

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-12201

(P2017-12201A)

(43) 公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	

審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 229 頁)

(21) 出願番号	特願2016-201106 (P2016-201106)	(71) 出願人	512069865
(22) 出願日	平成28年10月12日 (2016.10.12)		アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲ
(62) 分割の表示	特願2013-218766 (P2013-218766)		ーエムペーハー
原出願日	平成20年4月3日 (2008.4.3)		ドイツ 8 1 4 7 7 ミュンヘン シュタ
(31) 優先権主張番号	07006990.1	(74) 代理人	100121728
(32) 優先日	平成19年4月3日 (2007.4.3)		弁理士 井関 勝守
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	クファ, ペーター
(31) 優先権主張番号	07006988.5		ドイツ連邦共和国 モースブルク 8 5 3
(32) 優先日	平成19年4月3日 (2007.4.3)		6 8, アムカペレンアッカー 1 3
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ラウム, トビアス
(31) 優先権主張番号	60/913, 668		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 0 2
(32) 優先日	平成19年4月24日 (2007.4.24)		5, ピーンツェナウアーシュトラッセ 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 種間特異的結合ドメイン

(57) 【要約】

【課題】 ヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 3 (イプシロン) 鎖のエピトープと結合する能力を有するヒト結合ドメインを含むポリペプチド、並びに前述のポリペプチドを作製するためのプロセスを提供する。

【解決手段】 このポリペプチドをコードする核酸、それを含むベクター、及びそのベクターを含む宿主細胞。このポリペプチドを含む医薬組成物、及びこのポリペプチドの医学的な使用。ヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 3 ε (C D 3 イプシロン) のエピトープと結合する能力を有する異種間に特異的な結合ドメインを含むポリペプチドを同定するための方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3（イプシロン）のエピトープと結合する能力を有する第一のヒト結合ドメインを含むポリペプチド、並びに前述のポリペプチドを作製するためのプロセスに関する。本発明はさらに、このポリペプチドをコードする核酸、それを含むベクター、及びそのベクターを含む宿主細胞に関する。別の局面では、本発明は、前述のポリペプチドを含む医薬組成物、及びこのポリペプチドの医学的な使用を提供する。

10

【0002】

T細胞認識は、ペプチドMHC（pMHC）のペプチド負荷分子と相互作用する、クローンタイプの分布するアルファベータ及びガンマデルタT細胞レセプター（TcR）により媒介される（Davis & Bjorkman, Nature 334（1988）, 395-402）。TcRの抗原特異的鎖は、シグナリングドメインを持たず、その代わりに保存されたマルチサブユニットシグナル伝達装置CD3に結合する（Call, Cell 111（2002）, 967-979, Alarcon, Immunol. Rev. 191（2003）, 38-46, Malissen Immunol. Rev. 191（2003）, 7-27）。TcRライゲーションがシグナル伝達装置に直接通じる機構は、T細胞生物学の根本的な疑問のままである（Alarcon, 上記引用文献; Davis, Cell 110（2002）, 285-287）。持続したT細胞応答が、コレセプターの関与、TcRオリゴマー化及び免疫シナプス中のTcR-pMHC複合体の高次配列を含むことは明らかである（Davis & van der Merwe, Curr. Biol. 11（2001）, R289-R291, Davis, Nat. Immunol. 4（2003）, 217-224）。しかし、非常に早いTcRシグナル伝達は、これらの事象の非存在下で起こり、CD3イプシロン中のリガンドが誘起するコンフォメーション変化を含むかもしれない（Alarcon, 上記引用文献, Davis（2002）, 上記引用文献, Gil, J. Biol. Chem. 276（2001）, 11174-11179, Gil, Cell 109（2002）, 901-912）。シグナル伝達複合体のイプシロン、ガンマ、デルタ及びゼータサブユニットは互いに会合して、CD3イプシロン-ガンマヘテロダイマー、CD3イプシロン-デルタヘテロダイマー及びCD3ゼータ-ゼータホモダイマーを形成する（Call, 上記引用文献）。様々な研究は、CD3分子がアルファベータTcRの正常な細胞表面発現及び通常のT細胞発達にとって重要であることを明らかにした（Berkhout, J. Biol. Chem. 263（1988）, 8528-8536, Wang, J. Exp. Med. 188（1998）, 1375-1380, Kappes, Curr. Opin. Immunol. 7（1995）, 441-447）。マウスCD3イプシロンガンマヘテロダイマーのエクトドメイン断片の溶液構造は、イプシロンガンマサブユニットが、両方とも、互いに相互作用して異常な側々ダイマーコンフィグレーションを形成するC2セットIgドメインであることを示した（Sun, Cell 105（2001）, 913-923）。システインに富んだ軸は、CD3の二量体化を進めるのに重要な役割を果たすようであるが（Su, 上記引用文献, Borroto, J. Biol. Chem. 273（1998）, 12807-12816）、CD3イプシロン及びCD3ガンマの細胞外ドメインによる相互作用は、これらのタンパク質とTcRベータとの集合に十分である（Manolios, Eur. J. Immunol. 24（1994）, 84-92, Manolios & Li, Immunol. Cell Biol. 73（1995）, 532-536）。未だ議論の的となっているが、TcRの優勢な化学量論は、1つのアルファベータTc

20

30

40

50

R、1つのCD3イプシロンガンマヘテロダイマー、1つのCD3イプシロンデルタヘテロダイマー及び1つのCD3ゼータゼータホモダイマーを含むことが最も可能性がある (Call, 上記引用文献)。免疫応答におけるヒトCD3イプシロンガンマヘテロダイマーの中心的な役割を仮定して、治療抗体OKT3に結合したこの複合体の結晶構造が最近解明された (Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680)。

【0003】

多くの治療戦略は、TCRシグナル伝達を標的にしてT細胞免疫性を調整し、特に免疫抑制領域で臨床的に広く利用されている抗ヒトCD3モノクローナル抗体 (mAb) がある。CD3特異性マウスmAbOKT3は、ヒトへの使用に認可された最初のmAbであり (Sgro, Toxicology 105 (1995), 23-29)、移植 (Chatenoud, Clin. Transplant 7 (1993), 422-430, Chatenoud, Nat. Rev. Immunol. 3 (2003), 123-132, Kumar, Transplant. Proc. 30 (1998), 1351-1352)、1型糖尿病 (Chatenoud (2003), 上記引用文献) 及び乾癬 (Utset, J. Rheumatol. 29 (2002), 1907-1913) における免疫抑制剤として臨床的に広く使用されている。さらに、抗CD3mAbは、部分的なT細胞シグナル伝達及びクローンアネルギーを誘起することがある (Smith, J. Exp. Med. 185 (1997), 1413-1422)。OKT3は、潜在的なT細胞マイトジェン (Van Wauve, J. Immunol. 124 (1980), 2708-18) 並びに潜在的なT細胞キラー (Wong, Transplantation 50 (1990), 683-9) として、文献に記載されてきた。OKT3は、時間依存的にこれらの活性の両方を示す。サイトカイン放出につながるT細胞の早期活性化に続き、さらにOKT3を投与すると、公知のT細胞機能の全てを後に阻害する。同種移植組織拒絶の低減又はさらには全廃のために治療レジメンにおいて免疫抑制剤としてそのような広い用途をOKT3が見いだしたのは、この後期のT細胞機能の阻害による。

【0004】

OKT3は、急性拒絶反応に主要な役割を果たす全てのT細胞の機能を阻害することにより、同種移植組織拒絶を一変させていることが最も確からしい。OKT3は、T細胞 (TCR) の抗原認識構造に関連しシグナル伝達に必須のヒトT細胞の細胞膜中でCD3複合体と反応しその機能を阻害する。TCR/CD3のどのサブユニットがOKT3と結合するかは、多くの研究のテーマであった。TCR/CD3複合体のイプシロンサブユニットに対するOKT3の特異性を指摘したエビデンスもいくつかあった (Tunncliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50; Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680)。さらなるエビデンスは、TCR/CD3複合体とのOKT3の結合には、この複合体の他のサブユニットの存在が必要であることを示している (Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52)。

【0005】

CD3分子に特異的である他の周知の抗体は、Tunncliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50に列記されている。上述のとおり、そのようなCD3特異性抗体は、リンホカイン産生 (VonWussow, J. Immunol. 127 (1981), 1197; Palacios, J. Immunol. 128 (1982), 337)、増殖 (VanWauve, J. Immunol. 124 (1980), 2708-18) 及びサプレッサーT細胞誘起 (Kunicka, in "Lymphocyte Typing II" 1 (1986), 223) などの種々のT細胞応答を誘起することができる。すなわち、実験条件によって、CD3特異性モノクローナル抗体は、細胞障害性を阻害することも、誘起することもできる (Leewenberg, J. Immunol. 134 (1985), 3770; Ph

10

20

30

40

50

illips, J. Immunol. 136 (1986) 1579; Plattsoucas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 4500; Itoh, Cell. Immunol. 108 (1987), 283-96; Mentzer, J. Immunol. 135 (1985), 34; Landegren, J. Exp. Med. 155 (1982), 1579; Choi (2001), Eur. J. Immunol. 31, 94-106; Xu (2000), Cell Immunol. 200, 16-26; Kimball (1995), Transpl. Immunol. 3, 212-221)。

【0006】

当分野に記載されている多くのCD3抗体がCD3複合体のCD3イプシロンサブユニットを認識すると報告されているが、それらのほとんどは、実際は、立体配座エピトープに結合しており、そのためTCRのネイティブコンテキストにおけるCD3イプシロンを認識しているのみである。立体配座エピトープは、一次配列中では分かれているがネイティブタンパク質／抗原中にポリペプチドが折り畳まれる時分子の表面で一緒になる、2つ以上の別々のアミノ酸残基の存在により特徴づけられる (Sela, (1969) Science 166, 1365及びLaver, (1990) Cell 61, 553-6)。当分野に記載されているCD3イプシロン抗体に結合される立体配座エピトープは、2つの群に分けることができる。主要な群では、前記エピトープは、2つのCD3サブユニット、例えばCD3イプシロン鎖及びCD3ガンマ鎖又はCD3デルタ鎖により形成されている。例えば、最も広く使用されているCD3イプシロンモノクローナル抗体OKT3、WT31、UCHT1、7D6及びLeu-4は、CD3イプシロン鎖により単独にトランスフェクトされた細胞には結合しなかったことが複数の研究で見出された。しかし、これらの抗体は、CD3イプシロンとCD3ガンマ又はCD3デルタの組み合わせにより二重にトランスフェクトされた細胞を染色した (Tunncliffe, 上記引用文献; Law, Int. Immunol. 14 (2002), 389-400; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52; Coullie, Eur. J. Immunol. 21 (1991), 1703-9)。第2のより小さな群では、立体配座エピトープは、CD3イプシロンサブユニット自体の中に形成される。この群のメンバーは、例えば変性CD3イプシロンに対して産出されたmAbAPA1/1である (Risueno, Blood 106 (2005), 601-8)。ひとまとめにすると、当分野に記載されているCD3イプシロン抗体のほとんどは、CD3の2つ以上のサブユニット上に位置する立体配座エピトープを認識する。これらのエピトープの三次元構造を形成する別々のアミノ酸残基は、この結果、CD3イプシロンサブユニット自体の上に位置するか、CD3イプシロンサブユニットとCD3ガンマ又はCD3デルタなどの他のCD3サブユニットの上に位置することがある。

【0007】

CD3抗体に関する他の問題は、多くのCD3抗体が種特異的であると見いだされたことである。他のモノクローナル抗体では一般的に正しいとされているとおり、抗CD3モノクローナル抗体は、それらの標的分子の高度に特異的な認識により機能する。それらは、標的CD3分子上の単一の部位又はエピトープのみを認識する。例えば、最も広く使用されキャラクタリゼーションが詳細に行われているCD3複合体に特異的なモノクローナル抗体の1つはOKT3である。この抗体は、チンパンジーのCD3と反応するが、マカクザルなど他の霊長類のCD3ホモログ又はイヌCD3とは反応しない (Sandusky et al., J. Med. Primatol. 15 (1986), 441-451)。抗CD3モノクローナル抗体UCHT1もチンパンジーのCD3とは反応性であるが、マカクザルのCD3とは反応しない (発明者らのデータ)。その一方で、マカクザル抗原を認識するが、そのヒト対応物を認識しないモノクローナル抗体の例もある。この群の1例は、マカクザル由来のCD3を対象とするモノクローナル抗体FN-18である (Udaet al., J. Med. Primatol. 30 (2001), 141-147)。興味深いことに、カニクイザルの約12%の末梢リンパ球が、マカクザル

中のCD3抗原の多形性により、抗アカゲザルCD3モノクローナル抗体（FN-18）との反応性を欠くことが見いだされている。Udaらは、FN-18と反応性である動物から誘導されたCD3と比較し、FN-18と反応性でないカニクイザルのCD3配列中にある2つのアミノ酸の置換を記載した（Uda et al., J Med Primatol. 32 (2003), 105-10; Uda et al., J Med Primatol. 33 (2004), 34-7）。

【0008】

CD3モノクローナル抗体及びその断片に固有のこの識別能力、すなわち種特異性は、ヒトの疾患を治療するための治療薬としての開発には著しい妨げである。市場の認可を得るためには、どの新規薬剤候補も、厳しい試験を通過しなくてはならない。この試験は、前臨床相と臨床相に分けることができる。後者は、一般的に公知の臨床相I、II及びIIIとしてさらに分かれているが、ヒトの患者に実施され、前者は動物に実施される。前臨床試験の目的は、薬剤候補が望まれる活性を持ち、最も重要なことであるが安全であることを証明することである。動物での安全性及び薬剤候補の見込みのある効力が前臨床試験で確立された場合にのみ、その薬剤候補は、それぞれの規制当局によりヒトへの臨床試験を認可されるであろう。以下の3種の方法で、(i) 関連種、すなわち薬剤候補がオルソログ抗原を認識できる種において、(ii) ヒトの抗原を含むトランスジェニック動物において、及び(iii) 動物に存在するオルソログ抗原に結合できる薬剤候補のサロゲートの使用により、薬剤候補の動物での安全性を試験することができる。トランスジェニック動物の限界は、この技術が典型的には齧歯動物に限られることである。齧歯動物と人間の間には生理機能に著しい違いがあり、安全性の結果は容易にヒトに外挿できない。薬剤候補のサロゲートの限界は、実際の薬剤候補に比べて異なる組成物であり、多くの場合使用される動物は先に議論した限界を持つ齧歯動物である。したがって、齧歯動物で作られた前臨床データは、薬剤候補に関して限られた予測力しかない。安全性試験の選択の手法は、関連種、好ましくは下等霊長類の利用である。当分野に記載される人間の治療介入に好適なCD3結合分子の目下の限界は、関連種が高等霊長類、特にチンパンジーであることである。チンパンジーは絶滅危惧種と考えられており、ヒトに似た性質のためそのような動物を薬剤安全性試験に使用することは欧州では禁じられており、他の地域でも非常に制限されている。

【0009】

本発明は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε（イプシロン）鎖のエピトープと結合する能力を有する、好ましくはヒトの結合ドメインを含むポリペプチドに関し、ここで、このエピトープは配列番号2、4、6、又は8から成る群に含まれるアミノ酸配列の一部である。配列番号2、4、6、及び8に示す配列、並びにその機能性断片は、コンテキスト非依存性な（context independent）CD3エピトープである。

【0010】

本発明の利点は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε（イプシロン）鎖に異種間特異性を示す、結合ドメインを含むポリペプチドの提供であり、これは、霊長類におけるこれらの結合ドメインの安全性、活性及び／又は薬物動態学的なプロファイルの前臨床評価のために、且つ理想的な形態ではヒトの薬剤として使用できる。同じ分子が、前臨床動物試験並びにヒトでの臨床試験にも使用できる。これにより、種に特異的なサロゲート分子に比べて、動物試験が高度に同等な結果を生みだし、予測力が増す。本発明において、当分野に記載されるCD3イプシロンの他の公知のエピトープ全てとは対照的に、CD3複合体のネイティブ環境から取り出された（そして、EpCAM又は免疫グロブリンFc部などの異種アミノ酸配列に融合した）時にその三次元構造完全性を維持する、CD3イプシロンの細胞外ドメインのN末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド断片が、驚くべきことに確認された。

【0011】

本発明に提供されるCD3エピトープのコンテキスト非依存性は、CD3イプシロンの最初の27のN末端アミノ酸又はこの27アミノ酸ストレッチの機能性断片に相当する。

C D 3 エピトープに関連して本願で使用される「コンテキスト非依存性」という句は、本願記載の本発明の結合分子／抗体分子の結合が、抗原決定基又はエピトープを取り巻く立体配座、配列又は構造の変化又は修飾につながらないことを意味する。対照的に、従来のC D 3 結合分子（例えば、国際公開第 9 9 / 5 4 4 4 0 号又は国際公開第 0 4 / 1 0 6 3 8 0 号に開示される）により認識されるC D 3 エピトープは、コンテキスト非依存性エピトープのC D 3 イプシロン鎖C末端からN末端1－27アミノ酸に局在化するが、その場合、イプシロン鎖の残りの部分に埋め込まれ、イプシロン鎖とC D 3 ガンマ又はデルタ鎖とのヘテロダイマー化により正しい位置に保持されないと正しいコンフォメーションがとれない。

【0012】

本願に提供されコンテキスト非依存性C D 3 エピトープに対して発生した（対象とした）二重特異性結合分子の一部として、抗C D 3 結合分子は、T細胞再分布に関して驚くべき臨床上の改善及びさらに好ましい安全性プロファイルを与える。理論に拘束されないが、C D 3 エピトープはコンテキスト非依存性であり、C D 3 複合体の残りの部分にあまり影響を与えずに自律的で完全なサブドメインを形成するので、本願に提供されるC D 3 結合分子は、コンテキスト依存性C D 3 エピトープを認識する従来のC D 3 結合分子（国際公開第 9 9 / 5 4 4 4 0 号に提供されている様な分子）よりも、C D 3 コンフォメーションに誘起するアロステリック変化が少ない。

【0013】

二重特異性結合分子の一部として本発明のC D 3 結合分子のC D 3 エピトープのコンテキスト非依存性は、本発明のC D 3 結合分子による治療の開始段階におけるより低いT細胞再分布に関連し、コンテキスト依存性C D 3 エピトープを認識する、当分野に公知の従来のC D 3 結合分子と比べて、本発明のC D 3 結合分子の安全性プロファイルをより良好にする。特に、C D 3 結合分子による治療の開始段階におけるT細胞再分布は、C N S 有害事象の主な危険因子であるため、コンテキスト依存性ではなくコンテキスト非依存性のC D 3 エピトープを認識することにより、本発明のC D 3 結合分子は、当分野に公知のC D 3 結合分子に勝り、著しい安全性の利点を有する。従来のC D 3 結合分子による治療の開始段階におけるT細胞再分布に関連したそのようなC N S 有害事象を経験する患者は、通常混乱と失見当職になり、場合によっては尿失禁も患う。混乱は、患者が自身の通常の明晰さのレベルで考えられない、精神状態の変化である。患者は、通常集中が困難となり、思考が不鮮明で不明確であるだけでなく、しばしば著しく遅くなる。従来のC D 3 結合分子による治療の開始段階におけるT細胞再分布に関連したC N S 有害事象を経験する患者は、記憶喪失も患うことがある。多くの場合、混乱により、人及び／又は場所を認識する能力又は時間及び日付が分かる能力が失われる。方角が分からない感覚は混乱には通常のものであり、意志決定能力が損なわれる。従来のC D 3 結合分子による治療の開始段階におけるT細胞再分布に関連したC N S 有害事象は、不明瞭な発語及び／又は言葉を探すことの困難を含むこともある。この障害は、言語の表現及び理解並びに読みとり及び書きとりの両方を損なうことがある。尿失禁の他に、患者によっては、空間識失調及び目眩も、従来のC D 3 結合分子による治療の開始段階におけるT細胞の再分布に関連したC N S 有害事象に加わることがある。

【0014】

C D 3 イプシロンの言及された27アミノ酸N末端ポリペプチド断片内の三次元構造の維持は、インビトロでN末端C D 3 イプシロンポリペプチド断片に、インビボでT細胞上のネイティブ（C D 3 イプシロンサブユニット）C D 3 複合体に同じ結合親和性で結合することが可能な、好ましくはヒトの、結合ドメインの生成に使用できる。これらのデータは、本願に記載のN末端断片が、インビボで通常存在する構造に類似した三次コンフォメーションを形成していることを強く示している。C D 3 イプシロンのN末端ポリペプチド断片のアミノ酸1－27の構造完全性の重要性に関して非常に微妙な試験が実施された。C D 3 イプシロンのN末端ポリペプチド断片のアミノ酸1－27の個々のアミノ酸をアラニンに変えて（アラニンスキャニング）、微小な混乱に対するC D 3 イプシロンのN末端

10

20

30

40

50

ポリペプチド断片のアミノ酸 1-27 の感受性を試験した。本発明の二重特異性結合分子の一部としての CD3 特異性抗体分子を使用して、CD3 イブシロンの N 末端ポリペプチド断片のアミノ酸 1-27 のアラニン変異体への結合を試験した（添付される実施例 5 参照）。断片の正に N 末端での最初の 5 つのアミノ酸残基及び CD3 イブシロンの N 末端ポリペプチド断片のアミノ酸 1-27 の位置 23 及び 25 の 2 つのアミノ酸の個々の変化が、抗体分子の結合に重要であった。残基 Q（位置 1 でのグルタミン）、D（位置 2 でのアスパラギン酸）、G（位置 3 でのグリシン）、N（位置 4 でのアスパラギン）及び E（位置 5 でのグルタミン酸）を含む、位置 1~5 の領域のアミノ酸残基をアラニンに置換すると、前記断片に対する、本発明の、好ましくはヒトの、結合分子の結合が無くなった。その一方で、本発明の、好ましくはヒトの、結合分子の少なくともいくつかでは、言及された断片 T（位置 23 でのスレオニン）及び I（位置 25 でのイソロイシン）の C 末端での 2 つのアミノ酸残基、は、本発明の、好ましくはヒトの、結合分子への結合エネルギーを低下させた。

【0015】

予期せぬことに、このように単離された、好ましくはヒトの、結合分子が、CD3 イブシロンのヒトの N 末端断片だけでなく、新世界猿（マーマセツ、カリスリクス・ジャカス（*Callithrix jacchus*）；サグイヌス・オイディプス（*Saguinus oedipus*）；サイミリ・シウレウス（*Saimiri sciureus*））及び旧世界猿（カニクイザルとしても知られるマカカ・ファシキュラリス（*Macaca fascicularis*）；又はアカゲザルとしても知られるマカカ・ムラッタ（*Macaca mulatta*））を含む種々の霊長類の CD3 イブシロンの対応する相同断片も認識することが見いだされた。したがって、本発明の CD3 結合分子の多霊長類特異性が検出された。以下の配列分析は、CD3 イブシロンの細胞外ドメインの N 末端で高度に相同性のある配列ストレッチを、ヒト及び霊長類が共有することを確認した。

【0016】

CD3 イブシロンに特異的な、好ましくはヒトの結合分子であって、同一分子を前臨床動物試験に、臨床試験にも、さらにヒトの治療にも使用できる結合分子を発生させることが可能であることが本発明において見いだされた。これは、ヒト CD3 イブシロンへの結合に加え（おそらくはチンパンジー対応物との遺伝的類似性により）新世界猿及び旧世界猿を含む、非チンパンジー霊長類の前記抗原のホモログにも結合する、好ましくはヒトの結合分子の予期せぬ確認による。以下の実施例に示されるとおり、前記 CD3 イブシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子は、ガン又は免疫疾患を含むが、これらに限定されない種々の疾患に対する治療薬を生成するため、二重特異性単鎖抗体に一体化できる。したがって、サロゲート CD3 イブシロン結合ドメイン又は系統発生的に（ヒトから）遠い種での試験のためにそれを含む二重特異性単鎖抗体を構築する必要は消える。結果として、臨床試験でヒトに投与されるよう意図されるのと正に同じ分子を動物の前臨床試験に使用でき、それに続く市場の認可及び治療薬投与にも使用できる。後のヒトへの投与と同じ分子を前臨床動物試験に使用する能力があるので、前臨床動物試験で得られるデータのヒトの場合への適応性が限定される危険が、事実上消え、又は少なくとも大幅に低減する。手短に言うと、ヒトに実際に投与されるであろう分子と同じ分子を動物に使用して前臨床安全性データを得ることは、ヒトの関連するシナリオへのデータの適応性を確実にするために多くをなす。対照的に、サロゲート分子を使用する従来手法では、前記サロゲート分子は前臨床安全性評価に使用される動物試験システムに分子的に適応させる必要がある。したがって、実際にヒトの治療に使用されるべき分子は、薬物動態パラメータ及び／又は生物活性の前臨床試験に使用されるサロゲート分子とはその配列が異なり、おそらくは構造も異なり、前臨床動物試験で得られるデータのヒトの場合への適応性／転移性が限定される結果となる。サロゲート分子の使用は、完全に新しいコンストラクトの構築、製造、精製及びキャラクタリゼーションを必要とする。それにより、その分子を得るために追加の開発コスト及び時間がかかる。要するに、ヒトの治療に使用されるべき実際の薬剤に加えサロゲートは別に開発される必要があり、そのため 2 つの分子の 2 つの開発ライ

ンが実施されなくてはならない。したがって、本願に記載される異種間特異性を示すヒト結合分子又は抗体系コンストラクトの主な利点は、同一の分子が、ヒトの治療薬のために、及び前臨床動物試験に使用できることである。

【0017】

ヒト及び非チンパンジー霊長類のCD3 イプシロン鎖のエピトープに結合可能な本発明の結合分子は、ヒト起源であることが好ましい。

【0018】

さらに、本発明のヒト結合分子のヒト起源のため、前記結合分子に対する免疫反応の発生は、ヒトの患者への結合分子の投与時に、最大限可能な程度除外される。

【0019】

本発明の二重特異性結合分子の一部として、好ましくはヒトの、CD3 イプシロン特異性結合分子の他の主な利点は、種々の霊長類での前臨床試験のためのその適応性である。動物中の薬剤候補の挙動は、理想的には、ヒトへの投与時に予期されるこの薬剤候補の挙動を示さなければならない。その結果、したがって、そのような前臨床試験から得たデータは、一般的にヒトの場合への高度な予測力を当然持つ。しかし、最近のTGN1412 (CD28モノクローナル抗体)の第I相臨床試験の悲劇的な結果から分かるように、霊長類の種の中では、ヒトの中と薬剤候補の挙動が異なる。前記抗体の前臨床試験において、カニクイザルで実施された動物試験では有害事象が無いか、限定された有害事象のみが観察されたが、前記抗体の投与時に6人のヒトの患者が多臓器不全を起こした(Lancet 368 (2006), 2206-7)。これらの望ましくない有害な事象の結果は、前臨床試験を1つの(霊長類)種のみに限定することが十分でないことを示す。本発明のCD3 イプシロン特異性ヒト結合分子が、一連の新世界猿及び旧世界猿と結合するという事実は、上記の事例で直面する問題を克服する助けになることもある。したがって、本発明は、ヒトの治療用の薬剤が開発及び試験されている時に、事象における種の差異を最低限にする手段及び方法を提供する。

