

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6290209号
(P6290209)

(45) 発行日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日(2018.2.16)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 7

請求項の数 15 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-525848 (P2015-525848)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月5日(2013.8.5)
 (65) 公表番号 特表2015-525791 (P2015-525791A)
 (43) 公表日 平成27年9月7日(2015.9.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2013/066351
 (87) 國際公開番号 WO2014/023679
 (87) 國際公開日 平成26年2月13日(2014.2.13)
 審査請求日 平成28年8月4日(2016.8.4)
 (31) 優先権主張番号 12179473.9
 (32) 優先日 平成24年8月7日(2012.8.7)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁(EP)

(73) 特許権者 512036384
 ロシュ グリクアート アーゲー
 スイス国 ツェーハー-8952 シュリ
 ーレン, ヴァーギシュトラッセ 18
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ゲルデス, クリストゥイアン
 スイス国 ツェーハー-8703 エルレ
 ンバハ/チューリッヒ, ザントフェルゼ
 ンシュトラーセ 4
 (72) 発明者 クライン, クリストゥイアン
 スイス国 ツェーハー-8906 ボンシ
 ュッテン, クリュツアッハーヴェーク
 4 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低下した及び増加したエフェクター機能を有するように操作された2つの抗体を含む組成物。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする個体において疾患を治療するための医薬であって、(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質(FAP)に指向し、配列番号12の重鎖可変領域及び配列番号11の軽鎖可変領域、配列番号17の重鎖可変領域及び配列番号16の軽鎖可変領域、配列番号47の重鎖可変領域及び配列番号46の軽鎖可変領域、配列番号63の重鎖可変領域及び配列番号62の軽鎖可変領域、又は配列番号67の重鎖可変領域及び配列番号66の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原(CEA)に指向し、配列番号114の重鎖可変領域及び配列番号115の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長IgGクラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L234A、L235A、及びP329G(KabatのEU番号づけ)のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(ii) F42A、Y45A、及びL72Gのアミノ酸置換を含む変異ヒトIL-2分子、を含むイムノコンジュゲート、及び

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体(EGFR)に指向し、配列番号102の重鎖可変ドメイン及び配列番号103の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較してFc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgGクラス抗体、

(ii) HER3に指向し、配列番号142の重鎖可変ドメイン及び配列番号146

10

20

の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、及び
(i i i) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、を含み、(a) と (b) が組合せで投与される、医薬。

【請求項 2】

それを必要とする個体において疾患を治療するための医薬であって、
(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (FAP) に指向し、配列番号 12 の重鎖可変領域及び配列番号 11 の軽鎖可変領域、配列番号 17 の重鎖可変領域及び配列番号 16 の軽鎖可変領域、配列番号 47 の重鎖可変領域及び配列番号 46 の軽鎖可変領域、配列番号 63 の重鎖可変領域及び配列番号 62 の軽鎖可変領域、又は配列番号 67 の重鎖可変領域及び配列番号 66 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (CEA) に指向し、配列番号 114 の重鎖可変領域及び配列番号 115 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 IgG クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L234A、L235A、及び P329G (Kabat の EU 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(i i) F42A、Y45A、及び L72G のアミノ酸置換を含む変異ヒト IL-2 分子、を含むイムノコンジュゲートを含み、

ここで、

(i) 上皮増殖因子受容体 (EGFR) に指向し、配列番号 102 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 103 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、

(i i) HER3 に指向し、配列番号 142 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 146 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、及び

(i i i) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体との組合せで投与される、医薬。

【請求項 3】

変異ヒト IL-2 分子が配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 の医薬。

【請求項 4】

第一抗体が、IgG₁ サブクラス抗体である、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 5】

第一抗体がヒト IgGFc 領域を含む、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 6】

変異ヒト IL-2 分子が、アミノ又はカルボキシ末端のペプチド結合を第一抗体と共有する、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 7】

イムノコンジュゲートが、変異ヒト IL-2 分子及び第一抗体から本質的になり、

ここで、変異ヒト IL-2 分子が、そのアミノ末端アミノ酸で、第一抗体の重鎖の一方のカルボキシ末端に、任意選択的にペプチドリンクターを介して、融合される、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 8】

第二抗体が、完全長 IgG クラス抗体、特に IgG₁ サブクラス抗体である、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 9】

疾患が、エフェクター細胞機能を刺激することにより治療可能な疾患、特に癌である、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 10】

個体が、哺乳動物、特にヒトである、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

薬学的に許容可能な担体中に、

(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (FAP) に指向し、配列番号 12 の重鎖可変領域及び配列番号 11 の軽鎖可変領域、配列番号 17 の重鎖可変領域及び配列番号 16 の軽鎖可変領域、配列番号 47 の重鎖可変領域及び配列番号 46 の軽鎖可変領域、配列番号 63 の重鎖可変領域及び配列番号 62 の軽鎖可変領域、又は配列番号 67 の重鎖可変領域及び配列番号 66 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (CEA) に指向し、配列番号 114 の重鎖可変領域及び配列番号 115 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 IgG クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L234A、L235A、及び P329G (Kabat の EU 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(ii) F42A、Y45A、及び L72G のアミノ酸置換を含む変異ヒト IL-2 分子、を含むイムノコンジュゲート、及び

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体 (EGFR) に指向し、配列番号 102 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 103 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、

(ii) HER3 に指向し、配列番号 142 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 146 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、及び

(iii) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、
を含む薬学的組成物。

【請求項 12】

(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (FAP) に指向し、配列番号 12 の重鎖可変領域及び配列番号 11 の軽鎖可変領域、配列番号 17 の重鎖可変領域及び配列番号 16 の軽鎖可変領域、配列番号 47 の重鎖可変領域及び配列番号 46 の軽鎖可変領域、配列番号 63 の重鎖可変領域及び配列番号 62 の軽鎖可変領域、又は配列番号 67 の重鎖可変領域及び配列番号 66 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (CEA) に指向し、配列番号 114 の重鎖可変領域及び配列番号 115 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 IgG クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L234A、L235A、及び P329G (Kabat の EU 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(ii) F42A、Y45A、及び L72G のアミノ酸置換を含む変異ヒト IL-2 分子、を含むイムノコンジュゲート、及び

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体 (EGFR) に指向し、配列番号 102 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 103 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、

(ii) HER3 に指向し、配列番号 142 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 146 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、IgG クラス抗体、及び

(iii) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、
の個体における疾患の治療のための医薬の製造のための使用。

【請求項 13】

(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (FAP) に指向し、配列番号 12 の重鎖可変領域及び配列番号 11 の軽鎖可変領域、配列番号 17 の重鎖可変領域及び配列番号 16 の軽鎖可変領域、配列番号 47 の重鎖可変領域及び配列番号 46 の軽鎖可変領域、配列番号 63 の重鎖可変領域及び配列番号 62 の軽鎖可変領域、又は配列番号 67 の重鎖可変領域及び

10

20

30

40

50

配列番号 6 6 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (C E A) に指向し、配列番号 1 1 4 の重鎖可変領域及び配列番号 1 1 5 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 I g G クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、及び P 3 2 9 G (K a b a t の E U 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(i i) F 4 2 A 、 Y 4 5 A 、及び L 7 2 G のアミノ酸置換を含む変異ヒト I L - 2 分子、を含むイムノコンジュゲートの、個体における疾患の治療のための医薬の製造のための使用であって、

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体 (E G F R) に指向し、配列番号 1 0 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 0 3 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、

(i i) H E R 3 に指向し、配列番号 1 4 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 4 6 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、及び

(i i i) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、との組合せでの使用。

【請求項 1 4】

(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (F A P) に指向し、配列番号 1 2 の重鎖可変領域及び配列番号 1 1 の軽鎖可変領域、配列番号 1 7 の重鎖可変領域及び配列番号 1 6 の軽鎖可変領域、配列番号 4 7 の重鎖可変領域及び配列番号 4 6 の軽鎖可変領域、配列番号 6 3 の重鎖可変領域及び配列番号 6 2 の軽鎖可変領域、又は配列番号 6 7 の重鎖可変領域及び配列番号 6 6 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (C E A) に指向し、配列番号 1 1 4 の重鎖可変領域及び配列番号 1 1 5 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 I g G クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、及び P 3 2 9 G (K a b a t の E U 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(i i) F 4 2 A 、 Y 4 5 A 、及び L 7 2 G のアミノ酸置換を含む変異ヒト I L - 2 分子、を含むイムノコンジュゲートの、個体におけるエフェクター細胞機能を刺激するための医薬の製造のための使用であって、

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体 (E G F R) に指向し、配列番号 1 0 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 0 3 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、

(i i) H E R 3 に指向し、配列番号 1 4 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 4 6 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、及び

(i i i) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、との組合せでの使用。

【請求項 1 5】

疾患を治療するためのキットであって、

(a) イムノコンジュゲートであって、

(i) 線維芽細胞活性タンパク質 (F A P) に指向し、配列番号 1 2 の重鎖可変領域及び配列番号 1 1 の軽鎖可変領域、配列番号 1 7 の重鎖可変領域及び配列番号 1 6 の軽鎖可変領域、配列番号 4 7 の重鎖可変領域及び配列番号 4 6 の軽鎖可変領域、配列番号 6 3 の重鎖可変領域及び配列番号 6 2 の軽鎖可変領域、又は配列番号 6 7 の重鎖可変領域及び配列番号 6 6 の軽鎖可変領域を含む第一抗体、あるいはカルシノ胚性抗原 (C E A) に指向し、配列番号 1 1 4 の重鎖可変領域及び配列番号 1 1 5 の軽鎖可変領域を含む第一抗体であって、全長 I g G クラス抗体であり、イムノグロブリン重鎖において、L 2 3 4 A 、

10

20

30

40

50

L 2 3 5 A、及びP 3 2 9 G (K a b a t の E U 番号づけ) のアミノ酸置換を含む第一抗体、及び

(i i) F 4 2 A、Y 4 5 A、及びL 7 2 G のアミノ酸置換を含む変異ヒト I L - 2 分子、を含むイムノコンジュゲート、及び

(b) 第二抗体であって、

(i) 上皮増殖因子受容体 (E G F R) に指向し、配列番号 1 0 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 0 3 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、

(i i) H E R 3 に指向し、配列番号 1 4 2 の重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 4 6 の軽鎖可変ドメインを含み、非操作抗体と比較して F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された、I g G クラス抗体、及び

(i i i) セツキシマブ、から成る群から選択される第二抗体、及び

(c) 任意選択的に、疾患を治療するための方法として、併用治療の使用を指示する印刷された使用説明書を含むパッケージ挿入物、
を同じ又は別々の容器に含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般的に免疫療法に関連する。より具体的には、本発明は、免疫療法剤として組合せて使用するための抗原を標的とするイムノコンジュゲート及び F c 操作抗体に関する。更に、本発明は、前記イムノコンジュゲート及び抗体の組合せを含有する薬学的組成物と、疾患の治療において該組成物を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

個々の細胞又は特定の細胞型の選択的破壊は、様々な臨床設定において望ましい場合が多い。例えば、健常細胞及び組織を完全なまで損傷を受けない状態にしつつ、腫瘍細胞を特異的に破壊することは癌治療の主要な目標である。これを達成する魅力的な方法は、例えば、ナチュラルキラー (N K) 細胞又は細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) などの免疫エフェクター細胞に腫瘍細胞を攻撃させる、腫瘍に対する免疫応答を誘導することによる。エフェクター細胞は、免疫細胞の表面へのそれらの受容体の結合を介してシグナル伝達事象を誘発させる多くのサイトカイン類を含む様々な刺激により活性化されうる。例えば、とりわけ、細胞傷害性 T 細胞及び N K 細胞の増殖及び活性化を刺激するインターロイキン - 2 (I L - 2) は、転移性の腎細胞癌及び悪性メラノーマの治療用として承認されている。しかしながら、急速な血液クリアランス及び腫瘍特性の欠乏には、免疫応答を活性化させ、抗腫瘍効果を有するよう、腫瘍部位で高濃度のサイトカインを獲得するため、高用量のサイトカインを全身的に投与する必要がある。このように、サイトカインが全身的に高レベルであると、重度の毒性及び有害反応に至るおそれがあり、 I L - 2 についての場合もしかりである。従って、癌治療に使用するためには、腫瘍又は腫瘍微小環境に、特異的にサイトカインを送達させることが望まれる。これは、腫瘍抗原に特異的な抗体又は抗体断片等、標的部分にサイトカインをコンジュゲートさせることにより達成可能である。このようなイムノコンジュゲートのさらなる利点は、非コンジュゲートサイトカインと比較して、血清半減期が長いことである。免疫賦活性を最大にするそれらの能力は腫瘍部位で活性化され、低用量で全身性の副作用を最小に維持することは、サイトカインイムノコンジュゲートを最適な免疫療法剤にする。

【0 0 0 3】

エフェクター細胞を活性化させる他の方法は、免疫グロブリンの F c 部分又は F c 領域を含む組換え融合タンパク質による、それらの表面上の活性化 F c 受容体の関与を介している。その F c 領域により媒介されるいわゆる抗体のエフェクター機能は、抗体ベースの癌免疫療法における重要な作用機序である。抗体依存性細胞 - 媒介性細胞傷害、つまり抗体被覆標的細胞 (例えは腫瘍細胞) の N K 細胞による破壊は、細胞表面に結合した抗体が

10

20

30

40

50

NK細胞上のFc受容体と相互作用する場合に誘発される。NK細胞は、IgG₁又はIgG₃サブクラスの免疫グロブリンを認識するFcRIIIa(CD16a)を発現する。更に、エフェクター機能は、抗体依存性細胞媒介性食作用(ADCP)、及び補体依存性細胞傷害(CDCC)を含み、種々の免疫細胞型が、種々のタイプ及びサブタイプの免疫グロブリン重鎖定常ドメイン(例えば、それぞれIgA、IgD、IgE、IgG、又はIgMクラスの抗体に対応する、又はμ重鎖定常ドメイン)を認識する種々のFc受容体セットを有するため、抗体のクラス及びサブクラスによって変化する。
 抗体のエフェクター機能を増加させるための様々な方策が使用されている。例えば、Shie Idsら(J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001))は、Fc領域の298、333及び/又は334位のアミノ酸置換により、Fc IIIa受容体及びADCCへの、抗体の結合性が改善されることを示している。更に、Fc領域にアミノ酸修飾を有し、改善されたFc受容体結合性及びエフェクター機能を示す抗体変異体が、米国特許第6737056号、国際公開第2004/063351号、及び国際公開第2004/099249号に記載されている。また、受容体結合性及びエフェクター機能の増加は、抗体のグリコシル化を変えることにより、得ることができる。癌の免疫療法において最も一般に使用されているIgG1型の抗体は、Fc領域の各CH2ドメインにおいて、Asn297に保存されたN結合グリコシル化部位を有する。Asn297に結合した2つの複合二分岐オリゴ糖はCH2ドメインの間に埋在しており、ポリペプチド骨格と広大な接触部を形成し、それらの存在は、抗体が抗体依存性細胞-媒介性細胞障害性(ADCC)を含むエフェクター機能を媒介するのに必須である(Lifely et al., Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jeff eris et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997))。タンパク質工学研究では、Fc RはIgGのCH2ドメインの下側のヒンジ領域と相互作用することが示されている(Lund et al., J Immunol 157, 4963-69 (1996))。しかしながら、Fc R結合には、CH2領域にオリゴ糖の存在が必要であり(Lund et al., J Immunol 157, 4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech 15, 26-31 (1997))、オリゴ糖及びポリペプチドが双方とも相互作用部位に直接寄与するか、又はオリゴ糖が活性化CH2ポリペプチドの立体構造を維持するために必要であることが示唆される。よって、オリゴ糖構造の修飾は、IgG₁とFc Rとの相互作用の親和性を増加させるため、またIgG₁抗体のADCC活性を増加させるための手段として調べることができる。Umanaら(その内容の全体が出典明示によりここに援用されるNat Biotechnol 17, 176-180 (1999)及び米国特許第6602684号(国際公開第99/54342号))には、チャイニーズハムスター卵巣(CH0)細胞における、二分岐オリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(GnT II I)の過剰発現がその細胞において産生される抗体のインビトロADCC活性を有意に増加することが示されている。生産細胞株におけるGnT II Iの過剰発現は、一般的に非フコシル化型でハイブリッド型である二分岐型オリゴ糖に富んだ抗体をもたらす。GnT II Iに加えて、マンノシダーゼII(Man II)が産生細胞株で過剰発現している場合、複合型の二分岐、非フコシル化オリゴ糖に富む抗体が得られる(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006))。双方のタイプの抗体は、未修飾のグリカンを有する抗体と比較して、強く増加したADCCを示すが、N-グリカンの大部分が複合型のものである抗体のみが、有意な補体-依存性細胞傷害を誘導することができる(Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006))。ADCC活性を増加させるための重要な要因は、Fc R IIIaへのIgG Fcドメインの結合性を改善する、オリゴ糖コア部の最深部のN-アセチルグルコサミン残基からコースを除去することであると思われる(Shinkawa et al., J Biol Chem 278, 3466-3473 (2003))。フコシル化が低減した抗体を生成するためのさらなる方法は、例えば、(1,6)-フコシルトランスフェラーゼを欠く宿主細胞における発現を含む(Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng 87, 614-622 (2004); Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151-160 (2006))。

遊離のサイトカイン、イムノコンジュゲート、又は操作抗体の使用による抗癌免疫療法において達成された成功にもかかわらず、癌治療において新規の効果的で安全な治療選択肢が絶えず必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明者は、局所的な免疫細胞活性のためのこれら2つの方策の組み合せ、すなわち、サイトカインイムノコンジュゲートにより、及び増加したエフェクター機能を有するよう に操作された抗体により、エフェクター細胞の同時刺激が抗癌免疫療法の効能を大きく改善することを見出した。

【0006】

従って、本発明は、疾患の治療にそれを必要とする個体において使用される(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組み合せを提供する。一実施態様において、エフェクター部分はサイトカインである。一実施態様において、サイトカインは、IL-2、GM-CSF、IFN-、及びIL-12からなる群から選択される。特定の実施態様において、エフェクター部分はIL-2である。別の実施態様において、エフェクター部分はIL-12である。他の特定の実施態様において、IL-2エフェクター部分は、未変異IL-2エフェクター部分と比較すると、IL-2受容体のサブユニットに対する変異IL-2エフェクター部分の親和性を減少させ又は無効にするが、中程度の親和性のIL-2受容体に対する変異IL-2エフェクター部分の親和性を保存している少なくとも一つのアミノ酸変異、特にアミノ酸置換を含む変異IL-2エフェクター部分である。特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、ヒトIL-2(配列番号1)の残基42、45及び72に対応する位置から選択される1、2又は3の位置で、1、2又は3のアミノ酸置換を有する。更に特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、ヒトIL-2の残基42、45及び72に対応する位置で、3のアミノ酸置換を有する。また更に特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、アミノ酸置換F42A、Y45A及びL72Gを有するヒトIL-2である。所定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、IL-2のO-グリコシル化部位が除去された、ヒトIL-2の3位に対応する位置で、アミノ酸変異を付加的に含む。特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、配列番号2のアミノ酸配列を有する。一実施態様では、エフェクター部分は、単鎖エフェクター部分である。

【0007】

一実施態様において、第一抗体は、全長のIgGクラス抗体、特に完全長のIgG₁サブクラス抗体である。一実施態様において、エフェクター部分は、アミノ又はカルボキシ末端のペプチド結合を第一抗体と共有する。一実施態様において、エフェクター部分は、第一抗体とアミノ又末端のペプチド結合を共有する。一実施態様において、エフェクター部分はそのN末端で、第一抗体の重鎖の一方のC末端に融合している。特定の実施態様では、イムノコンジュゲートは、1個以下のエフェクター部分を含む。一実施態様において、イムノコンジュゲートは、一以上のペプチドリンカーで連結される、エフェクター部分と第一抗体から本質的になる。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートは、エフェクター部分、特に単鎖エフェクター部分と、第一抗体、特に完全長IgGクラス抗体を含み、ここで、エフェクター部分は、そのアミノ末端アミノ酸で、第一抗体の重鎖の一方のカルボキシ末端に、任意でペプチドリンカーを介して、融合される。所定の実施態様において、第一抗体は、そのFc領域に、2つの非同一免疫グロブリン重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾を含む。特定の実施態様において、前記修飾は、免疫グロブリン重鎖の一方にノブ修飾を、2つの免疫グロブリン重鎖の他の方にホール修飾を含む、ノブ・イントゥ・ホール(knob-into-hole)修飾である。一実施態様において、第一抗体は、CH3ドメインの2つの免疫グロブリン重鎖の間の界面に修飾を含み、ここで、i)一重鎖のCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基はより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置

10

20

30

40

50

換され、それによって、他の重鎖の C H 3 ドメイン内の界面の中のキャビティ（「ホール」）に配置可能である、一重鎖の C H 3 ドメイン内の界面の中に突起（「ノブ」）を生成し、及び、 i i) 他の重鎖の C H 3 ドメイン内で、アミノ酸残基はより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、その中に、第一の C H 3 ドメイン内の界面の中の突起（「ノブ」）を配置可能である、第二の C H 3 ドメイン内の界面の中にキャビティ（「ホール」）を生成する。一実施態様において、第一抗体は、免疫グロブリン重鎖の一方に、アミノ酸置換 T 3 6 6 W と、任意でアミノ酸置換 S 3 5 4 C を含み、かつ、免疫グロブリン重鎖の他方に、アミノ酸置換 T 3 6 6 S 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V と、任意でアミノ酸置換 Y 3 4 9 C を含む。特定の実施態様において、エフェクター部分は、ノブ修飾を含む免疫グロブリン重鎖のアミノ末端又はカルボキシ末端のアミノ酸に融合している。

【 0 0 0 8 】

一実施態様において、第一抗体の低下したエフェクター機能は、低下した活性化 F c 受容体への結合、低下した A D C C 、低下した A D C P 、低下した C D C 及び低下したサイトカイン分泌からなる群から選択される。一実施態様において、低下したエフェクター機能は、活性化 F c 受容体への結合の低下である。一実施態様において、活性化 F c 受容体はヒト F c 受容体である。一実施態様において、活性化 F c 受容体は F c R I I I a 、 F c R I 及び F c R I I I a の群から選択される。一実施態様において、活性化 F c 受容体は F c R I I I a 、特にヒト F c R I I I a である。一実施態様において、低下したエフェクター機能は低下した A D C C である。一実施態様において、低下したエフェクター機能は、活性化 F c 受容体への結合の低下と、低下した A D C C である。

【 0 0 0 9 】

一実施態様において、第一抗体は、その F c 領域において一以上のアミノ酸変異の導入によって操作される。特定の実施態様において、アミノ酸の変異とはアミノ酸置換である。特定の実施態様において、第一抗体、特にヒト完全長 I g G 1 サブクラス抗体は、免疫グロブリン重鎖の位置 P 3 2 9 でアミノ酸置換を含む（ K a b a t の E U 番号づけ）。より特異的な実施態様では、アミノ酸置換は、 P 3 2 9 A 又は P 3 2 9 G 、特に P 3 2 9 G である。一実施態様では、抗体は、免疫グロブリン重鎖の S 2 2 8 、 E 2 3 3 、 L 2 3 4 、 L 2 3 5 、 N 2 9 7 及び P 3 3 1 から選択される位置に更なるアミノ酸置換を含む。より特異的な実施態様では、更なるアミノ酸置換は、 S 2 2 8 P 、 E 2 3 3 P 、 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 L 2 3 5 E 、 N 2 9 7 A 、 N 2 9 7 D 又は P 3 3 1 S である。特定の実施態様において、抗体は、免疫グロブリン重鎖の位置 P 3 2 9 、 L 2 3 4 及び L 2 3 5 でアミノ酸置換を含む（ K a b a t の E U 番号づけ）。更に特定の実施態様では、抗体は、免疫グロブリン重鎖においてアミノ酸置換 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G (L A L A P 3 2 9 G) を含む。