【0020】

本発明の二重特異性結合分子の一部としての、好ましくはヒトの、異種間特異性CD3 イプシロン結合ドメインにより、トランスジェニック動物の作製など、ヒトへの投与用の薬剤候補に試験動物を適応させることももはや必要でない。本発明の使用及び方法により異種間特異性を示す、CD3 イプシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子(又はそれを含む二重特異性単鎖抗体)は、動物の遺伝子操作を全くせずに、非チンパンジー霊長類での前臨床試験に直接使用できる。当業者に周知のように、試験動物が薬剤候補に適応させられる手法では、動物が修飾されているので、前臨床安全性試験で得られる結果の典型性が低く、ヒトのための予測性が低いという危険性を常に帯びている。例えば、トランスジェニック動物では、導入遺伝子によりコードされるタンパク質が高度に過剰発現されることが多い。したがって、このタンパク質抗原に対する抗体の生物学的活性に関して得られたデータは、タンパク質の発現がはるかに低くより生理学的なレベルであるヒトに対する予測値において限定されることがある。

【0021】

異種間特異性を示すCD3 イプシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子(又はそれを含む二重特異性単鎖抗体)を使用するさらなる利点は、絶滅危惧種としてのチンパンジーが動物試験で回避される事実である。チンパンジーは、ヒトに最も近い近縁動物であり、ゲノムシーケンシングデータに基づき最近ヒト科に分類された(Wildman et al., PNAS 100 (2003), 7181)。したがって、チンパンジーで得られたデータは、一般的にヒトにとって高度に予測的であると考えられる。しかし、絶滅危惧種としての状況により、医学実験に使用できるチンパンジーの数は高度に制限されている。上述のとおり、したがって、動物試験のためのチンパンジーの維持は、コストがかかり、且つ倫理的にも問題である。本発明のCD3 イプシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子(又はそれを含む二重特異性単鎖抗体)を使用すると、得られる動物試験データの質、すなわち適応性を損なわずに、前臨床試験の間の倫理的な支障及び資金面で

の負担を避けられる。これに照らして、C D 3 イプシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子（又はそれを含む二重特異性単鎖抗体）の使用は、チンパンジーでの研究の妥当な代替物を与える。

【0022】

本発明のC D 3 イプシロン特異的な、好ましくはヒトの、結合分子（又はそれを含む二重特異性単鎖抗体）のさらなる利点は、動物前臨床試験の一部として使用している場合、例えば、薬物動態学動物試験の途中で、複数の血液サンプルを抽出する能力である。複数採血は、ネズミなどの下等動物よりも、非チンパンジー霊長類ではるかに容易に得られる。複数の血液サンプルを抽出すると、本発明の、好ましくはヒトの、結合分子（又は二重特異性単鎖抗体）により誘起される生物的效果を測定するための血液パラメータを連続試験できる。さらに、複数の血液サンプルの抽出により、本願に定義される、好ましくはヒトの、結合分子（又はそれを含む二重特異性単鎖抗体）の薬物動態学的プロファイルが研究者が評価できるようになる。さらに、血液パラメータに反映されている、前記の、好ましくはヒトの、結合分子（又はそれを含む二重特異性単鎖抗体）により誘起されるかもしれない潜在的な副作用が、前記抗体の投与の間に抽出された異なる血液サンプルで測定できる。これにより、本願に定義される、好ましくはヒトの、結合分子（又はそれを含む二重特異性単鎖抗体）の潜在的な毒性プロファイルが測定できる。

10

【0023】

本願に定義される、異種間特異性を示す、好ましくはヒトの、結合分子（又は二重特異性単鎖抗体）の利点は、以下のとおり簡単に要約できる。

20

【0024】

第1に、前臨床試験に使用される、本願に定義される、好ましくはヒトの、結合分子（又は二重特異性単鎖抗体）は、ヒトの治療に使用される物と同じである。したがって、薬物動態学的な性質及び生物活性が異なることがある、2つの独立した分子を開発する必要はもはやない。これは、例えば薬物動態学的結果が、例えば議論の的となるサロゲート手法よりも、より直接的にヒトの状況に転移可能で適用可能である点で、非常に有利である。

【0025】

第2に、ヒトの治療薬を製造するために、本願に定義される、好ましくはヒトの、結合分子（又は二重特異性単鎖抗体）を使用すると、サロゲート手法よりもコスト集約性及び労働集約性が低い。

30

【0026】

第3に、本願に定義される、好ましくはヒトの、結合分子（又は二重特異性単鎖抗体）は、1つの霊長類種だけでなく、一連の異なる霊長類種での前臨床試験に使用でき、そのため、霊長類とヒトの間の潜在的な種の差異の危険性を限定できる。

【0027】

第4に、動物試験のための、絶滅危惧種としてのチンパンジーが避けられる。

【0028】

第5に、複数の血液サンプルを、広範な薬物動態研究のために抽出できる。

【0029】

第6に、本発明の好ましい実施形態による、好ましくはヒトの、結合分子のヒト起源のため、ヒトの患者に投与した場合、前記結合分子に対する免疫反応の発生が最低限になる。マウス起源の治療分子に対するヒト-抗マウス抗体（HAMA）の発生につながる、ヒトでない種、例えばマウスから誘導された薬剤候補に特異的な抗体との免疫応答の誘起が排除される。

40

【0030】

「タンパク質」という用語は当分野に周知であり、生物学的化合物を記述する。タンパク質は、1つ以上のアミノ酸鎖（ポリペプチド）を含み、それによりアミノ酸がペプチド結合により互いに結合する。本願での「ポリペプチド」という用語は、30を超えるアミノ酸からなる、1群の分子を説明する。本発明によると、ポリペプチドの1群は、タンパ

50

ク質が単一のポリペプチドからなる限り、「タンパク質」を構成する。定義と調和して、「ポリペプチド」という用語は、断片が30を超えるアミノ酸からなる限り、タンパク質の断片を記述する。ポリペプチドは、ダイマー、トリマーなどのマルチマー及び高次のオリゴマー、すなわち2以上のポリペプチド分子からなるものをさらに形成することもある。そのようなダイマー、トリマーなどを形成するポリペプチド分子は、同一でも、異なってもよい。したがって、そのようなマルチマーの対応する高次の構造は、ホモ又はヘテロダイマー、ホモ又はヘテロトリマーなどと称される。ヘテロマルチマーの一例は抗体分子であり、その天然の形態で、2つの同一のポリペプチド軽鎖及び2つの同一のポリペプチド重鎖からなる。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの翻訳後修飾により修飾が実施される、天然修飾ポリペプチド／タンパク質も意味する。そのような修飾は当分野に周知である。

10

【0031】

本願では、「ヒト」及び「人間」はホモ・サピエンス (*Homo sapiens*) を意味する。本願に記載されるコンストラクトの医学的使用に関する限り、ヒトの患者が同じ分子で治療される。

【0032】

本発明の分子の文脈で使用される「ヒト起源」という用語は、ヒトライブラリーから誘導可能か、又はヒト等価物に相当する構造／配列を有する分子を記述する。したがって、アナログヒト配列に対応するアミノ酸配列を有するタンパク質、例えばヒト生殖細胞配列に対応するフレームワーク中にアミノ酸配列を有する抗体断片は、ヒト起源の分子と理解される。

20

【0033】

本願では、「非チンパンジー霊長類」又は「非チンブ霊長類」又はその文法的変形は、チンパンジー以外の任意の霊長類、すなわちチンパンジー属 (*Pan*) に属し、アンソロポピテクス・トログロディテス (*Anthropopithecustroglydytes*) 又はシミア・サティルス (*Simia satyrus*) としてもまた知られる、ボノボ (*Pan paniscus*) 種及びナミチンパンジー (*Pantroglydytes*) 種を含む動物以外である。「霊長類 (*primate*)」、「霊長類種」、「霊長類 (*primates*)」又はその文法的変形は、原猿 (*prosimians*) 及び類人猿 (*anthropoids*) の2つの亜目に分けられ、人間、類人猿 (*apes*)、猿 (*monkeys*) 及びキツネザル (*lemurs*) を含む真獣類の目を意味する。具体的には、本願の「霊長類」は、曲鼻猿亜目 (*Strepsirrhini*) (非メガネザル (*non-tarsier*) 原猿) を含み、前記亜目は、キツネザル下目 (*Lemuriformes*) (それ自体、コビトキツネザル上科 (*Cheirogaleoidea*) 及びキツネザル上科 (*Lemuroidea*) を含む)、アイアイ下目 (*Chiromyiiformes*) (それ自体、アイアイ科 (*Daubentonidae*) を含む) 及びロリス下目 (*Lorisiiformes*) (それ自体、ロリス科 (*Lorisiidae*) 及びガラゴ科 (*Galagidae*) を含む) を含む。本願の「霊長類」は、直鼻猿亜目 (*Haplorrhini*) もまた含み、前記亜目は、メガネザル下目 (*Tarsiiformes*) (それ自体、メガネザル科 (*Tarsiidae*) を含む)、真猿下目 (*Simiiformes*) (それ自体、広鼻小目 (*Platyrrhini*) 又は新世界猿、及びオナガザル科 (*Cercopithecoidea*) を含む狭鼻小目 (*Catarrhini*) 又は旧世界猿を含む) を含む。

30

40

【0034】

非チンパンジー霊長類種は、本発明の意味の中で、キツネザル、メガネザル、テナガザル、マーモセット (マーモセット科 (*Cebidae*) の新世界猿に属する) 又は旧世界猿 (オナガザル上科 (*Cercopithecoidea*) に属する) であると理解される。

【0035】

本願では「旧世界猿」は、オナガザル上科 (*Cercopithecoidea*) に分

50

類されるあらゆる猿を含み、それ自体、主にアフリカ系であるがアジア及び北アフリカである種々のマカク属を含むオナガザル亜科 (*Cercopithecinae*) ; 及びアジア属のほとんど及びアフリカコロブスザルも含むコロブス亜科 (*Colobinae*) に再分される。

【0036】

具体的には、オナガザル亜科の中で、有利な非チンパンジー霊長類は、オナガザル族 (*Cercopithecini*) 由来でよく、アレンモンキー属 (*Allenopithecus*) 内 (アレン沼地ザル、アレノピテクス・ニグロビリディス (*Allenopithecus nigroviridis*)) ; コビットグエノン属 (*Miopithecus*) 内 (コビットグエノン、ミオピテクス・タラポイン (*Miopithecus talapoin*)) ; ガボン・タラポアン、ミオピテクス・オゴウエンシス (*Miopithecus ogouensis*)) ; パタスモンキー属 (*Erythrocebus*) 内 (パタスモンキー、エリスロセブス・パタス (*Erythrocebus patas*)) ; クロロセブス属 (*Chlorocebus*) 内 (ミドリザル、クロロセブス・サバセウス (*Chlorocebus sabaeus*)) ; グリベットモンキー、クロロセブス・アエチオプス (*Chlorocebus aethiops*) ; ベールマウンテン・ベルベットモンキー、クロロセブス・ドジャムドジャメンシス (*Chlorocebus djambensis*) ; タンタルスモンキー、クロロセブス・タンタルス (*Chlorocebus tantalus*) ; ベルベットモンキー、クロロセブス・ピゲリスラス (*Chlorocebus pygerythrus*) ; マルブルック、クロロセブス・シノスロス (*Chlorocebus cynosuros*)) ; 又はオナガザル属 (*Cercopithecus*) 内 (ドリアスグエノン又はサロンゴモンキー、セルコピテクス・ドリアス (*Cercopithecus dryas*)) ; ダイアナモンキー、セルコピテクス・ダイアナ (*Cercopithecus diana*) ; ロロウェイモンキー、セルコピテクス・ロロウェイ (*Cercopithecus roloway*) ; オオハナジログエノン、セルコピテクス・ニクチタンス (*Cercopithecus nictitans*) ; ブルーモンキー、セルコピテクス・ミティス (*Cercopithecus mitis*) ; シルバーモンキー、セルコピテクス・ドゲッティ (*Cercopithecus doggetti*) ; ゴールデンモンキー、セルコピテクス・カンジチ (*Cercopithecus kandti*) ; サイクスモンキー、セルコピテクス・アルボグラリス (*Cercopithecus albogularis*) ; モナモンキー、セルコピテクス・モナ (*Cercopithecus mona*) ; キャンベル・モナモンキー、セルコピテクス・キャンベリ (*Cercopithecus campbelli*) ; ロウ・モナモンキー、セルコピテクス・ロウイ (*Cercopithecus lowei*) ; クラウングエノン、セルコピテクス・ポゴニアス (*Cercopithecus pogonias*) ; ウォルフグエノン、セルコピテクス・ウォルフィ (*Cercopithecus wolfi*) ; デント・モナモンキー、セルコピテクス・デンティ (*Cercopithecus denti*) ; ショウハナジログエノン、セルコピテクス・ペタウリスタ (*Cercopithecus petaurista*) ; アカハラグエノン、セルコベテクス・エリスログスター (*Cercopithecus erythrogaster*) ; スクラターグエノン、セルコピテクス・スクラテリ (*Cercopithecus sclateri*) ; アカミミグエノン、セルコピテクス・エリスロティス (*Cercopithecus erythrotis*) ; クチヒゲグエノン、セルコピテクス・セファス (*Cercopithecus cephus*) ; アカオザル、セルコピテクス・アスカニウス (*Cercopithecus ascanius*) ; ロエストグエノン、セルコピテクス・ロエスティ (*Cercopithecus lhoesti*) ; プロイッスモンキー、セルコピテクス・プロイッシ (*Cercopithecus preussi*) ; サンテイルド・モンキー、セルコピテクス・ソラタス (*Cercopithecus solatus*) ; ハムリンズモンキー (*Hamlyn's monkey*) 又はフクロウグエノン、セルコピテクス・ハムリニ (*Cercopithecus hamlyni*) ;

ブラッザモンキー、セルコピテクス・ネグレクトス (*Cercopithecus neglectus*) である。

【0037】

或いは、やはりオナガザル亜科内であるが、ヒヒ族 (*Papionini*) 内の有利な非チンパンジー霊長類は、マカク属 (*Macaca*) 内 (バーバリマカク、マカカ・シルバヌス (*Macacasyllvanus*) ; シシオザル、マカカ・シレヌス (*Macaca silenus*) ; ブタオザル又はベルク (*Beruk*)、マカカ・ネメストリナ (*Macacanemestrina*) ; キタブタオザル、マカカ・レオニア (*Macacaleonina*) ; パガイモンキー又はボッコイ (*Bokkoi*)、マカカ・パゲンシス (*Macacapagensis*) ; シブルー島マカク (*Siberut Macaque*)、マカカ・シベル (*Macacasiberu*) ; ムーアモンキー、マカカ・マウラ (*Macacamaura*) ; ウスイロマカク、マカカ・オケレアタ (*Macaca ochreata*) ; トンケアンマカク、マカカ・トンケアナ (*Macacatonkeana*) ; ヘックモンキー、マカカ・ヘッキ (*Macaca hecki*) ; ゴロンタロモンキー、マカカ・ニグリシェンス (*Macacanigriscens*) ; スラウェシトサカマカク又はクロザル、マカカ・ニグラ (*Macacanimigra*) ; シノモルガスサル又はカニクイザル又はオナガザル又はクラ、マカカ・ファシキュラリス (*Macacafascicularis*) ; ベニガオザル又はクマザル、マカカ・アークトイデス (*Macacaarctoides*) ; アカゲザル、マカク・ムラッタ (*Macacamulatta*) ; タイワンザル、マカカ・キュクロピス (*Macacacycl* 10
opis) ; ニホンザル、マカカ・フスカタ (*Macacafuscata*) ; トクモンキー、マカカ・シニカ (*Macacasinica*) ; ボンネットモンキー、マカカ・ラディアタ (*Macacaradiata*) ; バーバリーマカク、マカカ・シルバヌス (*Macacasyllvanmus*) ; アッサムモンキー、マカカ・アサメンシス (*Macaca assamensis*) ; チベットマカク又はミルンエドワーズマカク (*Milne-Edwards' Macaque*)、マカカ・チベタナ (*Macacathi* 20
betana) ; アルナチャルモンキー又はムンザラ、マカカ・ムンザラ (*Macacamunzala*) ; ロフォセブス属 (*Lophocebus*) 内 (ホホジロマンガベイ、ロフォセブス・アルビゲナ (*Lophocebus albigena*) ; ロフォセブス・アルビゲナ・アルビゲナ (*Lophocebus albigena albigen* 30
a) ; ロフォセブス・アルビゲナ・オスマニ (*Lophocebus albigena osmani*) ; ロフォセブス・アルビゲナ・ジョンストニ (*Lophocebus albigena johnstoni*) ; ブラックマンガベイ、ロフォセブス・アテリムス (*Lophocebus aterrimus*) ; オブデンボッシュ・マンガベイ (*Opdenbosch's Mangabey*)、ロファセブス・オブデンボッシ (*Lophocebus opdenboschi*) ; ハイランド・マンガベイ、ロファセブス・キブンジ (*Lophocebus kipunji*)) ; ヒヒ属 (*Papio*) 内 (マントヒヒ、パピオ・ハマドリアス (*Papio hamadryas*)) ; ギニアヒヒ、パピオ・パピオ (*Papio papio*) ; アヌビスヒヒ、パピオ・アヌビス (*Papioa* 40
nubis) ; キイロヒヒ、パピオ・シノセファルス (*Papio cynocephalus*) ; チャクマヒヒ、パピオ・ウルシヌス (*Papio ursinus*)) ; ゲラダヒヒ属 (*Theropithecus*) 内 (ゲラダヒヒ、テロピテクス・ゲラダ (*Theropithecus gelada*)) ; マンガベイ属 (*Cercocebus*) 内 (スーティ・マンガベイ、セルコセブス・アティス (*Cercocebus atys*) ; セルコセブス・アティス・アティス (*Cercocebus atys atys*) ; セルコセブス・アティス・ルヌラトゥス (*Cercocebus atys lunulatu* 50
s) ; シロエリマンガベイ、セルコセブス・トルクアトゥス (*Cercocebusto rquatus*) ; アジルマンガベイ、セルコセブス・アギリス (*Cercocebus agilis*) ; ゴールデンマンガベイ、セルコセブス・クリソガスター (*Cercocebuschrysogaster*) ; ボウシマンガベイ、セルコセブス・ガレリトゥ

ス (*Cercocebus galeritus*) ; サンジェマンガベイ、セルコセブス・サンジェイ (*Cercocebussanjei*) ; 又はマンドリル属 (*Mandrillus*) 内 (マンドリル、マンドリルス・スフィンクス (*Mandrillus sphinx*) ; ドリル、マンドリルス・ロイコファエウス (*Mandrillus leucophaeus*)) 由来でよい。

【0038】

最も好ましいのは、マカカ・ファシキュラリス (*Macaca fascicularis*) (カニクイザルとしても知られ、したがって実施例では「カニクイザル」と称される) 及びマカカ・ムラッタ (*Macacamulatta*) (アカゲザル、「アカゲザル」と称される) である。

【0039】

コロブス亜科内で、有利な非チンパンジー霊長類は、アフリカ系の群に由来してもよく、コロブス属 (*Colobus*) 内 (クロコロブス、コロブス・サタナス (*Colobus satanas*) ; アンゴラコロブス、コロブス・アンゴレンシス (*Colobus angolensis*) ; キングコロブス、コロブス・ポリコモス (*Colobus polykomos*) ; クマコロブス、コロブス・ベレロサス (*Colobus velleirosus*) ; アビシニアコロブス、コロブス・ゲレザ (*Colobus guerez*a)) ; ピリオコロブス属 (*Piliocolobus*) 内 (ウェスタン・アカコロブス、ピリオコロブス・バディウス (*Piliocolobus badius*) ; ピリオコロブス・バディウス・バディウス (*Piliocolobus badius badius*) ; ピリオコロブス・バディウス・テミンキー (*Piliocolobus badius temminckii*) ; ピリオコロブス・バディウス・ワルドロネ (*Piliocolobus badius waldroneae*) ; ペナントアカコロブス、ピリオコロブス・ペナントィ (*Piliocolobus pennantii*) ; ピリオコロブス・ペナントィ・ペナントィ (*Piliocolobus pennantii pennantii*) ; ピリオコロブス・ペナントィ・エビエニ (*Piliocolobus pennantii epieni*) ; ピリオコロブス・ペナントィ・ボウビエリ (*Piliocolobus pennantii bouvieri*) ; プレウス・アカコロブス (*Preuss's Red Colobus*)、ピリオコロブス・プレウシ (*Piliocolobus preussi*) ; トロン・アカコロブス、ピリオコロブス・トロニ (*Piliocolobus tholloni*) ; 中央アフリカ・アカコロブス、ピリオコロブス・フォアイ (*Piliocolobus foai*) ; ピリオコロブス・フォアイ・フォアイ (*Piliocolobus foai foai*) ; ピリオコロブス・フォアイ・エリオッティ (*Piliocolobus foai ellioti*) ; ピリオコロブス・フォアイ・オウスタレティ (*Piliocolobus foai oustaleti*) ; ピリオコロブス・フォアイ・セムリキエンシス (*Piliocolobus foai semlikiensis*) ; ピリオコロブス・フォアイ・パルメンティエロルム (*Piliocolobus foai parmentierorum*) ; ウガンダ・アカコロブス、ピリオコロブス・テフロスケルス (*Piliocolobus tephrosceles*) ; ウジンダワ・アカコロブス、ピリオコロブス・ゴルドノルム (*Piliocolobus gordonorum*) ; ザンジバル・アカコロブス、ピリオコロブス・キルキ (*Piliocolobus kirkii*) ; タナリバーアカコロブス、ピリオコロブス・ルフォミトラトゥス (*Piliocolobus rufomitratatus*)) ; 又はプロコロブス属 (*Procolobus*) 内 (オリブコロブス、ポロコロブス・ベラス (*Procolobus verus*)) でよい。

【0040】

コロブス亜科内で、有利な非チンパンジー霊長類は、或いは、ラングール (*Langur* (leaf monkey)) 群由来でもよく、ラングール属 (*Semnopithecus*) 内 (ネパール・グレイラングール、センノピテクス・スキスタケウス (*Semnopithecus schistaceus*) ; カシミール・グレイラングール、センノ

10

20

30

40

50

ピテクス・アジャクス (*Semnopithecus ajax*) ; タライ・グレイラン
 グール、センノピテクス・ヘクター (*Semnopithecus hector*) ; ハス
 マンラングール、センノピテクス・エンテラス (*Semnopithecus ente
 llus*) ; クロアシラングール (*Black-Footed Gray Langur*)
 、センノピテクス・ヒュボレウコス (*Semnopithecus hypoleuco
 s*) ; 南部平野グレイラングール (*Southern Plains Gray Langu
 r*)、センノピテクス・デュスミエリ (*Semnopithecus dussumie
 ri*) ; タフテッド・グレイラングール (*Tufted Gray Langur*)、セン
 ノピテクス・プリアム (*Semnopithecus priam*)) ; T. ベツルス (T.
 . *vetulus*) 群又はトラキピテクス属 (*Trachypithecus*) 内 (カ
 オムラサキラングール、トラキピテクス・ベツルス (*Trachypithecus ve
 tulus*) ; ニルギリラングール、トラキピテクス・ジョーニ (*Trachypith
 ecus johnii*)) ; トラキピテクス属の T. クリスタトゥス (T. *crist
 atus*) 群内 (ジャワ・ルトン、トラキピテクス・アウラトゥス (*Trachypit
 hecus auratus*) ; シルバーリーフモンキー又はシルバー・ルトン、トラキピ
 テクス・クリスタトゥス (*Trachypithecus cristatus*) ; イン
 ドシナ・ルトン、トラキピテクス・ジャーマイニ (*Trachypithecus ger
 maini*) ; テナセリム・ルトン、トラキピテクス・バーベイ (*Trachypith
 ecus barbei*)) ; トラキピテクス属の T. オブスキュルス (T. *obscu
 rus*) 群内 (ダスキー・リーフモンキー又はスペクタクルリーフモンキー、トラキピテ
 クス・オブスキュラス (*Trachypithecus obscurus*) ; ファイレ・
 リーフモンキー、トラキピテクス・ファイレイ (*Trachypithecus pha
 yrei*)) ; トラキピテクス属の T. ピレアトゥス (T. *pileatus*) 群内 (ボ
 ウシラングール、トラキピテクス・ピレアトゥス (*Trachypithecus pil
 eatus*) ; ショートトリッジ・ラングール、トラキピテクス・ショートトリジェイ (Tr
 achypithecus *shortridgei*) ; ゴールデンラングール、トラキ
 ピテクス・ギー (*Trachypithecus geei*)) ; トラキピテクス属の T.
 フランコイシ (T. *francoisi*) 群内 (フランソワ・ルトン、トラキピテクス・
 フランコイシ (*Trachypithecus francoisi*) ; ハティン・ラング
 ール、トラキピテクス・ハティンヘンシス (*Trachypithecus hatin
 hensis*) ; ハクトウラングール、トラキピテクス・ポリオセファラス (Trach
 ypithecus *poliocephalus*) ; ラオス・ラングール、トラキピテク
 ス・ラオタム (*Trachypithecus laotum*) ; コシジロラングール、
 トラキピテクス・デラコーリ (*Trachypithecus delacouri*) ; イ
 ンドシナ・クロラングール、トラキピテクス・エベヌス (*Trachypithec
 s ebenus*)) ; 又はリーフモンキー属 (*Presbytis*) 内 (クロカンムリ
 リーフモンキー、プレスビティス・メラロフォス (*Presbytismela
 lophos*) ; シマコノハザル、プレスビティス・フェモラリス (*Presbytis fem
 oralis*) ; サラワク・スリリ (*Sarawak Surili*)、プレスビティス
 ・クリソメラス (*Presbytischrysomelas*) ; シロモモ・スリリ (W
 hite-thighed *Surili*)、プレスビティス・シアメンシス (*Pres
 bytis siamensis*) ; シロビタイ・スリリ (*White-fronted
 Surili*)、プレスビティス・フロンタタ (*Presbytis frontata*
) ; ジャワ・スリリ (*Javan Surili*)、プレスビティス・コマタ (*Pres
 bytis comata*) ; トーマスラングール、プレスビティス・トマシ (*Presb
 ytis thomasi*) ; ホースラングール、プレスビティス・ホセイ (*Presb
 ytitishosei*) ; クリイロ・リーフモンキー、プレスビティス・ルビクンダ (Pr
 esbytis *rubicunda*) ; オナガララングール又はジョジャ (*Joja*)、
 プレスビティス・ポテンチアニ (*Presbytispotenziani*) ; ナツナ島
 スリリ (*Natuna Island Surili*)、プレスビティス・ナツナエ (Pr

esbytis natunae)) でよい。

【0041】

コロブス亜科内で、有利な非チンパンジー霊長類は、或いは、シシバナ (*Odd-Notosed*) 群由来でもよく、ドックモンキー属 (*Pygathrix*) 内 (アカアシドックモンキー、ピガスリクス・ネマエウス (*Pygathrix nemaeus*); クロアシドックモンキー、ピガスリクス・ニグリペス (*Pygathrix nigripes*); ハイイロアシドックモンキー、ピガスリクス・シネレア (*Pygathrix cinerea*)) ; シシバナザル属 (*Rhinopithecus*) 内 (キンシコウ、リノピテクス・ロクセラナ (*Rhinopithecus roxellana*); クロキンシコウ、リノピテクス・ビエティ (*Rhinopithecus bieti*); ハイイロシシバナザル、リノピテクス・ブレリチ (*Rhinopithecus brelichi*); トンキンシシバナザル、リノピテクス・アバンキュラス (*Rhinopithecus savunculus*)) ; テングザル属 (*Nasalis*) 内 (テングザル、ナサリス・ラバトゥス (*Nasalis larvatus*)) ; 又はコバナテングザル属 (*Simias*) 内 (メンタウェーコバナテングザル、シミアス・コンカラー (*Simias concolor*)) でよい。