【 0 0 1 0 】

ある実施態様において、第一抗体は、腫瘍細胞上又は腫瘍細胞環境内に存在する抗原に対するものである。特定の実施態様において、第一抗体は、線維芽細胞活性タンパク質（ F A P ）、テネイシン - C の A 1 ドメイン（ T N C A 1 ）、テネイシン - C の A 2 ドメイン（ T N C A 2 ）、フィブロネクチンのエクストラドメイン B (E D B) 、カルシノ胚性抗原（ C E A ）、及びメラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ M C S P ）からなる群から選択される抗原に対するものである。特定の実施態様において、第一抗体は C E A に対するものである。別の実施態様において、第一抗体は F A P に対するものである。

【 0 0 1 1 】

一実施態様において、第二抗体の増加したエフェクター機能は、増加した活性化 F c 受容体への結合、増加した A D C C 、増加した A D C P 、増加した C D C 、増加したサイトカイン分泌からなる群から選択される。一実施態様において、増加したエフェクター機能は、増加した活性化 F c 受容体への結合である。特定の実施態様において、活性化 F c 受

10

20

30

40

50

容体は、F c R I I I a、F c R I 及び F c R I I a の群から選択される。一実施態様において、活性化 F c 受容体は F c R I I I a である。一実施態様において、増加したエフェクター機能は、増加した ADC C である。一実施態様において、増加したエフェクター機能は、活性化 F c 受容体への結合の増加と、増加した ADC C である。

一実施態様において、第二抗体は、その F c 領域において一以上のアミノ酸変異の導入によって操作される。特定の実施態様において、アミノ酸の変異とはアミノ酸置換である。一実施態様において、第二抗体は、F c 領域におけるグリコシル化の修飾により操作される。特定の実施態様において、F c 領域におけるグリコシル化の修飾により、非操作抗体と比較して、F c 領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。さらなる特定の実施態様において、F c 領域において増加した割合の非フコシル化オリゴ糖は、F c 領域の少なくとも 20%、好ましくは少なくとも 50%、最も好ましくは少なくとも 70% の非フコシル化オリゴ糖である。別の特定の実施態様において、F c 領域におけるグリコシル化の修飾により、非操作抗体と比較して、F c 領域における二分岐オリゴ糖の割合が増加している。さらなる特定の実施態様において、F c 領域において増加した割合の二分岐オリゴ糖は、F c 領域の少なくとも約 20%、好ましくは少なくとも 50%、最も好ましくは少なくとも 70% の二分岐オリゴ糖である。さらなる他の特定の実施態様において、F c 領域におけるグリコシル化の修飾により、非操作抗体と比較して、F c 領域における二分岐の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。10

【0012】

好ましくは第二抗体は、F c 領域に、少なくとも約 25%、少なくとも約 35%、又は少なくとも約 50% の二分岐の非フコシル化オリゴ糖を有する。特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。抗体の F c 領域において非フコシル化オリゴ糖の割合が増加することで、抗体のエフェクター機能、特に ADC C が増加する。特定の実施態様において、非フコシル化オリゴ糖は二分岐の非フコシル化オリゴ糖である。20

【0013】

一実施態様において、第二抗体は、完全長の Ig G クラス抗体、特に完全長の Ig G₁ サブクラス抗体である。ある実施態様において、第二抗体は、腫瘍細胞に存在する抗原に対するものである。特定の実施態様において、第二抗体は、CD20、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、HER2、HER3、インスリン様成長因子受容体 (IGF-1R)、c-Met、CUB ドメイン含有タンパク質 - 1 (CDCP1)、癌胎児抗原 (CEA) 及びメラノーマ関連コンドロイチン硫酸ファートプロテオグリカン (M CSP) の群から選択される抗原に対するものである。30

特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗 CD20 抗体である。適切な抗 CD20 抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される国際公開第 2005/044859 号に記載されている。他の特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗 EGFR 抗体である。適切な抗 EGFR 抗体は、それぞれその全体が出典明示によりここに援用される、国際公開第 2006/082515 号及び国際公開第 2008/017963 号に記載されている。更に特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗 IGF-1R 抗体である。適切な抗 IGF-1R 抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される、国際公開第 2008/077546 号に記載されている。さらなる他の特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗 CEA 抗体である。適切な抗 CEA 抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される PCT 公開番号 WO 2011/023787 に記載されている。さらなる他の特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、F c 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗 HER3 抗体である。適切な抗 HER3 抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される4050

PCT公開番号WO2011/076683に記載されている。さらなる他の特定の実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、Fc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作された抗CDCP1抗体である。適切な抗CDCP1抗体は、その全体が出典明示によりここに援用されるPCT公開番号WO2011/023389に記載されている。一実施態様において、第二抗体は、非操作抗体と比較して、Fc領域にてグリコシル化が修飾され、一又は複数のグリコシルトランスフェラーゼの活性が変化した宿主細胞で抗体が生成されるように操作されている。

【0014】

一実施態様において、第二抗体は、増加した(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)活性を有する宿主細胞に抗体を生成させることにより、非操作抗体と比較して、Fc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。特定の実施態様において、宿主細胞は、付加的に、増加した-MannosidaseII(ManII)活性を有する。別の実施態様において、第二抗体は、低減した(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する宿主細胞に抗体を生成させることにより、非操作抗体と比較して、Fc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。

10

【0015】

一実施態様において、疾患はエフェクター細胞の機能を刺激することにより治療可能な疾患である。一実施態様において、疾患は細胞増殖性疾患である。特定の実施態様において、疾患は癌である。特定の実施態様において、癌は、肺癌、結腸直腸癌、腎癌、前立腺癌、乳癌、頭部及び頸部の癌、卵巣癌、脳癌、リンパ腫、白血病、及び皮膚癌の群から選択される。一実施態様において、個体は動物である。特定の実施態様において、個体はヒトである。

20

【0016】

特定の実施態様において、本発明は、

(a) Fc領域に一以上のアミノ酸変異の導入により低下したエフェクター機能を有するように操作された、第一の完全長IgGクラス抗体と、サイトカインを含むイムノコンジュゲートであって、エフェクター部分が、そのアミノ末端アミノ酸で、第一抗体の重鎖の一方のカルボキシ末端に、任意でペプチドリンカーを介して、融合されるイムノコンジュゲート、及び

30

(b) 疾患の治療においてそれを必要とする個体における使用のために、Fc領域におけるグリコシル化の修飾により増加したエフェクター機能を有するように操作された、第二の完全長IgGクラス抗体

の組合せを提供する。別の態様において、本発明は、薬学的に許容可能な担体中に、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体を含む薬学的組成物を提供する。

本発明はまた、個体における疾患の治療のための医薬の製造のために、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の使用を網羅する。

40

【0017】

本発明は、更に、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを、治療的有効量、個体に投与することを含む、個体の疾患を治療する方法を提供する。

【0018】

また本発明により提供されるのは、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを、エフェクター細胞機

50

能を刺激するのに有効な量、個体に投与することを含む、個体のエフェクター細胞機能を刺激する方法である。

【0019】

更なる態様において、本発明は、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体、及び(c)任意で、疾患を治療するための方法として、併用治療の使用を指示する印刷された使用説明書を含むパッケージ挿入物を、同じ又は別々の容器に収容してなる、疾患を治療することを意図したキットを提供する。

【0020】

本発明の薬学的組成物、使用、方法及びキットに使用されるイムノコンジュゲート及び第二抗体は、本発明に有用な第二抗体及びイムノコンジュゲートに関連した上述の段落に記載された特徴の任意のものを、単独で又は組み合せて含みうることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】CD25への結合を欠いているIL-2四重変異体(qm)、及び抗EGFR GlycoMabを含む、FAP-標的28H1 IgG-IL-2イムノコンジュゲート(A)又は非標的DP47GS IgG-IL-2イムノコンジュゲート(B)が、SCIDマウスへ舌の内部に注射されたヒトの頭頸部癌細胞株FaDuで試験された。データは、DP47GS IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートではなく、28H1 IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートと、抗EGFR GlycoMabの組合せが、それぞれのイムノコンジュゲート又は抗EGFR GlycoMab単独に比べて、高められた生存期間の中央値の観点から優れた効果を媒介することを示している(実施例1を参照)。

【図2】種々の濃度の抗EGFR GlycoMabの存在下における、0.57nMの(A)又は5.7nMの(B)Fap-標的28H1 IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート又はIL-2(プロロイキン(Proleukin))を用いて、前処理した又はしていない、PBMC(E:T=10:1、4時間)による、全体的なA549腫瘍細胞の死滅(実施例2を参照)。

【図3】CD25への結合を欠いているIL-2四重変異体(qm)を含むCEA標的CH1A1A IgG-IL-2イムノコンジュゲートと、抗EGFR GlycoMab(A)又はセツキシマブ(B)が、SCID Fc RIIIトランスジェニックマウスへ脾臓内に注射されたヒト結腸直腸癌細胞株LS174Tで試験された。データはCH1A1A IgG-IL2 qmのQMのイムノコンジュゲートと抗EGFR GlycoMabの組合せが、それぞれのイムノコンジュゲート、抗EGFR GlycoMab又はセツキシマブ単独、並びにCH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せに比べて、高められた生存期間の中央値の観点から優れた効果を媒介することを示している(実施例3参照)。

【図4】CD25への結合を欠いているIL-2四重変異体(qm)を含むCEA標的CH1A1A IgG-IL-2イムノコンジュゲートと、抗EGFR GlycoMab(A)又はセツキシマブ(B)が、SCID Fc RIIIトランスジェニックマウスへ静脈内注射されたヒト肺癌細胞株A549で試験された。データはCH1A1A IgG-IL2 q mのQMのイムノコンジュゲートと抗EGFR GlycoMabの組合せが、それぞれのイムノコンジュゲート又は抗EGFR GlycoMab単独、並びにCH1A1A IgG-IL2 q mイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せに比べて、高められた生存期間の中央値の観点から優れた効果を媒介することを示している(実施例4参照)。

【図5】CD25への結合を欠いているIL-2四重変異体(qm)を含むCEA標的CH1A1A IgG-IL-2イムノコンジュゲートと、抗HER3 GlycoMabが、SCID Fc RIIIトランスジェニックマウスへ脾臓内に注射されたヒト結腸直

10

20

30

40

50

腸癌細胞株 L S 1 7 4 T で試験された。データは、C H 1 A 1 A I g G - I L 2 q m イムノコンジュゲートと、抗H E R 3 G l y c o M a b の組合せが、それぞれのイムノコンジュゲート又は抗H E R 3 G l y c o M a b 単独に比べて、高められた生存期間の中中央値の観点から優れた効果を媒介することを示している（実施例 5 を参照）。

【図 6】C D 2 5 への結合を欠いているI L - 2 四重変異体（q m）を含むF A P 標的2 8 H 1 I g G - I L - 2 イムノコンジュゲートと、抗E G F R G l y c o M a b が、S C I D F c R I I I トランスジェニックマウスへ腎臓内に注射されたヒト腎臓癌細胞株 A C H N で試験された。データは、C H 1 A 1 A I g G - I L 2 q m イムノコンジュゲートと、抗E G F R G l y c o M a b の組合せが、抗E G F R G l y c o M a b 単独、又はプロロイキン（登録商標）と組合せた抗E G F R G l y c o M a b と比べて、高められた生存期間の中中央値の観点から優れた効果を媒介することを示している（実施例 6 を参照）。

【図 7】抗H E R 3 G l y c o M a b 単独（左パネル）、C H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q m イムノコンジュゲート単独（右パネル）又はC H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q m イムノコンジュゲートの抗H e r 3 G l y c o M a b との組合せ（右パネル）による処置による、全体的なL S 1 7 4 T 細胞の死滅。

【図 8】抗H E R 3 G l y c o M a b 単独（左パネル）、C H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q m イムノコンジュゲート単独（右パネル）又はC H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q m イムノコンジュゲートの抗H e r 3 G l y c o M a b との組合せ（右パネル）による処置による、N K 細胞上でのC D 2 5 (A) 又はC D 6 9 (B) の発現。

【0 0 2 2】

発明の詳細な説明

第一の態様において、本発明は、疾患の治療にそれを必要とする個体において使用される（a）低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び（b）増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組み合せを提供する。

【0 0 2 3】

本発明は、更に、（a）低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び（b）増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを、治療的有効量、個体に投与することを含む、個体の疾患を治療する方法を提供する。

【0 0 2 4】

また本発明により提供されるのは、（a）低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び（b）増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを、エフェクター細胞機能を刺激するのに有効な量、個体に投与することを含む、個体のエフェクター細胞機能を刺激する方法である。

【0 0 2 5】

定義

本明細書において、用語は、以下に定義されていない限り、当技術分野で一般的に使用されるように使用される。

【0 0 2 6】

本明細書で使用される場合、用語「イムノコンジュゲート」は、少なくとも一のエフェクター部分とを含む、ポリペプチド分子を意味する。所定の実施態様では、イムノコンジュゲートは、1 個以下のエフェクター部分を含む。本発明による特定のイムノコンジュゲートは、一以上のペプチドリソルバーにより連結される、1 個のエフェクター部分と抗体から本質的になる。本発明による特定のイムノコンジュゲートは、融合タンパク質であり、すなわち、イムノコンジュゲートの構成成分がペプチド結合により連結される。

【0 0 2 7】

本明細書で使用される場合、用語「コントロール抗体」は、エフェクター部分を含まない

10

20

30

40

50

いで存在するであろう抗体を意味する。例えば、本明細書に記載される IgG - IL2イムノコンジュゲートをコントロール抗体と比較する場合、コントロール抗体は遊離の IgG であり、ここで IgG - IL2イムノコンジュゲートと遊離の IgG 分子は共に同一抗原決定基に特異的に結合することができる。

【0028】

本明細書で使用されるように、用語「抗原決定基」は「抗原」及び「エピトープ」と同義語であり、抗体が結合し、抗体 - 抗原複合体を形成する、ポリペプチド高分子の部位（例えば、非隣接アミノ酸の種々の領域を形成する、アミノ酸又は立体構造的配置の隣接伸長）を意味する。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面上で、ウイルス感染細胞の表面上で、他の疾患細胞の表面上で、血清中に遊離して、及び / 又は細胞外マトリックス（ECM）中に見つけることができる。10

【0029】

「特異的に結合する」とは、結合が抗原について選択的であり、不必要な又は非特異的相互作用と区別されうることを意味する。特定の抗原決定基に結合する抗体の能力は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）又は当業者によく知られている他の技術、例えば表面プラズモン共鳴技術（BIAcore 機器で解析される）（Liljeblad, et al., Glyco.J. 17:323-329(2000)）及び伝統的な結合アッセイ（Heeley, R.P., Endocr.Res. 28:217-229(2002)）のいずれかによって測定することができる。

【0030】

用語「抗 [抗原] 抗体」及び [抗原] に結合する抗体」は、抗体が、抗原を標的とし、診断薬剤及び / 又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でそれぞれの抗原に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗 [抗原] 抗体の、無関係なタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される場合、抗体の抗原への結合の約 10 % 未満である。ある実施態様において、[抗原] へ結合する抗体は、解離定数 (K_D) $1 \mu M$ 、 $100 nM$ 、 $10 nM$ 、 $1 nM$ 、 $0.1 nM$ 、 $0.01 nM$ 、又は $0.001 nM$ （例えば、 $10^{-8} M$ 未満、例えば、 $10^{-8} M$ から $10^{-13} M$ 、例えば、 $10^{-9} M$ から $10^{-13} M$ ）を有する。20

【0031】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の 1 : 1 の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般的に、解離の比率である解離定数 (K_D) 及び会合速度定数（それぞれ k_{off} と k_{on} ）で表すことができる。従って、同等の親和性は、速度定数の比が同じままである限り、別の速度定数を含み得る。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で良く確立される方法によって測定することができる。親和性を測定するための特別な方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。30

【0032】

一実施態様によると、 K_D は、CM5 チップ上に固定されたリガンド（例えば、エフェクター部分受容体、Fc 受容体又は標的抗原）を用いて、25 で、BIA CORE（登録商標）T100 機器（GE Healthcare）を使用して表面プラズモン共鳴によって測定される。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5, GE Healthcare）を、提供者の指示書に従って N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N - ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化する。組換えリガンドを 10 mM の酢酸ナトリウム、pH 5.5 で 0.5 - 30 μg / ml に希釈し、結合したタンパク質の応答単位 (RU) がおよそ 100 - 5000 になるように 10 μl / 分の流速で注入する。リガンドの注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入する。動力学測定のために、イムノコンジュゲートの 3 から 5 倍の段階希釈 (~0.01 nM から 300 nM の間の範囲) が、HBS - EP+ (GE Healthcare, 10 mM の HEPES, 150 mM の NaCl, 3 mM の EDTA) で希釈され、これを 10 μl / 分の流速で注入する。40

A、0.05%界面活性剤P20、25、pH7.4)中で約30~50μl/分の流量で注入される。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIA CORE(登録商標)T100 Evaluationソフトウェアバージョン1.1.1)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(K_D)は k_{off}/k_{on} 比として算出される。例えば、Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999)を参照。

【0033】

「低下した結合」とは、例えばFc受容体又はCD25に対する結合の低下であり、例えばSPRにより測定される場合、それぞれの相互作用の親和性の低下を指す。明確にするために、この用語はまた、親和性がゼロへの低下(又は分析法の検出限界以下)、即ち、相互作用の完全な消滅をも含む。逆に、「結合の増加」は、それぞれの相互作用に対する結合親和性の増加を指す。

【0034】

本明細書で使用される場合、抗体に関して「第1」及び「第2」なる用語は、1以上の各タイプの部分が存在する場合に、簡便に区別するために使用される。これらの用語の使用は、明確に述べられていないならば、イムノコンジュゲートの特定の順番又は方向を付与することを意図したものではない。

【0035】

本明細書で使用しているように、用語「エフェクター部分」なる用語は、例えば、シグナル伝達又は他の細胞経路を介して、細胞活性に影響を与えるポリペプチド、例えばタンパク質又は糖タンパク質を意味する。従って、本発明のエフェクター部分は、エフェクター部分に対する一又は複数の受容体を担持する細胞にて、反応を調節するため、細胞膜の外側からシグナルを伝達する、受容体媒介性シグナル伝達に関連している。一実施態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する一又は複数の受容体を担持する細胞に、細胞傷害性反応を引き起こすことができる。他の実施態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する一又は複数の受容体を担持する細胞に、増殖反応を引き起こすことができる。他の実施態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する受容体を担持する細胞に、分化を引き起こすことができる。他の実施態様において、エフェクター部分は、エフェクター部分に対する受容体を担持する細胞において、内在性細胞タンパク質の発現を変更する(例えば、アップレギュレート又はダウンレギュレート)ことができる。非限定的エフェクター部分には、サイトカイン類、成長因子、ホルモン、酵素、基質、及び補助因子が含まれる。エフェクター部分は種々の立体配置で抗体と結合し、イムノコンジュゲートを形成する。

【0036】

本明細書で使用しているように、用語「サイトカイン」は、生物学的又は細胞性機能又はプロセス(例えば免疫、炎症及び造血)を媒介及び/又は制御する分子を指す。本願明細書において使用する用語「サイトカイン」には、「リンホカイン」、「ケモカイン」、「モノカイン」及び「インターロイキン」が含まれる。有用なサイトカインの例には、GM-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IFN-、IFN-、IFN-、MIP-1、MIP-1、TGF-、TNF-及びTNF-が含まれるが、これに限定されるものではない。特定のサイトカインはIL-2及びIL-12である。本明細書で使用される場合、「サイトカイン」なる用語は、対応する野生型サイトカインのアミノ酸配列に、一又は複数のアミノ酸変異を含むサイトカイン変異体であって、例えばSauve et al., Proc Natl Acad Sci USA 88, 4636-40 (1991); Hu et al., Blood 101, 4853-4861 (2003)及び米国特許第2003/0124678号; Shanafelt et al., Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000); Heaton et al., Cancer Res 53, 2597-602 (1993)及び米国特許第5229109号; 米国特許第2007/0036752号; 国際公開第2008/0034473号; 国際公開第2009/061853号; 又は上述及

10

20

30

40

50

び以下に記載するものを含むことを意味する。

【0037】

本明細書で使用される場合、「単鎖」なる用語は、ペプチド結合により直線的に結合したアミノ酸モノマーを含有する分子を意味する。一実施態様において、エフェクター分子は単鎖エフェクター部分である。単鎖エフェクター部分の非限定的な例には、サイトカイン、増殖因子、ホルモン類、酵素、基質、補助因子が含まれる。エフェクター部分がサイトカインであり、対象とするサイトカインが天然で多量体として通常見いだされるときには、多量体のサイトカインの各サブユニットはエフェクター部分の単鎖によって逐次にコードされる。従って、有用な単鎖エフェクター部分の非限定的な例には、GM-CSF、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IFN-₁、IFN-₂、IFN-₃、MIP-1、MIP-1、TGF-₁、TNF-₁及びTNF-₂が含まれる。
10

【0038】

本明細書で使用しているように、用語「コントロールエフェクター部分」は、コンジュゲートしていないエフェクター部分を指す。例えば、本明細書に記載されるIL-2イムノコンジュゲートをコントロールエフェクター部分と比較した場合、コントロールエフェクター部分はフリーな、コンジュゲートしていないIL-2である。同様に、例えば、IL-12イムノコンジュゲートをコントロールエフェクター部分と比較した場合、コントロールエフェクター部分はフリーな、コンジュゲートしていないIL-12（例えば、p40及びp35サブユニットがジスルフィド結合（一又は複数）だけを共有するヘテロ二量体タンパク質として存在する）である。
20

【0039】

本明細書で使用しているように、用語「エフェクター部分受容体」は、エフェクター部分に特異的に結合が可能なポリペプチド分子を指す。例えば、IL-2がエフェクター部分であるとき、IL-2分子（例えばIL-2を含むイムノコンジュゲート）と結合するエフェクター部分受容体はIL-2受容体である。同様に、例えば、IL-12がイムノコンジュゲートのエフェクター部分であるとき、エフェクター部分受容体はIL-12受容体である。エフェクター部分が特異的に複数の受容体と結合するとき、エフェクター部分と特異的に結合するすべての受容体はそのエフェクター部分のための「エフェクター部分受容体」である。
30

【0040】

用語「抗体」は最も広義の意味で使用され、種々の抗体構造を含み、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及びそれらが所望の抗原-結合活性を示し、免疫グロブリンのFc領域又はFc領域に等価な領域を含む限り、それらの抗体断片を含む。

【0041】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」なる用語は、本明細書では交換可能に使用され、天然の免疫グロブリン構造に実質的に類似した構造を有する抗体を意味する。

【0042】

用語「免疫グロブリン」は、天然に存在する抗体の構造を有するタンパク質を指す。例えば、IgGクラスの免疫グロブリンは、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、続いて重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）がある。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、続いて軽鎖定常領域とも呼ばれる定常軽鎖（CL）ドメインがある。免疫グロブリンの重鎖は、（IgA）、（IgD）、（IgE）、（IgG）又はμ（IgM）と呼ばれる5つのタイプの1つに割り当てることができ、そのうち幾つかは更に₁（IgG₁）、₂（IgG₂）
40
50

)、 IgG_3 (IgG_3)、 IgG_4 (IgG_4)、 IgA_1 (IgA_1) 及び IgA_2 (IgA_2) などのサブタイプに分割され得る。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()とラムダ()と呼ばれる、2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。免疫グロブリンは、免疫グロブリンヒンジ領域を介して連結された2つの Fab 分子及び Fc 領域から本質的になる。

【0043】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を意味する。抗体断片の例には、限定されるものではないが、 Fv 、 Fab 、 Fab' 、 $Fab'-SH$ 、 $F(ab')_2$ 、ダイアボディ、線形抗体、单鎖抗体分子(例えば、 $scFv$)、单ドメイン抗体、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。所定の抗体断片の総説については、Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)を参照。 $scFv$ 断片の総説については、例えば、Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113巻, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), 頁269-315 (1994)を参照；また、国際公開第93/16185号；及び米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させた Fab 及び $F(ab')_2$ 断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。ダイアボディは2価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号；国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)；及び Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。单ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。ある実施態様において、单ドメイン抗体は、ヒト单ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516号B1を参照)。抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体のタンパク質分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による生産を含む。

【0044】

「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全体に相補的であり、特異的に結合する領域を含む抗体の一部を指す。抗原結合ドメインは、例えば、一以上の抗体可変ドメイン(抗体可変領域とも呼ばれる)により与えられる。特に、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域(VL)と抗体重鎖可変領域(VH)を含む。

【0045】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」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。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ VH 及び VL)は、一般に類似した構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つの高頻度可変領域(HVR)を含む。例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 91頁 (2007)を参照。单 VH 又は VL ドメインは、抗原-結合特異性を付与するのに十分であり得る。

【0046】

本明細書で使用される用語「高頻度可変領域」又は「HVR」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループ(「高頻度可変ループ」)を形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、天然の四鎖抗体は6つのHVRを含む；つまり、 VH に3つ($H1$ 、 $H2$ 、 $H3$)、 VL に3つ($L1$ 、 $L2$ 、 $L3$)である。 HVR は、一般に高頻度可変ループ及び/又は相補性決定領域(CDR)からのアミノ酸残基を有し、後者は、抗原認識に関与し、及び/又は最も高い配列可変性をしている。 VH のCDR1を除き、CDRは、一般に高頻度可変ループからのアミノ酸残基を有する。高頻度可変領域(HVR)は「相補性決定領域」(CDR)とも称され、これらの用語は、抗原結合領域を形成する可変領域の一部に関連して、交換可能に使用される。この特

10

20

30

40

50

定の領域は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) 及び Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987) により記載され、定義には、互いに比較した場合に、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体又はその変異体の CDR を意味するいずれかの定義の適用は、本明細書において定義され、使用される場合の用語の範囲内にあることを意図している。上記の引用文献の各々によって定義されるように、CDR を包含する適切なアミノ酸残基が、比較として以下の表 1 に記載されている。特定の CDR を含む正確な残基番号は、CDR の配列及び大きさに応じて変わるであろう。当業者であれば、抗体の可変領域アミノ酸配列を付与する特定の CDR を含む残基を、常套的に決定できる。

10

【0047】

表1. CDRの定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

20

¹表1の全てのCDR定義の番号付けは、Kabatら（以下を参照）によって記載の番号付け規則に従う。

²表1に使用されるように小文字の「b」を含む「AbM」はオックスフォード分子の「AbM」抗体モデリングソフトウェアによって定義されるCDRを指す。

【0048】

Kabat らはまた、任意の抗体に適用可能である可変領域配列の番号付けシステムを定義した。当業者は、配列それ自体を超えた任意の実験データに頼ることなく、任意の可変領域配列に対してこの Kabat の番号付けシステムを一義的に割り当てることができる。本明細書で用いる場合、「Kabat 番号付け」とは、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) で明記されている番号付けシステムを指す。特記されない限り、抗体可変領域内の特定のアミノ酸残基の位置の番号付けへの参照は、Kabat 番号付けシステムに従う。

30

【0049】

配列表のポリペプチド配列（即ち、配列番号 3、4、5、6、7、8、9 など）は Kabat の番号付けシステムに従って番号付けされてはいない。しかし、Kabat の番号付けを配列表の配列の番号に変換することは当業者の通常の技術の範囲内である。

【0050】

40

「フレームワーク」又は「FR」は、高頻度可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を意味する。可変ドメインの FR は、一般に 4 の FR ドメイン：FR1、FR2、FR3 及び FR4 からなる。従って、HVR と FR 配列は、一般に VH（又は VL）：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4 の配列のようになるであろう。

【0051】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体には、5 つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、及び IgM が存在し、これらのいくつかはサブクラス（アイソタイプ）、例えば IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及び IgA₂ に更に分割することができる。異なるクラスの免

50

免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ 、 、 、 及び μ と称される。

用語「Fcドメイン」又は「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、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。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。IgG重鎖のFc領域の境界は、若干異なる場合があるものの、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、Cys226から又はPro230から重鎖のカルボキシル末端へ伸展するように定義されている。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。10

【0052】

「免疫グロブリンのFc領域に等価な領域」は、免疫グロブリンのFc領域の自然に生じた対立遺伝子変異体、並びに、エフェクター機能(例えば、抗体依存性細胞-媒介性細胞障害性)を媒介する免疫グロブリンの能力を実質的に低下させることのない、置換、付加又は欠失を生じる変更を有する変異体を含むことを意図している。例えば、一又は複数のアミノ酸が、実質的に生物学的機能を失うことなく、免疫グロブリンのFc領域のN末端又はC末端から欠失する可能性がある。このような変異体は、活性における影響が最小になるように、当該技術で公知の一般的規則に従い、選択することができる(例えばBowie et al., Science 247, 1306-10 (1990))を参照)。20

【0053】

「ヘテロ二量体化促進修飾」は、ホモ二量体を形成する同一なポリペプチドとのポリペプチドの会合を低減するか防止する、ペプチド骨格の操作又はポリペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖の翻訳後修飾である。ヘテロ二量体化促進修飾は、本明細書で使用される場合、二量体を形成することが所望される2つのポリペプチドの各々になされる別々の修飾を特に含み、その修飾は2つのポリペプチドの会合を促進するために互いに相補的である。例えば、ヘテロ二量体化促進修飾は、その会合をそれぞれ立体的又は静電気的に好ましくするために、二量体を形成することが所望されるポリペプチドの一方又は双方の構造又は電荷を改変しうる。ヘテロ二量体化は、重鎖の各々に融合された更なるイムノコンジュゲート要素(例えば、エフェクター部分)が同じではない、2つの免疫グロブリン重鎖などの、2つの非同一ポリペプチド間で生じる。本発明のイムノコンジュゲートにおいて、ヘテロ二量体化促進修飾は、重鎖においてであり、具体的には免疫グロブリン分子のFc領域においてである。幾つかの実施態様では、ヘテロ二量体化促進修飾は、アミノ酸変異、特にアミノ酸置換を含む。特定の実施態様では、ヘテロ二量体化促進修飾は、2つの免疫グロブリン重鎖の各々において、別々のアミノ酸変異、特にアミノ酸置換を含む。30

【0054】

抗体に関して使用される場合、「エフェクター機能」なる用語は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を意味する。抗体エフェクター機能の例には：C1q結合性及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、抗体-依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原の取込、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)のダウンレギュレーション、及びB細胞活性化が含まれる。40

【0055】

本明細書で使用される場合、「エフェクター細胞」なる用語は、エフェクター部分の受容体、例えばサイトカイン受容体、及び/又はそれらがエフェクター部分に結合するのを介してそれらの表面上にあるFc受容体、例えばサイトカイン、及び/又は腫瘍細胞等、標的細胞の破壊に寄与する抗体のFc領域を示す、リンパ球の集団を意味する。エフェクター細胞は、例えば細胞傷害又は食作用効果を媒介可能である。エフェクター細胞は、限定されるものではないが、エフェクターT細胞、例えばCD8+細胞傷害T細胞、CD450

+ヘルパーT細胞、T細胞、NK細胞、リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞、及びマクロファージ/単球が含まれる。それらの受容体発現パターンに依存して、種々のサブセットのエフェクター細胞、すなわち(a)Fc受容体ではなく、特定のエフェクター部分に対する受容体を発現し、本発明の抗体ではない、イムノコンジュゲートにより刺激される細胞(例えば、IL-2受容体を発現するT細胞);(b)特定のエフェクター部分に対する受容体ではない、Fc受容体を発現し、本発明のイムノコンジュゲートではない抗体により刺激される細胞;及び(c)Fc受容体と特定のエフェクター部分に対する受容体の双方を発現し、抗体と本発明のイムノコンジュゲートにより同時に刺激される細胞(例えば、Fc IIII受容体及びIL-2受容体を発現するNK細胞)が存在する。

10

【0056】

本明細書で使用される場合、「操作、操作された、操作する」といった用語は、自然に生じた又は組換えポリペプチド又はその断片の、ペプチド骨格の任意のマニピュレーション又は翻訳後修飾を含むと考えられる。操作には、アミノ酸配列の、グリコシル化ペターンの、又は個々のアミノ酸の側鎖基のアミノ酸配列の修飾、並びにこれらのアプローチの組み合せが含まれる。特に、接頭語「グリコ-」を有する「操作する」、並びに「グリコシル化操作」なる用語には、細胞で発現する糖タンパク質のグリコシル化の改変を達成するための、オリゴ糖合成経路の遺伝的マニピュレーションを含む細胞のグリコシル化の仕組みの代謝的操作が含まれる。更にグリコシル化操作には、グリコシル化における変異及び細胞環境の影響が含まれる。一実施態様において、グリコシル化操作は、グリコシルトランスフェラーゼ活性における変更である。特定の実施態様において、操作により、グルコサミニルトランスフェラーゼ活性及び/又はフコシルトランスフェラーゼ活性の変更に至る。グリコシル化操作は、「GnTII活性が増加した宿主細胞」(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)活性を有する一又は複数のポリペプチドを、増加したレベルで発現するようにマニピュレートされている宿主細胞)、「ManII活性が増加した宿主細胞」(例えば、-マンノシダーゼII(ManII)活性を有する一又は複数のポリペプチドを、増加したレベルで発現するようにマニピュレートされている宿主細胞)、又は「(1,6)フコシルトランスフェラーゼ活性が低減した宿主細胞」(例えば、(1,6)フコシルトランスフェラーゼを、低減したレベルで発現するようにマニピュレートされている宿主細胞)を得るために使用することができる。

20

【0057】

「アミノ酸変異」なる用語は、本明細書で使用される場合、アミノ酸置換、欠失、挿入、及び修飾を包含することを意味する。置換、欠失、挿入及び修飾の任意の組み合せにより、最終的なコンストラクトに達することができ、但し、最終コンストラクトは、所望の特徴、例えばFc受容体への結合性の低下を有する。アミノ酸配列の欠失及び挿入には、アミノ-及び/又はカルボキシ末端の欠失及びアミノ酸の挿入が含まれる。特定のアミノ酸変異はアミノ酸置換である。例えば、Fc領域の結合特性を変更する目的のために、非保存的アミノ酸置換、即ち一のアミノ酸を、異なる構造的及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸と置換することが特に所望される。アミノ酸置換は、20の標準的アミノ酸の非天然に生じるアミノ酸又は天然に生じるアミノ酸誘導体による置換を含む(例えば4-ヒドロキシプロリン、3-メチルヒスチジン、オルニチン、ホモセリン、5-ヒドロキシリジン)。アミノ酸変異は、当分野でよく知られた遺伝学的又は化学的方法を使用して生成されうる。遺伝学的方法は、部位特異的変異誘発、PCR、遺伝子合成等を含みうる。化学的修飾など、遺伝子工学以外の方法によるアミノ酸の側鎖基の改変方法がまた有用でありうることが意図される。本明細書において同一のアミノ酸変異を示すために様々な名称が使用されてもよい。例えば、Fc領域の位置329のプロリンからグリシンへの置換は、329G、G329、G₃₂₉、P329G、又はPro329Glyとして示すことができる。

30

【0058】

40

50

ポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な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、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、特にデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対する程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは、A及びBのプログラムアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと一致しない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは一致しないと評価されるであろう。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、直前のパラグラフに記載したように、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

【0059】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する初代形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は、親細胞と、核酸含有物において完全に同一ではなく、変異を含む場合もある。元來の形質転換細胞において、スクリーニング又は選択された場合に、同様の機能又は生物活性を有する変異子孫がここに含まれる。宿主細胞は、本発明で使用されるイムノコンジュゲート及び抗体を生成するために使用可能な、任意のタイプの細胞システムである。一実施態様において、宿主細胞は、修飾されたオリゴ糖による抗体の産生を可能にするように操作されている。特定の実施態様において、宿主細胞は、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)活性を有する一以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように操作されている。特定の実施態様において、宿主細胞は、-マンノシダーゼII(MannII)活性を有する一以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように更に操作されている。宿主細胞は、培養細胞、例えば、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YOの骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞などの哺乳類培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞、わずかな例を挙げると、しかしながら、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織の中に含まれる細胞も含む。

10

20

30

40

50

【0060】

本明細書において使用される場合、「GnTⅡⅠ活性を有するポリペプチド」とは、N-結合型オリゴ糖のトリマンノシルコアの 結合型マンノシドへの 1-4 結合でのN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の付加を触媒できるポリペプチドを指す。これは、用量依存性を伴うか又は伴わない特定の生物学的アッセイで測定した場合に、生化学と分子生物学の国際連合命名委員会(NC-IUBMB)に従って、1-1, 4-マンノシル-糖タンパク質の4-1-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.144)としても知られている(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼⅡの活性に、必ずしも同一ではないが、類似した酵素活性を示す融合ポリペプチドを含む。用量依存性が存在する場合、それは、GnTⅡⅠのものと同一である必要はなく、むしろGnTⅡⅠに比べた場合、付与された活性における用量依存性に実質的に類似している(すなわち、候補のポリペプチドは、GnTⅡⅠに比べて、より大きい活性を示すか又は最高で約25倍以下の活性、好ましくは最高で約10倍以下の活性、及びより最も好ましくは最高で約3倍以下の活性を示し得る)。特定の実施態様において、GnTⅡⅠ活性を有するポリペプチドは、異種性ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメイン及びGnTⅡⅠの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。特に、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼⅡ又はGnTⅠの局在化ドメインであり、最も具体的にはマンノシダーゼⅡの局在化ドメインである。あるいは、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼⅠの局在化ドメイン、GnTⅡⅠの局在化ドメイン、及び1,6コアフコシリトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される。このような融合ポリペプチドを生成する方法、及び増加したエフェクター機能を有する抗体を生成するためのそれらの使用は、その全内容が出典明示によりここに援用される、国際公開第2004/065540号、米国仮特許出願第60/495,142号及び米国特許出願公開第2004/0241817号に開示されている。10

【0061】

本明細書において用いられる場合、用語「ゴルジ局在化ドメイン」は、ゴルジ複合体の位置にポリペプチドを固定するために関与するゴルジ常在性ポリペプチドのアミノ酸配列を指す。一般的に、局在化ドメインは酵素のアミノ末端「尾部」を含む。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「ManⅡ活性を有するポリペプチド」は、N結合型オリゴ糖の分岐したGlcNAc₅GlcNAc₂マンノース中間体における末端1,3-及び1,6-結合-D-マンノース残基の加水分解を触媒することができるポリペプチドを指す。これは、生化学と分子生物学の国際連合の命名委員会(NC-IUBMB)による、マンノシルオリゴ糖1,3-1,6--マンノシダーゼⅡ(EC 3.2.1.114)としても知られる、ゴルジ-D-マンノシダーゼⅡの活性に必ずしも同一ではないが類似の酵素活性を示すポリペプチドを含む。30

【0063】

「活性化Fc受容体」は、抗体のFc領域による結合後に、エフェクター機能を遂行させるために受容体を持つ細胞を刺激するシグナル伝達イベントを誘発させるFc受容体である。活性化Fc受容体はFcRIIIa(CD16a)、FcRI(CD64)、FcRIIa(CD32)、及びFcRI(CD89)を含む。40

【0064】

抗体依存性細胞傷害(ADC C)は、免疫エフェクター細胞による抗体被覆標的細胞の溶解をもたらす免疫機構である。標的細胞は、Fc領域を含む抗体又はその断片が、N末端にあるタンパク質部分を一般に介してFc領域に特異的に結合する細胞である。本明細書で使用される場合、用語「増加した/低下したADC C」は、標的細胞を取り囲む培地中で、上に定義されたADC Cのメカニズムによって、所定の時間内に、抗体の所定の濃度で溶解される標的細胞の数の減少、及び/又はADC Cのメカニズムによって、所定の時間内に、所定の数の標的細胞の溶解を達成するために必要とされる、標的細胞を取り囲む培地中の抗体の濃度の増加のいずれかとして定義される。ADC Cの増加/低下は、同50

じ標準的な產生、精製、製剤、及び保存の方法（当業者に周知である）を使用して、同じ型の宿主細胞によって產生されるが、操作されていない、同じ抗体によって媒介されるA D C Cに相対するものである。例えば、本明細書に記載の方法によりグリコシル化のパターンを改変されるように（例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、G n T I I I、又は他のグリコシルトランスフェラーゼを発現させるために）操作された宿主細胞により產生される抗体により媒介されるA D C Cの増加は、同じタイプの非操作型宿主細胞により產生される同じ抗体により媒介されるA D C Cに相対するものである。

【 0 0 6 5 】

「增加した／低下した抗体依存性細胞 - 媒介性細胞傷害（A D C C）を有する抗体」は、当業者に周知の任意の適した方法により測定される、増加したA D C Cを有する抗体を意味する。承認されているインビトロA D C C アッセイは以下の通りである：

1) このアッセイは、抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが知られている標的細胞を使用する；

2) このアッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健常ドナーの血液から単離されたヒト末梢血单球細胞（P B M C）を使用する；

3) このアッセイは以下のプロトコールに従って使用される。

i) P B M C を、標準的な密度遠心分離手順を使用して単離し、R P M I 細胞培養培地中、 5×10^6 細胞 / m l で懸濁する；

i i) 標的細胞を、標準的な培養方法によって増殖させ、90 %よりも高い生存度を有する指数増殖期から収集し、R P M I 細胞培養培地中で洗浄し、100マイクロキュリーの $^{51}C r$ で標識し、細胞培養培地で2回洗浄し、そして 10^5 細胞 / m l の密度で細胞培養培地中に再懸濁する；

i i i) 100マイクロリットルの上記の最終的な標的細胞懸濁物を、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す；

i v) 抗体を、細胞培養培地中で4000ng / m l から0.04ng / m l まで段階希釈し、得られる抗体溶液の50マイクロリットルを96ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に加えて、上記の全体の濃度範囲を網羅する種々な抗体濃度を3通りで試験する；

v) 最大放出（M R）コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルは、抗体溶液（上記の要点 i v ）の代わりに、50マイクロリットルの2 % (V / V) 非イオン性界面活性剤（Nonidet, Sigma, St. Louis）の水溶液を受容する；

v i) 自発性放出（S R）コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルに、抗体溶液（上記の要点 i v ）の代わりに、50マイクロリットルのR P M I 細胞培養培地を受容する；

v i i) 次いで、96ウェルマイクロタイタープレートを、 $50 \times g$ で1分間遠心分離し、そして1時間4でインキュベートする；

v i i i) 50マイクロリットルのP B M C 懸濁液（上記の要点 i ）を各ウェルに加えて25 : 1のエフェクター：標的細胞比を生じ、そしてプレートをインキュベーター中、5 % CO₂ 大気、37下に4時間配置する；

i x) 各ウェルからの無細胞上清を収集し、実験的に放出された放射能（E R）をガンマカウンターを使用して定量する；

x) 特異的溶解のパーセンテージを、計算式（E R - M R）/ (M R - S R) × 100 に従って各抗体について計算し、ここで、E R は抗体濃度について定量された平均放射能（上記の要点 i x を参照のこと）であり、M R はM R コントロール（上記の要点 v を参照のこと）についての定量された平均放射能（上記の要点 i x を参照のこと）であり、そしてS R はS R コントロール（上記の要点 v i を参照のこと）についての定量された平均放射能（上記の要点 i x を参照のこと）である；

4) 「增加した／低下したA D C C」は、上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの増加／低下、及び／又は上記の試験された抗体濃度

10

20

30

40

50

範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの半分を達成するために必要とされる抗体の濃度の低下 / 増加のいずれかとして定義される。A D C C の増加 / 低下は、同じ標準的な产生、精製、製剤、及び保存の方法（当業者に公知である）を使用して、同じ型の宿主細胞によって產生されるが、操作されていない、同じ抗体によって媒介され、上のアッセイにより測定される、A D C C に相対するものである。

【0066】

本明細書で使用される場合、「組合せ」（及び「組合せる又は「組合せた」等のその文法的变形」）は、本発明の抗体とイムノコンジュゲートの組合せを含み、ここで抗体とイムノコンジュゲートは、同一又は異なった容器、同一又は異なった薬学的製剤にあり、一緒又は別々に投与され、任意の順序で連続して又は同時に投与され、同一又は異なった経路で投与されるが、但し、抗体とイムノコンジュゲートは、体内の生物学的効果を同時に働きかける、すなわちエフェクター細胞を同時に刺激することができるようになる。例えば、本発明の抗体とイムノコンジュゲートを「組合せる」とは、特定の薬学的製剤において、まずイムノコンジュゲートを投与し、続いて、他の薬学的組成物において抗体を投与する、又はその逆を意味する。

10

【0067】

薬剤の「有効量」は、それが投与される細胞又は組織に生理学的变化をもたらすのに必要な量を意味する。

【0068】

薬剤、例えば薬学的組成物の「治療的有効量」は、所望する治療的又は予防的結果を達成するのに必要な期間、用量で有効な量を意味する。治療的に有効な量の薬剤は例えば、疾患の有害作用を除去、低下、遅延、最小化又は防止させる。いくつかの活性成分の組合せの治療的有効量は、各活性成分の治療的有効量であってよい。あるいは、治療に起因する副作用を低減するために、いくつかの活性成分の組合せの治療的有効量は、付加的又は超付加的な、もしくは相乗効果を生じるのに有効であり、組合せて治療的に有効であるが、それらが単独で使用された場合、活性成分の一つ又はいくつかの治療量以下であってもよい、個々の活性成分の量である。

20

【0069】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、靈長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト靈長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。特に、個体又は被検体はヒトである。

30

【0070】

用語「薬学的組成物」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

【0071】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効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は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

40

本明細書で用いられるように、「治療」（及び「治療する（treat）」又は「治療している（treating）」など文法上の変形）は、治療されている個体における疾患の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の組合せは、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【0072】

用語「パッケージ挿入物」は、效能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情

50

報、及び／又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0073】

イムノコンジュゲート

本発明で有用なイムノコンジュゲートは、少なくとも一つのエフェクター部分と少なくとも一つの抗原・結合部分を有するポリペプチド分子である。

【0074】

イムノコンジュゲートは、抗原・結合部分にエフェクター部分を化学的にコンジュゲートすることにより、又は融合タンパク質として、抗原・結合部分とエフェクター部分を発現させることにより調製することができる（例えばNakamura and Kubo, Cancer 80, 2650-2655 (1997)；及び Becker et al., Proc Natl Acad Sci USA 93, 7826-7831 (1996)を参照）。本発明で使用するために、融合タンパク質として発現したイムノコンジュゲートが、一般に好ましい。従って、ある実施態様において、エフェクター部分は、抗原・結合部分とアミノ・又はカルボキシ・末端ペプチド結合を共有している（すなわち、イムノコンジュゲートは融合タンパク質である）。このようなイムノコンジュゲートにおいて、エフェクター部分は免疫グロブリン重鎖又は軽鎖に融合していてもよい。本発明において特に有用なものは、完全長IgGクラス抗体、特に、完全長IgG₁サブクラス抗体を含む、イムノコンジュゲートである。