【0042】

本願での用語「マーモセット」はマーモセット属 (*Callithrix*) 内の任意の新世界ザルを意味し、例えば、マーモセット亜属 (原文のまま) の大西洋マーモセットに属するもの (コモンマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) ジャカス (*Callithrix (Callithrix) jacchus*); クロミミマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) ペニシラータ (*Callithrix (Callithrix) penicillata*); クールマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) クーリ (*Callithrix (Callithrix) kuhlii*); ジョフロウマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) ジョフロイ (*Callithrix (Callithrix) geoffroyi*); キクガシラコモンマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) フラビセプス (*Callithrix (Callithrix) flaviceps*); ミミナガコモンマーモセット、カリスリクス (カリスリクス) アウリタ (*Callithrix (Callithrix) aurita*)) ; ミコ亜属 (*Mico*) のアマゾンマーモセットに属するもの (リオアカリマーモセット、カリスリクス (ミコ) アカリエンシス (*Callithrix (Mico) acarionensis*); マニコアママーモセット (*Manicore Marmoset*)、カリスリクス (ミコ) マニコレンシス (*Callithrix (Mico) manicorensis*); シルバーマーモセット、カリスリクス (ミコ) アルゲンタタ (*Callithrix (Mico) argentata*); ホワイトマーモセット、カリスリクス (ミコ) ロイシペ (*Callithrix (Mico) leucippe*); エミリアマーモセット (*Emilia's Marmoset*)、カリスリクス (ミコ) エミリアエ (*Callithrix (Mico) emiliae*); クロテマーモセット、カリスリクス (ミコ) ニグリセプス (*Callithrix (Mico) nigriceps*); マルカマーモセット (*Marca's Marmoset*)、カリスリクス (ミコ) マルカイ (*Callithrix (Mico) marcai*); オグロマーモセット、カリスリクス (ミコ) メラヌラ (*Callithrix (Mico) melanura*); サンタレムマーモセット、カリスリクス (ミコ) フメラリフェラ (*Callithrix (Mico) humeralifera*); マウエスマーモセット (*Maues Marmoset*)、カリスリクス (ミコ) マウエシ (*Callithrix (Mico) mauesi*); キンシロフサミミマーモセット、カリスリクス (ミコ) クリソロイカ (*Callithrix (Mico) chrysouleuca*); フサミミマーモセット、カリスリクス (ミコ) インテルメディア (*Callithrix (Mico) intermedia*); サテアママーモセット (*Satere Marmoset*)、カリスリクス (ミコ) サテレイ (*Callithrix (Mico) sateri*); カリベラ亜属 (*Callibella*) に属するルースマレン・ド

ワーフマーモセット (*Roosmalens' Dwarf Marmoset*)、カリスリクス (カリベラ) ヒュミリス (*Callithrix (Callibella) humilis*) ; 又はセブエラ亜属 (*Cebuella*) に属するピグミーマーモセット、カリスリクス (セブエラ) ピグマエア (*Callithrix (Cebuella) pygmaea*) を意味する。

【0043】

新世界ザルの他の属は、タマリン属 (*Saguinus*) のタマリン (サグイヌス・オイディプス (*S. oedipus*) 群、サグイヌス・ミダス (*S. midas*) 群、サグイヌス・ニグロコリス (*S. nigricollis*) 群、サグイヌス・ミスタックス (*S. mystax*) 群、サグイヌス・ビカラー (*S. bicolor*) 群及びサグイヌス・イヌスタス (*S. inustus*) 群を含む) 及びリスザル属 (*Saimiri*) のリスザル (例えば、サイミリ・シウレウス (*Saimirisciureus*)、サイミリ・オエルステディ (*Saimiri oerstedii*)、サイミリ・ウストゥス (*Saimiri ustus*)、サイミリ・ボルビエンシス (*Saimiribolivensis*)、サイミリ・バンゾリニ (*Saimirivanzolini*) を含む。

【0044】

「結合ドメイン」という用語は、本発明に関連して、ある標的構造／抗原／エピトープに特異的に結合／相互作用する、ポリペプチドのドメインを特徴づける。したがって、結合ドメインは、「抗原－相互作用部位」である。「抗原－相互作用部位」という用語は、本発明によると、特定の抗原又は抗原の特定の基、例えば異なる種における同一の抗原と特異的に相互作用できる、ポリペプチドのモチーフを定義する。前記結合／相互作用は、「特異的認識」を定義するとも理解される。「特異的に認識する」という用語は、本発明によると、抗体分子が、抗原、例えば本願に定義されるヒトCD3抗原の、少なくとも2つの、好ましくは少なくとも3つの、より好ましくは少なくとも4つのアミノ酸と特異的に相互作用し、且つ／又はそれらと結合可能であることを意味する。そのような結合は、「鍵と鍵穴の原理」の特異性により例示することができる。したがって、結合ドメインのアミノ酸配列及び抗原における特異的なモチーフが、その一次、二次及び三次構造の結果として、並びに前記構造の二次修飾の結果として、互いを結合させる。抗原相互作用部位とその特異的な抗原との特異的な相互作用は、抗原に対する前記部位の単純な結合も起こすことがある。さらに、抗原相互作用部位とその特異的な抗原との特異的な相互作用は、或いは、抗原のコンフォメーションの変化の誘起、抗原のオリゴマー化などにより、シグナルの開始となることもある。本発明と調和する結合ドメインの好ましい例は抗体である。結合ドメインは、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、或いはモノクローナル又はポリクローナル抗体から誘導されていることがある。

【0045】

「抗体」という用語は、その誘導体又は機能性断片であって、結合特異性を未だ保持するものを含む。抗体の製造の技術は、当分野に周知であり、例えば、Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988及びHarlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999に記載されている。「抗体」という用語は、異なるクラス (すなわち、IgA、IgG、IgM、IgD及びIgE) 及びサブクラス (IgG1、IgG2など) の免疫グロブリン (Ig) も含む。これらの抗体は、例えば、本発明のポリペプチド又は融合タンパク質の免疫沈降法、アフィニティ精製及び免疫局在化並びに、例えば、組換え原核生物或いは真核細胞又は真核生物の培養においてそのようなポリペプチドの存在及び量をモニタリングするために使用できる。

【0046】

「抗体」という用語の定義は、キメラ、単鎖及びヒト化抗体並びに抗体断片、とりわけFab断片などの実施形態も含む。抗体断片又は誘導体は、F(ab')₂、Fv、scF

v 断片又は単一ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体又は他のV領域又はドメインとは独立に抗原又はエピトープと特異的に結合するVH又はVLのことがある、1つの可変ドメインのみを含む免疫グロブリン単一可変ドメインをさらに含む。例えば、Harlow and Lane (1988) and (1999)の上記引用文献を参照されたい。そのような免疫グロブリン単一可変ドメインは、単離された抗体単一可変ドメインポリペプチドのみでなく、抗体単一可変ドメインポリペプチド配列の1つ以上のモノマーを含むより大きなポリペプチドも包含する。

【0047】

そのような抗体及び／又は断片の製造には、種々の手順が当分野に公知であり使用することができる。例えば、(抗体)誘導体は、ペプチドミメティックスにより製造できる。さらに、単鎖抗体の製造のために記載された技術(中でも米国特許第4,946,778号を参照されたい)を適応して、選択されたポリペプチド(複数可)に特異的な単鎖抗体を製造できる。また、トランスジェニック動物を使用して、本発明のポリペプチド及び融合タンパク質に特異的なヒト化抗体を発現できる。モノクローナル抗体の調製には、連続継代性細胞株により産生される抗体を提供するどのような技術も利用できる。そのような技術の例には、ハイブリドーマ技術(Kohler and Milstein Nature 256 (1975), 495-497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72)及びヒトモノクローナル抗体を製造する(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96)EBVハイブリドーマ技術がある。BIA Coreシステムに使用されている表面プラズモン共鳴を利用して、CD3イプシロンなどの、標的ポリペプチドのエピトープに結合するファージ抗体の効率を高めることができる(Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。本発明の文脈において、「抗体」という用語が、本願中で以下に記載する通り宿主中に発現される抗体コンストラクト、例えば、とりわけウイルス又はプラスミドベクターを介してトランスフェクト及び／又は形質導入される抗体コンストラクトを含むことも想定される。

【0048】

本発明により使用される「特異的な相互作用」という用語は、結合分子により結合されるものと類似の構造を持ち、対象とするポリペプチドと同じ細胞により発現されるポリペプチドと、結合(ドメイン)分子が、公差反応しないか、又は著しく公差反応しないことを意味する。調査している結合分子パネルの公差反応性を、例えば、従来の条件下で結合分子の前記パネルの結合を評価することにより試験できる(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988及びUsing Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999を参照されたい)。結合ドメインと特異的な抗原との特異的な相互作用の例は、リガンドとそのレセプターとの特異性を含む。そのような定義は、特にその特異的なレセプターとの結合時にシグナルを誘起するリガンドの相互作用を含む。前記定義により特に構成される、前記相互作用の例は、抗体の結合ドメイン(抗原結合部位)との抗原決定基(エピトープ)との相互作用である。

【0049】

本願での「異種間特異性」又は「種間特異性」という用語は、本願に記載される結合ドメインの、ヒト及び非チンパンジー霊長類における同じ標的分子への結合を意味する。例えば、「異種間特異性」又は「種間特異性」は、異なる種に発現される同じ分子X以外の分子に対してではなく、同じ分子Xに対する種間反応性であると理解されたい。非チンパンジー霊長類CD3イプシロン、例えばマカクザルCD3イプシロンに対する、例えばヒ

トCD3イプシロンを認識するモノクローナル抗体の異種間特異性は、例えば、FACS分析により測定できる。FACS分析は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン抗原をそれぞれ発現するヒト及び非チンパンジー霊長類細胞、例えばマカクザル細胞に対する結合に関して、それぞれのモノクローナル抗体を試験する方法で実施される。適当なアッセイは、以下の実施例に示される。

【0050】

本願では、CD3イプシロンは、T細胞レセプターの一部として発現された分子を意味し、従来技術で典型的にそれに属する意味を有する。ヒトでは、公知の全てのCD3サブユニット、例えば、CD3イプシロン、CD3デルタ、CD3ガンマ、CD3ゼータ、CD3アルファ及びCD3ベータの個別又は独立に組み合わせられた形態を包含する。本願で言及される非チンパンジー霊長類CD3抗原は、例えば、マカカ・ファシキュラリスCD3及びマカカ・ムラッタCD3である。マカカ・ファシキュラリスでは、それはCD3イプシロンFN-18陰性及びCD3イプシロンFN-18陽性、CD3ガンマ及びCD3デルタを包含する。マカカ・ムラッタでは、それはCD3イプシロン、CD3ガンマ及びCD3デルタを包含する。好ましくは、本願で使用される前記CD3は、CD3イプシロンである。ヒトCD3イプシロンは、GenBankアクセッション番号NM_000733に示されており、配列番号1を含む。ヒトCD3ガンマは、GenBankアクセッション番号NM_000073に示されている。ヒトCD3デルタは、GenBankアクセッション番号NM_000732に示されている。

【0051】

マカカ・ファシキュラリスのCD3イプシロン「FN-18陰性」（すなわち、上述の多形性のためモノクローナル抗体FN-18に認識されないCD3イプシロン）は、GenBankアクセッション番号AB073994に示されている。

【0052】

マカカ・ファシキュラリスのCD3イプシロン「FN-18陽性」（すなわち、モノクローナル抗体FN-18に認識されるCD3イプシロン）は、GenBankアクセッション番号AB073993に示されている。マカカ・ファシキュラリスのCD3ガンマは、GenBankアクセッション番号AB073992に示されている。マカカ・ファシキュラリスのCD3デルタは、GenBankアクセッション番号AB073991に示されている。

【0053】

マカカ・ムラッタのそれぞれのCD3イプシロン、ガンマ及びデルタホモログの核酸配列及びアミノ酸配列は、当分野に記載されている組換え技術により同定及び単離できる（Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition 2001）。これは、本願に定義される他の非チンパンジー霊長類のCD3イプシロン、ガンマ及びデルタホモログにも、必要な変更を加えて当てはまる。カリスリクス・ジャカス、サイミリ・シウレウス及びサグイヌス・オイディプスのアミノ酸配列の同定は、添付する実施例に記載されている。カリスリクス・ジャカスのCD3イプシロンの細胞外ドメインのアミノ酸配列は配列番号3に示されており、サグイヌス・オイディプスの配列は配列番号5に、サイミリ・シウレウスの配列は配列番号7に示されている。

【0054】

上記のことと調和して、「エピトープ」という用語は、上記で定義された結合分子により特異的に結合／同定される抗原決定基を意味する。結合ドメイン又は分子は、標的構造に特有な、立体配座エピトープ又は連続エピトープ、例えばヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン鎖と特異的に結合／相互作用することができる。立体配座エピトープ又は不連続エピトープは、一次配列中では分かれているがポリペプチドがネイティブタンパク質／抗原中に折り畳まれる時分子の表面上で一緒になる2つ以上の別々なアミノ酸残基の存在により、ポリペプチド抗原のために特徴づけられる（Sela, (1969) S

10

20

30

40

50

c i e n c e 1 6 6 , 1 3 6 5 及び L a v e r , (1 9 9 0) C e l l 6 1 , 5 5 3 - 6) 。 エピトープに寄与する2つ以上の別々のアミノ酸残基は、1つ以上のポリペプチド鎖(複数可)の別々のセクションに存在する。これらの残基は、ポリペプチド鎖(複数可)が三次元構造中に折り畳まれる時分子の表面上で一緒になり、エピトープを構成する。対照的に、連続エピトープ又は直線エピトープは、ポリペプチド鎖の単一の直線セグメントに存在する2つ以上の別々のアミノ酸残基からなる。本発明の中では、「コンテキスト依存性」CD3エピトープは、前記エピトープのコンフォメーションを意味する。CD3のイプシロン鎖に局在化する、そのようなコンテキスト依存性エピトープは、イプシロン鎖の残りの部分に埋め込まれイプシロン鎖とCD3ガンマ又はデルタ鎖とのヘテロダイマー化により正しい位置に保持されないと、その正しいコンフォメーションがとれない。対照的に、本願に提供されるコンテキスト非依存性CD3エピトープは、CD3イプシロンのN末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド又はその機能性断片を意味する。このN末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド又はその機能性断片は、CD3複合体中でそのネイティブ環境から出される時、その三次元構造完全性及び正しいコンフォメーションを維持する。CD3イプシロンの細胞外ドメインの一部である、N末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド又はその機能性断片のコンテキスト非依存性は、国際公開第2004/106380号におけるヒト結合分子の調製方法に関して記載されているCD3イプシロンのエピトープとは完全に異なるエピトープである。前記方法は、単独で発現したりコンビナントCD3イプシロンを使用した。この単独で発現したりコンビナントCD3イプシロンのコンフォメーションは、その天然形態で採り入れられたものとは異なり、すなわちTCR/CD3複合体のCD3イプシロンサブユニットが、TCR/CD3複合体のCD3デルタ又はCD3ガンマサブユニットとの非共有結合複合体の一部として存在する形態である。そのような単独で発現したりコンビナントCD3イプシロンタンパク質が、抗体ライブラリーから抗体を選択するための抗原として使用される場合、この抗原に特異的な抗体はライブラリーから同定されるが、そのようなライブラリーは自己抗原(self-antigens)/自己抗原(autoantigens)に対する特異性を持つ抗体を含まない。これは、単独で発現したりコンビナントCD3イプシロンタンパク質がインビボで存在しない事実による。それは自己抗原ではない。その結果、このタンパク質に特異的な抗体を発現するB細胞の亜集団は、インビボで枯渇していない。そのようなB細胞から構成される抗体ライブラリーならば、単独で発現したりコンビナントCD3イプシロンタンパク質に特異的な抗体の遺伝物質を含むであろう。

【0055】

しかし、コンテキスト非依存性N末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド又はその機能性断片は、そのネイティブ形態で折り畳まれたエピトープであるので、本発明に調和する結合ドメインは、国際公開第04/106380号に記載されている手法に基づく方法では同定できない。したがって、国際公開第2004/106380号に開示されている結合分子が、CD3イプシロン鎖のN末端1-27アミノ酸残基に結合できないことが試験で実証されうる。そのため、従来抗CD3結合分子又は抗CD3抗体分子(例えば、国際公開第99/54440号に開示されたもの)は、本願に提供されるコンテキスト非依存性N末端1-27アミノ酸残基ポリペプチド又はその機能性断片よりも、よりC末端に位置する位置でCD3イプシロン鎖と結合する。従来技術抗体分子OKT3及びUCHT-1は、アミノ酸残基35から85の間のTCR/CD3複合体のイプシロンサブユニットに特異性を有し、したがって、これらの抗体のエピトープもよりC末端側に位置する。更に、UCHT-1は、アミノ酸残基43から77の領域でCD3イプシロン鎖と結合する(Tunnaccliffe, Int. Immunol. 1 (1989), 546-50; Kjer-Nielsen, PNAS 101, (2004), 7675-7680; Salmeron, J. Immunol. 147 (1991), 3047-52)。したがって、従来技術の抗CD3分子は、本願に定義されるコンテキスト非依存性N末端1-27アミノ酸残基エピトープ(又はその機能性断片)と結合せず、それに対して作られていない。

10

20

30

40

50

【0056】

本発明のポリペプチド中に、例えば本願に定義された二重特異性単鎖抗体中に含まれる、好ましくはヒトの、結合ドメインを生成するために、例えば、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン（例えば、マカクザルCD3イプシロン）の両方に結合するモノクローナル抗体が使用できる。

【0057】

本発明のポリペプチドの好ましい実施形態において、非チンパンジー霊長類は旧世界猿である。ポリペプチドのより好ましい実施形態において、旧世界猿は、ヒヒ属、マカク属のサルである。最も好ましくは、マカク属のサルは、アッサムモンキー（マカカ・アサメンシス、*Macaca assamensis*）、バーバリーマカク（マカカ・シルバヌス、*Macaca sylvanus*）、ボンネットモンキー（マカカ・ラディアタ、*Macaca radiata*）、ウスイロマカク又はスラウェシマカク（マカカ・オケレアタ、*Macaca ochreata*）、クロザル（マカカ・ニグラ、*Macaca nigra*）、タイワンザル（マカカ・キュクロピス、*Macaca cyclopsis*）、スノーモンキー又はニホンザル（マカカ・フスカタ、*Macaca fuscata*）、シノモルガスサル又はカニクイザル又はオナガザル又はクラ（マカカ・ファシキュラリス、*Macaca fascicularis*）、シシオザル（マカカ・シレヌス、*Macaca silenus*）、ブタオザル（マカカ・ネメストリナ、*Macaca nemestrina*）、アカゲザル（マカク・ムラッタ、*Macacamulatta*）、チベットマカク（マカカ・チベタナ、*Macaca tibetana*）、トンケアンモンキー（マカカ・トンケアナ、*Macaca tonkeana*）、トクモンキー（マカカ・シニカ、*Macacasinica*）、ベニガオザル（*Stump-tailed macaque*）、ベニガオザル（*Red-faced macaque*）又はクマザル（マカカ・アークトイデス、*Macaca arctoides*）又はムーアモンキー（マカカ・マウラ、*Macaca maurus*）である。最も好ましくは、ヒヒ属のサルは、マントヒヒ（パピオ・ハマドリアス、*Papio hamadryas*）；ギニアヒヒ（パピオ・パピオ、*Papio papio*）；アヌビスヒヒ（パピオ・アヌビス、*Papio anubis*）；キイロヒヒ（パピオ・シノセファルス、*Papio cynocephalus*）；チャクマヒヒ（パピオ・ウルシヌス、*Papio ursinus*）である。

【0058】

本発明のポリペプチドの別の好ましい実施形態において、非チンパンジー霊長類は新世界猿である。ポリペプチドのより好ましい実施形態において、新世界猿は、マーモセット属（マーモセット）、タマリン属又はリスザル属のサルである。最も好ましくは、マーモセット属のサルはカリスリクス・ジャカスであり、タマリン属のサルはサグイヌス・オイディプスであり、リスザル属のサルはサイミリ・シウレウスである。

【0059】

本願で上述したように、本発明のポリペプチドは、ヒト及び非チンパンジー類人猿CD3ε（イプシロン）鎖のエピトープに、第1結合ドメインで結合するが、前記エピトープは、配列番号2、4、6又は8に記載される27アミノ酸残基又はその機能性断片からなる群に含まれるアミノ酸配列の一部である。

【0060】

本発明と調和して、本発明のポリペプチドにとって、前記エピトープが、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6又は5アミノ酸を含むアミノ酸配列の一部であることが好ましい。

【0061】

より好ましくは、前記エピトープは、少なくともアミノ酸配列Gln-Asp-Gly-Asn-Glu（Q-D-G-N-E-D）を含む。

【0062】

本発明の中で、「N末端1-27アミノ酸残基の機能性断片」は、CD3複合体のネイティブ環境から取り出された（そして、例えば実施例3.1に示すとおり、EpCAM又は免疫グロブリンFc部などの異種アミノ酸配列に融合された）時に、前記機能性断片が、まだ、その三次元構造完全性を維持するコンテクスト非依存性エピトープであることを意味する。CD3イプシロンの27アミノ酸N末端ポリペプチド又はその機能性断片内の三次元構造の維持は、インビトロでのN末端CD3イプシロンポリペプチド断片に、及びインビボでのT細胞上のネイティブ（CD3イプシロンサブユニット）CD3複合体に、同じ結合親和力で結合する結合ドメインの生成に利用できる。本発明の中で、N末端1-27アミノ酸残基の機能性断片は、本願に提供されるCD3結合分子が、コンテクスト独立的にそのような機能性断片に結合できることを意味する。当業者は、そのような抗CD3結合分子がエピトープのどのアミノ酸残基を認識するのかを測定するエピトープマッピングの方法（例えば、アラニンスキャニング）分析を承知している。

10

【0063】

本発明の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、ヒト及び非チンパンジー類人猿CD3ε鎖のエピトープに結合可能な（第1）結合ドメイン及び細胞表面抗原に結合可能な第2結合ドメインを含む。

【0064】

本願での「細胞表面抗原」という用語は、細胞の表面上に提示されている分子を意味する。ほとんどの場合で、この分子は、この分子の少なくとも一部分が、三次形態で細胞の外部から接近可能なままであるように、細胞の細胞膜の中又はその上に位置するであろう。細胞膜中に位置する細胞表面分子の非限定的な例は、その三次コンフォメーションで、親水性及び疎水性の領域を含む膜貫通型タンパク質である。ここで、少なくとも1つの疎水性領域は、細胞表面分子が細胞の疎水性細胞膜に埋め込まれるか、挿入されるようにし、その一方で親水性領域は、細胞膜の両面に延びてそれぞれ細胞質及び細胞外空間に延びる。細胞膜上に位置する細胞表面分子の非限定的な例は、パルミトイル基を持つようにシステイン残基で修飾されたタンパク質、ファルネシル基を持つようにC末端システイン残基で修飾されたタンパク質又はグリコシルホスファチジルイノシトール（「GPI」）アンカーを持つようにC末端で修飾されたタンパク質である。これらの基により、細胞膜の外部表面にタンパク質が共有結合でき、それらは抗体などの細胞外分子による認識のために接近可能なままである。細胞表面抗原の例には、EGFR、EGFRvIII、MCS P、炭酸脱水酵素IX（CAIX）、CD30、CD33、Her2/neu、IgE、CD44v6及びMuc-1がある。さらに、対応する細胞表面抗体の例は、特定の疾病又は病気、すなわち、ガン、自己免疫疾患又はウイルス感染を含む感染症に特徴的な抗原を含む。したがって、「細胞表面抗原」という用語は、感染細胞の表面に露出するネイティブの、未処理のウイルスタンパク質（とりわけ、B型、C型肝炎ウイルス及びHIV-1のエンベロープタンパク質に関して記載される）などのウイルスタンパク質を明確に含む。

20

30

【0065】

細胞障害性T細胞の防御機能の1つはウイルス感染細胞の破壊であり、したがって、本発明の二重特異性結合分子が、その自己由来の特異性にかかわらず、細胞障害性T細胞を活性化させ向け直す独特な性質は、広い分野の慢性ウイルス感染に大きな影響を持つ。これらの感染症の大部分にとって、持続感染している細胞の除去は、治癒のための唯一の機会である。最近、慢性CMV及びEBV感染症に対して、養子T細胞療法が開発されつつある（Rooney, CM., et al., Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. Lancet, 1995. 345 (8941): p. 9-13; Walter, EA, et al., Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfe

40

50

r of T-cell clones from the donor. N Engl J Med, 1995. 333 (16): p. 1038-44)。

【0066】

慢性B型肝炎感染は、明らかに、最も興味深くやりがいのある適応症の1つである。世界中で3億5千万人から4億人がHBVに感染している。慢性HBV肝炎の最近の治療は、インターフェロンガンマ及びヌクレオシド又はヌクレオチドアナログにあり、肝炎拡大、発熱、筋痛症、血小板減少及び鬱の誘起などの著しい副作用を伴う長期の治療である。現在4を超える認可された治療レジメンがあるが、ウイルスの除去が達成されることは希である。慢性B型肝炎の持続炎症は、25%を超える患者に肝硬変及び肝細胞ガンを起こす。さらに、慢性B型肝炎の患者の40%までが、重篤な合併症で死亡し、これは世界中で年間に60万人から100万人の死亡原因となっている。