10

【0075】

一実施態様において、エフェクター分子は単鎖エフェクター部分である。一実施態様において、エフェクター部分はサイトカインである。イムノコンジュゲートの抗体及びエフェクター部分は、上述及び以下に詳細に述べるものを含む。イムノコンジュゲートの抗体は、様々な標的分子に対するものであることができる（例えば、腫瘍細胞又は腫瘍ストローマにおいて発現したタンパク質分子常の抗原決定基）。抗体の限定されない例が、本明細書において記載される。本明細書に開示される特に有用なイムノコンジュゲートは、特に、同じ抗原決定基を標的にし、同じエフェクター部分を保有する、異なる構成のイムノコンジュゲートと比較して典型的には、以下の特性：作用の高い特異性、低下した毒性、良好な生産可能性及び／又は改善された安定性の一又は複数を示す。本発明に使用のための特定のイムノコンジュゲートは、その全体内容が参考により本明細書に援用される、PCT出願番号WO 2012/146628に更に記述される。

20

30

【0076】

イムノコンジュゲートのフォーマット

PCT出願番号WO 2012/146628に記載されるイムノコンジュゲートは、1個以下のエフェクター部分を含む。従って、特定の実施態様において、本発明において使用のためのイムノコンジュゲートは、1個以下のエフェクター部分を含む。特定の実施態様において、エフェクター部分は、単鎖エフェクター部分である。本発明にかかるイムノコンジュゲートに含まれる抗体は、完全長IgGクラス抗体、より具体的には、完全長IgG₁サブクラス抗体である。一実施態様において、抗体はヒトである。他の実施態様では、抗体はヒト、ヒト化、又はキメラである。一実施態様において、抗体は、ヒトFc領域、より具体的にはヒトIgGのFc領域、最も具体的にはヒトIgG₁のFc領域を含む。本発明に有用な抗体は、配列番号124に記載される、ヒトIgガンマ-1重鎖定常領域を含み得る（すなわち、抗体はヒトIgG₁サブクラスである）。

40

【0077】

一実施態様において、エフェクター部分は、アミノ又はカルボキシ末端のペプチド結合を抗体と共有する。一実施態様において、イムノコンジュゲートは、一以上のペプチドリソルバーにより連結された、エフェクター部分と抗体、特にIgGクラス抗体、より具体的にはIgG₁サブクラス抗体である。特定の実施態様において、エフェクター部分は、そのアミノ末端のアミノ酸で、免疫グロブリン重鎖の一方のカルボキシ末端のアミノ酸に、任意でリンクペプチドを介して融合している。

【0078】

50

所定の実施態様において、特にイムノコンジュゲートが单一エフェクター部分のみを含む場合、抗体は、その Fc 領域に、2つの非同一免疫グロブリン重鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾を含む。ヒト IgG の Fc 領域の 2 つのポリペプチド鎖間の最も広範なタンパク質 - タンパク質相互作用の部位は、Fc 領域の CH3 ドメインにある。従って、一実施態様では、前記修飾は、Fc 領域の CH3 ドメインにある。特定の実施態様において、前記修飾は、免疫グロブリン重鎖の一方にノブ修飾を、免疫グロブリン重鎖の他の一方にホール修飾を含む、ノブ・イントゥ・ホール (knob-into-hole) 修飾である。ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば米国特許第 5,731,168 号；米国特許第 7,695,936 号；Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 及び Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001) に記載される。一般に、本方法は、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げるように、突起が空洞内に配置することができるよう、第一のポリペプチドの界面での突起（「ノブ」）及び第二ポリペプチドの界面における対応する空洞（「穴」）を導入することを含む。突起は、第一のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置換することによって構築される。突起と同一又はより小さい大きさの相補的な空洞が、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置換することによって第二ポリペプチドの界面に作成される。突起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を改変することにより、例えば部位特異的突然変異誘発により、又はペプチド合成により作製することができる。特定の実施態様において、ノブ修飾は、2つの免疫グロブリン重鎖の一方にアミノ酸置換 T366W を含み、そしてホール修飾は、2つの免疫グロブリン重鎖の他の一方にアミノ酸置換 T366S、L368A 及び Y407V を含む（Kabat の EU 番号づけ）。更なる特定の実施態様において、ノブ修飾を含む免疫グロブリン重鎖は、アミノ酸置換 S354C を更に含み、ホール修飾を含む免疫グロブリン重鎖は、アミノ酸置換 Y349C を更に含む。これらの 2 つのシステイン残基の導入は、更に二量体を安定化させる、2 つの重鎖間のジスルフィド架橋の形成をもたらす（Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)）。

【0079】

特定の実施態様において、エフェクター部分は、ノブ修飾を含む免疫グロブリン重鎖のカルボキシ末端のアミノ酸に連結している。

【0080】

代わりの実施態様において、2つの非同一ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化を促進する修飾は、PCT 出願公開 WO 2009 / 089004 に記載されるように、静電的ステアリング効果を媒介する修飾を含む。一般に、この方法は、ホモ二量体形成は静電的に不利になるが、ヘテロ二量体は静電的に有利になるように、2つのポリペプチド鎖の界面で、荷電したアミノ酸残基による一又は複数のアミノ酸残基の置換を含む。

【0081】

Fc 領域は、その標的組織における良好な蓄積及び好ましい組織 - 血液分配比率に寄与する長い血清半減期を含む、好ましい薬物動態学的特性をイムノコンジュゲートに付与する。しかし、同時期に、好適な抗原保有細胞に対するよりもむしろ Fc 受容体を発現する細胞に対するイムノコンジュゲートの所望されない標的化を導く。更に、Fc 受容体シグナル伝達経路の同時活性化はサイトカイン放出につながる可能性があり、イムノコンジュゲートのエフェクター部分と長い半減期とが組み合わさって、サイトカイン受容体の過剰な活性化及び全身投与の際に重篤な副作用をもたらす。これに伴い、従来の IgG - IL-2 イムノコンジュゲートは注入反応に関連することが説明されている（例えば King et al., J Clin Oncol 22, 4463-4473 (2004)）。

【0082】

従って、イムノコンジュゲートに含まれる抗体は、対応する非操作抗体と比較して、低下したエフェクター機能を有するように操作される。特定の実施態様において、低下したエフェクター機能は、活性化 Fc 受容体への結合の低下である。一つのそうした実施態様において、抗体は、その Fc 領域に、活性化 Fc 受容体に対するイムノコンジュゲートの

10

20

30

40

50

結合親和性を減少させる一以上のアミノ酸変異を含む。典型的には、同一の一以上のアミノ酸置換が2つの免疫グロブリン重鎖の各々に存在する。一実施態様において、前記アミノ酸置換は、活性化F c受容体に対する結合親和性を、少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍減少させる。F c受容体に対するイムノコンジュゲートの結合親和性を減少させる複数のアミノ酸変異が存在する実施態様において、これらのアミノ酸変異は、活性化F c受容体に対するイムノコンジュゲートの結合親和性を少なくとも10倍、少なくとも20倍、又は更に少なくとも50倍減少させ得る。一実施態様において、操作された抗体を含むイムノコンジュゲートは、非操作抗体を含んでなるイムノコンジュゲートと比較した場合、活性化F c受容体に対する結合親和性の20%未満、具体的には10%未満、より具体的には5%未満を示す。特定の実施態様において、活性化F c受容体は、F c受容体であり、より具体的にはF c R I I I a、F c R I 又はF c R I I a受容体である。好ましくは、これらの受容体の各々に対する結合が減少する。幾つかの実施態様において、補体成分に対する結合親和性、具体的にはC 1 qに対する結合親和性もまた減少する。一実施態様において、新生児F c受容体(F c R n)への結合親和性は低下しない。F c R nへの実質的に類似な結合、すなわち、前記受容体への免疫グロブリンの結合親和性の保存は、抗体(又は前記F cドメインを含んでなるイムノコンジュゲート)が、F c R nに対し、非操作型形態の抗体(又は前記非操作型形態の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート)の約70%より大きな結合親和性を呈する場合に達成される。抗体又は前記抗体を含むイムノコンジュゲートは、その親和性の約80%を越える、又は更に約90%を越える親和性を示す場合がある。一実施態様では、アミノ酸変異はアミノ酸置換である。一実施態様において、抗体、特にヒト完全長I g G₁サブクラス抗体は、免疫グロブリン重鎖の位置P 3 2 9でアミノ酸置換を含む(KabatのEU番号づけ)。より特異的な実施態様では、アミノ酸置換は、P 3 2 9 A又はP 3 2 9 G、特にP 3 2 9 Gである。一実施態様では、抗体は、免疫グロブリン重鎖のS 2 2 8、E 2 3 3、L 2 3 4、L 2 3 5、N 2 9 7及びP 3 3 1から選択される位置に更なるアミノ酸置換を含む。より特異的な実施態様では、更なるアミノ酸置換は、S 2 2 8 P、E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、N 2 9 7 A、N 2 9 7 D又はP 3 3 1 Sである。特定の実施態様において、抗体は、免疫グロブリン重鎖の位置P 3 2 9、L 2 3 4及びL 2 3 5でアミノ酸置換を含む(KabatのEU番号づけ)。更に特定の実施態様では、抗体は、免疫グロブリン重鎖においてアミノ酸置換L 2 3 4 A、L 2 3 5 A及びP 3 2 9 G(L A L A P 3 2 9 G)を含む。参照によってその全体が援用される、PCT出願番号WO 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1に記載されるように、アミノ酸置換のこの組合せは、ヒトI g G分子のF c受容体結合をほとんど特に効率的に消失させ、従って、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADC C)を含む、エフェクター機能を低下させる。国際公開第2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1号はまた、このような変異体抗体を調製する方法、及びF c受容体結合又はエフェクター機能などその特性を決定するための方法を記載する。

【0083】

変異体抗体は、当技術分野で知られている遺伝子的又は化学的方法を用いて、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は修飾によって調製することができる。遺伝的方法は、コードするDNA配列、PCR、遺伝子合成等の部位特異的変異誘発を含むことができる。正しいヌクレオチド変化は、例えば配列決定によって検証することができる。

【0084】

F c受容体への結合は、例えば、B I A c o r e装置(GE Healthcare)など標準的な計測機器を使用してELISAによって又は表面プラズモン共鳴(SPR)によって容易に決定することができ、そのようなF c受容体は、組換え発現によって得ることができる。適切なこのような結合アッセイが本明細書に記載されている。代わりに、抗体又は、F c受容体に対する抗体を含むイムノコンジュゲートの結合親和性は、特定のF c受容体を発現することが知られている細胞株、例えばF c I I I a受容体を発現するNK細胞などを使用して評価することができる。

【0085】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、非操作抗体と比較して、低下したエフェクター機能を有するように、とりわけADCを低下されるように操作される。

【0086】

抗体又は抗体を含むイムノコンジュゲートのエフェクター機能は、当技術分野で公知の方法によって測定することができる。ADCを測定するのに適したアッセイが本明細書に記載されている。対象とする分子のADC活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例は、米国特許第5,500,362号: Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 及び Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); U.S. Patent No. 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987) に記述されている。あるいは、非放射性アッセイ法(例えば、フローサイトメトリーのためのACTITM非放射性細胞毒性アッセイ(CelITechnology, Inc. Mountain View, CA)及びCytotoxic 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照)を用いることができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は更に、目的の分子のADC活性は、例えば Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998) に開示される動物モデルにおいてインビボで評価することができる。

【0087】

幾つかの実施態様において、補体成分に対する、具体的にはC1qに対する抗体の結合が改変される。従って、抗体が、低下したエフェクター機能を有するように操作される幾つかの実施態様において、前記低下したエフェクター機能は低下したCDCを含む。イムノコンジュゲートがC1qに結合することができ故にCDC活性を有するかを決定するためにC1q結合アッセイを実施することができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); 及び Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

【0088】

幾つかの実施態様において、イムノコンジュゲートは、エフェクター部分と抗体との間に位置する一以上のタンパク質分解性切断部位を含む。イムノコンジュゲートの構成要素は、直接又は様々なリンカー、特に、一以上のアミノ酸を含み、典型的には、本明細書に記載されているか、又は当技術分野で知られている約2~20個のアミノ酸を含むペプチドリンカーによって連結されていてもよい。適切な非免疫原性ペプチドリンカーは、例えば、(G₄S)_n、(SG₄)_n又はG₄(SG₄)_nペプチドリンカーを含み、nは一般に、1と10の間、典型的には2と4の数である。

【0089】

イムノコンジュゲートの抗体

本発明のイムノコンジュゲートは、一般に、特定の抗原決定基に結合し、かつ標的部位、例えば抗原決定基を担う特定のタイプの腫瘍細胞又は腫瘍間質に結合する実体(例えば、エフェクター部分)を指向することができる免疫グロブリン分子である。イムノコンジュゲートは、例えば、腫瘍細胞の表面、ウイルス感染細胞の表面、他の疾患細胞の表面、血清中に遊離して、及び/又は細胞外マトリックス(ECM)中に見出される抗原決定基に結合可能である。腫瘍抗原の非限定的例には、MAGE、MART-1/メラン-A、gp100、ジペプチジルペプチターゼIV(DPPIV)、アデノシンデアミナーゼ-結合タンパク質(ADAbp)、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胎児抗原(CEA)及びその免疫原性エピトープCAP-1及びCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異性抗原(PSA)及びその免疫原性エピトープPSA-1、PSA-2、及びPSA-3、前立腺特異性膜抗原(PSMA)、T-細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、MAGE-腫瘍抗原ファミリー(例えば、MAGE

10

20

30

40

50

- A 1、MAGE - A 2、MAGE - A 3、MAGE - A 4、MAGE - A 5、MAGE - A 6、MAGE - A 7、MAGE - A 8、MAGE - A 9、MAGE - A 10、MAGE - A 11、MAGE - A 12、MAGE - Xp2 (MAGE - B 2)、MAGE - Xp3 (MAGE - B 3)、MAGE - Xp4 (MAGE - B 4)、MAGE - C 1、MAGE - C 2、MAGE - C 3、MAGE - C 4、MAGE - C 5)、GAGE - 肿瘍抗原ファミリー(例えば、GAGE - 1、GAGE - 2、GAGE - 3、GAGE - 4、GAGE - 5、GAGE - 6、GAGE - 7、GAGE - 8、GAGE - 9)、BAGE、RAGE、LAGE - 1、NAG、GnT - V、MUM - 1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、-フェトプロテイン、E - カドヘリン、-カテニン、-カテニン、及び -カテニン、p120ctn、gp100 Pmel1117、PRAME、NY - ESO - 1、cdcc27、大腸腺腫症タンパク質(APC)、フォドリン、コネキシン37、Ig - イディオタイプ、p15、gp75、GM2及びGD2ガングリオシド、ウイルス生成物、例えばヒト乳頭腫ウイルスタンパク質、腫瘍抗原のSmadファミリー、1mp - 1、P1A、EBV - コード化核内抗原(EBNA) - 1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX - 1、SSX - 2 (HOM - MEL - 40)、SSX - 1、SSX - 4、SSX - 5、SCP - 1及びCT - 7、及びc - erbB - 2が含まれる。ウイルス性抗原の非限定例は、インフルエンザウイルス血球凝集素、エプスタイン・バーウイルスLMP - 1、C型肝炎ウイルスE2糖タンパク質、HIV gp160、及びHIV gp120を含む。ECM抗原の非限定例は、シンデカン、ヘパラナーゼ、インテグリン、オステオポンチン、リンク、カドヘリン、ラミニン、ラミニンタイプEGF、レクチン、フィブロネクチン、ノッチ、テネイシン、及びマトリキシン(matrixin)を含む。本発明のイムノコンジュゲートは、次の特異的な非限定的例の細胞表面抗原:FAP、Her2、EGFR、IGF - 1R、CD2(T - 細胞表面抗原)、CD3(TCRと結合したヘテロマルチマー)、CD22(B - 細胞受容体)、CD23(低親和性のIgE受容体)、CD25(IL - 2受容体鎖)、CD30(サイトカイン受容体)、CD33(骨髄細胞表面抗原)、CD40(腫瘍壊死因子受容体)、IL - 6R(IL6受容体)、CD20、MCSP、c - Met、CUBドメイン含有タンパク質 - 1(CDCP1)、及びPDGF R(血小板由来成長因子受容体)に結合可能である。

【0090】

30

ある実施態様において、抗体は、腫瘍細胞上又は腫瘍細胞環境内に存在する抗原に対するものである。特定の実施態様において、抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、テネイシン-CのA1ドメイン(TNC-A1)、テネイシン-CのA2ドメイン(TNC-A2)、フィブロネクチンのエクストラドメインB(EDB)、癌胎児抗原(CEA)及びメラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)の群から選択される抗原に対するものである。

【0091】

40

抗体は、抗原決定基に特異的に結合することを保持し、かつFc領域を含む抗体又はその断片の任意のタイプとすることができます。一実施態様において、抗体は、完全長抗体である。特に好ましい抗体は、IgGクラス、具体的にはIgG₁サブクラスの免疫グロブリンである。

【0092】

50

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、テネイシンのA1及び/又はA4ドメイン(TNC - A1又はTNC - A4又はTNC - A1/A4)に特異的である抗体を含む。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号8又は配列番号9の何れかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号6又は配列番号7の何れかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持して

いるその変異体を含む。更に特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号8又は配列番号9の何れかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号6又は配列番号7の何れかに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。

【0093】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、テネイシンのA2ドメイン(TNC-A2)に特異的である抗体を含む。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号5、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83及び配列番号85の群から選択される配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である重鎖可変領域配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号3、配列番号4；配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82及び配列番号84の群から選択される配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。より特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号5、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83及び配列番号85の群から選択される配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号3、配列番号4；配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82及び配列番号84の群から選択される配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。

【0094】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的である抗体を含む。具体的な実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号12、配列番号14、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65、配列番号67及び配列番号69からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の具体的な実施態様において、イムノコンジュゲートの抗原結合部分は、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66及び配列番号68からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。より具体的な実施態様において、イムノコンジュゲートの抗原結合部分は、配列番号12、配列番号14、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43

10

20

30

40

50

43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65、配列番号67及び配列番号69からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66及び配列番号68からなる群から選択される配列に対して、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号12の重鎖可変領域配列、及び配列番号11の軽鎖可変領域配列を含む。別の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号17の重鎖可変領域配列、及び配列番号16の軽鎖可変領域配列を含む。別の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号47の重鎖可変領域配列、及び配列番号46の軽鎖可変領域配列を含む。別の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号63の重鎖可変領域配列、及び配列番号62の軽鎖可変領域配列を含む。別の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号67の重鎖可変領域配列、及び配列番号66の軽鎖可変領域配列を含む。別の特定の実施態様において、本発明のイムノコンジュゲートは、配列番号125に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、配列番号126に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号129に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、本発明のイムノコンジュゲートは、配列番号127に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、配列番号128に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号129に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、本発明のイムノコンジュゲートは、配列番号130に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、配列番号131に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号132に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。

【0095】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（M C S P）に特異的である抗体を含む。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号86又は配列番号122の何れかの配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号87又は配列番号123

の何れかの配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。更に特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 8 6 又は配列番号 1 2 2 の何れかの配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号 8 7 又は配列番号 1 2 3 の何れかの配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。より特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 8 6 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域配列、及び配列番号 8 7 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域配列を含む。別の特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 8 6 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域配列、及び配列番号 8 7 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域配列を含む。

【 0 0 9 6 】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、癌胎児抗原（C E A）に特異的である抗体を含む。特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 1 1 4 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 1 1 5 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域、又は機能性を保持しているその変異体を含む。より特定の実施態様において、イムノコンジュゲートの抗体は、配列番号 1 1 4 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域配列、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号 1 1 5 の配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。別の特定の実施態様において、本発明のイムノコンジュゲートは、配列番号 1 3 6 に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、配列番号 1 3 7 に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体、及び配列番号 1 3 8 に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるポリペプチド配列、又は機能性を保持しているその変異体を含む。

【 0 0 9 7 】

本発明によるイムノコンジュゲートは、配列番号 3 ~ 8 7、1 0 8 ~ 1 3 2 及び 1 3 6 ~ 1 3 8 に記載された配列に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一である配列を、その機能性断片又は変異体を含み、含むものを含む。本発明によるイムノコンジュゲートはまた、保存的アミノ酸置換を有する配列番号 3 ~ 1 2 7 の配列を含む抗体も包含する。配列番号 1 2 6、1 2 8、1 3 1、1 3 4 及び 1 3 7 の配列において、本明細書に記載される変異体 I L - 2 の配列の配列（配列番号 2 を参照）は、ヒト I L - 2 の配列（配列番号 1 を参照）により置換され得ることが理解される。

【 0 0 9 8 】

イムノコンジュゲートのエフェクター部分

本発明における使用のためのエフェクター部分は、一般に、例えばシグナル伝達経路を

介して細胞活性に影響を与えるポリペプチドである。従って、本発明において有用なイムノコンジュゲートのエフェクター部分は、細胞内応答を調節する細胞膜の外側からシグナルを伝達する受容体媒介性シグナル伝達と関連することができる。例えば、イムノコンジュゲートのエフェクター部分は、サイトカインとすることができます。特定の実施態様において、エフェクター部分は、本明細書で記載されたような、単鎖エフェクター部分である。一実施態様において、本発明によるイムノコンジュゲートのエフェクター部分、典型的には単鎖エフェクター部分は：IL-2、GM-CSF、IFN-、及びIL-12からなる群から選択されるサイトカインである。一実施態様において、エフェクター部分はIL-2である。他の実施態様において、イムノコンジュゲートの単鎖エフェクター部分は：IL-8、MIP-1、MIP-1、及びTGM-からなる群から選択されるサイトカインである。10

【0099】

一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はIL-2である。特定の実施態様において、IL-2エフェクター部分は：活性化Tリンパ球細胞における増殖、活性化Tリンパ球細胞における分化、細胞傷害性T細胞（CTC）活性、活性化B細胞における増殖、活性化B細胞における分化、ナチュラルキラー（NK）細胞における増殖、NK細胞における分化、活性化T細胞NK細胞によるサイトカイン分泌、及びNK/Tリンパ球活性化キラー（LAK）抗腫瘍細胞傷害からなる群から選択される、又は複数の細胞反応を誘発させることができる。ある実施態様において、IL-2エフェクター部分は、変異していないIL-2エフェクター部分と比較して、IL-2受容体の-サブユニットに対する変異IL-2エフェクター部分の親和性は減少させ又は無効になっているが、中程度の親和性のあるIL-2受容体（IL-2受容体の-及び-サブユニットからなる）に対する、変異IL-2エフェクター部分の親和性は保存されている、少なくとも一つのアミノ酸変異を有するIL-2エフェクター部分である。一実施態様において、アミノ酸変異はアミノ酸置換である。特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、ヒトIL-2（配列番号1）の残基42、45及び72に対応する位置から選択される1、2又は3の位置（複数）に、1、2又は3のアミノ酸置換を有する。更に特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、ヒトIL-2の残基42、45及び72に対応する位置で、3のアミノ酸置換を有する。また更に特定の実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、アミノ酸置換F42A、Y45A及びL72Gを有するヒトIL-2である。一実施態様において、変異IL-2エフェクター部分は、ヒトIL-2の3位に対応する位置に、アミノ酸変異を付加的に有し、IL-2のO-グリコシル化部位が除去されている。特に、前記付加的なアミノ酸変異は、スレオニン配列がアラニン残基で置き換えられたアミノ酸置換である。アミノ酸置換T3A、F42A、Y45A及びL72Gを有する四重変異（QM）IL-2の配列を、配列番号2に示す。適切な変異IL-2分子は、PCT出願番号WO2012/107417に詳細に記載されている。2030

【0100】

イムノコンジュゲートにおけるエフェクター部分として有用な変異型サイトカイン分子は、当技術分野で公知の遺伝的又は化学的方法を用いて、欠失、置換、挿入又は修飾によって調製することができる。遺伝的方法は、コードするDNA配列、PCR、遺伝子合成等の部位特異的変異誘発を含むことができる。正確なヌクレオチド変化は、例えば配列決定によって検証することができる。これに関し、天然IL-2のヌクレオチド配列は、Taniguchiら（Nature 302, 305-10 (1983)）に記載されており、ヒトIL-2をコードする核酸は、例えばAmerican Type Culture Collection (Rockville MD)などの公の受託者から入手することができる。ヒトIL-2の例示的な配列は、配列番号1に示されている。置換又は挿入は、天然ならびに非天然のアミノ酸残基を含むことができる。アミノ酸修飾は、グリコシル化部位の付加又は除去又は炭水化物連結など化学修飾の周知の方法を含む。40

【0101】

50

一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はGM-CSFである。特定の実施態様において、GM-CSFのエフェクター部分は、顆粒球、単球又は樹状細胞において増殖及び/又は分化を誘発することができる。一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はIFN- α である。特定の実施態様において、IFN- α のエフェクター部分は、ウイルス感染細胞におけるウイルス複製の阻害、及び主要組織適合性複合体I(MHC I)の発現の上方制御からなる群から選択される細胞応答の一以上を誘発することができる。別の特定の実施態様では、IFN- α のエフェクター部分は、腫瘍細胞において増殖を阻害することができる。一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はIL-12である。特定の実施態様において、IL-12のエフェクター部分は、NK細胞における増殖、NK細胞における分化、T細胞における増殖、及びT細胞分化からなる群から選択される細胞応答の一つ以上を誘発することができる。一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はIL-8である。特定の実施態様において、IL-8のエフェクター部分は、好中球において走化性を誘発することができる。一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はMIP-1 α である。特定の実施態様において、MIP-1 α のエフェクター部分は、単球及びTリンパ球細胞において走化性を誘発することができる。一実施態様において、イムノコンジュゲートのエフェクター部分、特に一本鎖のエフェクター部分はTGF- β である。特定の実施態様において、TGF- β のエフェクター部分は、単球における走化性、マクロファージにおける走化性、活性化マクロファージにおけるIL-1発現の上方制御、及び活性化B細胞におけるIgA発現の上方制御からなる群から選択される細胞応答の一以上を誘発することができる。
10
20

【0102】

イムノコンジュゲートと組合せのための抗体

本発明によれば、イムノコンジュゲートと組合せのための抗体は、増加したエフェクター機能を有するように操作される。イムノコンジュゲートと組合せのための本発明における有用な抗体は、特定の抗原決定基、例えば特定の腫瘍細胞抗原に結合し、Fc領域を含む抗体又は抗体断片を含む。ある実施態様において、抗体は、腫瘍細胞に存在する抗原に対するものである。本発明で有用な抗体の特定の標的抗原は、限定されるものではないが、細胞表面受容体、例えば上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)、インスリン様成長因子受容体(IGFR)、及び血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)、前立腺特異性膜抗原(PSMA)、癌胎児抗原(CEA)、ジペプチジルペプチダーゼIV(CD26、DPPIV)、FAP、HER2/neu、HER-3、E-カドヘリン、CD20、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)、c-Met、CUBドメイン含有タンパク質-1(CDCP1)、及び扁平上皮癌抗原(SCCA)等を含む、腫瘍細胞の表面で発現する抗原を含む。
30
40

【0103】

特定の実施態様において、抗体は、CD20、上皮増殖因子受容体(EGFR)、HER2、HER3、インスリン様成長因子受容体(IGF-1R)、癌胎児抗原(CEA)、c-Met、CUBドメイン含有タンパク質-1(CDCP1)、及びメラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)の群から選択される抗原に対するものである。一実施態様において、抗体、多重特異性抗体は、CD20、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)、HER2、HER3、インスリン様成長因子1受容体(IGF-1R)、癌胎児抗原(CEA)、c-Met、CUBドメイン含有タンパク質-1(CDCP1)、及びメラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)の群から選択される、2又はそれ以上の抗原に対するものである。
50

【0104】

本発明で有用な特定の抗CD20抗体は、マウスB-Ly1抗体の結合特異性を有する、ヒト化された、IgGクラスII型の抗CD20抗体である(Poppema and Visser, Biotest Bulletin 3, 131-139 (1987))。特に有用であるのは、

a)重鎖可変ドメインに、配列番号88のCDR1、配列番号89のCDR2、及び配列番号90のCDR3、及び

b)軽鎖可変ドメインに、配列番号91のCDR1、配列番号92のCDR2、及び配列番号93のCDR3；

を有する、ヒト化された、IgGクラスII型の抗CD20抗体である。

【0105】

10

特に、前記抗体の重鎖可変領域フレームワーク領域(FR)FR1、FR2、及びFR3は、VH1_10ヒト生殖系配列によりコードされるヒトFR配列であり、前記抗体の重鎖可変領域FR4は、JH4ヒト生殖系配列によりコードされるヒトFR配列であり、前記抗体の軽鎖可変領域FR、FR1、FR2、及びFR3は、VK2_40ヒト生殖系配列によりコードされるヒトFR配列であり、前記抗体の軽鎖可変領域FR4は、JK4ヒト生殖系配列によりコードされるヒトFR配列である。

【0106】

特に本発明で有用な特定の抗CD20抗体は、配列番号94の重鎖可変ドメイン、及び配列番号95の軽鎖可変ドメインを含む。

【0107】

20

そのような抗CD20抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される国際公開第2005/044859号に記載されている。

【0108】

本発明で有用な特定の抗EGFR抗体は、ラットICR62抗体の結合特異性を有する、ヒト化された、IgGクラスの抗体である(Modjtahedi et al., Br J Cancer 67, 247-253 (1993))。特に有用であるのは、

a)重鎖可変ドメインに、配列番号96のCDR1、配列番号97のCDR2、及び配列番号98のCDR3、及び

b)軽鎖可変ドメインに、配列番号99のCDR1、配列番号100のCDR2、及び配列番号101のCDR3；

を含む、ヒト化された、IgGクラスの抗EGFR抗体である。

30

【0109】

本発明で有用なより特定の抗EGFR抗体は、配列番号102の重鎖可変ドメイン、及び配列番号103の軽鎖可変ドメインを含む。

【0110】

そのような抗EGFR抗体は、それぞれその全体が出典明示によりここに援用される、国際公開第2006/082515号及び国際公開第2008/017963号に記載されている。

【0111】

本発明で有用な他の適切なヒト化されたIgGクラスの抗EGFR抗体は、セツキシマブ/IMC-C225(アービタックス(登録商標)、Goldstein et al., Clin Cancer Res 1, 1311-1318 (1995)に記載)、パニツムナブ/ABX-EGF(Vectibix(登録商標)、Yang et al., Cancer Res 59, 1236-1243 (1999)、Yang et al., Critical Reviews in Oncology/Hematology 38, 17-23 (2001)に記載)、ニモツズマブ/h-R3(Theracim(登録商標)、Mateo et al., Immunotechnology 3, 71-81 (1997); Crombet-Ramos et al., Int J Cancer 101, 567-575 (2002)、Boland & Bebb, Expert Opin Biol Ther 9, 1199-1206 (2009)に記載)、マツズマブ/EMD7200(Biere et al., Cancer Immunol Immunother 46, 167-173 (1998)、Kim, Curr Opin Mol Ther 6, 96-103 (2004))に記載)、及びザルツムマブ/2F8(Bleeker et al., J Immunol 173, 4699-4707 (2004)、Lammerts van Bueren, PNAS 105, 6109-6114 (2008)に記載)を含

40

50

む。

【 0 1 1 2 】

本発明で有用な特定の抗 IGF - 1 R 抗体は、その全内容が出典明示によりここに援用される、国際公開第 2005 / 005635 号及び国際公開第 2008 / 077546 号に記載されており、インスリン様成長因子 - 1 受容体 (IGF - 1 R) への、インスリン様成長因子 - 1 (IGF - 1) 及びインスリン様成長因子 - 2 (IGF - 2) の結合を阻害する。

【 0 1 1 3 】

本発明で有用な抗 IGF - 1 R 抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、更にキメラ抗体 (ヒト定常ドメイン)、ヒト化抗体、特に好ましくは全長ヒト抗体である。本発明で有用な特定の抗 IGF - 1 R 抗体は、抗体 18 に競合して、ヒト IGF - 1 R に結合する、すなわち、それらは、国際公開第 2005 / 005635 号に記載されているように、抗体 18 と、 IGF - 1 R の同じエピトープに結合する。特定の抗 IGF - 1 R 抗体は、 IGF - 1 R への親和性が 10^{-8} M (K_D) 未満、特に約 $10^{-9} \sim 10^{-13}$ M であることにより更に特徴付けられ、好ましくはインスリン受容体へのインスリン結合性の検出可能な濃度依存性阻害を示さない。

【 0 1 1 4 】

本発明で有用な特定の抗 IGF - 1 R 抗体は、次の配列：

a) 配列番号 104 又は 106 の CDR、CDR1、CDR2、及び CDR3 を含む抗体重鎖；

b) 配列番号 145 又は 147 の CDR、CDR1、CDR2、及び CDR3 を含む抗体軽鎖；

を有する、補体決定領域 (CDR) を含む。

【 0 1 1 5 】

特に、本発明で有用な抗 IGF - 1 R 抗体は、配列番号 104 の抗体重鎖可変ドメインアミノ酸配列と配列番号 105 の抗体軽鎖可変ドメインアミノ酸配列、又は配列番号 106 の抗体重鎖可変ドメインアミノ酸配列と配列番号 107 の抗体軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を有する。

【 0 1 1 6 】

本発明で有用な特定の抗 IGF - 1 R 抗体は、それぞれ、寄託番号 DSM ACC 25 30 87 及び DSM ACC 2594 にて、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germany に寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 <IGF - 1 R> HUMAB - クローン 18 及び <IGF - 1 R> HUMAB - クローン 22 から得ることができる。

【 0 1 1 7 】

本発明で有用な他の適切な抗 IGF - 1 R 抗体は、例えば、全長ヒト IgG₁ mAb シクツムマブ (cixutumumab) / IMC - A12 (Burtrum et al., Cancer Res 63, 8912 -21 (2003); Rowinsky et al., Clin Cancer Res 13, 5549s-5555s (2007) に記載)、全長ヒト IgG₁ mAb AMG - 479 (Beltran et al., Mol Cancer Ther 8, 1095-1105 (2009); Tolcher et al., J Clin Oncol 27, 5800-7 (2009) に記載)、ヒト化 IgG₁ mAb MK - 0646 / h7C10 (Goetsch et al., Int J Cancer 113, 316-28 (2005); Broussas et al., Int J Cancer 124, 2281-93 (2009); Hidalgo et al., J Clin Oncol 26, abstract 3520 (2008); Atzori et al., J Clin Oncol 26, abstract 3582 (2008); Moreau et al., Blood 110, abstract 1166 (2007); Maloney et al., Cancer Res 63, 5073-83 (2003) に記載)、全長ヒト IgG₂ mAb フィギツムマブ / CP - 751、871 (Cohen et al., Clin Cancer Res 11, 2063-73 (2005); Haluska et al., Clin Cancer Res 13, 5834-40 (2007); Lacy et al., J Clin Oncol 26, 3196-203 (2008); Gualberto & Karp, Clin Lung Cancer 10, 273-80 (2009)、全長ヒト IgG₁ mAb SCH 50

- 7 1 7 4 5 4 (国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 6 2 5 7 号又はKolb et al., *Pediatr Blood Cancer* 50, 1190-7 (2008)に記載)、2 . 1 3 . 2 . m A b (米国特許第 7 0 3 7 4 9 8 号 (国際公開第 2 0 0 2 / 0 5 3 5 9 6 号)に記載)、又は全長ヒト Ig G₄ m A b B I I B 0 2 2 である。

【 0 1 1 8 】

本発明で有用な特定の抗 C E A 抗体は、マウス P R 1 A 3 抗体の結合特異性を有する、ヒト化された、Ig G クラスの抗体である (Richman and Bodmer, *Int J Cancer* 39, 317 -328 (1987))。特に有用であるのは、

a) 重鎖可変ドメインに、配列番号 1 0 8 の C D R 1 、配列番号 1 0 9 の C D R 2 、及び配列番号 1 1 0 の C D R 3 、及び

b) 軽鎖可変ドメインに、配列番号 1 1 1 の C D R 1 、配列番号 1 1 2 の C D R 2 、及び配列番号 1 1 3 の C D R 3 ；

を含む、ヒト化された、Ig G クラスの抗 C E A 抗体である。

【 0 1 1 9 】

本発明において有用である、より特定の抗 C E A 抗体は、配列番号 1 1 4 の重鎖可変ドメイン、及び配列番号 1 1 5 の軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 1 2 0 】

そのような抗 C E A 抗体は、その全体が出典明示によりここに援用される P C T 公開番号 W O 2 0 1 1 / 0 2 3 7 8 7 に記載されている。

【 0 1 2 1 】

本発明で有用な特定の抗 H E R 3 抗体は、ヒト化された、Ig G クラスの抗体、例えば、M a b 2 0 5 . 1 0 . 1 、M a b 2 0 5 . 1 0 . 2 、及び M a b 2 0 5 . 1 0 . 3 、特に M a b 2 0 5 . 1 0 . 2 で、P C T 公開番号 W O 2 0 1 1 / 0 7 6 6 8 3 に記載されているものである。特に有用であるのは、

a) 重鎖可変ドメインに、配列番号 1 3 9 の C D R 1 、配列番号 1 4 0 の C D R 2 、及び配列番号 1 4 1 の C D R 3 、及び

b) 軽鎖可変ドメインに、配列番号 1 4 3 の C D R 1 、配列番号 1 4 4 の C D R 2 、及び配列番号 1 4 5 の C D R 3 ；

を含む、ヒト化された、Ig G クラスの抗 H E R 3 抗体である。

【 0 1 2 2 】

本発明において有用である、より特定の抗 H E R 3 抗体は、配列番号 1 4 2 の重鎖可変ドメイン、及び配列番号 1 4 6 の軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 1 2 3 】

本発明で有用な特定の抗 C D C P 1 - 抗体は、P C T 公開番号 W O 2 0 1 1 / 0 2 3 3 8 9 に記載されているような、C U B 4 抗体 (寄託番号 D S M A C C 2 5 5 1 (D S M Z) から誘導される、ヒト化された Ig G クラスの抗体である。

【 0 1 2 4 】

本発明で使用可能な例示的な抗 M C S P 抗体は、例えば欧州特許出願番号 E P 1 1 1 7 8 3 9 3 . 2 号に記載されている。特に有用であるのは、

a) 重鎖可変ドメインに、配列番号 1 1 6 の C D R 1 、配列番号 1 1 7 の C D R 2 、及び配列番号 1 1 8 の C D R 3 、及び

b) 軽鎖可変ドメインに、配列番号 1 1 9 の C D R 1 、配列番号 1 2 0 の C D R 2 、及び配列番号 1 2 1 の C D R 3 ；

を含む、ヒト化された、Ig G クラスの抗 M C S P 抗体である。

【 0 1 2 5 】

本発明において有用である、より特定の抗 M C S P 抗体は、配列番号 1 2 2 の重鎖可変ドメイン、及び配列番号 1 2 3 の軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 1 2 6 】

一実施態様において、抗体は、Ig G クラスの完全長抗体である。特定の実施態様において、抗体は Ig G₁ 抗体である。一実施態様において、抗体は、ヒト F c 領域、より具

10

20

30

40

50

体的にはヒト Ig G の Fc 領域、最も具体的にはヒト Ig G₁ の Fc 領域を含む。上述される、抗 IgF - 1 R、抗 EGFR 及び抗 CD20 抗体など、本発明に有用な抗体は、配列番号 124 に記載される、ヒト Ig ガンマ - 1 重鎖定常領域を含み得る（すなわち、抗体はヒト Ig G₁ サブクラスである）。

【0127】

本発明で有用な抗体は、対応する非操作抗体と比較して、増加したエフェクター機能を有するように操作されている。一実施態様において、増加したエフェクター機能を有するように操作された抗体は、対応する非操作抗体と比較して、少なくとも 2 倍、少なくとも 10 倍、又は少なくとも 100 倍増加したエフェクター機能を有する。増加したエフェクター機能には、限定されるものではないが、一又は複数の次の特徴：増加した Fc 受容体結合性、増加した C1q 結合性及び補体依存性細胞傷害（CDC）、増加した抗体 - 依存性細胞 - 媒介性細胞傷害（ADCC）、増加した抗体 - 依存性細胞ファゴサイトーシス（ADCP）、増加したサイトカイン分泌性、抗原提示細胞による増加した免疫複合体 - 媒介性抗原の取込、増加した NK 細胞への結合性、増加したマクロファージへの結合性、増加した単球への結合性、増加した多形核細胞への結合性、増加した直接的シグナル伝達誘発性アポトーシス、増加した標的結合抗体の架橋性、増加した樹状細胞の成熟、又は増加した T 細胞プライミングが含まれる。

【0128】

一実施態様において、増加したエフェクター機能は、増加した Fc 受容体結合性、増加した CDC、増加した ADCC、増加した ADCP、及び増加したサイトカイン分泌性の群から選択される、一又は複数のものである。一実施態様において、増加したエフェクター機能は、増加した活性化 Fc 受容体への結合である。このような実施態様において、活性化 Fc 受容体は、Fc RI IIa、Fc RI、及び Fc R I Ia の群から選択される。一実施態様において、活性化 Fc 受容体は Fc RI IIa、特にヒト Fc RI IIa である。他の実施態様において、増加したエフェクター機能は増加した ADCC である。このような実施態様において、ADCC は、対応する非操作抗体により媒介される ADCC と比較して、少なくとも 10 倍、特に少なくとも 100 倍に増加している。他の実施態様において、増加したエフェクター機能は、活性化 Fc 受容体への結合性、及び増加した ADCC である。

【0129】

増加したエフェクター機能は、当業者に周知の方法によって測定することができる。ADCC を測定するのに適したアッセイが本明細書に記載されている。目的の分子の ADCC 活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例は、米国特許第 5,500,362 号 : Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 及び Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); 米国特許第 5,821,337 号 ; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987) に記述されている。あるいは、非放射性アッセイ法（例えば、フローサイトメトリーのための ACTITM 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）を参照）を用いることができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血单核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。あるいは、又は更に、目的の分子の ADCC 活性は、例えば Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998) に開示される動物モデルにおいてインビオで評価することができる。Fc 受容体への結合は、例えば、BIAcore 装置（GE ヘルスケア）など標準的な計測機器を使用して E L I S A によって又は表面プラズモン共鳴（SPR）によって容易に決定することができ、そのような Fc 受容体は、組換え発現によって得ることができる。特定の実施態様によれば、活性化 Fc 受容体への結合親和性は、25 で BIA CORE（登録商標）T100 装置（GE Healthcare）を使用して表面プラズモン共鳴によって測定される。代わりに、Fc 受容体

10

20

30

40

50

に対する抗体の結合親和性は、特定の Fc 受容体を発現することが知られている細胞株、例えば Fc I II Ia 受容体を発現する NK 細胞などを使用して評価することができる。抗体が C1q に結合することができそれ故に CDC 活性を有するかを決定するために C1q 結合アッセイを実施することができる。例えば、国際公開第 2006/029879 号及び国際公開第 2005/100402 号の C1q 及び C3c 結合 ELISA を参照。補体活性化を評価するために、CDC アッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); 及び Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)）。

【0130】

増加したエフェクター機能は、例えば、Fc 領域の糖鎖操作から、又は抗体のFc 領域のアミノ酸の変異の導入から生じ得る。一実施態様において、抗体は、そのFc 領域において一以上のアミノ酸変異の導入によって操作される。特定の実施態様において、アミノ酸の変異とはアミノ酸置換である。さらなる特定の実施態様において、アミノ酸置換は、Fc 領域の 298、333、及び / 又は 334 位に存在する（残基の EU 番号付け）。更に適切なアミノ酸変異は、例えば Shields et al., J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001)；米国特許第 6737056 号；国際公開第 2004/063351 号及び国際公開第 2004/099249 号に記載されている。変異 Fc 領域は、当該技術でよく知られている遺伝的又は化学的方法を使用し、アミノ酸を欠失、置換、挿入又は修飾することにより調製することができる。遺伝的方法は、コードする DNA 配列、PCR、遺伝子合成等の部位特異的変異誘発を含むことができる。正確なヌクレオチド変化は、例えば配列決定によって検証することができる。10

【0131】

別の実施態様において、抗体は、Fc 領域におけるグリコシル化の修飾により操作される。特定の実施態様において、抗体は、非操作抗体と比較して、Fc 領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。抗体のFc 領域において非フコシル化オリゴ糖の割合が増加することで、抗体のエフェクター機能、特に ADCD が増加する。20

【0132】

更に特定の実施態様において、抗体のFc 領域におけるN結合オリゴ糖の、少なくとも約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、又は約 100%、好ましくは少なくとも約 50%、より好ましくは約 70% が、非フコシル化型である。非フコシル化オリゴ糖はハイブリッド又は複合型であってよい。30

【0133】

他の特定の実施態様において、抗体は、非操作抗体と比較して、Fc 領域における二分岐オリゴ糖の割合が増加するように操作されている。更に特定の実施態様において、抗体のFc 領域におけるN結合オリゴ糖の、少なくとも約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、又は約 100%、好ましくは少なくとも約 50%、より好ましくは少なくとも約 70% が二分岐である。二分岐オリゴ糖はハイブリッド又は複合型であってよい。40

【0134】

さらなる他の特定の実施態様において、抗体は、非操作抗体と比較して、Fc 領域における二分岐の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加するように操作されている。更に特定の実施態様において、抗体のFc 領域におけるN結合オリゴ糖の、約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、又は約 100%、好ましくは少なくとも約 15%、より好ましくは少なくとも約 25%、少なくとも約 35%、又は少なくとも約 50% が、二分岐の非フコシル化である。二分岐の非フコシル化オリゴ糖はハイブリッド又は複合型であってよい。50

【0135】

Fcドメイン中のオリゴ糖構造は、当該分野で周知の方法によって、例えばUmana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)又はFerrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)で説明したように、MALDI TOF質量分析法により分析することができる。非フコシル化オリゴ糖のパーセンテージは、Asn297に結合した全てのオリゴ糖に対する、フコース酸基を欠くオリゴ糖の量であり（例えば、複合した、ハイブリッドの高マンノース構造）、MALDI TOF MSにより、N-グルコシダーゼF処理されたサンプルにおいて同定される。Asn297は、Fc領域においてほぼ297位に位置するアスパラギン残基を意味する（Fc領域残基のEU番号付け）が；抗体中の小さな配列変化のために、Asn297は、297位のほぼ±3アミノ酸の上流又は下流、すなわち294～300位に位置していてもよい。二分歧、又は二分歧の非フコシル化オリゴ糖のパーセンテージは、同様に決定される。
10

【0136】

一実施態様において、抗体は、非操作抗体と比較して、Fc領域にてグリコシル化が修飾され、一又は複数のグリコシルトランスクレオチドに活性が変化した宿主細胞で抗体が生成されるように操作されている。グリコシルトランスクレオチドには、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスクレオチド(GnTⅡ)、(1,4)-ガラクトシルトランスクレオチド(GalT)、(1,2)-N-アセチルグルコサミニルトランスクレオチド(GnTⅠ)、(1,2)-N-アセチルグルコサミニルトランスクレオチド(GnTⅡ)及び(1,6)-フコシルトランスクレオチドが含まれる。特定の実施態様において、抗体は、増加した(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスクレオチド(GnTⅡ)活性を有する宿主細胞に抗体を生成させることにより、非操作抗体と比較して、Fc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。更に特定の実施態様において、宿主細胞は、付加的に、増加した-マンノシダーゼⅡ(ManⅡ)活性を有する。本発明に有用な抗体を操作するために使用可能な糖鎖工学法は、その全内容が出典明示によりここに援用される、Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Ferrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006); 国際公開第99/54342号(米国特許第6602684号; 欧州特許出願公開第10711700号); 国際公開第2004/065540号(米国特許第2004/0241817号; 欧州特許出願公開第1587921号)、国際公開第03/011878号(米国特許第2003/0175884号)に更に詳細に記載されている。この方法を使用して糖鎖操作された抗体は、本明細書ではGlycoMabと称する。
20