10

【0067】

ヘパドナウイルスの原型であるHBVは、その緩和環状(rc)ゲノムがRNAプレゲノムに逆転写される、エンベロープウイルスである。感染後、rcDNAは肝細胞の細胞核に取り込まれ、そこで4つの重複するリーディングフレームを含む共有結合閉環状DNA(cccDNA)になる。それは、プレゲノムRNA及び3つのサブゲノムRNAのための転写鋳型として働く。RNAプレゲノムは、ウイルスコア及びポリメラーゼタンパク質の翻訳のためのmRNAとして機能する。感染細胞は、HBV複製が停止した時でも、cccDNAからHBV表面タンパク質(HBsAg)を連続的に産生する。HBsAgは、極低い割合の中程度及び大きい(L)表面タンパク質と共に小さい表面(S)タンパク質からなる。HBVS及びLのどちらも、小胞体(ER)膜を標的とし、そこでそれらは膜小胞中でトランスゴルジ小器官を介して細胞膜に輸送される(Gorelick, F. S. and C. Shugrue, Exiting the endoplasmic reticulum. Mol Cell Endocrinol, 2001. 177 (1-2): p. 13-8)。最近示されたとおり、S及びLタンパク質は、HBVを複製する肝細胞の表面上で永久に発現される(Chu, CM. and Y. F. Liaw, Membrane staining for hepatitis B surface antigen on hepatocytes: a sensitive and specific marker of active viral replication in hepatitis B. J Clin Pathol, 1995. 48 (5): p. 470-3)。

20

30

【0068】

細胞表面でエンベロープタンパク質を露出するプロトタイプウイルスは、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)及びHIV-1であり、そのどちらも世界的に莫大な疾病の苦しみを象徴する。HIV-1ウイルス適応症では、gp120エンベロープタンパク質に対するFv抗体コンストラクトを持つキメラTCRにより修飾されたT細胞がHIV-1に感染した標的細胞を殺すことができることが最近示された(Masiero, S., et al., T-cell engineering by a chimeric T-cell receptor with antibody-typespecificity for the HIV-1 gp120. Gene Ther, 2005. 12 (4): p. 299-310)。ヘパドナウイルスのうち、B型肝炎ウイルス(HBV)は、HBV複製が低下した場合ですら、エピソーマルcccDNAから連続的に産生されるエンベロープタンパク質複合体HBsAgを発現する。

40

【0069】

細胞表面上での無傷のS及びL HBVタンパク質としての発現は、患者が感染の急性期から回復し、循環するHBsAgから抗HBsに変わる時に、血清変換の特徴である抗体にとって接近可能になる。血清変換が起こらない場合、最大30%の肝細胞が、長期間の非常に活性な抗ウイルス治療の後でも、HBVSタンパク質を発現し続ける。したがって、細胞内で処理されたHBVペプチドを特異的に認識し細胞表面でMHC分子により提示されるTリンパ球を超えて、外部細胞膜中で接近可能なS及びL抗原などの無傷の表面

50

タンパク質に向けられた、他の形態のT細胞関与がありうる。B型肝炎ウイルス小(S)及び大(L)エンベロープタンパク質を認識する単鎖抗体断片を使用して、グラフトT細胞を感染した肝細胞に向け、これらのT細胞の抗原接触活性化時にサイトカインを分泌し、感染した肝細胞を殺すことを可能にする、人工T細胞レセプターが生成された。

【0070】

この手法の限界は、(i) T細胞をインビトロで操作する必要がある、(ii) T細胞レセプターの輸送に使用するレトロウイルスは、T細胞中に挿入突然変異を起こすことがある、(iii) T細胞が一旦輸送されると細胞障害性応答は制限できない。

【0071】

これらの限界を克服するため、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン抗原(本発明の文脈中で本願に提供される)に対する結合特異性を持つ第1ドメイン並びに感染肝細胞のHBV又はHBCエンベロープタンパク質に対する結合特異性を持つ第2ドメインを含む、二重特異性単鎖抗体分子を生成することができ、これは本発明の範囲内である。

【0072】

本発明の中で、第2結合ドメインが、ヒトの及び／又は非チンパンジー霊長類の細胞表面抗原と結合することがさらに好ましい。

【0073】

本発明のポリペプチド、例えば本願に定義される二重特異性単鎖抗体の第2結合ドメインを生成するために、それぞれのヒト及び／又は非チンパンジー霊長類の細胞表面抗原の両方に結合するモノクローナル抗体が利用できる。本願に定義される二重特異性ポリペプチドのための適切な結合ドメインは、当分野に記載されている組換え法による異種間特異性モノクローナル抗体から誘導できる。ヒトの細胞表面抗原及び非チンパンジー霊長類の前記表面抗原のホモログに結合するモノクローナル抗体は、上述のとおりFACSアッセイにより試験できる。異種間特異性抗体も文献に記載されているハイブリドーマ技術から生成できることは当業者には明らかである(Milstein and Kohler, Nature 256 (1975), 495-7)。例えば、マウスを、ヒト及び非チンパンジー霊長類のCD33に対して交互に免疫することができる。これらのマウスから、異種間特異性抗体を産生するハイブリドーマ細胞がハイブリドーマ技術により単離され、上述のとおりFACSにより分析される。本願に記載された異種間特異性を示す二重特異性単鎖抗体などの二重特異性ポリペプチドの生成及び分析は、以下の実施例に示される。異種間特異性を示す二重特異性単鎖抗体の利点は、以下に列挙された点を含む。

【0074】

本発明のポリペプチドにとって、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープと結合可能な第1結合ドメインが、以下から選択されるCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を含むことが特に好ましい：

(a) 配列番号27に示されるCDR-L1、配列番号28に示されるCDR-L2及び配列番号29に示されるCDR-L3；

(b) 配列番号117に示されるCDR-L1、配列番号118に示されるCDR-L2及び配列番号119に示されるCDR-L3；

(c) 配列番号153に示されるCDR-L1、配列番号154に示されるCDR-L2及び配列番号155に示されるCDR-L3。

【0075】

可変領域、すなわち可変軽鎖(「L」又は「VL」)及び可変重鎖(「H」又は「VH」)は、抗体の結合ドメインを与えると当分野で理解される。この可変領域は、相補性決定領域を含む。「相補性決定領域」(CDR)という用語は、抗体の抗原特異性を示すことが当分野に周知である。「CDR-L」又は「LCDR」という用語は、VL中のCDRを意味し、「CDR-H」又は「HCDR」という用語は、VH中のCDRを意味する。

【0076】

本発明のポリペプチドの別の好ましい実施形態において、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープに結合可能な第1結合ドメインは、以下から選択されるCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域を含む：

(a) 配列番号12に示されるCDR-H1、配列番号13に示されるCDR-H2及び配列番号14に示されるCDR-H3；

(b) 配列番号30に示されるCDR-H1、配列番号31に示されるCDR-H2及び配列番号32に示されるCDR-H3；

(c) 配列番号48に示されるCDR-H1、配列番号49に示されるCDR-H2及び配列番号50に示されるCDR-H3；

(d) 配列番号66に示されるCDR-H1、配列番号67に示されるCDR-H2及び配列番号68に示されるCDR-H3；

(e) 配列番号84に示されるCDR-H1、配列番号85に示されるCDR-H2及び配列番号86に示されるCDR-H3；

(f) 配列番号102に示されるCDR-H1、配列番号103に示されるCDR-H2及び配列番号104に示されるCDR-H3；

(g) 配列番号120に示されるCDR-H1、配列番号121に示されるCDR-H2及び配列番号122に示されるCDR-H3；

(h) 配列番号138に示されるCDR-H1、配列番号139に示されるCDR-H2及び配列番号140に示されるCDR-H3；

(i) 配列番号156に示されるCDR-H1、配列番号157に示されるCDR-H2及び配列番号158に示されるCDR-H3；及び

(j) 配列番号174に示されるCDR-H1、配列番号175に示されるCDR-H2及び配列番号176に示されるCDR-H3。

【0077】

ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープに結合可能な結合ドメインが、配列番号35、39、125、129、161又は165に示されるVL領域からなる群から選択されるVL領域を含むことがさらに好ましい。

【0078】

或いは、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープに結合可能な第1結合ドメインが、配列番号15、19、33、37、51、55、69、73、87、91、105、109、123、127、141、145、159、163、177又は181に示されるVH領域からなる群から選択されるVH領域を含むことが好ましい。

【0079】

より好ましくは、本発明のポリペプチドは、以下からなる群から選択されるVL領域及びVH領域を含む、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープに結合可能な第1結合ドメインにより特徴づけられる。

(a) 配列番号17又は21に示されるVL領域及び配列番号15又は19に示されるVH領域；

(b) 配列番号35又は39に示されるVL領域及び配列番号33又は37に示されるVH領域；

(c) 配列番号53又は57に示されるVL領域及び配列番号51又は55に示されるVH領域；

(d) 配列番号71又は75に示されるVL領域及び配列番号69又は73に示されるVH領域；

(e) 配列番号89又は93に示されるVL領域及び配列番号87又は91に示されるVH領域；

(f) 配列番号107又は111に示されるVL領域及び配列番号105又は109に示されるVH領域；

(g) 配列番号125又は129に示されるVL領域及び配列番号123又は127に示されるVH領域；

10

20

30

40

50

(h) 配列番号 1 4 3 又は 1 4 7 に示される V L 領域及び配列番号 1 4 1 又は 1 4 5 に示される V H 領域；

(i) 配列番号 1 6 1 又は 1 6 5 に示される V L 領域及び配列番号 1 5 9 又は 1 6 3 に示される V H 領域；及び

(j) 配列番号 1 7 9 又は 1 8 3 に示される V L 領域及び配列番号 1 7 7 又は 1 8 1 に示される V H 領域。

【0080】

本発明のポリペプチドの好ましい実施形態によると、V H 領域と V L 領域の組は、単鎖抗体 (s c F v) のフォーマットにある。V H 及び V L 領域は、V H - V L 又は V L - V H の順番に配置されている。V H 領域が、リンカー配列の N 末端に位置することが好ましい。V L 領域は、リンカー配列の C 末端に位置する。

10

【0081】

本発明の上述のポリペプチドの好ましい実施形態は、配列番号 2 3、2 5、4 1、4 3、5 9、6 1、7 7、7 9、9 5、9 7、1 1 3、1 1 5、1 3 1、1 3 3、1 4 9、1 5 1、1 6 7、1 6 9、1 8 5 又は 1 8 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 3 ε 鎖のエピトープに結合可能な第 1 結合ドメインにより特徴づけられる。

【0082】

本発明は、第 2 結合ドメインが、好ましくは腫瘍抗原である細胞表面抗原に結合する、上述のポリペプチドにさらに関する。

20

【0083】

本願での「腫瘍抗原」という用語は、腫瘍細胞上に提示される抗原であると理解される。これらの抗原は、分子の膜貫通及び細胞質部分と結合していることが多い細胞外部分とともに細胞表面に提示されることがある。これらの抗原は、腫瘍細胞によりのみ提示され、通常細胞によっては決して提示され得ない。腫瘍抗原は、腫瘍細胞上にのみ発現されるか、通常細胞と比較して腫瘍特異的な突然変異を表すことがある。この場合、それらは腫瘍特異的抗原と称される。腫瘍細胞及び通常細胞により提示される抗原がより一般的であり、それらは腫瘍関連抗原と称される。これらの腫瘍関連抗原は、正常細胞と比較して過剰発現される場合があり、又は正常組織と比較して腫瘍組織の構造が小さくないことから腫瘍細胞中で抗体結合を起こしやすい。本明細書で用いられる腫瘍抗原の限定されない例としては、E G F R (L i u, B r. J. C a n c e r 8 2 / 1 2 (2 0 0 0), 1 9 9 1 - 1 9 9 9; B o n n e r, S e m i n. R a d i a t. O n c o l. 1 2 (2 0 0 2), 1 1 - 2 0; K i y o t a, O n c o l o g y 6 3 / 1 (2 0 0 2), 9 2 - 9 8; K u a n, B r a i n T u m o r P a t h o l. 1 7 / 2 (2 0 0 0), 7 1 - 7 8)、E G F R v I I I (K u a n, B r a i n T u m o r P a t h o l. 1 7 / 2 (2 0 0 0), 7 1 - 7 8)、カルボアンヒドラーゼ I X (C a r b o a n h y d r a s e I X) (M N / C A I X) (U e m u r a, B r. J. C a n c e r 8 1 / 4 (1 9 9 9), 7 4 1 - 7 4 6; L o n g c a s t e r, C a n c e r R e s. 6 1 / 1 7 (2 0 0 1), 6 3 9 4 - 6 3 9 9; C h i a, J. C l i n. O n c o l. 1 9 / 1 6 (2 0 0 1), 3 6 6 0 - 3 6 6 8; B e a s l e y, C a n c e r R e s. 6 1 / 1 3 (2 0 0 1), 5 2 6 2 - 5 2 6 7)、C D 3 3 (A b u t a l i b, C u r r P h a r m B i o t e c h n o l. 7 (2 0 0 6), 3 4 3 - 6 9)、M C S P (C a m p o l i, C r i t R e v I m m u n o l. 2 4 (2 0 0 4), 2 6 7 - 9 6)、又は I g E (I n f u h r, A l l e r g y 6 0 (2 0 0 5), 9 7 7 - 8 5) である。

30

40

【0084】

腫瘍抗原は、E G F R、E G F R v I I I、M C S P、E p C A M、カルボニックアンヒドラーゼ I X (C A I X)、C D 3 0、C D 3 3、H e r 2 / n e u、C D 4 4 v 6、及び M u c - 1 から選択されることが好ましい。

【0085】

50

EGFR (c-erbB1又はHER1としても知られる)は、erbBレセプターチロシンキナーゼファミリーに属する。成長因子のEGFファミリーのリガンドの結合により活性化すると、EGFRは、第2のEGFR又はerbBレセプターファミリーの他のメンバーとそれぞれホモダイマー化又はヘテロダイマー化し、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ及び他の転写因子によりシグナル伝達カスケードを開始し、増殖、分化及び修復が起こる (Olayioye, EMBO J. 19 (2000), 3159-67)。EGFRは、結直腸ガン、乳ガン、肺ガン及び頭頸部ガンを含む多くの上皮ガンで過剰発現される (Mendelsohn, J. Clin. Oncol. 21 (2003), 2787-99; Mendelsohn, J. Clin. Oncol. 20 (18, Suppl.) (2002), 1S-13S; Prewett, Clin. Cancer Res. 8 (2002), 994-1003)。悪性細胞中でのEGFRの過剰発現及び／又は突然変異は、キナーゼ活性の恒常的活性化につながり、増殖、血管形成、浸潤、転移及びアポトーシスの阻害を起こす (Mendelsohn (2003, 上記引用文献; Ciardiello, Clin. Cancer Res. 7 (2001), 2958-70; Perez-Soler, Oncologist 9 (2004), 58-67)。細胞外リガンド結合ドメイン又はEGFRの細胞内チロシンキナーゼシグナル伝達カスケードを標的にするモノクローナル抗体は、抗腫瘍標的としての効力が示されている (Laskin, Cancer Treat. Review 30 (2004), 1-17)。例えば、セツキシマブ (Erbix) 、EGFRに対するヒト化モノクローナル抗体は、EGFRの細胞外ドメインを競合阻害し、レセプターのリガンド活性化を阻害するが、トポイソメラーゼ阻害剤イリノテカンと組み合わせた転移性大腸ガンの治療用に食品医薬品局 (FDA) により2004年に認可された。

【0086】

メラノーマ関連細胞表面コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Melanoma-associated cell surface chondroitin sulphate proteoglycan) (MCSP) は、高分子量メラノーマ関連抗原 (HMW-MAA) 又はメラノーマ関連プロテオグリカンとしても知られる、250kDaの糖タンパク質コア及びそれに結合したグリコサミノグリカン鎖を含む450kDaを超える大型の細胞表面プロテオグリカンである (Pluschke, PNAS 93 (1996), 9710; Nishiyama, J. Cell Biol. 114 (1991), 359)。MCSPの正確な作用は、未だ分かっていない。MCSPは、細胞外器質 (ECM) との細胞間相互作用を媒介する共に、恐らく、血管形成、組織浸潤、及び細胞伸展に参与する受容体としての機能を果たす可能性があり、恐らく、血管形成、組織浸潤、及び細胞伸展に参与する (Burg, Cancer Res. 59 (1999), 2869; Iida, J. Biol. Chem. 276 (2001), 18786; Eisenmann, Nat. Cell Biol. 1 (1999), 507; Iida, Cancer Res. 55 (1995), 2177; Campoli (2004), loc. cit)。MCSPはa4b1によるリガンド結合を増強することができ、MCSPの活性化により、cdc42依存性及びp130cas依存性機構によるインテグリンが媒介する細胞浸潤が増強され得る。MCSPは、コンドロイチン硫酸を介してMT3-MMPと関連し、種々のECMタンパク質を分解し得る。これは、MT3-MMPを特異的に細胞のECM接着部位に局在させることができる。従って、I型コラーゲンの浸潤及びI型ゼラチンの分解には、両分子が必要であると考えられる (Iida (2001), loc. cit.)。MCSPは、腫瘍細胞の表面で顕著に発現される、メラノーマの主要なマーカーである。MCSPは、少なくとも90%のメラノーマ病変で発現する (Natali, J. Natl. Cancer Inst. 72 (1984), 13)。全てのメラノーマ関連抗原の中で、MCSPは最も低度の不均質性を示す (Natali, Cancer Res. 45 (1985), 2883)。通常MCSP陽性である、表在拡大型メラノーマ (発生率: 60%)、結節型メラノーマ (発生率: 20%) 及び悪性黒子性メラノーマ (発生率: 10%) の原発腫瘍 (Reza Zi

a i 1987 Cancer Res. 47: 2474) とは対照的に、末端性黒子性メラノーマ（発生率：5%）の原発腫瘍は、しばしばMCSP陰性である（Kageshita, Cancer Res. 51 (1991), 1726）。現在、米国では、毎年53,600件の新たなメラノーマの症例が診断されている（2002年）。全体的なメラノーマ発生率は増加している。

【0087】

本発明の好ましい実施形態において、ポリペプチドは二重特異性単鎖抗体分子である。

【0088】

前臨床試験のためのサロゲート分子の開発に関する本願で先に記載した問題は、薬剤候補が二重特異性抗体、例えば二重特異性単鎖抗体である場合、さらにひどくなる。そのような二重特異性抗体では、認識される抗原の両方が、ある動物種に異種間特異性であり、そのような動物での安全性試験を可能にすることが要される。

【0089】

やはり本願で先に記したとおり、本発明は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε鎖のエピトープに結合可能な第1結合ドメイン及び細胞表面抗原に結合可能な第2結合ドメインを含むポリペプチドを提供するが、前記第2結合ドメインは、ヒト及び／又は非チンパンジー霊長類の細胞表面抗原にも結合することが好ましい。本発明の好ましいポリペプチドの要件を満たす薬剤候補としての二重特異性単鎖抗体分子の利点は、その様な分子の前臨床動物試験での使用並びに臨床試験で、さらにはヒトの治療での使用である。本発明の種間特異的二重特異性単鎖抗体の好ましい実施形態において、細胞表面抗原に結合する第2の結合ドメインはヒト起源である。本発明の種間特異的二重特異性分子において、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン鎖のエピトープに結合する結合ドメインは、二重特異性分子のN末端又はC末端でVH-VL又はVL-VHの順で位置する。第1及び第2結合ドメインにおいてVH及びVL鎖の異なる配列にある本発明の種間特異的二重特異性分子の例は、添付する実施例に記載される。

【0090】

本願では、「二重特異性単鎖抗体」は、2つの結合ドメインを含むポリペプチド単鎖を意味する。各結合ドメインは、抗体重鎖からの1つの可変領域（「VH領域」）を含むが、第1結合ドメインのVH領域は、CD3ε分子に特異的に結合し、第2結合ドメインのVH領域は、以下により詳細に定義される細胞表面抗原に特異的に結合する。2つの結合ドメインは、短いポリペプチドスペーサーにより任意に互いに結合する。ポリペプチドスペーサーの非限定的な例は、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（G-G-G-G-S）及びそのリピートである。各結合ドメインは、抗体軽鎖からの1つの可変領域（「VL領域」）をさらに含み、第1及び第2結合ドメインのそれぞれにおいて、VH領域及びVL領域は、例えばEP623679B1に開示され特許請求されているタイプのポリペプチドリンカーにより互いに結合しているが、しかしいずれにせよ第1結合ドメインのVH領域及びVL領域と第2結合領域のVH領域及びVL領域が、それぞれの第1及び第2分子と特異的に結合できるように、互いに組むことが可能なほど長い。

【0091】

本発明の好ましい態様によると、上記で特徴付けた二重特異性単鎖抗体分子は、第二の結合ドメイン中にCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3として以下の配列の一群：配列番号：189-194、配列番号：201-206、配列番号：219-224、配列番号：237-242、配列番号：255-260、配列番号：273-279、配列番号：382-384及び387-389、配列番号：400-402及び405-407、配列番号：418-420及び423-425、配列番号：436-438及び441-443、配列番号：454-456及び459-461、配列番号：472-474及び477-479、配列番号：490-492及び495-497、配列番号：及び508-510及び513-515、配列番号：530-532及び568乃至570、配列番号：545-547及び550-552、配列番号：559-561及び564-566、配列番号：577-579及び5

82 - 584、配列番号：615 - 617及び620 - 622、配列番号：633 - 635、638、639、及び1571、配列番号：650 - 652及び655 - 657、配列番号：668 - 670及び673 - 675、配列番号：682 - 684及び687 - 689、配列番号：696 - 698及び701 - 703、配列番号：710 - 712及び715 - 717、配列番号：724 - 726及び729 - 731、配列番号：738 - 740及び743 - 745、配列番号：752 - 754及び757 - 759、配列番号：766 - 768及び771 - 773、配列番号：780 - 782及び785 - 787、配列番号：794 - 796及び799 - 801、配列番号：808 - 810及び813 - 815、配列番号：822 - 824及び827 - 829、配列番号：836 - 838及び841 - 843、配列番号：850 - 852及び855 - 857、配列番号：866 - 868及び871 - 873、配列番号：884 - 886及び889 - 891、配列番号：902 - 904及び907 - 909、配列番号：920 - 922及び925 - 927、配列番号：938 - 940及び943 - 945、配列番号：956 - 958及び961 - 963、配列番号：974 - 976及び979 - 981、配列番号：992 - 994及び997 - 999、配列番号：1006 - 1008及び1011 - 1013、配列番号：1020 - 1022及び1025 - 1027、配列番号：1034 - 1036及び1039 - 1041、配列番号：1048 - 1050及び1053 - 1055、配列番号：1062 - 1064及び1067 - 1069、配列番号：1076 - 1078及び1081 - 1083、配列番号：1090 - 1092及び1095 - 1097、配列番号：1114 - 1116及び1119 - 1121、配列番号：1128 - 1130及び1133 - 1135、配列番号：1141 - 1143及び1146 - 1148、配列番号：1155 - 1157及び1160 - 1162、配列番号：1169 - 1171及び1174 - 1176、配列番号：1183 - 1185及び1188 - 1190、配列番号：1197 - 1199及び1202 - 1204、配列番号：1211 - 1213及び1216 - 1218、配列番号：1225 - 1227及び1230 - 1232、配列番号：1239 - 1241及び1244 - 1246、配列番号：1253 - 1255及び1258 - 1260、配列番号：1267 - 1269及び1272 - 1274、配列番号：1281 - 1283及び1286 - 1288、配列番号：1295 - 1297及び1300 - 1302、配列番号：1309 - 1311及び1314 - 1316、配列番号：1323 - 1325及び1328 - 1330、配列番号：1343 - 1345及び1348 - 1350、配列番号：1361 - 1363及び1366 - 1368、配列番号：1375 - 1377及び1380 - 1382、配列番号：1389 - 1391及び1394 - 1396、配列番号：1403 - 1405及び1408 - 1410、配列番号：1417 - 1419及び1422 - 1424、配列番号：1431 - 1433及び1436 - 1438、配列番号：1445 - 1447及び1450 - 1452、配列番号：1459 - 1461及び1464 - 1466、配列番号：1473 - 1475及び1478 - 1480、配列番号：1486 - 1491、配列番号：1492 - 1497、配列番号：1505 - 1507及び1510 - 1512、配列番号：1531 - 1533及び1536 - 1538、配列番号：1573 - 1575及び1578 - 1580、配列番号：1591 - 1593及び1596 - 1598、配列番号：1605 - 1607及び1610 - 1612、及び配列番号：1619 - 1621、1624 - 1626、配列番号：1634 - 1636及び1639 - 1641、及び配列番号：1652 - 1654、配列番号：1657 - 1659、並びに配列番号：1669 - 1674、から成る群より選択される一群を含む。

【0092】

本発明の特に好ましい態様は、上記で述べたポリペプチドに関し、ここで、二重特異性単鎖抗体分子は：

(a) 配列番号291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311、313、315、317、319、321、323、325、327、329、331、333、335、337、339、341、343、345若しくは347、393、395、397、411、413、415、429、431、43

3、447、449、451、465、467、469、483、485、487、501、503、505、519、521、523、1336、1338、1340、538、540、542、556、570、572、574、588、590、592、626、628、630、643、645、647、661、663、665、679、693、707、721、735、749、763、777、791、805、819、833、847、861、863、877、879、881、895、897、899、913、915、917、931、933、935、949、951、953、967、969、971、985、987、989、1003、1017、1031、1045、1059、1073、1087、1101、1125、1138、1152、1166、1180、1194、1208、1222、1236、1250、1264、1278、1292、1306、1320、1334、1354、1356、1358、1372、1386、1400、1414、1428、1442、1456、1470、1484、1500、1502、1518、1520、1522、1524、1526、1528、1544、1546、1548、1550、1552、1554、1556、1558、1560、1562、1564、1566、1586、1588、1602、1616、1630、1647、1649、又は1663のいずれかで示されるアミノ酸配列；及び、

(b) 配列番号292、294、296、298、300、302、304、306、308、310、312、314、316、318、320、322、324、326、328、330、332、334、336、338、340、342、344、346若しくは348、394、396、398、412、414、416、430、432、434、448、450、452、466、468、470、484、486、488、502、504、506、520、522、524、1337、1339、1341、539、541、543、557、571、573、575、589、591、593、627、629、631、644、646、648、662、664、666、680、694、708、722、736、750、764、778、792、806、820、834、848、862、864、878、880、882、896、898、900、914、916、918、932、934、936、950、952、954、968、970、972、986、988、990、1004、1018、1032、1046、1060、1074、1088、1102、1126、1139、1153、1167、1181、1195、1209、1223、1237、1251、1265、1279、1293、1307、1321、1335、1355、1357、1359、1373、1387、1401、1415、1429、1443、1457、1471、1485、1501、1503、1519、1521、1523、1525、1527、1529、1545、1547、1549、1551、1553、1555、1557、1559、1561、1563、1565、1567、1587、1589、1603、1617、1631、1648、1650、又は1664のいずれかで示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、
から選択される配列を含む。