一般に、ここで論議される細胞株を含む、任意の種類の培養された細胞株は、変化したグリコシル化パターンを有する抗TNCA2抗体を生成するための細胞株の作製に使用することができる。特定の細胞株には、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、又はハイブリドーマ細胞、及び他の哺乳動物細胞が含まれる。特定の実施態様において、宿主細胞は、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスクレオチド(GnTⅡ)活性を有する以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように操作されている。特定の実施態様において、宿主細胞は、-マンノシダーゼⅡ(ManⅡ)活性を有する以上のポリペプチドの増加したレベルを発現するように更に操作されている。特定の実施態様において、GnTⅡ活性を有するポリペプチドは、異種性ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメイン及びGnTⅡの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。特に、前記ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼⅡのゴルジ局在化ドメインである。このような融合ポリペプチドを生成し、増加したエフェクター機能を有する抗体を産生するためにそれらを使用するための方法はFerrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006)及び国際公開第2004/065540号に開示され、その内容全体が参照により本明細書に援用される。
30

【0137】

本発明で有用な抗体のコード化配列、及び／又はグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのコード化配列を有し、生物学的に活性な遺伝子生成物を発現する宿主細胞は、例えばDNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション；「マーカー」遺伝子機能の存在又は不在；宿主細胞における、それぞれのmRNA転写の発現により測定される場合の転写レベルの評価；又はイムノアッセイ又はその生物活性により測定される場合の、遺伝子生成物の検出で、当該技術でよく知られている方法により同定可能である。GnTI II 又はMan II 活性は、例えば、GnTI II 又はMan II の生合成産物に結合するレクチンを用いることによって検出することができる。そのようなレクチンの例は二分するGalcNAcを含むオリゴ糖に優先的に結合するE₄-PHAレクチンである。GnTI II 又はMan II 活性を有するポリペプチドの生合成産物（すなわち、特定のオリゴ糖構造）はまた、前記ポリペプチドを発現する細胞により生産される糖タンパク質から遊離されたオリゴ糖の質量分析によって検出することができる。あるいは、GnTI II 又はMan II 活性を有するポリペプチドを用いて操作された細胞により生成された抗体で媒介される、増加したエフェクター機能、例えば増加したFc受容体結合性を測定する機能アッセイを使用してもよい。
10

【0138】

他の実施態様において、抗体は、低下した(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する宿主細胞に抗体を生成させることにより、非操作抗体と比較して、Fc領域に増加した割合の非フコシル化オリゴ糖を有するように操作される。低下した(1,6)-フコシルトランスフェラーゼを有する宿主細胞は、(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子が破壊又は不活性化された、例えばノックアウトされた細胞であってよい(Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng 87, 614 (2004); Kanda et al., Biotechnol Bioeng, 94(4), 680-688 (2006); Niwa et al., J Immunol Methods 306, 151-160 (2006)を参照)。

20

【0139】

脱フコシル化(defucosylated)抗体を生成可能な細胞株の他の例には、タンパク質フコシル化におけるLec13 CHO細胞欠失(Ripka et al., Arch Biochem Biophys 249, 533-545 (1986); 米国特許第2003/0157108号; 及び国際公開第2004/056312号、特に実施例11)が含まれる。本発明で有用な抗体は、例えば、抗体生成に使用される宿主細胞における、GDP-フコーストランスポーターランパク質の活性を減少させ又は無効にすることにより、欧州特許出願公開第1176195A1号、国際公開第03/084570号、国際公開第03/085119号、及び米国特許第2003/0115614号、同2004/093621号、同2004/110282号、同2004/110704号、同2004/132140号、米国特許第6946292号(Kyowa)に開示されている技術に従い、Fc領域におけるフコース残基を低減させるように糖鎖操作することができる。

30

【0140】

本発明で有用な糖鎖操作された抗体は、修飾された糖タンパク質を生成する発現システムにても生成可能であり、例えば国際公開第03/056914号(GlycoFi, Inc.)又は国際公開第2004/057002号及び国際公開第2004/024927号(Greenovation)に教示されている。

40

【0141】

組換え方法

本発明で有用な抗体及びイムノコンジュゲートを生成する方法は、当該技術でよく知られており、例えば国際公開第2012/146628号、国際公開第2005/044859号、国際公開第2006/082515号、国際公開第2008/017963号、国際公開第2005/005635号、国際公開第2008/077546号、国際公開第2011/023787号、国際公開第2011/076683号、国際公開第2011/023389号、及び国際公開第2006/100582号に開示されている。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を生成するための確立された方法も、例えば、Ha
50

Row and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されている。

【0142】

天然に生じない抗体又はその断片は、固相ペプチド合成を使用して構築することができ、組換え的に生成することもでき（例えば、米国特許第4,816,567号に記載）、又は可変重鎖及び可変軽鎖を有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（例えば、米国特許第5,969,108号、McCafertry）得ることができる。本発明で有用なイムノコンジュゲート及び抗体を組換え生成するために、該イムノコンジュゲート又は抗体をコードする一又は複数のポリヌクレオチド（複数）を単離し、宿主細胞において更にクリーニングし及び／又は発現させるために、一又は複数のベクターに挿入する。このようなポリヌクレオチドは、一般的な手順を使用して容易に単離され配列決定されうる。当業者によく知られている方法を使用し、適切な転写／翻訳コントロールシグナルと共に、抗体又はイムノコンジュゲートのコード化配列を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、インピトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインピボ組換え／遺伝的組換えを含む。例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)に記載される技術を参照。

10

【0143】

本発明で有用なイムノコンジュゲートは、全イムノコンジュゲートをコードする单一のポリヌクレオチドから、又は共発現される複数（例えば、2又はそれ以上）のポリヌクレオチドから発現され得る。共発現するポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段を介して結合し、機能性イムノコンジュゲートを形成している。例えば、抗体の軽鎖部分は、抗体の重鎖部分とエフェクター部分を含むイムノコンジュゲートの一部からの、別々のポリヌクレオチドによってコードされてもよい。共発現されたとき、重鎖ポリペプチドが軽鎖ポリペプチドと会合し、抗体を形成する。

20

【0144】

組換えタンパク質の複製及び発現の補助に好適な宿主細胞は当分野でよく知られている。このような細胞は、適切である場合、特定の発現ベクターを用いて形質移入又は形質導入されてよく、多量のベクター含有細胞は、例えば臨床用途に、十分な量のタンパク質を得るために、大規模発酵槽に播種して増殖させることができる。好適な宿主細胞は、原核生物微生物、例えば大腸菌、又は様々な真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞などを含む。例えば、組換えタンパク質は、特にグリコシリ化が必要でない場合、細菌中に生成させてもよい。発現後、タンパク質は可溶化フラクションにおいて、細菌細胞ペーストから単離され、更に精製することもできる。原核生物に加え、真核微生物、例えば糸状菌又は酵母は、グリコシリ化経路が「ヒト化」されている真菌及び酵母株を含む、タンパク質 - コード化ベクターに対する適切なクローニング又は発現宿主であり、部分的又は全長ヒトグリコシリ化パターンを有するタンパク質の生成をもたらす。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006)を参照。（グリコシリ化）タンパク質の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株が同定され、これらは特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組合せて使用することができる。植物細胞培養を宿主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、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号及び第6,417,429号（トランスジェニック植物における抗体産生に関するPLANT IBODIESTM技術を記載）を参照。脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞の他の例は、SV40により形質転換したサル腎臓CV1系（C

30

40

50

O S - 7) ; ヒト胎児腎臓 (H E K) 系 (例えば、Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)) に記載されているような 2 9 3 又は 2 9 3 T 細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (B H K) 、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 T M 4 細胞) 、サル腎臓細胞 (C V 1) 、アフリカミドリザル腎臓細胞 (V E R O - 7 6) 、ヒト子宮頸癌細胞 (H E L A) 、イヌ腎臓細胞 (M D C K) 、バッファローラット肝臓細胞 (B R L 3 A) 、ヒト肺細胞 (W 1 3 8) 、ヒト肝臓細胞 (H e p G 2) 、マウス乳房腫瘍細胞 (M M T 0 6 0 5 6 2) 、 T R I 細胞 (例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982) に記載) 、 M R C 5 細胞、及び F S 4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、 d h f r - C H O 細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞 (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)) ；及び骨髄腫細胞株、例えば Y O 、 N S 0 、 P 3 X 6 3 及び S p 2 / 0 が含まれる。タンパク質生成に適したある種の哺乳動物宿主細胞の概説について、例えば Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, 248巻 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 頁255-268 (2003) を参照。宿主細胞は、培養細胞、例えば、哺乳動物の培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞、また、トランスジェニック生物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織に含まれる細胞を含む。一実施態様において、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、ヒト胎児腎臓 (H E K) 2 9 3 細胞、又はリンパ球系細胞 (例えば、 Y 0 、 N S 0 、 S p 2 0 細胞) である。

【 0 1 4 5 】

抗体及びイムノコンジュゲートがヒト使用を意図している場合、抗体又は抗原結合部分のキメラ形態が使用されてよく、ここで抗体定常領域はヒトからのものである。ヒト化又は完全ヒト形態の抗体がまた、当分野でよく知られている方法に従って調製されうる (例えば Winter の米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号を参照) 。ヒト化は、様々な方法によって達成することができ、限定されながら、(a) 非ヒト (例えば、ドナー抗体) の C D R を、重要なフレームワーク残基 (例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体の機能を維持するために重要であるもの) の保持を伴うか又は伴わない、ヒト (例えば、レシピエント抗体) のフレームワーク領域及び定常領域の上に移植する、(b) 非ヒト特異性決定領域 (S D R 又は a - C D R ; 抗体 - 抗原相互作用に重要な残基) のみを移植ヒトフレームワーク領域及び定常領域上に移植する、又は (c) 非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってヒト様部分 (section) で「覆い隠す」。ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に総説され、更に、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989) ; 米国特許第 5 , 5 , 8 2 1 , 3 3 7 号、第 7 , 5 2 7 , 7 9 1 号、第 6 , 9 8 2 , 3 2 1 号、及び第 7 , 0 8 7 , 4 0 9 号; Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 31(3):169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (S D R (a - C D R) グラフティングを記述) ; Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記述) ; Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「 F R シャッフリング」を記述) ; 及び Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 及び Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (F R シャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述) に記載されている。ヒト抗体及びヒト可変領域は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的に van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に記載されている。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法によって作製されたヒトモノクローナル抗体の一部を形成することができ、それに由来することができる (例えば、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 頁51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) を参照) 。ヒト抗体及びヒト可変領域は、抗原チャレンジに応答して、インタ 10 20 30 40 50

クトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変され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調製することができる（例えば、Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)を参照）。ヒト抗体及びヒト可変領域はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラーから選択された F v クローン可変領域配列を単離することによって生成することができる（例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); 及びMcCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)）。ファージは典型的には、抗体断片を短鎖 F v (s c F v) 断片として又は F ab 断片としてディスプレイする。

【0146】

10

ある実施態様において、本発明で有用な抗体は、例えば、その全内容が出典明示によりここに援用される、米国特許第 2004 / 0132066 号に開示されている方法に従い、高められた結合親和性を有するように操作されている。特定の抗原決定基に結合する本発明において有用な抗体の能力は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) 又は当業者によく知られている他の技術、例えば表面プラズモン共鳴技術 (BIACORE T100 システムで解析される) (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) 及び伝統的な結合アッセイ (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)) のいずれかによって測定することができる。

【0147】

20

本明細書で記載のように調製される抗体及びイムノコンジュゲートは、当分野で知られている技術、例えば高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティーコロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等によって精製されうる。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、一部には正味荷電、疎水性、親水性等の要因に依存し、当業者に明瞭であろう。

【0148】

薬学的組成物

30

別の態様において、本発明は、薬学的に許容可能な担体中に、(a) 低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び (b) 増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体を含む薬学的組成物を提供する。これらの薬学的組成物は、例えば以下に記載する任意の治療方法に使用することができる。

【0149】

本明細書で記載されたように、増加したエフェクター機能を有する抗体とイムノコンジュゲートの薬学的組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態に、一又は複数の任意の薬学的に許容可能な担体と、所望の純度を有する抗体とこののようなイムノコンジュゲートを混合することによって調製される (Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, Mack Printing Company (1990))。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量及び濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；及び m - クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；マンノサッカライド、ジサッカライド、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn - タンパク質錯体）；及び / 又はポリエチレングリコール (PEG) 等の非

40

50

イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体には、更に、間質薬剤分散剤、例えば可溶性の中性 - 活性化ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (S H A S E G P) 、例えばヒト可溶性 PH - 20 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば r H u P H 2 0 (H Y L E N E X (登録商標) 、 Baxter International, Inc.) が含まれる。r H u P H 2 0 を含む、ある例示的な S H A S E G P 及び使用方法は、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 1 8 6 号及び同 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8 号に記載されている。一態様において、S H A S E G P は、コンドロイチナーゼなどの 1 つ又は複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わされる。

【 0 1 5 0 】

例示的な凍結乾燥製剤は、米国特許第 6 2 6 7 9 5 8 号に記載されている。水性製剤は 10 、米国特許第 6 1 7 1 5 8 6 号及び国際公開第 2 0 0 6 / 0 4 4 9 0 8 号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン - 酢酸緩衝液を含む。

【 0 1 5 1 】

本明細書において、薬学的組成物は、治療される特定の兆候に必要な付加的な活性成分、特に互いに悪影響を与えない相補活性を有するものを、更に含有してよい。例えば、治療すべき疾患が癌である場合、1つ又は複数の抗癌剤、例えば、化学療法剤は、腫瘍細胞の増殖の阻害剤、又は腫瘍細胞のアポトーシスの活性化剤などを更に提供するのが望まれ得る。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わされ適切に存在する。

【 0 1 5 2 】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ (メチルメタクリレート (methylmethacrylate)) マイクロカプセル) により、コロイド薬物送達系で (例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル) 又はマクロ・エマルジョンで調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, Mack Printing Company (1990) に開示されている。

【 0 1 5 3 】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが含まれ、このマトリックスは成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。

【 0 1 5 4 】

インビボ投与に使用される組成物は、一般に滅菌されてる。滅菌は、例えば滅菌濾過膜を介して濾過することにより、容易に達成される。

【 0 1 5 5 】

治療の方法

本明細書において提供される、(a) 低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び (b) 増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せが、治療方法において使用され得る。

【 0 1 5 6 】

一態様において、医薬として使用のための、(a) 低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び (b) 増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せが提供される。更なる態様において、疾患の治療において使用のための、(a) 低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び (b) 增加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せが提供される。ある実施態様において、治療の方法において使用のための、(a) 低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び (b) 增加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体 50

の組合せが提供される。ある実施態様において、本発明は、組合せの治療的有効量を、個体に投与することを含む、疾患に罹患している個体を治療する方法に使用するための、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組み合せを提供する。このような一実施態様において、本方法は、以下に記載するような、少なくとも一つの付加的な治療的有効量を、個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本発明は、エフェクター細胞機能の刺激に使用するための、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを提供する。ある実施態様において、本発明は、エフェクター細胞機能を刺激するために、有効量の組合せを個体に投与することを含む、個体のエフェクター細胞機能を刺激する方法に使用するための、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組み合せを提供する。上述した任意の実施態様の「個体」は、哺乳動物、特にヒトである。上述した任意の実施態様の「疾患」は、エフェクター細胞機能の刺激により治療可能な疾患である。ある実施態様において、疾患は細胞増殖性疾患、特に癌である。10

【0157】

更なる態様において、本発明は、医薬の製造又は調製における、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の使用を提供する。一実施態様において、医薬は疾患を治療するためのものである。さらなる実施態様において、医薬は、治療的有効量の医薬を、疾患に罹患している個体に投与することを含む、疾患を治療する方法において使用するためのものである。このような一実施態様において、本方法は、以下に記載するような、少なくとも一つの付加的な治療的有効量を、個体に投与することを更に含む。さらなる実施態様において、医薬は、エフェクター細胞機能を刺激するためのものである。さらなる実施態様において、医薬は、エフェクター細胞機能を刺激するために、医薬的有効量、個体に投与することを含む、個体のエフェクター細胞機能を刺激する方法に使用されるものである。上述した任意の実施態様の「個体」は、哺乳動物、特にヒトである。上述した任意の実施態様の「疾患」は、エフェクター細胞機能の刺激により治療可能な疾患である。ある実施態様において、疾患は細胞増殖性疾患、特に癌である。20

【0158】

更なる態様において、本発明は疾患を治療する方法を提供する。一実施態様において、本方法は、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを、治療的有効量、このような疾患に罹患している個体に投与することを含む。このような一実施態様において、本方法は、以下に記載するような、少なくとも1つの付加的な治療剤を治療的有効量、個体に投与することを更に含む。上述した任意の実施態様の「個体」は、哺乳動物、特にヒトである。上述した任意の実施態様の「疾患」は、エフェクター細胞機能の刺激により治療可能な疾患である。ある実施態様において、疾患は細胞増殖性疾患、特に癌である。30

【0159】

更なる態様において、本発明は、個体におけるエフェクター細胞機能を刺激する方法を提供する。一実施態様において、本方法は、エフェクター細胞機能を刺激するために、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せを有効量、個体に投与することを含む。一実施態様において、「個体」は哺乳動物、特にヒトである。

【0160】

50

更なる態様において、本発明は、例えば上述した治療方法のいずれかに使用するための、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せの何れかを含む、薬学的組成物を提供する。一実施態様において、薬学的組成物は、本明細書に提供される、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体の組合せ、及び薬学的に許容可能な担体を含有する。他の実施態様において、薬学的組成物は、例えば以下に記載するような、少なくとも1つの付加的な治療剤と、ここで提供される任意の組合せを含有する。

10

【0161】

上述した任意の実施態様によれば、疾患は、エフェクター細胞機能を刺激することにより治療可能な疾患である。本発明の組合せは、疾患の治療に有用であり、宿主の免疫系の刺激により、特に細胞免疫反応を高めることが所望される病状において有効である。これらには、宿主免疫反応は不十分又は欠失している病状も含まれる。本発明の組合せを投与可能な病状は、細胞免疫反応が特定の免疫に対して重要なメカニズムである、腫瘍又は肝炎を含む。本発明の組合せを使用可能な特定の病状には、癌、特に腎細胞癌又はメラノーマ；特にHIV-ポジティブの患者における免疫不全、免疫抑制された患者、慢性感染症が含まれる。ある実施態様において、疾患は細胞増殖性疾患である。特定の実施態様において、疾患は癌、特に肺癌、結腸直腸癌、腎癌、前立腺癌、乳癌、頭部及び頸部の癌、卵巣癌、脳癌、リンパ腫、白血病、皮膚癌からなる群から選択される癌である。

20

【0162】

本発明の組合せは、治療において、単独で、又は他の薬剤と共に使用することができる。例えば、本発明の組合せは、少なくとも一つの付加的な治療剤と同時投与されてよい。ある実施態様において、付加的な治療剤は抗癌剤、例えば化学療法剤、腫瘍細胞増殖のインヒビター、又は腫瘍細胞アポトーシスのアクチベーターである。

【0163】

ここで提供される併用療法は、抗体とイムノコンジュゲートと一緒に投与すること(2又はそれ以上の治療剤が、同じ又は別々の処方剤に含有されている場合)、又は抗体の投与が、イムノコンジュゲート、付加的な治療剤、及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又は後に生じるケースでは別々に投与することを含む。また、本発明の組合せは、放射線療法と併用することもできる。

30

【0164】

本発明の組合せ(及び任意の付加的な治療剤)は、非経口、肺内、及び経鼻による投与、局所的治療が所望されている場合は、病巣内投与が可能である。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。抗体及びイムノコンジュゲートは、同じ又は違う経路で投与されてよい。投与は、短期間又は慢性的であるかどうかに部分的に依存して、任意の適切な経路、例えば注射、特に静脈又は皮下注射とすることができる。限定されるものではないが、種々の時点での单一又は複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含む、種々の投与スケジュールが、ここで考慮される。

40

【0165】

本発明の組合せは、良好な医療行為に矛盾しない方式で、処方、服用、及び投与されるであろう。ここで考慮される要因は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、患者個体の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医者に公知の他の要因が含まれる。組合せが、必要ではないが、場合によっては当該問題の疾患を予防又は治療するのに現在使用されている一又は複数の薬剤と共に処方されてもよい。このような他の薬剤の有効量は、製剤に存在する抗体及びイムノコンジュゲートの量、疾患又は治療の種類、及び上述にて論議した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用

50

量及び任意の経路により使用される。

【0166】

疾患の予防又は治療のために、(場合によっては、一又は複数の他の付加的な治療剤との併用で使用される場合)抗体及びイムノコンジュゲートの適切な投薬量は、治療される疾患のタイプ、抗体及びイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重篤度及び経過、組合せが予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、事前治療、患者の臨床病歴及び抗体及び/又はイムノコンジュゲートに対する応答性、及び担当医師の裁量に依存する。抗体及びイムノコンジュゲートは一度に又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。

【0167】

疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連續注入によるかに関わらず、抗体の約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ から 15 mg/kg (例えば 0.1 mg/kg から 10 mg/kg)が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ から 100 mg/kg 又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約 0.05 mg/kg から約 10 mg/kg の範囲である。従って、約 0.5 mg/kg 、 2.0 mg/kg 、 4.0 mg/kg 又は 10 mg/kg の1つ以上の用量(又はこれらの何れかの組合せ)を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎(例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けるように)投与してよい。初期の高負荷用量の後、1つ以上の低用量を投与してよい。例示的投与レジメンは、抗体の約 4 mg/kg の初期負荷投与量の後、約 2 mg/kg の毎週の維持用量を投与することを含む。投与に関して、同じ考慮が、本発明の組合せに使用されるイムノコンジュゲートにも適用される。しかしながら、他の投与レジメンも有益であり得る。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【0168】

製造品

本発明の他の態様では、上述の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、一又は複数の容器、及び容器上又はそれに付随したラベル又はパッケージ挿入物を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成されてもよい。容器は、組成物自体、又は病状の治療、予防及び/又は診断に有効な他の組成物と組合せて収容され、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってもよい)。組成物中の少なくとも一の活性剤は、本発明の組合せに使用される抗体である。他の活性剤は、本発明の組合せに使用されるイムノコンジュゲートであり、抗体と同じ組成物及び容器に存在していてよく、又は異なる組成物及び容器において提供されてもよい。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択した症状の治療のために使用されることを示している。

【0169】

一態様において、本発明は、(a)低下したエフェクター機能を有するように操作された第一抗体と、エフェクター部分を含むイムノコンジュゲート、及び(b)増加したエフェクター機能を有するように操作された第二抗体を、同じ又は別々の容器に収容し、及び任意で、(c)疾患を治療するための方法として、併用治療の使用を指示する印刷された使用説明書を含むパッケージ挿入物を更に含む、疾患を治療することを意図したキットを提供する。更に、キットは、(a)増加したエフェクター機能を有するように操作された抗体を含有する組成物を収容する第1の容器；(b)少なくとも一つの抗原結合部分とエフェクター部分を含むイムノコンジュゲートを含有する組成物を収容する第2の容器；及び場合によっては(c)更に細胞傷害剤又は他の治療剤を含有する組成物を収容する第3の容器を具備していてよい。本発明のこの実施態様のキットは、組成物が、特定の病状を治療するのに使用可能であることを示したパッケージ挿入物を更に含んでいてよい。代替