【0093】

本発明の好ましい態様では、二重特異性単鎖抗体は、CD3イプシロンに対して、及びその第二の結合ドメインによって認識される細胞表面抗原に対して種間特異的である。より好ましい態様では、このような二重特異性単鎖抗体は、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類MCSP、EGFR、EGFRvIII、カルボニックアンヒドラーゼIX、CD30、CD33、IgE、CD44v6、Muc-1、HBV、及びHCVに対して種間特異的である。別の選択肢としての態様では、本発明は、上述の本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を提供する。

【0094】

本発明はまた、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。

【0095】

10

20

30

40

50

多くの好適なベクターが分子生物学の当業者に公知であり、その選択は望まれる機能に依存するであろうが、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ及び遺伝子工学で従来使用される他のベクターがある。当業者に周知の方法を利用して種々のプラスミド及びベクターを構築することができる。例えば、Sambrook et al. (上記引用文献) 及び Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989), (1994) に記載されている技術を参照されたい。或いは、本発明のポリヌクレオチド及びベクターを、標的細胞への送達のため、リボソーム中に再構築することもできる。以下に詳細に議論されるように、クローニングベクターを使用してDNAの個別の配列を単離することもできる。関連する配列を、特定のポリペプチドの発現が求められる発現ベクター中に移すこともできる。典型的なクローニングベクターは、p Bluescript SK、p GEM、p UC9、p BR322 及び pGBT9 がある。典型的な発現ベクターには p TRE、p CAL-n-EK、p ESP-1、p OP13CAT がある。

【0096】

好ましくは、前記ベクターは、本願に定義される前記核酸配列に機能的に結合している調節配列である核酸配列を含む。

【0097】

「調節配列」という用語は、それがライゲーションされるコード配列の発現をもたらすのに必要なDNA配列を意味する。そのような制御配列の性質は、宿主生物により異なる。原核生物では、一般的に、制御配列はプロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーターを含む。真核生物では、一般的に、制御配列は、プロモーター、ターミネーター及び、場合によって、エンハンサー、トランスアクティベーター又は転写因子を含む。「制御配列」という用語は、最低でも、その存在が発現に必要な全成分を含むものとし、追加の有利な成分も含むことがある。

【0098】

「機能的に結合する」という用語は、そのように記載される成分が、その意図される方法で機能することを可能にする関係にある並列である。コード配列に「機能的に結合する」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と同等の条件下で達成するようにライゲーションされる。制御配列がプロモーターである場合、二本鎖核酸が使用されることが好ましいことは当業者には明らかである。

【0099】

従って、列挙されるベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」は、選択された宿主を形質転換するために使用でき、選択された宿主中にコード配列の発現を可能にするコンストラクトである。発現ベクターは、例えば、クローニングベクター、バイナリーベクター又は組み込み型ベクターでよい。発現は、好ましくは翻訳可能なmRNAへの核酸分子の転写を含む。

【0100】

原核生物及び／又は真核生物において発現を確実にする調節因子は、当業者に周知である。真核細胞の場合には、それらは、転写の開始を確実にするプロモーター並びに、任意に、転写の停止及び転写の安定化を確実にするポリAシグナルを通常含む。原核生物宿主細胞での発現を可能にする可能性のある調節因子は、例えば、大腸菌でのPL、lac、trp又はtacプロモーターがあり、真核生物宿主細胞での発現を可能にする調節因子の例は、酵母菌中のAOX1又はGAL1プロモーター、又は哺乳類又は他の動物細胞中のCMV-、SV40-、RSV-プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMV-エンハンサー、SV-40エンハンサー又はグロビンイントロンがある。

【0101】

転写の開始の原因となる因子の他に、そのような調節因子は、ポリヌクレオチドの下流に、SV-40-ポリA部位又はtk-ポリA部位など転写停止シグナルを含むこともある。

【0102】

さらに、使用される発現系によって、ポリペプチドを細胞区画に向けることが可能な、又はそれを媒体中に分泌することが可能なリーダー配列も、列記された核酸配列のコード配列に加えることができ、当分野に周知である。添付される実施例も参照されたい。リーダー配列（複数可）は、翻訳、開始及び停止配列並びに好ましくは、翻訳されたタンパク質又はその一部を細胞膜周辺腔又は細胞外媒体へ分泌するよう指示することのできるリーダー配列と適当な相で組み立てられる。任意に、異種配列は、所望の特性、例えば発現された組換え産物の安定化又は簡易化精製を付与するN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。上記を参照されたい。この文脈において、Okayama-Berg DNA発現ベクターpCDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pCDNA1、pCDNA3 (Invitrogen)、pEF-HFR、pEF-ADA又はpEF-neo (Mack et al. PNAS (1995) 92, 7021-7025及びRaum et al. Cancer Immunol Immunother (2001) 50 (3), 141-150) 又はpSPORT1 (GIBCO BRL) などの好適な発現ベクターが当分野に公知である。

10

【0103】

好ましくは、発現制御配列は真核生物宿主細胞を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の制御配列も使用できる。ベクターが適当な宿主中に一旦取り入れられると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルな発現に好適な条件下に維持され、望まれる場合、本発明のポリペプチドの回収及び精製を続けてよい。例えば、添付される実施例を参照されたい。

20

【0104】

細胞周期相互作用タンパク質の発現に使用できる、別な発現系はインサート系である。そのような系において、オートグラファー・カリフォルニカ (Autographa californica) 核多角体ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用し、スポドプテラ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞又はイラクサギンウワバ (Trichoplusia) 幼虫に外来遺伝子を発現する。言及された核酸分子のコード配列は、ポリヘドリン遺伝子など、ウイルスの非必須領域中にクローニングされ、ポリヘドリンプロモーターの制御下におくことができる。前記コード配列の挿入がうまくいくと、ポリヘドリン遺伝子が不活性化し、コートタンパク質コートを欠く組換えウイルスが産生されるであろう。次いで、組換えウイルスを使用して、エス・フルギベルダ細胞又はイラクサギンウワバ幼虫を感染させ、そこで本発明のタンパク質が発現される (Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhardt, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994), 3224-3227)。

30

【0105】

追加の調節因子には、転写エンハンサー並びに翻訳エンハンサーが含まれる。上述の本発明のベクターが、選択マーカー及び／又はスコア可能なマーカーを含むことが有利である。

【0106】

形質転換された細胞及び、例えば、植物組織及び植物の選択に有用な選択マーカー遺伝子は当業者に周知であり、例えば、メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994), 143-149); アミノグリコシドネオマイシン、カナマイシン及びパロマイシンに対する耐性を与えるnpt (Herrera-Estrella, EMBO J. 2 (1983), 987-995); 及びハイグロマイシンに対する耐性を与えるhygro (Marsh, Gene 32 (1984), 481-485) に対する選択の基礎として代謝拮抗剤耐性を含む。追加の選択的遺伝子、すなわち、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するのを可能にするtrpB; 細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するのを可能にするhisD (Hartman, Proc.

40

50

Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); 細胞がマンノースを利用するのを可能にするマンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ (国際公開第94/20627号) 及びオルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤である2-(ジフルオロメチル)-DLオルニチン、DFMOに対する耐性を与えるODC (オルニチンデカルボキシラーゼ) (McConlogue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.) 又はブラストシジンSに対する耐性を与えるアスペルギルス・テルレウス (*Aspergillus terreus*) 由来のデアミナーゼ (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59 (1995), 2336-2338) が記載されている。

10

【0107】

有用なスコア可能なマーカーも当業者に公知であり、市販されている。前記マーカーが、ルシフェラーゼ (Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996), 59-72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996), 121)、緑色蛍光タンパク質 (Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996), 44-47) 又は β -グルクロニダーゼ (Jefferson, EMBO J. 6 (1987), 3901-3907) をコードする遺伝子であることが有利である。この実施形態は、記載されたベクターを含む細胞、組織及び生物の簡単に迅速なスクリーニングに特に有用である。

【0108】

上述のとおり、記載された核酸分子は、例えば、精製のため、そのみならず遺伝子治療目的に、単独又は細胞に本発明のポリペプチドを発現するベクターの一部として使用できる。本発明の上述のポリペプチドのいずれかをコードするDNA配列 (複数可) を含む核酸分子又はベクターは、細胞に導入され、次に目的とするポリペプチドを産生する。遺伝子治療は、エキソビボ又はインビボ技術による細胞への治療遺伝子の導入に基づくが、遺伝子導入の最も重要な用途の1つである。インビトロ又はインビボ遺伝子治療のための好適なベクター、方法又は遺伝子送達システムは文献に記載されており、当業者に公知である。例えば、Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91 (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N. Y. Acad. Sci. 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; 国際公開第94/29469号; 国際公開第97/00957号、米国特許第5, 580, 859号; 米国特許第5, 589, 466号; 又はSchaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640を参照されたい。記載された核酸分子及びベクターは、細胞への直接導入用にも、或いはリポソーム又はウイルスベクター (例えば、アデノウイルス、レトロウイルス) による導入用にも設計できる。好ましくは、前記細胞は、生殖細胞株細胞、胚細胞又は卵細胞であり、或いはそれらから誘導されており、最も好ましくは前記細胞は幹細胞である。胚性幹細胞の例は、とりわけ、Nagy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 8424-8428に記載されている幹細胞でよい。

20

30

40

【0109】

本発明は、本発明のベクターにより形質転換又はトランスフェクトされたホストも提供する。前記ホストは、本発明の上述のベクター又は本発明の上述の核酸分子をホストへ導

50

入して製造できる。ホスト中の少なくとも1つのベクター又は少なくとも1つの核酸分子の存在が、上述の単鎖抗体コンストラクトをコードする遺伝子の発現を媒介することができる。

【0110】

記載された本発明の核酸分子又はベクターは、ホストに導入され、ホストのゲノムに統合されることがあるが、染色体外に維持されることもある。

【0111】

ホストは、どのような原核生物細胞でも真核生物細胞でもよい。

【0112】

「原核生物」という用語は、細菌全てを含むように意味し、本発明のタンパク質の発現のためDNA又はRNA分子により形質転換又はトランスフェクトすることができる。原核細胞ホストは、大腸菌、ネズミチフス菌、霊菌及び枯草菌などのグラム陰性菌並びにグラム陽性菌を含む。「真核」という用語は、酵母、高等植物、昆虫、好ましくは哺乳類の細胞を含むように意味する。組換え産生手順に使用されるホストにより、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質はグリコシル化されることがあるが、非グリコシル化されることもある。本発明のポリペプチドのコード配列を含みN末端FLAGタグ及び／又はC末端Hisタグが遺伝子的に融合されるプラスミド又はウイルスの使用が特に好ましい。好ましくは、前記FLAGタグの長さは、約4～8アミノ酸であり、最も好ましくは8アミノ酸である。上述のポリヌクレオチドを使用して、当業者に通常公知である技術のいずれかを利用して、ホストを形質転換又はトランスフェクトすることができる。さらに、融合し、機能的に結合した遺伝子の調製及び、例えば哺乳類細胞及び細菌中のそれらの発現の方法は、当業者に周知である（Sambrook、上記引用文献中）。

【0113】

好ましくは、前記ホストは、細菌或いは昆虫、真菌、植物又は動物の細胞である。

【0114】

記載されたホストが哺乳類細胞であることが特に想定される。特に好ましいホスト細胞は、CHO細胞、COS細胞、SP2／0又はNS／0などのミエローマ細胞株を含む。添付される実施例に示すとおり、CHO細胞がホストとして特に好ましい。

【0115】

より好ましくは、前記ホスト細胞は、ヒトの細胞又はヒトの細胞株、例えばper.c6である（Kroos, Biotechnol. Prog., 2003, 19:163-168）。

【0116】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの産生方法にも関するが、前記方法は、本発明のポリペプチドの発現を可能にする条件下で本発明のホストを培養する工程及び産生されたポリペプチドを培養物から回収する工程を含む。

【0117】

形質転換されたホストは、当業者に公知の技術により発酵槽中で生育され、培養されて、最適な細胞成長を得る。次いで、本発明のポリペプチドは、増殖培養液、細胞溶解物又は細胞膜分画から単離できる。例えば、細菌により発現した本発明のポリペプチドの単離及び精製は、例えば、分取クロマトグラフ分離並びに、例えば本発明のポリペプチドのタグに対するモノクローナル又はポリクローナル抗体の使用を含むもの或いは添付される実施例に記載のものなどの免疫学的分離など、どのような従来的手段によってもよい。

【0118】

発現を可能にするホストの培養条件は当業者に公知であり、ホスト系及びそのような方法に利用される発現系／ベクターに依存する。組換えポリペプチドの発現を可能にする条件を得るために修正すべきパラメータは当分野に公知である。例えば、好適な条件は、さらなる発明のインプットなしに当業者により決定できる。

【0119】

一旦発現すると、本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカ

ラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当分野の標準的な手順により精製することができる。Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y. (1982)を参照されたい。少なくとも約90から95%の均質性の実質的に純粋なポリペプチドが好ましく、98から99%以上の均質性が医薬用途に最も好ましい。部分的に又は望まれるとおりの均質に一旦精製されると、本発明のポリペプチドを（体外を含む）治療用に又はアッセイ手順の開発及び実施に使用できる。さらに、培養物からの本発明のポリペプチドの回収方法の例は、添付される実施例に詳細に記載される。

【0120】

さらに、本発明は本発明のポリペプチド又は先に開示された方法により産生されたポリペプチドを含む組成物を与える。好ましくは、前記組成物は医薬組成物である。

【0121】

本発明によると、「医薬組成物」という用語は、患者、好ましくはヒトの患者に投与するための組成物に関する。本発明の特に好ましい医薬組成物は、コンテクスト非依存性CD3エピトープを対象としそれに対して生成された結合分子を含む。好ましくは、医薬組成物は、キャリア、安定剤及び／又は賦形剤の好適な製剤を含む。好ましい実施形態において、医薬組成物は、非経口、経皮、腔内、動脈内、髄腔内及び／又は鼻腔内投与のための、又は組織への直接注入による組成物を含む。前記組成物が、注入又は注射により患者に投与されることが特に想定される。好適な組成物の投与は、種々の方法により、例えば、静脈中への、腹膜内への、皮下への、筋肉内への、局所又は皮内への投与により実施することができる。特に、本発明は、好適な組成物の中断されない投与を与える。非限定的な例として、中断されない、すなわち連続的な投与が、患者の体内への治療薬の流入を測定する、患者が装着する小さなポンプシステムにより実現できる。本発明のコンテクスト非依存性CD3エピトープを対象としそれに対して生成された結合分子を含む医薬組成物は、前記ポンプシステムの利用により投与できる。そのようなポンプシステムは一般的に当分野に公知であり、注入すべき治療薬を含むカートリッジの周期的な交換に通常頼る。そのようなポンプシステムでカートリッジを交換する際、患者の体内への治療薬のそうでなければ中断されない流入の一時的な中断が起こることがある。そのような場合、カートリッジ交換の前の投与の時期及びカートリッジ交換の後の投与の時期は、それでも医薬手段の意味の中にあると考えられ、本発明の方法は共に、そのような治療薬の1つの「中断されない投与」を作り上げる。

【0122】

本発明のコンテクスト非依存性CD3エピトープを対象とし又はそれらに対して生成されたこれら結合分子の連続又は中断されない投与は、流体を貯蔵器から出すための流体駆動機構及び前記駆動機構を作動させるための作動機構を含む流体送達装置又は小さなポンプシステムにより、静脈又は皮下へ実施できる。皮下投与のためのポンプシステムは、患者の皮膚を貫通し、好適な組成物を患者の体内へ送達するための針又はカニューレを含む。前記ポンプシステムは、静脈、動脈又は血管に関係なく、患者の皮膚に直接固定又は付着してよく、それによりポンプシステムと患者の皮膚の直接接触を可能にする。ポンプシステムは、数日程度、24時間、患者の皮膚に付着してよい。ポンプシステムは、小さい容積の貯蔵器を持つ小さなサイズでもよい。非限定的な例として、投与すべき好適な医薬組成物の貯蔵器の容積は、0.1から50mlでありうる。

【0123】

連続投与は、皮膚に貼り付け時々交換するパッチによる経皮でもよい。当業者は、この目的に好適な薬物送達のためのパッチシステムを承知している。好都合には、第1の使用済みパッチの交換が、例えば、第1の使用済みパッチのすぐ隣の皮膚表面で第1の使用済みパッチの除去の直前に、新しい第2のパッチの配置と同時に実施できるので、経皮投与が中断されない投与を特に受け入れやすいことに留意されたい。流入の中断又は電池の消耗の問題が起こらない。

【0124】

特に、コンテキスト非依存性CD3エピトープを対象としそれに対して生成される結合分子を含む本発明の組成物は、薬剤的に許容できるキャリアをさらに含んでよい。好適な医薬キャリアの例は当分野に周知であり、溶液、例えばリン酸緩衝食塩水、水、水中油滴型エマルジョンなどのエマルジョン、種々の湿潤剤、無菌液、リポソームなどが挙げられる。そのようなキャリアを含む組成物は、周知の従来法により処方できる。製剤は、炭水化物、緩衝溶液、アミノ酸及び／又は界面活性剤を含むことがある。炭水化物は、非還元糖、好ましくはトレハロース、スクロース、八硫酸エステル、ソルビトール又はキシリトールでよい。そのような製剤は、ポンプシステムがある、及び／又はポンプシステムがない経皮でも皮下でもよい連続投与に使用できる。アミノ酸は、荷電アミノ酸、好ましくはリジン、リジン酢酸塩、アルギニン、グルタミン酸塩及び／又はヒスチジンでよい。界面活性剤は、好ましくは分子量が1.2 kDを超える洗剤及び／又は好ましくは分子量が3 kDを超えるポリエーテルでよい。好ましい洗剤の非限定的な例は、Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80又はTween 85である。好ましいポリエーテルの非限定的な例は、PEG 3000、PEG 3350、PEG 4000又はPEG 5000である。本発明に使用される緩衝系は、pH 5～9を有することが好ましく、クエン酸塩、コハク酸塩、リン酸塩、ヒスチジン及び酢酸塩を含むことがある。本発明の組成物は、例えば、非チンパンジー霊長類、例えばマカクザルへの、本願に記載される異種間特異性を示す本発明のポリペプチドの投与量を増加させることによる用量増加試験により決定できる好適な用量で、被験者に投与することができる。上述のとおり、本願に記載される異種間特異性を示す本発明のポリペプチドは、好都合には、非チンパンジー霊長類における前臨床試験とヒトの薬剤として同一の形態で使用できる。これらの組成物は、他のタンパク質又は非タンパク質薬剤と組み合わせることもできる。これらの薬剤は、本願に定義される本発明のポリペプチドを含む組成物と同時に投与してもよいが、前記ポリペプチドの投与の前又は後に、折良く決められた間隔及び用量で別々に投与することもできる。投与計画は、主治医及び臨床因子により決定されるであろう。医学分野に周知の通り、ある1人の患者への投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間及び経路、全般的な健康状態及び同時に投与される他の薬剤など多くの因子による。非経口投与の調剤薬は、無菌の水溶液又は非水溶液、懸濁液及びエマルジョンを含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性キャリアには、塩水及び緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、エマルジョン又は懸濁液がある。非経口賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル又は不揮発性油がある。静注用賦形剤には、流体及び栄養補液、電解質補液（リンゲルデキストロースに基づくものなど）等がある。抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、不活性ガスなどの防腐剤及び他の添加物も存在してよい。さらに、本発明の組成物は、好ましくはヒト起源の、血清アルブミン又は免疫グロブリンなどのタンパク質キャリアを含んでよい。本発明の組成物が、本願に定義された本発明のポリペプチドに加え、組成物の意図される用途によって、生物活性薬剤をさらに含むことが想定される。そのような薬剤は、胃腸系に作用する薬剤、細胞増殖抑制剤として作用する薬剤、高尿酸血症を防ぐ薬剤、免疫反応を阻害する薬剤（例えば、コルチコステロイド）、炎症反応を和らげる薬剤、循環系に作用する薬剤及び／又は当分野に工程のサイトカインなどの薬剤であることがある。

【0125】

本願に定義される医薬組成物の生物活性は、例えば、以下の実施例、国際公開第99/54440号又はSchlerethら（Cancer Immunol. Immunother. 20（2005），1－12）に記載される通り、細胞障害性アッセイにより測定することができる。本願での「効能」又は「インビボ効能」は、例えば標準化されたNCI応答基準を利用する、本発明の医薬組成物による治療への応答を意味する。本発明の医薬組成物を使用する治療の成功又はインビボ効能は、その意図された目的のための組成物の効力、すなわち組成物がその望まれる効果を起こす能力、すなわち、例えば

腫瘍細胞など病的細胞の消耗を意味する。インビボ効能は、白血球数、ディファレンシャル、蛍光活性化細胞選別、骨髓穿刺法などがあるがこれらに限定されない、それぞれの疾病のための確立された標準方法により監視できる。それに加え、種々の疾病特異的な臨床化学パラメータ及び他の確立された標準法を使用してよい。さらに、コンピュータによる断層撮影、X線、核磁気共鳴断層撮影（例えば、米国国立ガン研究所の基準に基づく反応評価 [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RL, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippenstein D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr; 17 (4): 1244]）、陽電子放出断層撮影スキャニング、白血球数、ディファレンシャル、蛍光活性化細胞選別、骨髓穿刺、リンパ節生検／組織構造及び種々のリンパ腫特異的な臨床化学的パラメータ（例えば、乳酸デヒドロゲナーゼ）及び他の確立された標準的な方法を利用できる。

10

【0126】

本発明の医薬組成物などの薬剤の開発における他の主な課題は、薬物動態学的性質の予測可能な調整である。このために、薬剤候補の薬物動態学的プロファイル、すなわちある病気を治療するための特定の薬剤の能力を発揮する薬物動態学パラメータが確立される。ある疾病を治療するための薬剤の能力に影響を与える薬剤の薬物動態学的パラメータには、半減期、分布容積、肝初回通過代謝及び血清タンパク結合率があるが、これらに限定されない。ある薬剤の効能は、上述のパラメータのそれぞれにより影響を受けうる。

20

【0127】

「半減期」は、投与された薬剤の50%が、例えば代謝、排泄などの生物学的過程により除去される時間である。

【0128】

「肝初回通過代謝」は、肝臓との初回接触時、すなわち肝臓を最初に通過する間に薬剤が代謝される傾向を意味する。「分布容積」は、体の種々の区画、例えば細胞内及び細胞外空間、組織及び器官等における薬剤の保持の程度及びこれらの区画中の薬剤の分布を意味する。「血清結合率」は、薬剤が、アルブミンなどの血清タンパク質と相互作用及び結合し、薬剤の生物活性の低下又は損失をもたらす傾向を意味する。

30

【0129】

薬物動態学的パラメータには、投与されるある量の薬剤に対して、バイオアベイラビリティ、ラグタイム (Tlag)、Tmax、吸収速度、より多くの発症及び／又はCmaxがある。

【0130】

「バイオアベイラビリティ」は、血液区画中の薬剤の量を意味する。

40

【0131】

「ラグタイム」は、薬剤の投与と血液又は血漿中のその検出及び可測性の間の遅延時間を意味する。

【0132】

「Tmax」は、薬剤の最高血液濃度に達する時間であり、「Cmax」はある薬剤で最大に得られる血液濃度である。その生物学的効果のために要する薬剤の血液又は組織濃度に達する時間は、全てのパラメータに影響される。異種間特異性を示す本発明のポリペプチドの好ましい実施形態である、二重特異性単鎖抗体の薬物動態学的パラメータは、上記のとおり非チンパンジー霊長類における前臨床動物試験で測定可能だが、例えばSchlerethら (Cancer Immunol. Immunother. 20 (20

50

05), 1-12) による刊行物にも述べられている。

【0133】

本願での「毒性」という用語は、有害事象又は重篤な有害事象に明らかになる薬剤の毒作用を意味する。これらの副作用は、全般的な薬剤の耐受性の欠如及び／又は投与後の局所耐受性の欠如を意味することがある。毒性は、薬剤により起こる催奇性又は発ガン作用も含むことがある。

【0134】

本願での「安全性」、「インビボ安全性」又は「耐受性」は、投与の直後（局所耐受性）及びより長い期間の薬剤の使用の間の重篤な有害事象を引き起こさない薬剤の投与を定義する。「安全性」、「インビボ安全性」又は「耐受性」は、例えば治療及び継続管理期間の間に定期的に評価できる。測定には、臨床評価、例えば器官の症状及び臨床検査値異常のスクリーニングが挙げられる。臨床評価は、NCI-CTC及び／又はMedDRA基準により記録／コード化された通常の所見により実施され基準から外れることもある。器官の症状には、Common Terminology Criteria for adverse events v3.0 (CTCAE) に述べられている通り、アレルギー／免疫、血液／骨髄、不整脈、凝固などの基準が含まれる。試験できる臨床検査パラメータには、例えば、血液、臨床化学検査、凝固プロファイル及び尿の分析があり、血清、血漿、リンパ球又は髄液、リカーなどの他の体液の検査がある。例えば、安全性は、身体検査、イメージング技術（すなわち、超音波、X線、CTスキャン、磁気共鳴イメージング(MRI)）、技術装置による他の手段（すなわち、心電図）、バイタルサインにより、臨床検査パラメータ測定及び有害事象の記録により評価できる。例えば、本発明の使用及び方法における非チンパンジー霊長類での有害事象は、組織病理学的及び／又は組織化学的方法により調査できる。

【0135】

本願での「有効且つ非毒性の投与量」は、目立った毒作用を伴わず、又は基本的に伴わずに、病的細胞の枯渇、腫瘍の消去、腫瘍の縮小又は疾病の安定化をもたらすに十分なほど高い、本願に定義される二重特異性単鎖抗体の耐容量を意味する。そのような有効且つ非毒性の投与量は、例えば、当分野に記載される用量増加試験により決定することができ、重篤な有害事象を引き起こす用量未満でなくてはならない（用量規制毒性、DLT）。

【0136】

上記の用語は、例えば、バイオテクノロジー由来医薬品の前臨床における安全性評価S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997にも言及されている。

【0137】

さらに、本発明は、増殖性疾患、腫瘍性疾患又は免疫疾患から選択された疾患の予防、治療又は回復のための本発明のポリペプチド（すなわち、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン鎖のエピトープに結合可能な少なくとも1つの結合ドメインを含むポリペプチドであって、前記エピトープが、本発明の、又は本発明の方法により産生された配列番号2、4、6又は8からなる群に含まれるアミノ酸配列の一部である）を含む医薬組成物に関する。好ましくは、前記医薬組成物は、キャリア、安定剤及び／又は賦形剤の好適な製剤をさらに含む。

【0138】

本発明のさらなる態様は、先に本願に定義されたポリペプチド又は先に本願に定義された方法により産生されるポリペプチドの、疾患の予防、治療又は回復のための医薬組成物を調製するための使用に関する。好ましくは、前記疾患は、増殖性疾患、腫瘍性疾患又は免疫疾患である。前記腫瘍性疾患が悪性疾患、好ましくはガンであることがさらに好ましい。

【0139】

本発明のポリペプチドの使用の他の好ましい実施形態において、前記医薬組成物は、追

加の薬剤と組み合わせて、すなわち併用療法の一部として投与されることが好適である。前記併用療法において、活性薬剤が、本発明のポリペプチドとして同じ医薬組成物中に任意に含まれてもよく、或いは別な医薬組成物に含まれることもある。この後者の場合、前記の別な医薬組成物の投与は、本発明のポリペプチドを含む前記医薬組成物の投与の前でも、同時でも、その後でも好適である。追加の薬剤又は医薬組成物は、非タンパク質化合物でも、タンパク質化合物でもよい。追加の薬剤がタンパク質化合物である場合、タンパク質化合物が、免疫エフェクター細胞のための活性化シグナルを提供できるタンパク質化合物であることが有利である。

【0140】

好ましくは、前記タンパク質化合物又は非タンパク質化合物は、本発明のポリペプチド、上記に定義された核酸分子、上記に定義されたベクター又は上記に定義されたホストと同時にでも、又は非同時にでも投与できる。

【0141】

本発明の他の態様は、その必要のある被験者での疾患の予防、治療又は回復の方法に関するが、前記方法は本発明の有効量の医薬組成物を投与する工程を含む。好ましくは、前記疾患は、増殖性疾患、腫瘍性疾患又は免疫疾患である。さらにより好ましくは、前記腫瘍性疾患は、悪性疾患、好ましくはガンである。

【0142】

本発明の方法の他の好ましい実施形態では、前記医薬組成物は、追加の薬剤と組み合わせて、すなわち併用療法の一部として投与されるのが好ましい。前記併用量において、活性薬剤が、本発明のポリペプチドとして同じ医薬組成物中に任意に含まれてもよく、或いは別な医薬組成物に含まれることもある。この後者の場合、前記の別な医薬組成物の投与は、本発明のポリペプチドを含む前記医薬組成物の投与の前でも、同時でも、その後でも好適である。追加の薬剤又は医薬組成物は、非タンパク質化合物でも、タンパク質化合物でもよい。追加の薬剤がタンパク質化合物である場合、タンパク質化合物が、免疫エフェクター細胞のための活性化シグナルを提供できるタンパク質化合物であることが有利である。

【0143】

好ましくは、前記タンパク質化合物又は非タンパク質化合物は、本発明のポリペプチド、上記に定義された核酸分子、上記に定義されたベクター又は上記に定義されたホストと同時にでも、又は非同時にでも投与できる。

【0144】

本発明の上記の方法では、前記被験者がヒトであることが好ましい。

【0145】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明の核酸分子、本発明のベクター又は本発明のホストを含むキットに関する。

【0146】

本発明は、以下のアイテムのリストによりさらに特徴づけられる。

アイテム 1

ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン(CD3 ϵ)のエピトープに結合可能な異種間特異性結合ドメインを含むポリペプチド(複数可)の同定方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 該ポリペプチド(複数可)を、アミノ酸配列Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly(配列番号381)又はGln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly(配列番号382)を含み、そのC末端で固定相に固定されている最大27アミノ酸のCD3 ϵ の細胞外ドメインのN末端断片に接触させる工程；

(b) 結合したポリペプチド(複数可)を前記断片から溶離する工程；及び

(c) 該ポリペプチド(複数可)を(b)溶離液から単離する工程。

【0147】

本発明の上記方法で同定されたポリペプチド（複数可）がヒト起源であることが好ましい。

【0148】

本「ポリペプチド（複数可）の同定方法」は、複数のポリペプチド候補から、アミノ酸配列 $Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly$ （配列番号381）又は $Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly$ （配列番号382）をそのN末端で含むCD3 ϵ の細胞外ドメインの断片に対して同じ特異性を持つ1つ以上の異なるポリペプチドを単離する方法並びに溶液からのポリペプチドの精製方法であると理解される。CD3 ϵ の細胞外ドメインの断片に対して同じ特異性を持つ1つ以上の異なるポリペプチドを単離する方法の非限定的な実施形態には、抗原特異性結合体の選択方法、例えばハイブリドーマスクリーニングに通常利用されるパニング法、真核宿主細胞の一過性導入／安定導入されたクローンのスクリーニング、ファージディスプレイ法がある。後者の溶液からのポリペプチドの精製方法の非限定的な例は、例えば、培養上清からのリコンビナント発現ポリペプチドの精製又はそのような培養液の調製である。

【0149】

上述のとおり、本発明の方法に使用される断片は、霊長類CD3 ϵ 分子の細胞外ドメインのN末端断片である。異なる霊長類のCD3 ϵ 分子の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、配列番号1、3、5及び7に示されている。N末端オクタマーの2つの形態は、配列番号381及び382に示されている。本発明の方法により同定されるポリペプチドの結合用に、N末端が自由に利用可能であることが好ましい。本発明の文脈において、「自由に利用可能」という用語は、His-tagなどの追加モチーフがないと理解される。そのようなHis-tagと本発明の方法により同定される結合分子との干渉は、添付する実施例6及び34に記載されている。

【0150】

本発明の方法によると、前記断片はC末端で固定相に固定されている。当業者は、本発明の方法の利用される実施形態に頼って、好適な固定相支持体を容易に発明の労作無く選択するであろう。固体支持体の例は、ビーズなどのマトリックス（例えば、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ポリスチロールビーズ、デキストランビーズ）、プレート（培養プレート又は多穴プレート）並びに例えばBiacore（登録商標）から知られるチップがあるが、これらに限定されない。断片の前記固体支持体への固定（fixation）／固定化（immobilization）の手段及び方法の選択は、固体支持体の選択による。固定／固定化に通常利用される方法は、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルによるカップリングである。このカップリングの基となる化学作用並びに固定／固定化の他の方法は、例えばHermanson "Bioconjugate Techniques", Academic Press, Inc. (1996) から当業者に公知である。クロマトグラフィ支持体に固定／固定化するには、以下の手段が通常利用される：NHS活性化セファロース（例えば、GELife Science-AmershamのHiTrap-NHS）、CnBr-活性化セファロース（例えば、GELife Science-Amersham）、NHS活性化デキストランビーズ（Sigma）又は活性化ポリメタクリレート。これらの試薬は、バッチ式手法にも使用できる。さらに、酸化鉄を含むデキストランビーズ（例えばMiltenyiから市販）もバッチ式手法に使用できる。これらのビーズは、溶液からビーズを分離するための磁石と組み合わせて使用できる。ポリペプチドは、NHS活性化カルボキシメチルデキストランの使用によりBiacoreチップ（例えばCM5チップ）に固定化できる。適当な固体支持体のさらなる例は、アミン反応性MultiWellプレート（例えば、Nunc Immobilizer（商標）プレート）である。

【0151】

本発明の方法によると、CD3 ϵ の細胞外ドメインの前記断片は、直接に、或いは、リンカー又は他のタンパク質／ポリペプチド部分であることもあるアミノ酸のストレッチを介して固体支持体にカップリングできる。別法としては、CD3 ϵ の細

胞外ドメインは、1つ以上のアダプター分子（複数可）により間接的にカップリングできる。

【0152】

固定化されたエピトープに結合したペプチドを溶離する手段及び方法は当分野に周知である。同定されたポリペプチド（複数可）を溶離液から単離する方法にも同じことがいえる。

【0153】

本発明と調和して、複数のポリペプチド候補から、そのN末端でアミノ酸配列Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-X-Glyを含むCD3εの細胞外ドメインの断片に同じ特異性を持つ1つ以上の異なるポリペプチドを単離する方法は、抗原特異体の選択に以下の方法の1つ以上の工程を含むことがある。

10

【0154】

CD3ε特異的結合分子は、抗体から誘導されたレパートリーから選択できる。例えば、"Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に開示されている標準的な手順に基づき、ファージディスプレイライブラリーを構築できる。抗体ライブラリー中の抗体断片のフォーマットはscFvでよいが、一般的にはFab断片でも、さらには単一ドメイン抗体断片でもよい。抗体断片の単離には、ナイーブ抗体断片ライブラリーを利用できる。後に治療で利用するための潜在的に低い抗原性結合体の選択には、ヒト抗体断片ライブラリーが、ヒト抗体断片の直接選択に有利であることがある。場合によっては、それらは合成抗体ライブラリーの基礎を形成することがある（Knappiket al. J Mol. Biol. 2000, 296:57 ff）。対応するフォーマットは、Fab、scFv（以下に記載されるとおり）又はドメイン抗体（dAbs、Holt et al., Trends Biotechnol. 2003, 21:484 ffに総評されるとおり）でもよい。

20

【0155】

多くの場合において、標的抗原に対し利用可能な免疫ヒト抗体源がないことも当分野で公知である。したがって、動物を標的抗原により免疫し、それぞれの抗体ライブラリーが動物組織、例えば脾臓又はPBMCから単離される。N末端断片をビオチン化し、或いはKLH又はウシ血清アルブミン（SBA）などのタンパク質に共有結合することができる。通常の手法によると、齧歯動物が免疫に使用される。非ヒト起源の免疫抗体レパートリーが、他の理由で、例えばラクダ種から誘導された単一ドメイン抗体（VHH）の存在により（Muyldermans, J Biotechnol. 74:277; De Geest et al. Dev Comp Immunol. 2006, 30:187 ffに記載のとおり）特に有利である。したがって、抗体ライブラリーの対応するフォーマットは、Fab、scFv（以下に記載の通り）又は単一ドメイン抗体（VHH）でよい。

30

【0156】

可能性のある一手法において、balb/c x C57黒交配の10週齢のF1マウスを、成熟CD3ε鎖のN末端アミノ酸1から27を翻訳融合としてN末端で示す膜貫通型EpCAMを発現する全細胞で免疫することができる。別法としては、マウスを、1-27CD3イプシロンFc融合タンパク質で免疫することもできる（対応する手法は添付する実施例2に記載される）。追加免疫（複数可）の後、血液サンプルをとり、CD3陽性T細胞に対する抗体血清力価を、例えばFACS分析で試験できる。通常、血清力価は、非免疫動物より免疫動物でははるかに高い。

40

【0157】

免疫動物は、免疫抗体ライブラリーの構築の基礎を形成できる。そのようなライブラリーの例は、ファージディスプレイライブラリーがある。そのようなライブラリーは、一般的に、例えば"Phage Display: A Laboratory Manual"; Ed. Barbas, Burton, Scott & Silverman; Cold

50

Spring Harbor Laboratory Press, 2001に開示されている標準的な手順に基づき構築することができる。

【0158】

非ヒト抗体は、より可変的な抗体ライブラリーの生成のためファージディスプレイによりヒト化でき、次いで選択の間バインダーのために高めることができる。

【0159】

ファージディスプレイ手法では、抗体ライブラリーをディスプレイするファージのプールのいずれも、標的分子としてそれぞれの抗原を使用して結合体を選択する基礎を形成する。抗原特異的な抗原に結合したファージが単離される中心工程はパニングと称される。ファージの表面の抗体断片のディスプレイのため、この一般的な方法はファージディスプレイと称される。選択の好ましい一方法は、ファージによりディスプレイされたscFvのN末端に翻訳融合した繊維状ファージN2ドメインなどの小さいタンパク質の使用である。結合体を単離するのに使用できる、当分野に公知の他のディスプレイ法は、リボソームディスプレイ法である (Groves & Osbourn, Expert Opin Biol Ther. 2005, 5:125 ff; Lipovsek & Pluckthun, J Immunol Methods 2004, 290:52 ffに総評されている)。

【0160】

1-27CD3ε-Fc融合タンパク質へのscFvファージ粒子の結合を示すために、クローニングされたscFvレパートリーを持つファージライブラリーを、それぞれの培養上清からPEG (ポリエチレングリコール) により採取することができる。scFvファージ粒子は、固定化されたCD3ε融合タンパク質とともにインキュベートすることができる。固定化されたCD3ε-Fc融合タンパク質は固体相に被覆することができる。結合体は溶離することができ、溶離液を、新鮮な未感染細菌ホストの感染のために使用できる。ヒトscFv断片をコードする、ファージミドコピーにうまく形質導入された細菌ホストは、再びカルベニシリン耐性に関して選択され、次いで、例えばVCMS13ヘルパーファージに感染させられ、第2ラウンドの抗体ディスプレイ及びインビトロ選択を開始する。通常、合計で4から5ラウンドの選択が実施される。

【0161】

単離された結合体の結合は、フローサイトメトリーアッセイを利用して、CD3イプシロン陽性Jurkat細胞、HPBa11細胞、PBMC又は表面提示されたEpCAMに融合したN末端CD3ε配列を有するトランスフェクトされた真核細胞で試験することができる (添付した実施例4参照)。

【0162】

アイテム2

ポリペプチド (複数可) が、第1結合ドメインとして同定された結合ドメイン及び細胞表面抗原に結合可能な第2結合ドメインを含む、アイテム1の方法。

【0163】

本発明の方法により同定されるポリペプチドの第2結合ドメインの生成のため、例えば、本願に定義される二重特異性単鎖抗体、それぞれのヒト及び非チンパンジー霊長類細胞表面抗原の両方に結合するモノクローナル抗体を使用できる。本願に記載される二重特異性ポリペプチドのための適当な結合ドメインを、当分野に記載の組換え法により異種間特異性モノクローナル抗体から誘導できる。ヒト細胞表面抗原及び非チンパンジー霊長類での前記細胞表面抗原のホモログに結合するモノクローナル抗体は、上述のとおりFACSアッセイにより試験できる。文献に記載されるハイブリドーマ技術 (Milsteina and Kohler, Nature 256 (1975), 495-7) も異種間特異性抗体の生成に利用できる。例えば、マウスを、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD333で交互に免疫できる。これらのマウスから、異種間特異性抗体産生ハイブリドーマ細胞をハイブリドーマ技術により単離し、上述のFACSにより分析できる。本願に記載される異種間特異性を示す二重特異性単鎖抗体などの二重特異性ポリペプチドの生成及び分析は

以下の実施例に示される。異種間特異性を示す二重特異性単鎖抗体の利点には以下に列記される点がある。

【0164】

アイテム3

第2結合ドメインがヒト及び非チンパンジー霊長類の細胞表面抗原と結合する、アイテム2の方法。

【0165】

アイテム4

第1結合ドメインが抗体である、アイテム1から3のいずれかの方法。

【0166】

アイテム5

抗体が単鎖抗体である、アイテム4の方法。

【0167】

アイテム6 第2結合ドメインが抗体である、アイテム2から5のいずれかの方法。

【0168】

アイテム7

CD3εの細胞外ドメインの断片が、配列番号2、4、6又は8に示されるいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドの1つ以上の断片からなる、アイテム1から6のいずれかの方法。

【0169】

アイテム8

前記断片の長さが、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27アミノ酸残基である、アイテム7の方法。

【0170】

アイテム9

同定の方法が、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3εとのエピトープに結合する異種間特異性結合ドメインを含む複数のポリペプチドをスクリーニングする方法である、アイテム1から8のいずれかの方法。

【0171】

アイテム10

同定の方法が、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3εのエピトープに結合する異種間特異性結合ドメインを含むポリペプチドを精製／単離する方法である、アイテム1から8のいずれかの方法。

【0172】

アイテム11

異種間特異性結合ドメインの生成のための、アミノ酸配列Gln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Met-Gly（配列番号381）又はGln-Asp-Gly-Asn-Glu-Glu-Ile-Gly（配列番号382）を含む最大27アミノ酸のCD3εの細胞外ドメインのN末端断片の使用。本発明の前記使用と調和して、生成した異種間特異性結合ドメインがヒト起源であることが好ましい。

【0173】

アイテム12

異種間特異性結合ドメインが抗体である、アイテム11による使用。

【0174】

アイテム13

抗体が単鎖抗体である、アイテム12による使用。

【0175】

アイテム14

抗体が二重特異性抗体である、アイテム12から13による使用。

10

20

30

40

50

【0176】

これらの実施形態及び他の実施形態は、本発明の説明及び実施例により開示されており、それらに包含される。免疫学における組換え技術及び方法は、例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition 2001; Lefkovits; Immunology Methods Manual; The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Laboratory Press, 2002に記載されている。本発明により利用されるべき抗体、方法、使用及び化合物のいずれかに関するさらなる文献は、例えば電子デバイスを利用して公共の図書館及びデータベースから検索できる。例えば、インターネットで利用可能な公共データベース「Medline」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>で利用できる。さらなるデータベース及び<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>などのアドレス又は<http://www.embl.de/services/index.html>でEMBLサービスホームページに列挙されたアドレスは当業者に公知であり、例えば<http://www.google.com>を利用しても得られる。

【図面の簡単な説明】

【0177】

〔図1〕異種可溶性タンパク質への霊長類CD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27の融合。

〔図2〕一過性導入された293細胞の上清中で、ヒトIgG1のヒンジ及びFcガンマ領域並びにC末端6ヒスチンタグに融合した成熟ヒトCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27を含むコンストラクトの存在を検出するELISAアッセイで測定された4連のサンプルの平均吸収値である。「27アミノ酸ヒトCD3E」と名称を付けられた第1カラムは、コンストラクトの平均吸収値を示し、「無関係な上清」と名称を付けられた第2のカラムは、ネガティブコントロールとして無関係なコンストラクトによりトランスフェクトされた293細胞の上清の平均値である。コンストラクトで得られた値をネガティブコントロールで得られた値と比較すると、組換えコンストラクトの存在を明らかに示している。

〔図3〕ヒトIgG1のヒンジ及びFcガンマ領域並びにC末端His6タグに融合した成熟ヒトCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27を含むコンストラクトへの、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗CD3結合分子の結合を検出するELISAアッセイで測定された4連のサンプルの平均吸収値を示す。カラムは、左から右へ、A2JHLP、I2CHLP、E2MHLP、F7O HLP、G4H HLP、H2CHLP、E1L HLP、F12QHLP、F6A HLP及びH1E HLPと称される特異性の平均吸収値を示す。「ネガティブコントロール」と称される一番右のカラムは、ネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒトCD3抗体の単鎖調製物の平均吸収値を示す。抗CD3特異性で得られた値とネガティブコントロールで得られた値を比べると、成熟ヒトCD3イプシロン鎖のN末端1-27アミノ酸への抗CD3特異性の強い結合を明らかに示している。

〔図4〕異種膜結合タンパク質への霊長類CD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27の融合。

〔図5〕カニクイザルEpCAM並びにそれぞれ、ヒト、マーモセット、タマリン、リスザル及び家畜ブタのCD3イプシロン鎖のN末端1-27アミノ酸からなる組換え膜貫通型融合タンパク質の存在を検出するFACSアッセイで試験された異なるトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである。ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、それぞれヒト27量体、マーモセット27量体、タマリン27量体、リスザ

ル 27 量体及びブタ 27 量体を含むコンストラクトを発現するトランスフェクタントの結果を示す。個別のオーバーレイで、細線はネガティブコントロールとして抗 F l a g M 2 の代わりに 2 % F C S を含む P B S でインキュベートされたサンプルを表し、太線は抗 F l a g M 2 抗体とともにインキュベートされたサンプルを表す。各コンストラクトで、ヒストグラムのオーバーレイは、トランスフェクタントへの抗 F l a g M 2 抗体の結合を示し、トランスフェクタントでの組換えコンストラクトの発現を明らかに示している。

〔図 6 A〕カニクイザル E p C A M にそれぞれ融合したヒト、マーモセット、タマリン及びリスザル C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 への、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗 C D 3 結合分子の結合を検出する F A C S アッセイで測定された種々のトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである

10

。ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、H 2 C H L P、F 1 2 Q H L P、E 2 M H L P 及び G 4 H H L P とそれぞれ称される C D 3 特異的結合分子とともに試験されたヒト 27 量体を含む 1-27 C D 3-E p C A M を発現するトランスフェクタントの結果を示す。

個別のオーバーレイにおいて、細線はネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒト C D 3 抗体の単鎖調製物とともにインキュベートされたサンプルを表し、太線は示されているそれぞれの抗 C D 3 結合分子とともにインキュベートされたサンプルを表す。ブタ 27 量体トランスフェクタントへの結合の欠如及び図 5 に示されるコンストラクトの発現レベルを考察すると、ヒストグラムのオーバーレイは、カニクイザル E p C A M に融合したそれぞ

20

れヒト、マーモセット、タマリン及びリスザル C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 を含む組換え膜貫通型融合タンパク質を発現する細胞への、完全に異種間特異的なヒト二重特異性単鎖抗体の試験された抗 C D 3 特異性の特異的で強い結合を示し、したがって、抗 C D 3 結合分子の多種霊長類異種間特異性を示す。

〔図 6 B〕カニクイザル E p C A M にそれぞれ融合したヒト、マーモセット、タマリン及びリスザル C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 への、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗 C D 3 結合分子の結合を検出する F A C S アッセイで測定された種々のトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである

。ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、H 2 C H L P、F 1 2 Q H L P、E 2 M H L P 及び G 4 H H L P とそれぞれ称される C D 3 特異的結合分子とともに試験されたマーモセット 27 量体を含む 1-27 C D 3-E p C A M を発現するトランスフェクタントの結果を示す。

30

個別のオーバーレイにおいて、細線はネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒト C D 3 抗体の単鎖調製物とともにインキュベートされたサンプルを表し、太線は示されているそれぞれの抗 C D 3 結合分子とともにインキュベートされたサンプルを表す。ブタ 27 量体トランスフェクタントへの結合の欠如及び図 5 に示されるコンストラクトの発現レベルを考察すると、ヒストグラムのオーバーレイは、カニクイザル E p C A M に融合したそれぞ

40

れヒト、マーモセット、タマリン及びリスザル C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 を含む組換え膜貫通型融合タンパク質を発現する細胞への、完全に異種間特異的なヒト二重特異性単鎖抗体の試験された抗 C D 3 特異性の特異的で強い結合を示し、したがって、抗 C D 3 結合分子の多種霊長類異種間特異性を示す。

〔図 6 C〕カニクイザル E p C A M にそれぞれ融合したヒト、マーモセット、タマリン及びリスザル C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 への、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗 C D 3 結合分子の結合を検出する F A C S アッセイで測定された種々のトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである

。ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、H 2 C H L P、F 1 2 Q H L P、E 2 M H L P 及び G 4 H H L P とそれぞれ称される C D 3 特異的結合分子とともに試験されたタマリン 27 量体を含む 1-27 C D 3-E p C A M を発現するトランスフェ

50

クタントの結果を示す。

個別のオーバーレイにおいて、細線はネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒトCD3抗体の単鎖調製物とともにインキュベートされたサンプルを表し、太線は示されているそれぞれの抗CD3結合分子とともにインキュベートされたサンプルを表す。ブタ27量体トランスフェクタントへの結合の欠如及び図5に示されるコンストラクトの発現レベルを考察すると、ヒストグラムのオーバーレイは、カニクイザルEpCAMに融合したそれぞれヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27を含む組換え膜貫通型融合タンパク質を発現する細胞への、完全に異種間特異的なヒト二重特異性単鎖抗体の試験された抗CD3特異性の特異的で強い結合を示し、したがって、抗CD3結合分子の多種霊長類異種間特異性を示す。

10

〔図6D〕カニクイザルEpCAMにそれぞれ融合したヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27への、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗CD3結合分子の結合を検出するFACSアッセイで測定された種々のトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである。

ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、H2CHLP、F12QHLP、E2MHLP及びG4HHLPとそれぞれ称されるCD3特異的結合分子とともに試験されたリスザル27量体を含む1-27CD3-EpCAMを発現するトランスフェクタントの結果を示す。

個別のオーバーレイにおいて、細線はネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒトCD3抗体の単鎖調製物とともにインキュベートされたサンプルを表し、太線は示されているそれぞれの抗CD3結合分子とともにインキュベートされたサンプルを表す。ブタ27量体トランスフェクタントへの結合の欠如及び図5に示されるコンストラクトの発現レベルを考察すると、ヒストグラムのオーバーレイは、カニクイザルEpCAMに融合したそれぞれヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27を含む組換え膜貫通型融合タンパク質を発現する細胞への、完全に異種間特異的なヒト二重特異性単鎖抗体の試験された抗CD3特異性の特異的で強い結合を示し、したがって、抗CD3結合分子の多種霊長類異種間特異性を示す。

20

〔図6E〕カニクイザルEpCAMにそれぞれ融合したヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27への、ペリプラズム発現された単鎖抗体の粗調製物の形態である異種間特異性抗CD3結合分子の結合を検出するFACSアッセイで測定された種々のトランスフェクタントのヒストグラムオーバーレイである。

30

ヒストグラムオーバーレイは、左から右へ、上から下へ、H2CHLP、F12QHLP、E2MHLP及びG4HHLPとそれぞれ称されるCD3特異的結合分子とともに試験されたブタ27量体を含む1-27CD3-EpCAMを発現するトランスフェクタントの結果を示す。

個別のオーバーレイにおいて、細線はネガティブコントロールとしてネズミ抗ヒトCD3抗体の単鎖調製物とともにインキュベートされたサンプルを表し、太線は示されているそれぞれの抗CD3結合分子とともにインキュベートされたサンプルを表す。ブタ27量体トランスフェクタントへの結合の欠如及び図5に示されるコンストラクトの発現レベルを考察すると、ヒストグラムのオーバーレイは、カニクイザルEpCAMに融合したそれぞれヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27を含む組換え膜貫通型融合タンパク質を発現する細胞への、完全に異種間特異的なヒト二重特異性単鎖抗体の試験された抗CD3特異性の特異的で強い結合を示し、したがって、抗CD3結合分子の多種霊長類異種間特異性を示す。

40

〔図7〕トランスフェクトされたネズミEL4T細胞上でのヒトCD3イプシロンの検出のためのFACSアッセイ。グラフ解析は、ヒストグラムのオーバーレイを示す。太線は、抗ヒトCD3抗体UCHT-1とともにインキュベートされたトランスフェクトされた細胞を示す。細線は、マウスIgG1アイソタイプコントロールとともにインキュベ

50

トされた細胞を表す。抗CD3抗体UCHT-1の結合は、トランスフェクトされたネズミEL4T細胞の細胞表面でのヒトCD3イプシロン鎖の発現を明らかに示す。

〔図8A〕アラニンスキャニング実験でのアラニン変異体への異種間特異性抗CD3抗体の結合。個別の図で、カラムは、左から右へ、野生型トランスフェクタント（WT）及び位置1から27からの全てのアラニン変異体の対数スケールでの任意単位の計算結合値を示す。結合値は以下の式を利用して計算される：

（式）

$$\text{サンプル値}(x,y) = \frac{\text{サンプル}(x,y) - \text{陰性対照}(x)}{(\text{UCHT}-1(x) - \text{陰性対照}(x)) * \frac{\text{野生型}(y) - \text{陰性対照}(wt)}{\text{UCHT}-1(wt) - \text{陰性対照}(wt)}}$$