10

20

30

40

50

的に、又は付加的に、キットは、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば注射用の静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を収容する第3（又は第4）の容器を更に具備していてもよい。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見地から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

【实施例】

【 0 1 7 0 】

以下は本発明の方法及び組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

【 0 1 7 1 】

一般的な方法

抗体の Fc 領域の糖鎖操作により、高められた ADCCC 誘発及び抗腫瘍効果に順に翻訳される、ヒト Fc RIII 受容体に対する、結合親和性の増加に至る。ヒト Fc RIII 受容体は、マクロファージ、好中球、及びナチュラルキラー (NK)、樹状細胞及び

T 細胞において発現する。マウスにおいて、前臨床効能を試験するために最も広く利用されている種、マウス Fc R I V、ヒト Fc R I I I a のマウス類似体は、マクロファージ及び好中球に存在するが、NK 細胞には存在しない。よって、糖鎖操作された抗体を用いた任意の予期される改善された効能は、全ての程度ではないが、これらのモデルに反映されている。我々は、血液、リンパ様組織及び腫瘍中のマウス NK 細胞において、安定したヒト CD 16 a 発現を示す、ヒト Fc R I I I a (CD 16 a) に対してトランスジェニックなマウスを作製した。更に、これらのトランスジェニックマウスの血液中の、刺激していない NK 細胞における、ヒト CD 16 a の発現レベルは、ヒトにおいて見出されたものに類似している。また、我々は、抗体治療を抗腫瘍活性と相互に関連させた後、腫瘍結合 NK 細胞のヒト Fc R I I I a のダウンレギュレーションを示した。最後に、我々は、この新規のマウス株を使用した腫瘍モデルにおいて、それらのヒト CD 16 - ネガティブ同腹仔と比較して、糖鎖操作された抗体治療によりかなり改善された効能が示されることを示した。

【 0 1 7 2 】

実施例 1

F a D u 頭頸部癌異種移植モデル

I L - 2 四重突然変異体 (q m) を含む F A P 標的 2 8 H 1 I g G - I L 2 及び非標的 D P 4 7 G S I g G - I L 2 イムノコンジュゲート (それぞれ、配列番号 1 2 5 、 1 2 6 、 1 2 9 、及び配列番号 1 3 3 - 1 3 5) 及び抗 E G F R G l y c o M a b (配列番号 1 0 2 及び 1 0 3) を、 S C I D マウスの舌の内部に注射されたヒト頭頸部癌細胞株 F a D u において試験した。

【 0 1 7 3 】

この腫瘍モデルは、新鮮な凍結組織の IHC により、FAP に対してポジティブであることが示された。FaDu 細胞は元々 ATCC (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション) から入手し、増殖後 Glycarrt 内部細胞バンクに寄託されたものである。腫瘍細胞株は、5% CO₂ で水飽和した大気中、37°で、10% FCS (Gibco) を含有する DMEM 中で常套的に培養された。95.8% 生存率のインビトロ継代 9 を舌内注射用に使用した。20 μl の細胞懸濁液 (AIMV 培地 (Gibco)) に 2×10^5 FaDu 細胞) が舌内に注射された。実験の開始時に 8 - 9 週齢であったメスの SCID マウス (Taconics, Denmark) を、認定されたガイドライン (GV-Solas; Felasa; Tiersch G) に従い、特定の病原体が無い条件下、12 時間明所 / 12 時間暗所の 1 日のサイクルで維持した。実験の調査プロトコルは、地方自治体により調査され承認された (P2008016)。動物は、到着後、新環境への馴致と観察のために一週間保管された。連続的な健康のモニタリングを定期的に実施した。マウスに、 2×10^5 の FaDu 細胞を、試験の 0 日目に舌内注射し、無作為化し、計量した。腫瘍細胞注射の 1 週間後、マウスに、28H1 IgG - IL2 qm イムノコンジュゲート、DP47GS IgG - IL2 qm イムノコンジュゲート、抗 EGFR Glycarrt Mab、28H1 IgG - IL2 qm

mイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せ、又はDP47GS IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せを、週に1回で4週間、静脈注射した。全てのマウスは200μlの適切な溶液を静脈注射された。投与量は表2に明記されている。ビヒクル群のマウスにはPBSを注射し、処置群には28H1 IgG - IL2 qmイムノコンジュゲート、DP47GS IgG - IL2 qmイムノコンジュゲート、抗EGFR Glycomab、28H1 IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せ、又はDP47GS IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せを注射した。200μlあたりの適切なる量のイムノコンジュゲートを得るために、原液は必要な場合にPBSで希釈された。図1Aには、FAP標的28H1 IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組み合せが、28H1 IgG - IL2 qmイムノコンジュゲート又は抗EGFR Glycomab単独と比較して、高められた生存期間中央値において、優れた有効性を媒介することが示されている。これとは対照的に、非標的DP47GS IgG - IL2 qmと抗EGFR Glycomabの組合せは、単剤投与への優位性を示さなかった(図1B)。

【0174】

表2

化合物	用量/マウス	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
抗-EGFR Glycomab	625 μg	20 mM His/HisCl 240 mM トレハロース 0.02% ポリソルベート 80 10 mM メチオニン pH 5.5	26.65 (= 原液)
FAP 28H1 IgG-IL2 qm	50 μg	20 mM ヒスチジン, 140 mM NaCl, pH 6.0	3.46 (= 原液)
非標的DP47GS IgG-IL2 qm	50 μg	20 mM ヒスチジン, 140 mM NaCl, pH 6.0	5.87 (= 原液)

【0175】

実施例2

IL-2イムノコンジュゲートによるNK細胞の殺傷能力のインピトロ増強

NK細胞におけるイムノコンジュゲートの効果を測定するために、我々は、イムノコンジュゲート、特にエフェクター部分としてIL-2を含むイムノコンジュゲートを用いた処理時における、腫瘍細胞の死滅性を評価する。この目的のために、末梢血単核細胞(PBMC)を、Histopaque-1077(Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO, USA)を使用して、標準的な手順に従い単離した。簡単には、静脈血が健常なボランティアからヘパリン化シリンジで採取された。カルシウム又はマグネシウムを含有しないPBSを用いて、血液を2:1に希釈し、Histopaque-1077上に層化させた。中断することなく、室温(RT)で30分、450×gで、勾配を遠心分離した。PBMCを含有する中間相を收集し、全体で3回(350×g、続いて300×gを、RTで10分)、PBSで洗浄した。

【0176】

単離されたPBMCを、細胞上清に添加されたIL-2(プロロイキン(Proleukin))又はIL-2イムノコンジュゲートと共に、45時間インキュベートした。続いて、PBMCを回収し、10:1のE:Tにて4時間、A549細胞の抗EGFR GlycoMab - 媒介性ADCに使用した。標的細胞の死滅を細胞上清へのLDHの放出を測定することにより検出した(Roche Cytotoxicity Detection Kit LDH)。図2は、種々の濃

10

20

30

40

50

度の抗EGFR G1yc oMabの存在下にて、0.57nM(A)又は5.7nM(B)のFAP-標的28H1 IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート又はIL-2(プロロイキン)により前処理した又はしていないPBM Cによる、全体的なA549腫瘍細胞の死滅を示す。グラフは、エフェクター細胞のイムノコンジュゲートによる前処置が、未処置のエフェクター細胞と比較して、G1yc oMabの濃度の増加に伴って標的細胞の死滅を大きく増加させる結果をもたらすことを示している。

【0177】

実施例3

LS174T結腸直腸異種移植モデル

CEA標的CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート(配列番号136-138)、抗EGFR G1yc oMab(配列番号102及び103)及びセツキシマブを、SCID-ヒトFc RIIIトランスジェニックマウスに脾臓内注射された、ヒト結腸直腸LS174T細胞株において試験した。この腫瘍モデルは、新鮮な凍結組織状で、IHCにより、CEAに対してポジティブであることが示された。LS174T細胞(ヒト結腸癌細胞)は、元々ECA CCC(細胞培養の欧州コレクション)から得、増殖後にG1ycartの内部細胞バンクに寄託されたものである。LS174Tを、10%のFCS(PAA Laboratories, Austria)、1%のグルタマックス、及び1%のMEM非必須アミノ酸(Sigma)を含有するMEMイーグルにて培養した。その細胞を、5%のCO₂で水飽和した大気中、37°で培養させた。99%の生存率で、インビトロ継代19又は23を脾臓内注射用に使用した。麻酔されたSCID Fc RIIIトランスジェニックマウスの左腹部に、小さな切込を入れた。30マイクロリットルの細胞懸濁液(Aim V培地に2×10⁶のLS174T細胞)を、脾臓の囊の真下に腹壁を通して注射した。クランプ又は分解可能な縫合糸使用し、皮膚創傷を閉じた。実験の開始時に8-9週齢であったメスのSCID Fc RIIIトランスジェニックマウス(Taconics, Denmarkから購入)を、認定されたガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従い、特定の病原体が無い条件下、12時間明所/12時間暗所の1日サイクルで維持した。実験の調査プロトコルは、地方自治体により調査され承認された(P2008016、P2011/128)。動物は、到着後、新環境への馴致と観察のために1週間保管された。連続的な健康のモニタリングを定期的に実施した。マウスに、2×10⁶のLS174T細胞を、試験の0日目に脾臓内注射し、無作為化し、計量した。腫瘍細胞注射の1週間後、マウスに、CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート、抗EGFR G1yc oMab、セツキシマブ、CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR G1yc oMabの組合せ、又はCH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せを、週に1回で3週間、静脈注射した。全てのマウスは200μlの適切な溶液を静脈注射された。投与量は表3に明記されている。ビヒクル群のマウスにはPBSを注射し、処置群にはCH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート、又は抗EGFR G1yc oMab、セツキシマブ、CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR G1yc oMabの組合せ、又はCH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せを注射した。200μlあたりの適切なる量のイムノコンジュゲートを得るために、原液は必要な場合にPBSで希釈された。図3及び表3Aと3Bには、CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR G1yc oMabの組み合せが、CH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲート単独、抗EGFR G1yc oMab単独、セツキシマブ単独、又はCH1A1A IgG-IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せと比較して、高められた生存期間中央値及び全生存期間において、優れた有効性を媒介することが示されている。

【0178】

表3

化合物	用量／マウス	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
抗-EGFR Glycomab	500 μ g	20 mM His/HisCl 240 mM トレハロース 0.02% Tween 20 pH 6.0	25.3 (= 原液)
CH1A1A IgG-IL2 qm	40 μ g (図3A) 又は20 μ g (図3B)	20 mM ヒスチジン, 140 mM NaCl, pH 6.0	4.27 (= 原液)
セツキシマブ	500 μ g	10 mM クエン酸Na, NaCl, グリシン, Tween 80, pH 5.5	4.36 (= 原液)

10

表3A. 図3Aに対応する生存データの概要

処置	生存期間の 中央値 (日数)	全生存期間
ビヒクル	24	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm	33	0/8
抗-EGFR Glycomab	40	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm + 抗-EGFR GlycoMab	141	3/8

20

表3B. 図3Bに対応する生存データの概要

処置	生存期間の 中央値 (日数)	全生存期間
ビヒクル	29	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm	35	0/8
セツキシマブ	39	0/8
CH1A1A IgG-IL2 qm + セツキシマブ	53 (継続中)	2/8 (継続中)

30

【0179】

実施例 4

A 5 4 9 肺異種移植モデル

C E A 標的 C H 1 A 1 A I g G - I L 2 q m イムノコンジュゲート (配列番号 1 3 6 - 1 3 8)、抗 E G F R G l y c o M a b (配列番号 1 0 2 及び 1 0 3)及びセツキシマブを、 S C I D - ヒト F c R I I I トランスジェニックマウスに静脈内注射された、ヒト N S C L C 細胞株 A 5 4 9 において試験した。

40

【0180】

A 5 4 9 非小細胞肺癌細胞は、元々 A T C C (C C L - 1 8 5)から入手され、増殖後に G l y c a r t の内部細胞バンクに寄託されたものである。腫瘍細胞株は、5 % C O ₂で水飽和した大気中、37°で、10 % F C S (Gibco)を含有する D M E M 中で常套的に培養された。97 - 98 % 生存率の継代 8 を移植用に使用した。動物あたり 5 × 1 0 ⁶ 細胞を、200 μ l の A i m V 細胞培養培地 (Gibco) 中で尾部静脈に静脈注射した。

50

【0181】

実験の開始時に8-9週齢であったメスのSCID-Fc RIIIマウス (Roche-Glycart; Switzerland) を、認定されたガイドライン (GV-Solas; Felasa; TierschG) に従い、特定の病原体が無い条件下、12時間明所 / 12時間暗所の1日サイクルで維持した。実験の調査プロトコルは、地方自治体により調査され承認された (P 2011/128)。動物は、到着後、新環境への馴致と観察のために1週間保管された。連続的な健康のモニタリングを定期的に実施した。

【0182】

マウスに、 5×10^6 のA549細胞を、試験の0日目に静脈注射し、無作為化し、計量した。腫瘍細胞注射の1週間後 (図4A) 又は2週間後 (図4B) 、マウスに、CH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲート、抗EGFR Glycomab、セツキシマブ、CH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せ、又はCH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せを、週に1回で3週間、静脈注射した。全てのマウスは $200 \mu l$ の適切な溶液を静脈注射された。投与量は表4に明記されている。ビヒクル群のマウスにはPBSを注射し、処置群にはCH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲート、抗EGFR Glycomab、CH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組合せ、又はCH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せを注射した。 $200 \mu l$ あたりの適切な量のイムノコンジュゲートを得るために、原液は必要な場合にPBSで希釈した。

【0183】

図4及び表4Aと4Bには、CH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートと抗EGFR Glycomabの組み合せが、該イムノコンジュゲート、抗EGFR Glycomab又はセツキシマブ単独、並びに、CH1A1A IgG - IL2 qmイムノコンジュゲートとセツキシマブの組合せと比較して、高められた生存期間中央値及び全生存期間において、優れた有効性を媒介することが示されている。

【0184】

表4

化合物	用量	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
CH1A1A IgG-IL2 qm	$20 \mu g$	20mM ヒスチジン, 140mM NaCl, pH6.0	4.27 (= 原液)
抗-EGFR Glycomab	$500 \mu g$	20 mM His/HisCl, 240 mM トレハロース, 0.02% Tween 20, pH 6.0	25.3 (= 原液)
セツキシマブ	$500 \mu g$	10 mM クエン酸Na, NaCl, グリシン, Tween 80, pH 5.5	4.36 (= 原液)

10

20

30

40

表4A. 図4Aに対応する生存データの概要

処置	生存期間の中央値(日数)	全生存期間
ビヒクル	53	0/9
CH1A1A IgG-IL2 qm	103	0/9
抗-EGFR Glycomab	211	2/9
CH1A1A IgG-IL2 qm + 抗-EGFR GlycoMab	到達せず	9/9

10

表4B. 図4Bに対応する生存データの概要

処置	生存期間の中央値(日数)	全生存期間
ビヒクル	49	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm	64	0/10
セツキシマブ	68	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm + セツキシマブ	91	0/10

20

【0185】

実施例5

L S 1 7 4 T 結腸直腸異種移植モデル

C E A 標的 C H 1 A 1 A I g G - I L 2 q m イムノコンジュゲート(配列番号 1 3 6 - 1 3 8)及び抗 H E R 3 G l y c o M a b (配列番号 1 4 2 及び 1 4 6)を、 S C I D - ヒト F c R I I I トランスジェニックマウスに脾臓内注射された、ヒト結腸直腸 L S 1 7 4 T 細胞株において試験した。

30

【0186】

L S 1 7 4 T 細胞(ヒト結腸癌細胞)は、元々 E C A C C (細胞培養の欧洲コレクション)から入手し、増殖後に R o c h e - G l y c a r t の内部細胞バンクに寄託されたものである。L S 1 7 4 T 細胞を、10%の F C S (PAA Laboratories, Austria)、1%のグルタマックス、及び1%の M E M 非必須アミノ酸(S i g m a)を含有する M E M イーグルにて培養した。細胞を、5%の C O ₂ で水飽和した大気中、37° で培養した。97.9% 生存率のインビトロ継代 21 を脾臓内注射用に使用した。麻酔された S C I D - ヒト F c R I I I トランスジェニックマウスの左腹部に、小さな切込を入れた。30マイクロリットルの細胞懸濁液(A i m V 培地に 2 × 1 0 ⁶ の L S 1 7 4 T 細胞)を、脾臓の囊の真下に腹壁を通して注射した。分解可能な縫合糸を使用して、皮膚創傷を閉じた。

40

【0187】

実験の開始時に 8 - 9 週齢であったメスの S C I D - ヒト F c R I I I トランスジェニックマウス(Roche-Glycart, Switzerland)を、認定されたガイドライン(GV-Solas ; Felasa; TierschG)に従い、特定の病原体が無い条件下、12時間明所 / 12時間暗所の1日サイクルで維持した。実験の調査プロトコルは、地方自治体により調査され承認された(P 2 0 1 1 / 1 2 8)。動物は、到着後、新環境への馴致と観察のために1週間保管された。連続的な健康のモニタリングを定期的に実施した。

【0188】

マウスに、2 × 1 0 ⁶ の L S 1 7 4 T 細胞を、試験の0日目に脾臓内注射し、無作為化して計量した。腫瘍細胞注射の1週間後、マウスに、C H 1 A 1 A I g G - I L 2 q m

50

イムノコンジュゲート、抗HER3 GlycoMab、又はCH1A1A IgG-IL2 qm イムノコンジュゲートと抗HER3 GlycoMabの組合せを、週に1回で3週間、静脈注射した。

【0189】

全てのマウスは200 μlの適切な溶液を静脈注射された。投与量は表5に明記されている。

ビヒクル群のマウスにはPBSを注射し、処置群にはCH1A1A IgG-IL2 qm イムノコンジュゲート、抗Her3 GlycoMab、又はCH1A1A IgG-IL2 qm イムノコンジュゲートと抗Her3 GlycoMabとの組合せを注射した。200 μlあたりの適切なる量のイムノコンジュゲートを得るために、原液は必要な場合に PBSで希釈された。図5及び表5Aには、CH1A1A IgG-IL2 qm イムノコンジュゲートと抗HER3 GlycoMabの組み合せが、CH1A1A IgG-IL2 qm イムノコンジュゲート又は抗HER3 GlycoMab単独と比較して、高められた生存期間中央値において、優れた有効性を媒介することが示されている。

【0190】

表5

化合物	用量	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
抗-Her3 GlycoMab	200 μg		10.0 (= 原液)
CH1A1A IgG-IL2 qm	20 μg	20 mM ヒスチジン, 140 mM NaCl, pH6.0	13.60 (= 原液)

10

20

表5A. 図5に対応する生存データの概要

処置	生存期間の 中央値 (日数)	全生存期間
ビヒクル	24	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm	25	0/10
抗-Her3 GlycoMab	27	0/10
CH1A1A IgG-IL2 qm + 抗-Her3 GlycoMab	34	0/10

30

【0191】

実施例 6

A CHN 腎臓癌異種移植モデル

IL-2 四重変異体 (qm) を含むFAP標的28H1 IgG-IL2 イムノコンジュゲート (配列番号125、126及び129) 及び抗EGFR GlycoMab (配列番号102及び103) を、SCID-ヒトFc RIIIトランスジェニックマウスに腎臓内注射された、ヒト腎細胞株A CHNにおいて試験した。

40

【0192】

A CHN 細胞 (ヒト腎臓癌細胞) は元々 ATCC (アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション) から入手し、増殖後 Roche-Glycart 内部細胞バンクに寄託されたものである。A CHN は、10% FCSを含有するD MEM 中で培養された。細胞を、5%のCO₂で水飽和した大気中、37°で培養した。96.4% 生存率のインピットロ継代22を腎臓内注射用に使用した。麻酔されたSCID-ヒトFc RIIIトランスジェニックマウスの右脇腹と腹膜壁に、小さな切込 (2 cm) を入れた。50 μlの細胞懸濁液 (AimV 培地中に 1×10^6 のA CHN) が、腎臓に被膜下2 mmに注射された

50

。分解可能な縫合糸使用して、皮膚創傷と腹膜壁を閉じた。

【0193】

実験の開始時に8-9週齢であったメスのSCID-HITFc RIIIトランシスジェニックマウス(Roche-Glycart, Switzerland)を、認定されたガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従い、特定の病原体が無い条件下、12時間明所/12時間暗所の1日サイクルで維持した。実験の調査プロトコルは、地方自治体により調査され承認された(P 2011/128)。動物は、到着後、新環境への馴致と観察のために1週間保管された。連続的な健康のモニタリングを定期的に実施した。

【0194】

マウスに、 1×10^6 のACHN細胞を、試験の0日目に腎臓内注射し、無作為化し、計量した。腫瘍細胞注射後1週間で、マウスは、ビヒクル、抗EGF-Glycomab、28H1 IgG-IL2イムノコンジュゲートと抗EGFR-Glycomabの組合せ、又はプロロイキン(登録商標)と抗EGFR-Glycomabの組合せを静脈注射された。EGFR-Glycomab及び28H1 IgG-IL2イムノコンジュゲートは、3週間、週1回投与された。プロロイキン(登録商標)は3週間月曜から金曜まで毎日注射された。

10

【0195】

全てのマウスは $200 \mu\text{l}$ の適切な溶液を静脈注射された。投与量は表6に明記されている。ビヒクル群のマウスはPBSを注射され、処置群は、抗EGF-Glycomab、28H1 IgG-IL2イムノコンジュゲートと抗EGFR-Glycomabの組合せ、又はプロロイキン(登録商標)と抗EGFR-Glycomabの組合せを静脈注射された。 $200 \mu\text{l}$ あたりの適切なる量のイムノコンジュゲートを得るために、原液は必要な場合にPBSで希釈された。

20

【0196】

図6及び表6Aは、28H1 IgG-IL2イムノコンジュゲートと抗EGFR-Glycomabは、抗EGFR-Glycomab単独及びプロロイキン(登録商標)と抗EGFR-Glycomabの組合せと比較して、高められた生存期間中央値及び全生存期間において、優れた有効性を媒介することを示している。

【0197】

30

表6

化合物	用量	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
抗-EGFR-Glycomab	$625 \mu\text{g}$	20 mM His/HisCl 240 mM トレハロース 0.02% Tween 20, pH 6.0	26.65 (= 原液)
28H1 IgG-IL2	$78 \mu\text{g}$	20mM ヒスチジン, 140mM NaCl, pH6.0	3.46 (= 原液)
プロロイキン(登録商標)	$22.2 \mu\text{g}$		1 (= 原液)

40

表6A. 図6に対応する生存データの概要

処置	生存期間の 中央値 (日数)	全生存期間
ビヒクル	59	0/7
抗-EGFR Glycomab	155	0/7
抗-EGFR GlycoMab + プロロイキン (登録商標)	174	0/7
28H1 IgG-IL2 qm + 抗-EGFR GlycoMab	到達せず	7/7

10

【0198】

実施例 7

IL-2 イムノコンジュゲートによる NK 細胞の殺傷能力並びに CD25 及び CD69 発現のインピトロ増強

実施例 2 にあるように、イムノコンジュゲート、特に、エフェクター部分として IL-2、及び GlycoMab、この場合には抗 HER3 GlycoMab を含むイムノコンジュゲートを用いた処置の際の、NK 細胞による腫瘍細胞 (LS174T) の死滅を評価した。標的細胞の死滅は、細胞上清中の LDH 放出を測定することによって検出された。