10

この式において、「サンプル値」は、図に示される特定のアラニン変異体に対する特定の抗CD3抗体の結合の程度を示す任意単位の結合の値を意味し、「サンプル」は、特定のアラニンスキャニングトランスフェクタントにアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「ネガティブコントロール」は、特定のアラニン変異体にアッセイされたネガティブコントロールで得られた幾何平均蛍光値を意味し、UCHT-1は、特定のアラニン変異体にアッセイされたUCHT-1抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「野生型」は、野生型トランスフェクタントでアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、xはそれぞれのトランスフェクタントを明示し、yはそれぞれの抗CD3抗体を明示し、wtはそれぞれのトランスフェクタントが野生型であることを明示する。個々のアラニン変異体の位置は、野生型アミノ酸の1文字のコード及び位置の数により標識づけられている。

20

キメラIgG分子として発現した異種間特異性抗CD3抗体A2JHLPの結果を示す。位置4（アスパラギン）、位置23（スレオニン）及び位置25（イソロイシン）でのアラニンへの変異体では結合活性の低下が見られる。位置1（グルタミン）、位置2（アスパラギン酸）及び位置3（グリシン）及び位置5（グルタミン酸）でのアラニンへの変異体では結合が完全に失われている。

〔図8B〕アラニンスキャニング実験でのアラニン変異体への異種間特異性抗CD3抗体の結合。個別の図で、カラムは、左から右へ、野生型トランスフェクタント（WT）及び位置1から27からの全てのアラニン変異体の対数スケールでの任意単位の計算結合値を示す。結合値は以下の式を利用して計算される：

30

（式）

$$\text{サンプル値}(x,y) = \frac{\text{サンプル}(x,y) - \text{陰性対照}(x)}{(\text{UCHT}-1(x) - \text{陰性対照}(x)) * \frac{\text{野生型}(y) - \text{陰性対照}(wt)}{\text{UCHT}-1(wt) - \text{陰性対照}(wt)}}$$

40

この式において、「サンプル値」は、図に示される特定のアラニン変異体に対する特定の抗CD3抗体の結合の程度を示す任意単位の結合の値を意味し、「サンプル」は、特定のアラニンスキャニングトランスフェクタントにアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「ネガティブコントロール」は、特定のアラニン変異体にアッセイされたネガティブコントロールで得られた幾何平均蛍光値を意味し、UCHT-1は、特定のアラニン変異体にアッセイされたUCHT-1抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「野生型」は、野生型トランスフェクタントでアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、xはそれぞれのトランスフェクタントを明示し、yはそれぞれの抗CD3抗体を明示し、wtはそれぞれのトランスフェクタントが野生型であることを明示する。個々のアラニン変異体の位置は、野生型アミノ酸の1文字の

50

コード及び位置の数により標識づけられている。

キメラ I g G 分子として発現した異種間特異性抗 C D 3 抗体 E 2 M H L P の結果を示す。位置 4 (アスパラギン)、位置 2 3 (スレオニン) 及び位置 2 5 (イソロイシン) でのアラニンへの変異体では結合活性の低下が見られる。位置 1 (グルタミン)、位置 2 (アスパラギン酸) 及び位置 3 (グリシン) 及び位置 5 (グルタミン酸) でのアラニンへの変異体では結合が完全に失われている。

[図 8 C] アラニンスキャニング実験でのアラニン変異体への異種間特異性抗 C D 3 抗体の結合。個別の図で、カラムは、左から右へ、野生型トランスフェクタント (W T) 及び位置 1 から 2 7 からの全てのアラニン変異体の対数スケールでの任意単位の計算結合値を示す。結合値は以下の式を利用して計算される：

(式)

$$\text{サンプル値}(x,y)=\frac{\text{サンプル}(x,y)-\text{陰性対照}(x)}{(\text{UCHT}-1(x)-\text{陰性対照}(x))\times\frac{\text{野生型}(y)-\text{陰性対照}(wt)}{\text{UCHT}-1(wt)-\text{陰性対照}(wt)}}$$

この式において、「サンプル値」は、図に示される特定のアラニン変異体に対する特定の抗 C D 3 抗体の結合の程度を示す任意単位の結合の値を意味し、「サンプル」は、特定のアラニンスキャニングトランスフェクタントにアッセイされた特定の抗 C D 3 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「ネガティブコントロール」は、特定のアラニン変異体にアッセイされたネガティブコントロールで得られた幾何平均蛍光値を意味し、U C H T - 1 は、特定のアラニン変異体にアッセイされた U C H T - 1 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「野生型」は、野生型トランスフェクタントでアッセイされた特定の抗 C D 3 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、x はそれぞれのトランスフェクタントを明示し、y はそれぞれの抗 C D 3 抗体を明示し、w t はそれぞれのトランスフェクタントが野生型であることを明示する。個々のアラニン変異体の位置は、野生型アミノ酸の 1 文字のコード及び位置の数により標識づけられている。

キメラ I g G 分子として発現した異種間特異性抗 C D 3 抗体 H 2 C H L P の結果を示す。位置 4 (アスパラギン) でのアラニンへの変異体では結合活性の低下が見られる。位置 1 (グルタミン)、位置 2 (アスパラギン酸) 及び位置 3 (グリシン) 及び位置 5 (グルタミン酸) でのアラニングルタミンへの変異体では結合が完全に失われている。

[図 8 D] アラニンスキャニング実験でのアラニン変異体への異種間特異性抗 C D 3 抗体の結合。個別の図で、カラムは、左から右へ、野生型トランスフェクタント (W T) 及び位置 1 から 2 7 からの全てのアラニン変異体の対数スケールでの任意単位の計算結合値を示す。結合値は以下の式を利用して計算される：

(式)

$$\text{サンプル値}(x,y)=\frac{\text{サンプル}(x,y)-\text{陰性対照}(x)}{(\text{UCHT}-1(x)-\text{陰性対照}(x))\times\frac{\text{野生型}(y)-\text{陰性対照}(wt)}{\text{UCHT}-1(wt)-\text{陰性対照}(wt)}}$$

この式において、「サンプル値」は、図に示される特定のアラニン変異体に対する特定の抗 C D 3 抗体の結合の程度を示す任意単位の結合の値を意味し、「サンプル」は、特定のアラニンスキャニングトランスフェクタントにアッセイされた特定の抗 C D 3 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「ネガティブコントロール」は、特定のアラニン変異体にアッセイされたネガティブコントロールで得られた幾何平均蛍光値を意味し、U C H T - 1 は、特定のアラニン変異体にアッセイされた U C H T - 1 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「野生型」は、野生型トランスフェクタントでアッセイされた特定の抗 C D

3 抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、xはそれぞれのトランスフェクタントを明示し、yはそれぞれの抗CD3抗体を明示し、wtはそれぞれのトランスフェクタントが野生型であることを明示する。個々のアラニン変異体の位置は、野生型アミノ酸の1文字のコード及び位置の数により標識づけられている。

ペリプラズム発現した単鎖抗体として試験される、異種間特異性抗CD3抗体F12QHLPの結果を示す。位置1（グルタミン）、位置2（アスパラギン酸）及び位置3（グリシン）及び位置5（グルタミン酸）でのアラニンへの変異体では結合が完全に失われている。

〔図9〕N末端His6タグがある場合と無い場合のヒトCD3への、異種間特異性抗CD3結合分子H2CHLPの結合を検出するFACSアッセイ。

ヒストグラムオーバーレイは、異種間特異性結合分子H2CHLPの結合を検出するFACSアッセイで試験された、野生型ヒトCD3イプシロン鎖（左のヒストグラム）又はN末端His6タグがあるヒトCD3イプシロン鎖（右のヒストグラム）によりトランスフェクトされたEL4細胞株で実施される。サンプルは、ネガティブコントロールとして適当なアイソタイプコントロールと（細線）、ポジティブコントロールとして抗ヒトCD3抗体UCHT-1と（点線）及びキメラIgG分子の形態の異種間特異性抗CD3抗体H2CHLPと（太線）ともにインキュベートされる。

ヒストグラムオーバーレイは、組換え構築体の両方の発現を示すアイソタイプコントロールに比べ、両トランスフェクタントへのUCHT-1抗体の同等な結合を示す。ヒストグラムオーバーレイは、His6ヒトCD3イプシロン鎖でなく、野生型ヒトCD3イプシロン鎖のみへの抗CD3結合分子H2CHLPの結合も示す。これらの結果は、異種間特異性抗CD3結合分子H2CHLPの結合にはフリーのN末端が必須であることを表す。

〔図10〕FACS分析による、細胞上でのCD3結合のKD値を測定する、ヒトCD3陽性PBMCへのEGFR-21-63LHxH2Cの飽和結合。このアッセイは、実施例7に記載されるとおり実施される。

〔図11a〕ヒトEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は実施例12に記載のとおり実施される。太線は、2µg/mlの精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図11b〕ヒトEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は実施例12に記載のとおり実施される。太線は、2µg/mlの精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図11c〕ヒトEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は実施例12に記載のとおり実施される。太線は、2µg/mlの精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

10

20

30

40

50

〔図 1 1 d〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 1 e〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 1 f〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 1 g〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 1 h〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 1 i〕 ヒト E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、カニクイザル E G F R によりトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x への、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの F A C S 結合分析。F A C S 染色は実施例 1 2 に記載のとおり実施される。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗 h i s 抗体及び P E 標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラムの線はネガティブコントロールを表す：細胞は、抗 h i s 抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図 1 2〕 示した標的細胞株へ向け直された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘起された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P

10

20

30

40

50

〔図 13 h〕 示した標的細胞株へ向け直された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘起された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激された CD4- / CD56- ヒト P BMC がエフェクター細胞として、ヒト EGFR でトランスフェクトされた CHO 細胞が標的細胞として用いられる。B) マカク T 細胞株 4119 Ln Px がエフェクター細胞

として、カニクイザルEGFRでトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として用いられる。このアッセイは実施例13で述べるようにして実施される。

〔図13i〕示した標的細胞株へ向け直された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘起された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-／CD56-ヒトPBMCがエフェクター細胞として、ヒトEGFRでトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として用いられる。B) マカクT細胞株4119LnPxがエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRでトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として用いられる。このアッセイは実施例13で述べるようにして実施される。

〔図13j〕示した標的細胞株へ向け直された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘起された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-／CD56-ヒトPBMCがエフェクター細胞として、ヒトEGFRでトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として用いられる。B) マカクT細胞株4119LnPxがエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRでトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として用いられる。このアッセイは実施例13で述べるようにして実施される。

〔図14〕ヒトMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は、実施例17に記載されたとおり実施される。太線は、2µg/mlの精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す：細いヒストグラム線はネガティブコントロールを表す。細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図15〕ヒトMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は、実施例17に記載されたとおり実施される。太線は、2µg/mlの精製タンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラム線はネガティブコントロールを表す。細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図16〕ヒトMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxへの、明示された種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析。FACS染色は、実施例17に記載されたとおり実施される。太線は、2µg/mlのモノマータンパク質とともにインキュベートされ、その後抗his抗体及びPE標識検出抗体とともにインキュベートされた細胞を表す。細いヒストグラム線はネガティブコントロールを表す。細胞は、抗his抗体及び検出抗体とインキュベートされるのみである。

〔図17〕示される標的細胞株に向け直された、明示された異種間特異性MCSP特異性単鎖コンストラクトにより誘起される細胞障害活性。A) 刺激されたCD4-／CD56-ヒトPBMCがエフェクター細胞として使用され、ヒトMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として使用される。B) マカクザルT細胞株4119LnPxがエフェクター細胞として使用され、カニクイザルMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として使用される。アッセイは実施例18に記載のとおり実施される。

〔図18〕示される標的細胞株に向け直された、明示された異種間特異性MCSP特異性単鎖コンストラクトにより誘起される細胞障害活性。A) 及びB) マカクザルT細胞株4119LnPxがエフェクター細胞として使用され、カニクイザルMCSPD3によりトランスフェクトされたCHO細胞が標的細胞として使用される。アッセイは実施例18に記載のとおり実施される。

〔図 19〕示される標的細胞株に向け直された、明示された異種間特異性 M C S P 特異性単鎖コンストラクトにより誘起される細胞障害活性。A) 及び B) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用され、ヒト M C S P D 3 によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞として使用される。アッセイは実施例 18 に記載のとおり実施される。

〔図 20〕示される標的細胞株に向け直された、明示された異種間特異性 M C S P 特異性単鎖コンストラクトにより誘起される細胞障害活性。A) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用され、ヒト M C S P D 3 によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞として使用される。B) マカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x がエフェクター細胞として使用され、カニクイザル M C S P D 3 によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞として使用される。アッセイは実施例 18 に記載のとおり実施される。

〔図 21〕示される標的細胞株に向け直された、明示された異種間特異性 M C S P 特異性単鎖コンストラクトにより誘起される細胞障害活性。A) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用され、ヒト M C S P D 3 によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞として使用される。B) マカクザル T 細胞株 4 1 1 9 L n P x がエフェクター細胞として使用され、カニクイザル M C S P D 3 によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞として使用される。アッセイは実施例 18 に記載のとおり実施される。

〔図 22-1〕50% ヒト血漿とともにそれぞれ 37℃ 及び 4℃ で 24 時間インキュベートされた、或いは細胞障害性試験の直前に 50% ヒト血漿が添加された、又は血漿が添加されない、明示された単鎖コンストラクトのサンプルにより誘起された、細胞障害活性の測定により試験される M C S P 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の血漿安定性。ヒト M C S P によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞株として使用され、刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用される。アッセイは実施例 19 に記載されるとおり実施される。

〔図 22-2〕50% ヒト血漿とともにそれぞれ 37℃ 及び 4℃ で 24 時間インキュベートされた、或いは細胞障害性試験の直前に 50% ヒト血漿が添加された、又は血漿が添加されない、明示された単鎖コンストラクトのサンプルにより誘起された、細胞障害活性の測定により試験される M C S P 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の血漿安定性。ヒト M C S P によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞株として使用され、刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用される。アッセイは実施例 19 に記載されるとおり実施される。

〔図 22-3〕50% ヒト血漿とともにそれぞれ 37℃ 及び 4℃ で 24 時間インキュベートされた、或いは細胞障害性試験の直前に 50% ヒト血漿が添加された、又は血漿が添加されない、明示された単鎖コンストラクトのサンプルにより誘起された、細胞障害活性の測定により試験される M C S P 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の血漿安定性。ヒト M C S P によりトランスフェクトされた C H O 細胞が標的細胞株として使用され、刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用される。アッセイは実施例 19 に記載されるとおり実施される。

〔図 23a〕従来のコンテクスト依存性 C D 3 エピトープを認識する C D 3 結合分子 C D 19 × C D 3 の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環する C D 19 - 陽性標的 B 細胞（黒三角）を実質的に持たない B - N H L 患者（表 4 の特許番号 1、7、23、30、31、及び 33）の末梢血液中の絶対 T 細胞数（白四角）の最初の低下及び回復（すなわち、再分布）を示す図である。絶対細胞数は、血液 1 マイクロリットル中 1000 個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。C D 19 × C D 3 の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図 23b〕従来のコンテクスト依存性 C D 3 エピトープを認識する C D 3 結合分子 C D 19 × C D 3 の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環する C D 19 - 陽性標的 B 細胞（黒三角）を実質的に持たない B - N H L 患者（表 4 の特許番号 1、7、23、30

10

20

30

40

50

、31、及び33)の末梢血液中の絶対T細胞数(白四角)の最初の低下及び回復(すなわち、再分布)を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図23c〕従来のコンテクスト依存性CD3エピトープを認識するCD3結合分子CD19×CD3の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環するCD19-陽性標的B細胞(黒三角)を実質的に持たないB-NHL患者(表4の特許番号1、7、23、30、31、及び33)の末梢血液中の絶対T細胞数(白四角)の最初の低下及び回復(すなわち、再分布)を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図23d〕従来のコンテクスト依存性CD3エピトープを認識するCD3結合分子CD19×CD3の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環するCD19-陽性標的B細胞(黒三角)を実質的に持たないB-NHL患者(表4の特許番号1、7、23、30、31、及び33)の末梢血液中の絶対T細胞数(白四角)の最初の低下及び回復(すなわち、再分布)を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図23e〕従来のコンテクスト依存性CD3エピトープを認識するCD3結合分子CD19×CD3の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環するCD19-陽性標的B細胞(黒三角)を実質的に持たないB-NHL患者(表4の特許番号1、7、23、30、31、及び33)の末梢血液中の絶対T細胞数(白四角)の最初の低下及び回復(すなわち、再分布)を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図23f〕従来のコンテクスト依存性CD3エピトープを認識するCD3結合分子CD19×CD3の静脈内注入の開始フェーズの間における、循環するCD19-陽性標的B細胞(黒三角)を実質的に持たないB-NHL患者(表4の特許番号1、7、23、30、31、及び33)の末梢血液中の絶対T細胞数(白四角)の最初の低下及び回復(すなわち、再分布)を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

〔図24〕(A)最初の投与量として1日目は $5\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間}$ とし、すぐに投与量を $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間}$ に増加して連続して行ったCD19×CD3の静脈注入の下、循環するCD19-陽性標的B細胞(黒三角)を持たないB-NHL患者番号19(表4)で繰り返し発生するT細胞再分布(白四角)、及びCNS症状の発症を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。 $5\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間}$ で開始した治療によって引き起こされた再分布の第一のエピソードからの循環するT細胞の回復後、5から $15\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間}$ への段階的な投与量の増加によってT細胞再分布の第二のエピソードが引き起こされ、これは、主として錯乱及び見当識障害であるCNS症状の発症を伴った。

(B)CD19×CD3を $1.5\mu\text{g}/\text{m}^2$ で繰り返し静脈内ボラス注入した場合のB-NHL患者で繰り返し発生するT細胞再分布を示す図であり、この患者はCNS症状を発症した。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。各ボラス投与の注入時間は2乃至4時間とした。垂直の矢印はボラス注入の開始を示す。各ボラス投与の最初のデータポイントは、ボラス注入開始直前のT細胞数を示す。各ボラス注入は、T細胞再分布のエピソードを引き起こし、続いて次のボラス注入の前にT細胞数は回復した。最後に、この患者では、T細胞再分布の第三のエピソードがCNS症状の発症を伴った。

10

20

30

40

50

〔図 25〕CD19×CD3 注入のランプイニシエーション (ramp initiation)、すなわち、治療の最初の 24 時間はほぼ 0 から $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間まで流量を均等に徐々に増加させるという場合における、循環する CD19 - 陽性標的 B 細胞 (黒三角) を持たない B - NHL 患者番号 20 (表 4) の複雑な T 細胞再分布パターン (白四角) を示す図である。絶対細胞数は、血液 1 マイクロリットル中 1000 個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3 の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。CD19×CD3 への第一の曝露によって引き起こされた最初の再分布後に循環血液中に再出現する T 細胞の一部は、ランプフェーズの間のさらに増加を続ける CD19×CD3 のレベルに誘発されて循環血液中から再消滅する。

10

〔図 26〕著しい数の循環する CD19 - 陽性標的 B (リンパ腫) 細胞 (黒三角) を持つ B - NHL 患者番号 13 (表 4) を CD19×CD3 で治療した際の T 及び B 細胞数を示す図である。絶対細胞数は、血液 1 マイクロリットル中 1000 個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3 の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。T 細胞 (白四角) は CD19×CD3 の注入開始と共に循環から完全に消滅し、循環する CD19 - 陽性標的 B (リンパ腫) 細胞 (黒三角) が末梢血液から除去されるまで再出現しない。

〔図 27〕循環する CD19 - 陽性標的 B 細胞 (黒三角) を実質的に持たず、CD19×CD3 注入をこの薬剤の安定化に必要である HSA を追加することなく開始すると共に CNS 症状を発症した B - NHL 患者番号 24 (表 4) で繰り返し発生する T 細胞再分布 (白四角) を示す図である (上側の図)。最初の再分布からの循環する T 細胞の第一の回復後、安定化させる HSA が存在しないために不均一となった薬剤流量によって T 細胞再分布の第二のエピソードが引き起こされ、これは、主として錯乱及び見当識障害である CNS 症状の発症を伴った。同一の患者にて、薬剤安定化のための HSA を追加して含有する CD19×CD3 溶液で正しく治療を再度開始すると、T 細胞再分布の繰り返しは観察されず (下側の図)、この患者はいずれの CNS 症状をも再度発症することはなかった。絶対細胞数は、血液 1 マイクロリットル中 1000 個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。CD19×CD3 の投与量は患者番号の横のカッコ内に示す。

20

〔図 28〕コンテクスト依存性 CD3 エピトープへの一価の結合によって誘発される内皮細胞への T 細胞の接着のモデルを示す図である。従来の CD3 結合分子は、CD3 イブシロン上のそのコンテクスト依存性エピトープに対する一価の相互作用によって CD3 のコンフォメーションのアロステリックな変化を、続いて CD3 イブシロンの細胞質ドメインへの Nck2 の動員を引き起こすことができる (Gillet al. (2002) Cell 110: 901)。Nck2 は PINCH 及び ILK を介してインテグリンと直接結合していることから (Legate et al. (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7: 20)、従来の CD3 結合分子 (実施例 20 の CD19×CD3 のような) が CD3 イブシロン上のそのコンテクスト依存性エピトープに結合することによる CD3 のコンフォメーションのアロステリックな変化に続いて Nck2 が CD3 イブシロンの細胞質ドメインへ動員されると、内側からのシグナル伝達 (inside-out signaling) を通して T 細胞表面上のインテグリンがより接着性の高いアイソフォームへと一時的に変換され、T 細胞の内皮細胞への接着性を高めることができる。

30

40

〔図 29〕実施例 21 で述べるようにカニクイザルのインビボでの研究に使用された CD33 - AF5 VH - VL×I2C VH - VL 試験物質の細胞障害活性を示す図である。CD33 陽性標的細胞の特異的な溶解を、CD33 - AF5 VH - VL×I2C VH - VL の濃度を上昇させる標準的な ^{51}Cr クロム放出アッセイによって測定した。アッセイは 18 時間行った。マカク T 細胞株 4119 LnPx をエフェクター細胞源として用いた。カニクイザル CD33 でトランスフェクトされた CHO 細胞を標的細胞とした。標的細胞に対するエフェクター細胞の比 (E:T 比) は 10:1 とした。標的細胞溶解の最大半減 (

50

half-maximal target cell lysis) に要する CD33-AF5 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の濃度 (EC50) は、用量反応曲線より 2.7 ng/ml の値であると算出された。

〔図30A〕実施例21で述べる CD33-AF5 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の連続する静脈注入による、カンクイザル末梢血液からの投与量依存及び時間依存の CD33 陽性単球の除去を示す図である。カラム上に示した処理時間後の循環する CD33 陽性単球の絶対数のベースライン (すなわち 100%) に対するパーセントを、投与量レベルごと、2匹のカンクイザルの各々に対して示す。投与量レベル (すなわち、注入流量) をカラムの下に示す。30 μ g/m²/24時間の投与量で7日間処理した動物1及び2では、循環する CD33 陽性単球の除去は観察されなかった。60 μ g/m²/24時間の投与量で7日間処理した動物3及び4では、循環する CD33 陽性単球数がそれぞれベースラインの 68% 及び 40% へ減少した。240 μ g/m²/24時間では、循環する CD33 陽性単球は3日間の処理の後に末梢血液からほぼ完全に除去された (動物5及び6)。1000 μ g/m²/24時間では、循環する CD33 陽性単球は1日の処理の後にすでに末梢血液から完全に除去されていた (動物7及び8)。

〔図30B-1〕120 μ g/m²/24時間で CD33-AF5 VH-VL $\times$ I2C VH-VL を14日間連続注入した場合の、2匹のカンクイザルの末梢血液中の T 細胞数及び CD33 単球数の推移を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。注入を開始して最初の12時間の CD33 単球の最初の動員後、その後の注入の過程において末梢血液中の CD33 単球 (黒三角) は、それぞれのベースライン数に対して3分の2 (動物10) 及び50% (動物9) が除去されている。循環する T 細胞数 (白四角) は、最初に限定的な低下を示し、続いて循環する CD33 陽性単球標的細胞が依然として存在している間に回復している。

〔図30B-2〕120 μ g/m²/24時間で CD33-AF5 VH-VL $\times$ I2C VH-VL を14日間連続注入した場合の、2匹のカンクイザルの末梢血液中の T 細胞数及び CD33 単球数の推移を示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。注入を開始して最初の12時間の CD33 単球の最初の動員後、その後の注入の過程において末梢血液中の CD33 単球 (黒三角) は、それぞれのベースライン数に対して3分の2 (動物10) 及び50% (動物9) が除去されている。循環する T 細胞数 (白四角) は、最初に限定的な低下を示し、続いて循環する CD33 陽性単球標的細胞が依然として存在している間に回復している。

〔図31〕実施例22で述べるようにカンクイザルのインビボでの研究に使用された MCS P-G4 VH-VL $\times$ I2C VH-VL 試験物質の細胞障害活性を示す図である。MCS P 陽性標的細胞の特異的な溶解を、MCS P-G4 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の濃度を上昇させる標準的な⁵¹クロム放出アッセイによって測定した。アッセイは18時間行った。マカク T 細胞株 4119 Ln Px をエフェクター細胞源として用いた。カンクイザル MCS P でトランスフェクトされた CHO 細胞を標的細胞とした。標的細胞に対するエフェクター細胞の比 (E:T 比) は 10:1 とした。標的細胞溶解の最大半減に要する MCS P-G4 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の濃度 (EC50) は、用量反応曲線より 1.9 ng/ml の値であると算出された。

〔図32-1〕実質的にコンテキスト非依存性 CD3 エピトープを認識する CD3 結合分子 MCS P-G4 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の静脈内注入の開始フェーズの間における、カンクイザル末梢血液中の絶対 T 細胞数の低下及びそれに続く回復 (すなわち、再分布) という最初のエピソードが発生していないことを示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。MCS P-G4 VH-VL $\times$ I2C VH-VL の投与量は動物番号の横のカッコ内に示す。カンクイザルの循環血液中に MCS P 陽性標的細胞が存在しないことが既知である場合、標的細胞の媒介による CD3 の架橋を通し

10

20

30

40

50

てのT細胞の再分布（すなわち、絶対T細胞数の低下及びそれに続く回復という最初のエピソード）は誘発されない。さらに、T細胞がCD3結合部位との相互作用を通すことでしか受けることができないシグナルによるT細胞の再分布（すなわち、絶対T細胞数の低下及びそれに続く回復という最初のエピソード）の誘発は、実質的にコンテキスト非依存性CD3エピトープを認識するMCS P - G 4 V H - V L × I 2 C V H - V LのようなCD3結合分子を用いることで避けることができる。