20

【0199】

PBMC を、新鮮な血液から単離した。簡潔には、血液は PBS で 3 : 1 に希釀された。血液 / PBS 混合物の約 30 ml が、15 ml の Histopaque (Sigma) の上に積層され、ブレーキなしで 30 分間、450 × g で 30 分間遠心分離された。リンパ球を、5 ml ピペットを用いて PBS を含有する 50 ml のチューブに収集した。チューブは PBS で 50 ml にまで充填され、350 g で 10 分間遠心分離された。上清は廃棄され、ペレットは 50 ml の PBS に再懸濁され、300 g で 10 分間遠心分離された。洗浄工程を 1 回繰り返した。細胞を計数し、1 mlあたり 1×10^6 細胞を有する 10% FCS と 1% グルタミンを含有する予め温められた RPMI に再懸濁した。細胞を 37 度で一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、計数した。

30

【0200】

LS174T (ECACC #87060401) は、ヒト白人結腸腺癌細胞株である。細胞を、1% グルタミン、1% 非必須アミノ酸及び 10% FCS を含有する EMEM 中で培養し、コンフルエンスに到達する前に、2 日から 3 日毎に分割された。LS174T 細胞をトリプシンを用いて剥離した。細胞を計数し、生存率を確認した。アッセイ前の細胞の生存率は 99.4% であった。細胞を 1 mlあたり 0.3×10^6 で、それぞれの培地に再懸濁した。100 μl の細胞懸濁液を 96 ウェル細胞培養処理された平底プレートに播種し、37 度で一晩インキュベートした。翌日、上清を細胞から除去した。次いで、1000 ng / ml、100 ng / ml 及び 10 ng / ml に希釀した抗 HER3 GlycoMab (配列番号 142 及び 146) 又は培地を 50 μl、それぞれのウェルに加えた。次いで示された濃度での CEA 標的 CH1A1A IgG - IL2 qm イムノコンジュゲート (配列番号 136 - 138) (図 7 を参照) 又は培地を 50 μl、ウェル毎に加えた。室温で 10 分間インキュベートした後、1 mlあたり 3×10^6 細胞の PBMC 又は培地 100 μl をウェルあたり 200 μl の最終体積に達するまで加えた。

40

【0201】

細胞をインキュベーター中で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを 400 g で 4 分間遠心分離し、上清を回収した。ウェルあたり 50 μl の上清が、LDH 放出を測定するために使用された (Roche Cytotoxicity Detection Kit LDH)。残りの上清は、次に使用するまで -20 度で保存された。細胞を FACS 緩衝液に再懸濁

50

し、F A C S 染色を開始する前に4で保存した（下記参照）。

【0202】

図7は、抗H E R 3 G l y c o M a b 単独（左パネル）、C H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q mイムノコンジュゲート単独（右パネル）又はC H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q mイムノコンジュゲートと抗H e r 3 G l y c o M a b の組合せ（右パネル）を用いた処置の際の、P B M C による全体的なL S 1 7 4 T 細胞の死滅を示す。

【0203】

P B M C を、24時間後に回収し、N K 細胞のC D 2 5 及びC D 6 9 発現のF A C S 分析のために用いた。細胞を、400gで4分間遠心分離し、0.1% B S A を含むP B S (F A C S 緩衝液)で一回洗浄した。その後、ウェルあたり $20\mu l$ の抗体混合物を細胞に加えた。細胞を、冷蔵庫で30分間インキュベートした。その後、細胞をF A C S 緩衝液で2回洗浄し、ウェルあたり2%のP F A を含むF A C S 緩衝液 $200\mu l$ に再懸濁した。分析は、B D F A C S F o r t e s s a 及び以下の抗体混合物：C D 3 P E / C y 7 (BioLegend, #300420; 1:40希釈)、C D 5 6 A P C (BioLegend #318310; 1:20希釈)、C D 6 9 B r i l l i a n t V i o l e t 4 2 1 (BioLegend #310929; 1:40希釈)、C D 2 5 P E (BD Bioscience #557138; 1:20希釈)を使用して実施された。
10

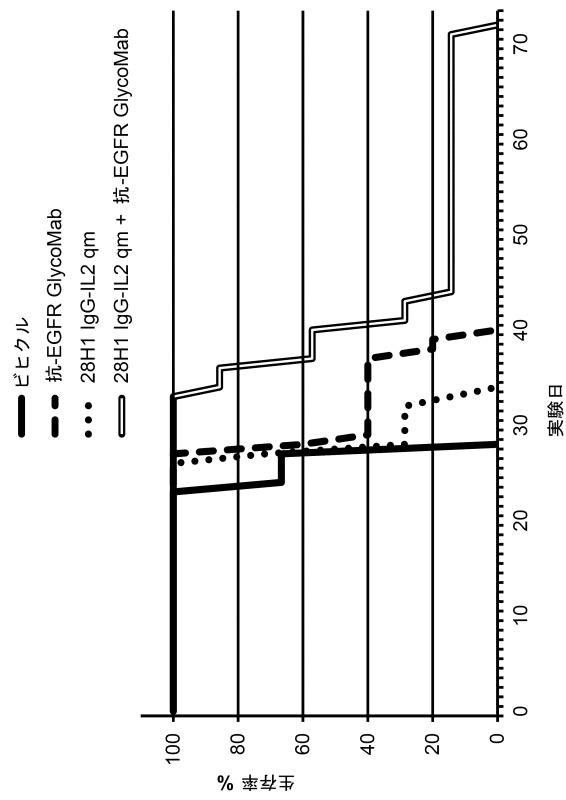
【0204】

図8は、抗H E R 3 G l y c o M a b 単独（左パネル）、C H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q mイムノコンジュゲート単独（右パネル）又はC H 1 A 1 A I g G - I L - 2 q mイムノコンジュゲートと抗H e r 3 G l y c o M a b の組合せ（右パネル）を用いた処置の際の、N K 細胞上でのC D 2 5 (A) 又はC D 6 9 (B) の発現を示す。
20

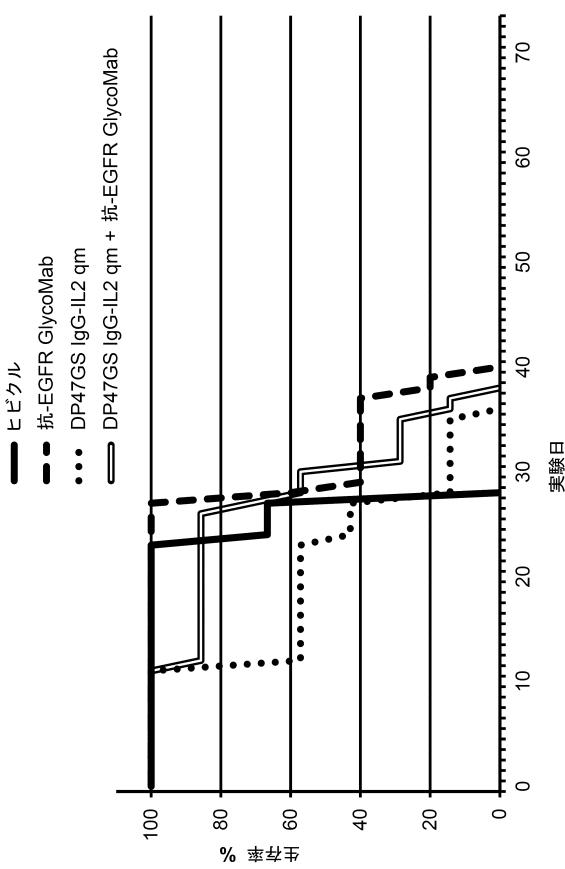
【0205】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示及び実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用された全ての特許及び科学文献の開示はその全体が出典明示により明示的に援用される。

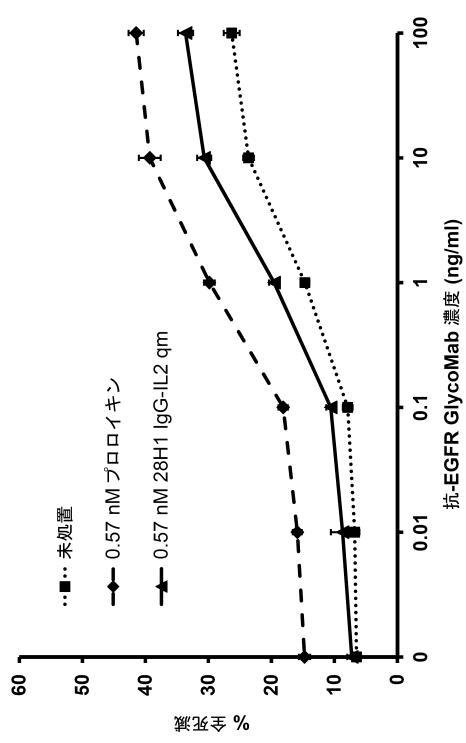
【図1 A】



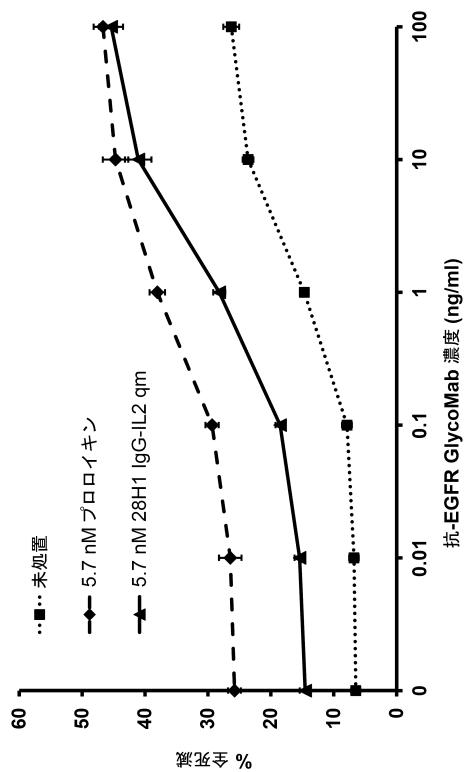
【図1 B】



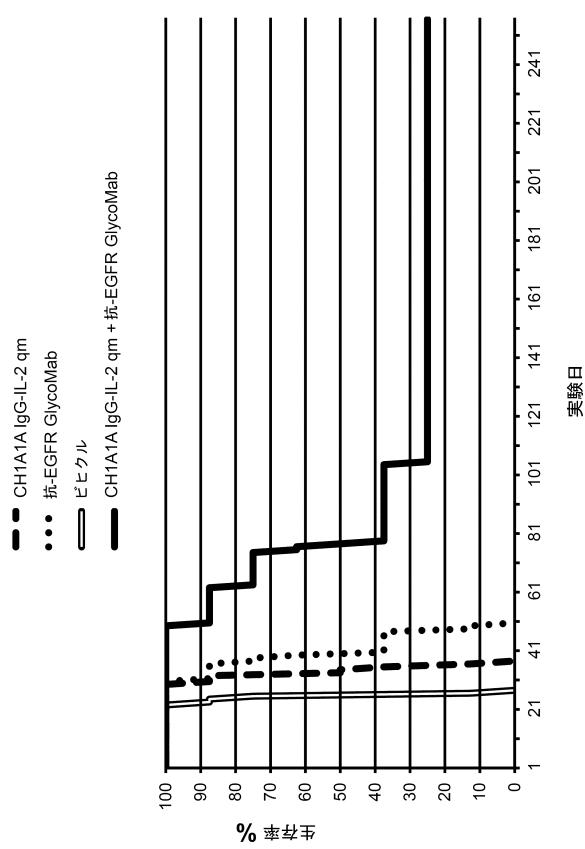
【図2 A】



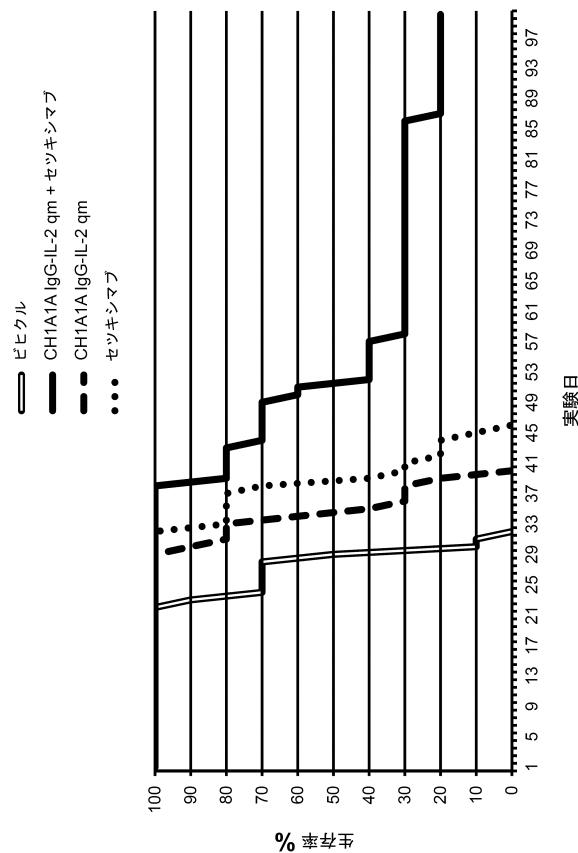
【図2 B】



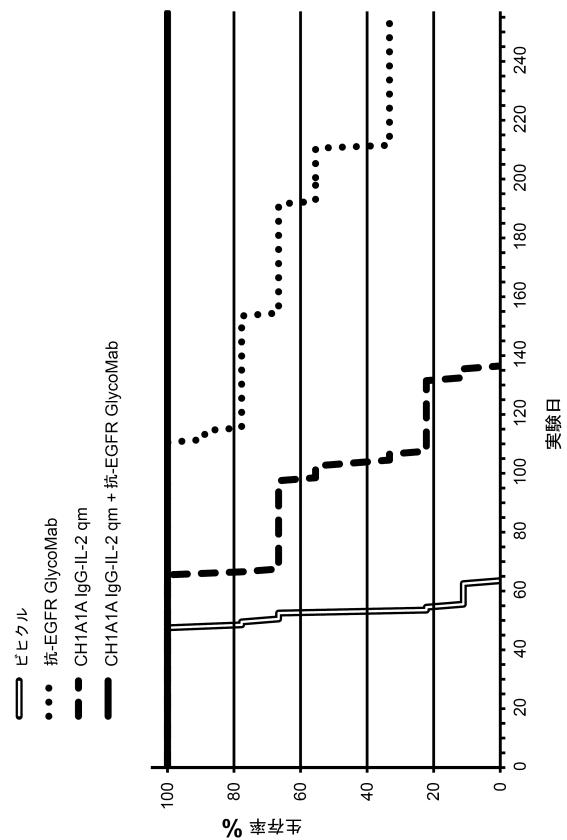
【図3 A】



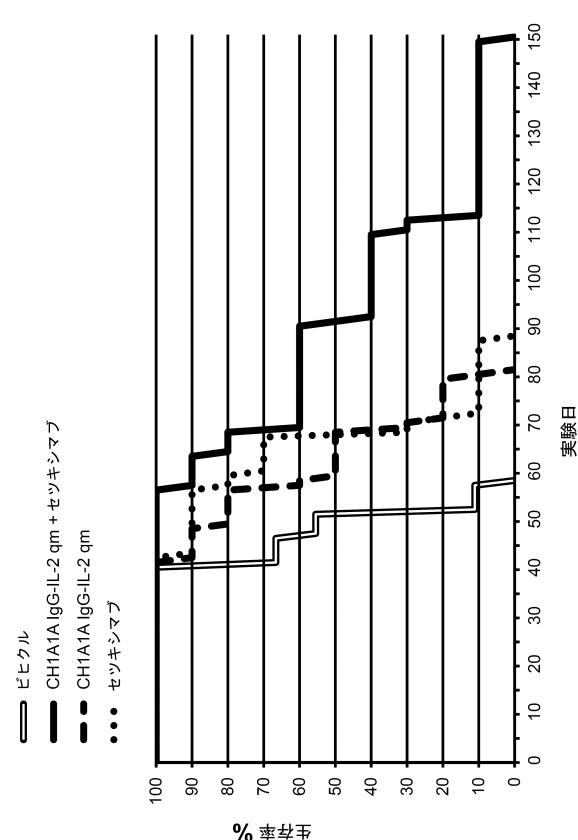
【図3 B】



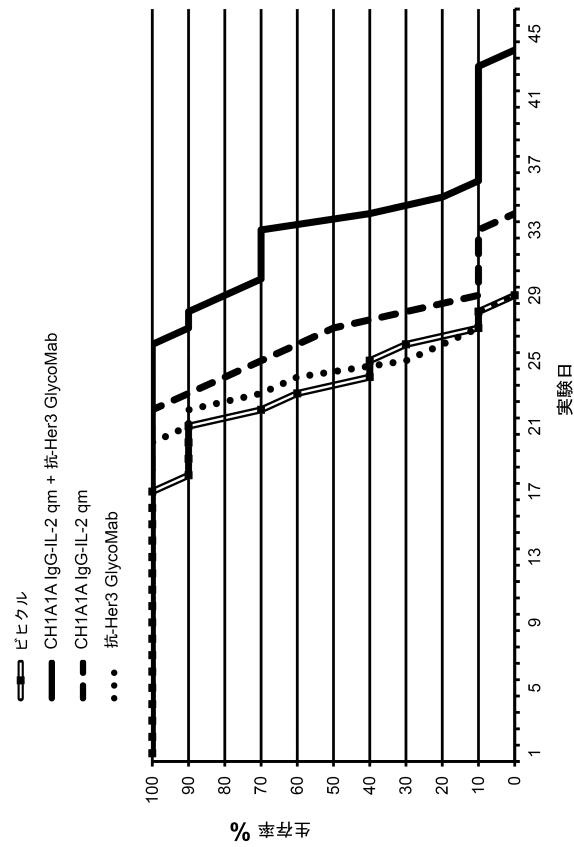
【図4 A】



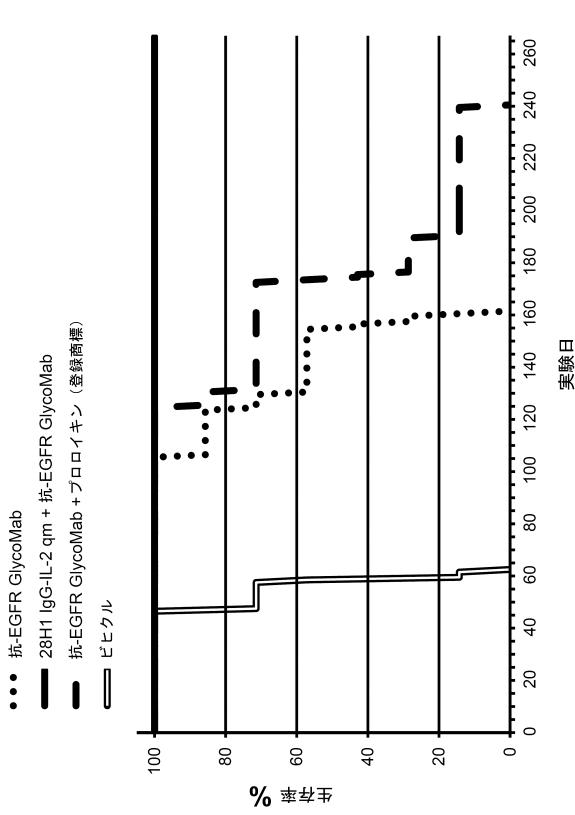
【図4 B】



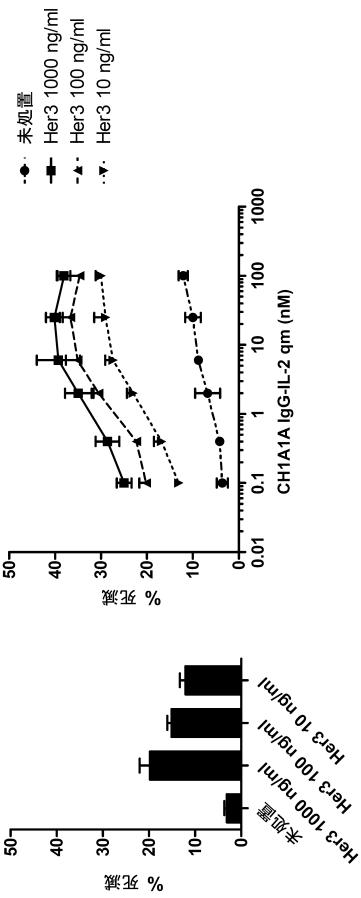
【図5】



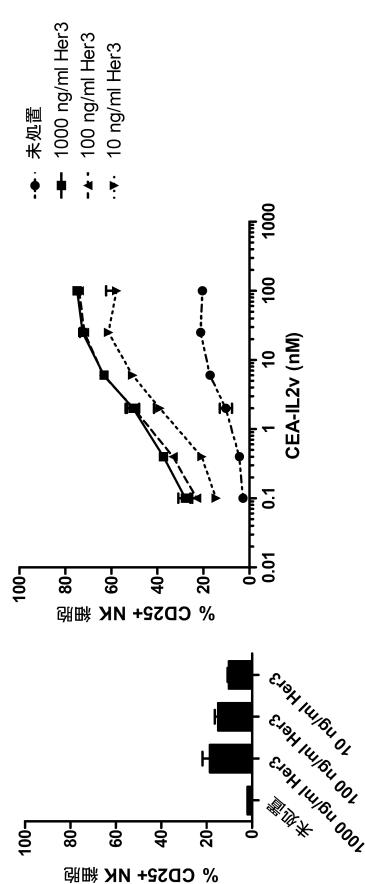
【図6】



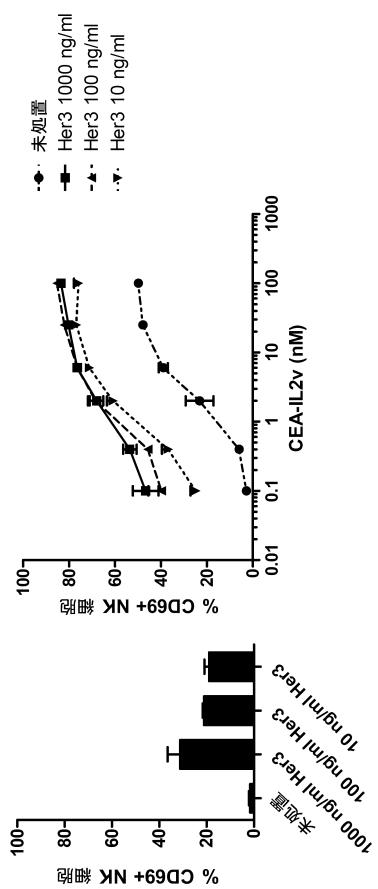
【図7】



【図8 A】



【図 8 B】



【配列表】

0006290209000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 14/55 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/735 (2006.01)	C 0 7 K 14/55
	C 0 7 K 14/735

(72)発明者 ニコリーニ， バレリア へ。

イスス国 ツェーハー - 8703 エルレンバハノチューリッヒ， ザントフェルゼンシュトラーセ 4

(72)発明者 ウマーニヤ， パブロ

イスス国 ツェーハー - 8832 ヴォルララウ， フエルゼンラインシュトラーセ 28

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第2011/001276 (WO, A1)

特表2009-542592 (JP, A)

国際公開第2012/020038 (WO, A1)

国際公開第2012/107416 (WO, A1)

国際公開第2012/146628 (WO, A1)

国際公開第2012/130831 (WO, A1)

国際公開第2011/020783 (WO, A2)

国際公開第2012/020006 (WO, A2)

国際公開第2012/107417 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39 / 395

A 61 P 35 / 00

A 61 P 37 / 04

A 61 P 43 / 00

C 0 7 K 14 / 55

C 0 7 K 14 / 735

C 0 7 K 16 / 18

C 0 7 K 16 / 28

C 0 7 K 19 / 00

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

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