〔図32-2〕実質的にコンテキスト非依存性CD3エピトープを認識するCD3結合分子MCS P - G 4 V H - V L × I 2 C V H - V Lの静脈内注入の開始フェーズの間における、カニクイザル末梢血液中の絶対T細胞数の低下及びそれに続く回復（すなわち、再分布）という最初のエピソードが発生していないことを示す図である。絶対細胞数は、血液1マイクロリットル中1000個の細胞の単位として表される。最初のデータポイントは注入開始直前のベースライン数を示す。MCS P - G 4 V H - V L × I 2 C V H - V Lの投与量は動物番号の横のカッコ内に示す。カニクイザルの循環血液中にMCS P陽性標的細胞が存在しないことが既知である場合、標的細胞の媒介によるCD3の架橋を通してのT細胞の再分布（すなわち、絶対T細胞数の低下及びそれに続く回復という最初のエピソード）は誘発されない。さらに、T細胞がCD3結合部位との相互作用を通すことでしか受けることができないシグナルによるT細胞の再分布（すなわち、絶対T細胞数の低下及びそれに続く回復という最初のエピソード）の誘発は、実質的にコンテキスト非依存性CD3エピトープを認識するMCS P - G 4 V H - V L × I 2 C V H - V LのようなCD3結合分子を用いることで避けることができる。

〔図33-1〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、5 µg/mlの精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-2〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、5 µg/mlの精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-3〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、5 µg/mlの精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。

種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-4〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

10

〔図33-5〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

20

〔図33-6〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

30

〔図33-7〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23.4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

40

〔図33-8〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合

50

分析を示す図である。FACS染色は実施例23、4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-9〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23、4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-10〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23、4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-11〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23、4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図33-12〕指定の種間特異的二重特異性コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例23、4で述べるようにして実施する。太線は、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールにはトランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

イはヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図34-1〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-2〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-3〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-4〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-5〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-6〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-7〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図34-8〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例23.5で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

10

20

30

40

50

〔図 3 5 a〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 4 . 5 で述べるようにして実施した。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカク C A I X 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

10

〔図 3 5 b〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 4 . 5 で述べるようにして実施した。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカク C A I X 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

20

〔図 3 5 c〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 4 . 5 で述べるようにして実施した。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカク C A I X 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

30

〔図 3 5 d〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 4 . 5 で述べるようにして実施した。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカク C A I X 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

40

〔図 3 5 e〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C A I X でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C A I X で

50

トランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例24.5で述べるようにして実施した。太線は、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CAIXでトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCAIX並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

10

〔図35f〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例24.5で述べるようにして実施した。太線は、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CAIXでトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCAIX並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

20

〔図35g〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例24.5で述べるようにして実施した。太線は、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合に対するネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CAIXでトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカクCAIX並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

30

〔図36a〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CAIX特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例24.6で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

40

〔図36b〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CAIX特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例24.6で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図36c〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CAIX特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例24.6で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCAIXで

50

トランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図37〕ヒトT細胞をエフェクター細胞として用いた、指定のEpCAM特異的単鎖コンストラクトによって誘発されるヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞に対する細胞障害活性を示す図である。このアッセイは実施例のセクションで述べるようにして実施した。この図より、各コンストラクトによる細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

エフェクター細胞：刺激されたCD4／CD56除去ヒトPBMC

標的細胞：ヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO

〔図38a〕指定の二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞（2a）、EpCAM及びCD3陰性細胞株としてのトランスフェクトされていないCHO細胞（2b）、ヒトPBMC（2c）、及びマカクT細胞株4119LnPx（2d）のそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。細胞は、それぞれの二重特異性単鎖コンストラクトを含有する上清と共にインキュベートした。FACS染色は実施例のセクションで述べるようにして実施する。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒトEpCAM、並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

a：CHO-EpCAM（ヒト）

b：CHO（トランスフェクトされていない）

c：ヒトPBMC

d：マカク4119LnPx（CD3+）

〔図38b〕指定の二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞（2a）、EpCAM及びCD3陰性細胞株としてのトランスフェクトされていないCHO細胞（2b）、ヒトPBMC（2c）、及びマカクT細胞株4119LnPx（2d）のそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。細胞は、それぞれの二重特異性単鎖コンストラクトを含有する上清と共にインキュベートした。FACS染色は実施例のセクションで述べるようにして実施する。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒトEpCAM、並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

a：CHO-EpCAM（ヒト）

b：CHO（トランスフェクトされていない）

c：ヒトPBMC

d：マカク4119LnPx（CD3+）

〔図38c〕指定の二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞（2a）、EpCAM及びCD3陰性細胞株としてのトランスフェクトされていないCHO細胞（2b）、ヒトPBMC（2c）、及びマカクT細胞株4119LnPx（2d）のそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。細胞は、それぞれの二重特異性単鎖コンストラクトを含有する上清と共にインキュベートした。FACS染色は実施例のセクションで述べるようにして実施する。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒトEpCAM、並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

a：CHO-EpCAM（ヒト）

b：CHO（トランスフェクトされていない）

c：ヒトPBMC

d：マカク4119LnPx（CD3+）

〔図38d〕指定の二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞（2a）、EpCAM及びCD3陰性細胞株としてのトランスフェクトされていないCHO細胞（2b）、ヒトPBMC（2c）、及びマカクT細胞株4119LnPx（2d）のそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。細胞は、それぞれの二重特異性単鎖コンストラクトを含有する上清と共にインキュベートした。FACS

S染色は実施例のセクションで述べるようにして実施する。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒトEGFRvIII、並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

a: CHO-EGFRvIII (ヒト)

b: CHO (トランスフェクトされていない)

c: ヒトPBMC

d: マカク4119LnPx (CD3+)

[図39a] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、 $2\mu\text{g/ml}$ の精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

10

[図39b] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、 $2\mu\text{g/ml}$ の精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

20

[図39c] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、 $2\mu\text{g/ml}$ の精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

30

[図39d] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、 $2\mu\text{g/ml}$ の精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

[図39e] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、 $2\mu\text{g/ml}$ の精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

40

[図39f] 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株411

50

9 Ln P xに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例26.3で述べるようにして実施する。太線は、2 μ g/mlの精製した単量体タンパク質と共にインキュベートされ、続いて抗h i s抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗h i s抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

[図40a]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

10

[図40b]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

[図40c]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

20

[図40d]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

[図40e]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

30

[図40f]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

40

[図40g]示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119 Ln P xをエフェクター細胞として、カニクイザルEGFRv I I IでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例26.3で述べるようにして実施する。

[図41a]指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、及びマカクT細胞株4119 Ln P xに対する

50

FACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例27.2で述べるようにして実施する。太線は、指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトでトランスフェクトされたCHO細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

〔図41b〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例27.2で述べるようにして実施する。太線は、指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトでトランスフェクトされたCHO細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

〔図41c〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例27.2で述べるようにして実施する。太線は、指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトでトランスフェクトされたCHO細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされ、続いて抗his抗体及びPE標識検出抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。細線のヒストグラムは、ネガティブコントロール：抗his抗体及び検出抗体と共にインキュベートされただけである細胞を表す。

〔図42a〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞として、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例27.2で述べるようにして実施する。

〔図42b〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞として、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例27.2で述べるようにして実施する。

〔図42c〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞として、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例27.2で述べるようにして実施する。

〔図42d〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒトPBMCをエフェクター細胞として、ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。B) マカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞として、マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例27.2で述べるようにして実施する。

〔図42e〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激されたCD4-/CD56-ヒト

P B M C をエフェクター細胞として、ヒト I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。B) マカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x をエフェクター細胞として、マカク I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例 2 7 . 2 で述べるようにして実施する。

[図 4 2 f] 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C をエフェクター細胞として、ヒト I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。B) マカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x をエフェクター細胞として、マカク I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例 2 7 . 2 で述べるようにして実施する。

10

[図 4 2 g] 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。A) 刺激された C D 4 - / C D 5 6 - ヒト P B M C をエフェクター細胞として、ヒト I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。B) マカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x をエフェクター細胞として、マカク I g E でトランスフェクトされた J 5 5 8 L 細胞を標的細胞として用いる。このアッセイは実施例 2 7 . 2 で述べるようにして実施する。

20

[図 4 3] 指定の種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク P B M C のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 8 . 6 で述べるようにして実施した。太線は、5 μ g / m l の精製したニ重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2 % F C S を含む P B S を用いた。種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイはヒト及びマカク C D 4 4 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

[図 4 4] 指定の種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの、v 6 エクソンが欠損したヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞に対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 2 8 . 6 で述べるようにして実施する。C D 4 4 の発現のコントロールとして、v 6 エクソンが欠損したヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及び完全長ヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞を抗 C D 4 4 抗体と共にインキュベートした。太線は、5 μ g / m l の精製したニ重特異性単鎖コンストラクト、又は示した抗 C D 4 4 抗体 (5 μ g / m l) と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2 % F C S を含む P B S を用いた。種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、v 6 エクソンが欠損したヒト C D 4 4 へのコンストラクトの結合の欠如を示している。v 6 エクソンが欠損したヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞上に C D 4 4 が存在することは、これらの細胞及び完全長ヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた細胞に対する抗 C D 4 4 抗体の結合が同等であることによって示された。F A C S 結合分析により、C D 4 4 の v 6 エクソンに対する種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの特異性が示された。

30

40

[図 4 5] 実施例 2 8 . 1 で述べるように、ヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞へ再指向された指定の種間特異的 C D 4 4 特異的単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。エフェクター細胞として、刺激され C D 4 及び C D 5 6 が除去されたヒト P B M C を 1 0 : 1 の E : T 比で用いた。このアッセイは実施例 2 8 . 7 で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト C D 4 4 でトランスフェクトされた C H O 細胞に対するヒトエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が示された。

[図 4 6 - 1] 指定の種間特異的ニ重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C D 3 0 でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 0 + B 細胞株 M E C - 1、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C D 3 0 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク

50

P B M Cのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例29. 5で述べるようにして実施した。太線は、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2% F C Sを含むP B Sを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクC D 3 0並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図46-2〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトC D 3 0でトランスフェクトされたC H O細胞、ヒトC D 3 0 + B細胞株M E C - 1、ヒトC D 3 + T細胞株H P B - A L L、マカクC D 3 0でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクP B M Cのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例29. 5で述べるようにして実施した。太線は、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2% F C Sを含むP B Sを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクC D 3 0並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図47〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的C D 3 0特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例29. 6で述べるようにして実施した。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクC D 3 0に対して陽性である細胞それぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図48〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトH E R 2でトランスフェクトされたC H O細胞、ヒトC D 3 + T細胞株H P B - A L L、マカクH E R 2でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクT細胞株4 1 1 9 L n P xのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例30. 5で述べるようにして実施した。太線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクトと共にインキュベートされた細胞を表す。細線はネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2% F C Sを含むP B Sを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクH E R 2並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図49〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的H E R 2特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。示したエフェクター細胞も用いた。このアッセイは実施例30. 6で述べるようにして実施した。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクH E R 2でトランスフェクトされたC H O細胞それぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図50〕E 2 9 2 F 3 H L $\times$ I 2 C H Lと称する種間特異的二重特異性単鎖分子の精製をモニタリングするS D S P A G Eゲル及びウエスタンブロットを示す図である。図に示すように、溶離液からのサンプル、細胞培養物の上清(S N)、及びカラムのフロースルー(F T)を分析した。サイズのレファレンスとしてタンパク質マーカー(M)を適用した。S D S P A G Eゲルにおける50及び60 k D aの間の分子量の強いタンパク質バンドは、実施例31. 2で述べる1段階の精製法によって非常に高い純度まで種間特異的二重特異性単鎖分子が効率的に精製されていることを示す。ヒスチジン₆タグを検出するウエスタンブロットにより、溶離液中のタンパク質バンドがこの種間特異的二重特異性単鎖分子であることが確認される。さらに、この高感度な検出法においてフロースルーサンプルのシグナルが非常に弱いものであることは、この精製法によって二重特異性単鎖分子がほぼ完全に捕獲されることを示している。

〔図51〕V 2 0 7 C 1 2 H L $\times$ H 2 C H Lと称する種間特異的二重特異性単鎖分子の

精製をモニタリングする SDS PAGE ゲル及びウエスタンブロットを示す図である。図に示すように、溶離液からのサンプル、細胞培養物の上清 (SN)、及びカラムのフロースルー (FT) を分析した。サイズのレファレンスとしてタンパク質マーカー (M) を適用した。SDS PAGE ゲルにおける 50 及び 60 kDa の間の分子量の強いタンパク質バンドは、実施例 31.2 で述べる 1 段階の精製法によって非常に高い純度まで種間特異的二重特異性単鎖分子が効率的に精製されていることを示す。ヒスチジン₆ タグを検出するウエスタンブロットにより、溶離液中のタンパク質バンドがこの種間特異的二重特異性単鎖分子であることが確認される。さらに、この高感度な検出法においてフロースルーサンプルのシグナルが非常に弱いものであることは、この精製法によって二重特異性単鎖分子がほぼ完全に捕獲されることを示している。

10

[図 52] AF5HL×F12QHL と称する種間特異的二重特異性単鎖分子の精製をモニタリングする SDS PAGE ゲル及びウエスタンブロットを示す図である。図に示すように、溶離液からのサンプル、細胞培養物の上清 (SN)、及びカラムのフロースルー (FT) を分析した。サイズのレファレンスとしてタンパク質マーカー (M) を適用した。SDS PAGE ゲルにおける 50 及び 60 kDa の間の分子量の強いタンパク質バンドは、実施例 31.2 で述べる 1 段階の精製法によって非常に高い純度まで種間特異的二重特異性単鎖分子が効率的に精製されていることを示す。ヒスチジン₆ タグを検出するウエスタンブロットにより、溶離液中のタンパク質バンドがこの種間特異的二重特異性単鎖分子であることが確認される。この高感度な検出法におけるフロースルーサンプル中のシグナルは、上清中の二重特異性単鎖分子の濃度が高いためにアフィニティカラムが飽和したことで説明される。

20

[図 53] 50% マカクザル血清中の AF5HL×I2CHL の標準曲線である。上側の図は実施例 32.2 で述べるアッセイに対して作成された標準曲線を示す。

下側の図は、50% マカクザル血清中の AF5HL×I2CHL の品質管理サンプルに対する結果を示す。高 QC 及び中 QC サンプルに対する回収率は 90% 超であり、低 QC サンプルに対しては 80% 超である。

従って、このアッセイにより、血清サンプル中の AF5HL×I2CHL に対して 10 ng/ml 乃至 200 ng/ml の範囲 (希釈前) の検出が可能である。

[図 54] 50% マカクザル血清中の MCS P-G4 HL×I2CHL の標準曲線である。上側の図は実施例 32.2 で述べるアッセイに対して作成された標準曲線を示す。

30

下側のグラフは、50% マカクザル血清中の MCS P-G4 HL×I2CHL の品質管理サンプルに対する結果を示す。高 QC 及び中 QC サンプルに対する回収率は 98% 超であり、低 QC サンプルに対しては 85% 超である。

従って、このアッセイにより、血清サンプル中の MCS P-G4 HL×I2CHL に対して 10 ng/ml 乃至 200 ng/ml の範囲 (希釈前) の検出が可能である。

[図 55] カニクイザル EpCAM に融合した指定の種の CD3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1-27 でトランスフェクトされた CHO 細胞に対する抗 Fl ag 抗体の FACS 結合分析を示す図である。FACS 染色は実施例 33.1 で述べるようにして実施した。太線は、抗 Fl ag 抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、2% FCS を含む PBS を用いた。ヒストグラムより、すべてのトランスフェクタントに対して抗 Fl ag 抗体の結合が強く同等であることが示され、このことは、トランスフェクトされたコンストラクトの発現が強く同等であることを示している。

40

[図 56] カニクイザル EpCAM に融合した指定の種の CD3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1-27 を発現する CHO 細胞に対する I2CIgG1 コンストラクトの FACS 結合分析を示す図である。FACS 染色は実施例 33.3 で述べるようにして実施する。太線は、I2CIgG1 コンストラクトを発現する細胞の細胞培養物の上清 50 µl と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、カニクイザル EpCAM に融合したブタの CD3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1-27 を発現する細胞を用いた。ネガティブコントロールと

50

比較して、ヒストグラムは、ヒト、マーモセット、タマリン、及びリスザルのCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27に対してI2CIgG1コンストラクトが結合することを明らかに示している。

〔図57〕実施例6. 1及び5. 1でそれぞれ述べるN末端His6タグ付き及びタグ無しのヒトCD3に対する実施例33. 2で述べるI2CIgG1コンストラクトのFACS結合分析を示す図である。太線は、図に示すように、抗ヒトCD3抗体UCHT-1、ペンタ-His抗体(Qiagen)、及びI2CIgG1コンストラクトを発現する細胞の細胞培養物の上清のそれぞれと共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムは、ネガティブコントロールとして関連性のないマウスIgG1抗体と共にインキュベートされた細胞を表す。

上段の2つのヒストグラムのオーバーレイは、アイソタイプコントロールと比較して、両方のトランスフェクタントに対するUCHT-1抗体の結合が同等であることを表しており、両組み換えコンストラクトの発現を示している。中段の2つのヒストグラムのオーバーレイは、ペンタhis抗体が、His6-ヒトCD3イプシロン鎖(His6-CD3)を発現する細胞とは結合するが、野生型CD3イプシロン鎖(WT-CD3)を発現する細胞とは結合しないことを示す。下段のヒストグラムのオーバーレイは、I2CIgG1コンストラクトが、野生型ヒトCD3イプシロン鎖とは結合するが、His6-ヒトCD3イプシロン鎖とは結合しないことを示す。これらの結果から、種間特異的抗CD3結合分子I2CのCD3イプシロン鎖への結合には遊離のN末端が不可欠であることが示される。

〔図58a〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、2µg/mlの精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58b〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、2µg/mlの精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58c〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べる

ようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58d〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58e〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58f〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。MCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクMCSPD3並びにヒト及びマカクCD3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

〔図58g〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトMCSPD3でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクMC

S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクT細胞株4 1 1 9 L n P xのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないC H O細胞の上清を用いた。M C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクM C S P D 3並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

10

〔図58h〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、ヒトC D 3+T細胞株H P B - A L L、マカクM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクT細胞株4 1 1 9 L n P xのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないC H O細胞の上清を用いた。M C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクM C S P D 3並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

20

〔図58i〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、ヒトC D 3+T細胞株H P B - A L L、マカクM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクT細胞株4 1 1 9 L n P xのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないC H O細胞の上清を用いた。M C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクM C S P D 3並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

30

〔図58j〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、ヒトC D 3+T細胞株H P B - A L L、マカクM C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞、及びマカクT細胞株4 1 1 9 L n P xのそれぞれに対するF A C S結合分析を示す図である。F A C S染色は実施例17で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないC H O細胞の上清を用いた。M C S P D 3でトランスフェクトされたC H O細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクM C S P D 3並びにヒト及びマカクC D 3へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

40

50

〔図 5 8 k〕 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 1 7 で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカク M C S P D 3 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

10

〔図 5 8 l〕 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 1 7 で述べるようにして実施した。太線は、それぞれ、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製した二重特異性単鎖コンストラクト、又は二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T 細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていない C H O 細胞の上清を用いた。M C S P D 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカク M C S P D 3 並びにヒト及びマカク C D 3 へのコンストラクトの特異的な結合を示している。

20

〔図 5 9 a〕 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的 M C S P D 3 特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。エフェクター細胞、及び標的に対するエフェクターの比も示したものをを用いた。このアッセイは実施例 1 8 で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトによる細胞障害活性の強力な種間特異的な増加が明らかに示される。

30

〔図 5 9 b〕 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的 M C S P D 3 特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。エフェクター細胞、及び標的に対するエフェクターの比も示したものをを用いた。このアッセイは実施例 1 8 で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトによる細胞障害活性の強力な種間特異的な増加が明らかに示される。

〔図 5 9 c〕 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的 M C S P D 3 特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。エフェクター細胞、及び標的に対するエフェクターの比も示したものをを用いた。このアッセイは実施例 1 8 で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトによる細胞障害活性の強力な種間特異的な増加が明らかに示される。

40

〔図 5 9 d〕 示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的 M C S P D 3 特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。エフェクター細胞、及び標的に対するエフェクターの比も示したものをを用いた。このアッセイは実施例 1 8 で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトによる細胞障害活性の強力な種間特異的な増加が明らかに示される。

〔図 6 0 a〕 指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒト C D 3 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、ヒト C D 3 + T 細胞株 H P B - A L L、マカク C D 3 3 でトランスフェクトされた C H O 細胞、及びマカク P B M C のそれぞれに対する F A C S 結合分析を示す図である。F A C S 染色は実施例 3 6 . 2 で述べるようにして実施した。太

50

線は、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3ヘコンストラクトが特異的に結合していることを示している。

〔図60b〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクPBMCのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。FACS染色は実施例36.2で述べるようにして実施した。太線は、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。ネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD33並びにヒト及びマカクCD3ヘコンストラクトが特異的に結合していることを示している。

〔図61〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD33特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を測定するクロム放出アッセイの結果を示す図である。エフェクター細胞も示したものをを用いた。このアッセイは実施例36.3で述べるようにして実施する。この図より、各コンストラクトについて、ヒト及びマカクCD33でトランスフェクトされたCHO細胞のそれぞれに対するヒト及びマカクエフェクター細胞の細胞障害活性の強力な増加が明らかに示される。

〔図62〕PBS/5% HSA、及びPBS/5% HSAプラス単鎖EpCAM/CD3二重特異性抗体コンストラクトを、1.6、2.0、3.0、及び4.5 µg/kgの投与量で週1回の静脈内ボラス注入を行った場合のチンパンジーのT細胞再分布を示す図である。各ボラス投与の注入時間は2時間とした。垂直の矢印はボラス注入の開始を示す。各ボラス投与の最初のデータポイントは、ボラス注入開始直前のT細胞数を示す。従来のコンテクスト依存性CD3エピトープを認識する単鎖EpCAM/CD3二重特異性抗体コンストラクトの各ボラス注入によってT細胞再分布のエピソードが引き起こされ、続いて次のボラス注入の前にT細胞はベースライン値へ回復した。

〔図63〕選択されたクローンからのFlagタグscFvタンパク質断片を含む周辺質製剤のCD3特異的ELISA分析を示す図である。可溶性scFvタンパク質断片の周辺質製剤を、可溶性ヒトCD3イプシロン(aa1-27)-Fc融合タンパク質でコーティングしてPBS 3% BSAでさらにブロックしておいたELISAプレートのウェルに添加した。検出は、モノクローナル抗Flag-ビオチン標識抗体、続いてペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンで行った。ELISAの発色はABTS基質溶液で行った。OD値(y軸)は、ELISAリーダーにより405nmで測定した。x軸にクローン名を示す。

〔図64〕選択されたクローンからのFlagタグscFvタンパク質断片を含む周辺質製剤のCD3特異的ELISA分析を示す図である。図63と同じ可溶性scFvタンパク質断片の周辺質製剤を、可溶性ヒトCD3イプシロン(aa1-27)-Fc融合タンパク質ではなくhuIgG1(Sigma)でコーティングしてPBS中の3% BSAでブロックしておいたELISAプレートのウェルに添加した。

検出は、モノクローナル抗Flag-ビオチン標識抗体、続いてペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンで行った。ELISAの発色はABTS基質溶液で行った。OD値(y軸)は、ELISAリーダーにより405nmで測定した。x軸にクローン名を示す。

〔図65a〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラク

10

20

30

40

50

トのCD44に対する特異性を強調するために、コントロールとしてヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞を用いた。FACS染色は実施例39.3で述べるようにして実施する。太線は、二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CD44及びCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD44並びにヒト及びマカクCD3へコンストラクトが特異的に結合していることを示している。各コンストラクトについてのヒストグラムのオーバーレイは、ヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞に対して特異的に結合していないことを示している。

10

〔図65b〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのCD44に対する特異性を強調するために、コントロールとしてヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞を用いた。FACS染色は実施例39.3で述べるようにして実施する。太線は、二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CD44及びCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD44並びにヒト及びマカクCD3へコンストラクトが特異的に結合していることを示している。各コンストラクトについてのヒストグラムのオーバーレイは、ヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞に対して特異的に結合していないことを示している。

20

〔図65c〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのCD44に対する特異性を強調するために、コントロールとしてヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞を用いた。FACS染色は実施例39.3で述べるようにして実施する。太線は、二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CD44及びCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD44並びにヒト及びマカクCD3へコンストラクトが特異的に結合していることを示している。各コンストラクトについてのヒストグラムのオーバーレイは、ヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞に対して特異的に結合していないことを示している。

30

40

〔図65d〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのCD44に対する特異性を強調するために、コントロールとしてヒトCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞を用いた。FACS染色は実施例39.3で述

50

べるようにして実施する。太線は、二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CD44及びCD44 d e l v 6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD44並びにヒト及びマカクCD3へコンストラクトが特異的に結合していることを示している。各コンストラクトについてのヒストグラムのオーバーレイは、ヒトCD44 d e l v 6でトランスフェクトされたCHO細胞に対して特異的に結合していないことを示している。

10

〔図65e〕指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD3+T細胞株HPB-ALL、マカクCD44でトランスフェクトされたCHO細胞、及びマカクT細胞株4119LnPxのそれぞれに対するFACS結合分析を示す図である。指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのCD44に対する特異性を強調するために、コントロールとしてヒトCD44 d e l v 6でトランスフェクトされたCHO細胞を用いた。FACS染色は実施例39.3で述べるようにして実施する。太線は、二重特異性単鎖コンストラクトを含む細胞上清と共にインキュベートされた細胞を表す。黒塗りのヒストグラムはネガティブコントロールを表す。T細胞株への結合についてのネガティブコントロールには、トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を用いた。CD44及びCD44 d e l v 6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合についてのネガティブコントロールには、関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを用いた。種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトの各々について、ヒストグラムのオーバーレイは、ヒト及びマカクCD44並びにヒト及びマカクCD3へコンストラクトが特異的に結合していることを示している。各コンストラクトについてのヒストグラムのオーバーレイは、ヒトCD44 d e l v 6でトランスフェクトされたCHO細胞に対して特異的に結合していないことを示している。

20

〔図66〕示した標的細胞株へ再指向された指定の種間特異的CD44特異性単鎖コンストラクトによって誘発された細胞障害活性を示す図である。エフェクター細胞、及び標的に対するエフェクターの比も示したものをを用いた。このアッセイは実施例39.4で述べるようにして実施する。この図より、各々の二重特異性コンストラクトによる細胞障害活性を媒介する効力が明らかに示される。

30

〔図67〕実施例41で述べる指定の種間特異的二重特異性単鎖コンストラクトのFACS結合分析を示す図である。

〔図68〕実施例41で述べる指定の種間特異的結合分子によって誘発された細胞障害活性を示す図である。

【0178】

本発明及びその多くの利点をさらによく理解するために、以下の限定されない例示的な実施例によって本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0179】

40

1. 非ヒト霊長類の血液サンプルからのCD3イプシロン配列の同定

以下の非ヒト霊長類、カリスリクス・ジャカス、サグイヌス・オイディプス及びサイミリ・シウレウスの血液サンプルを、CD3イプシロン同定に使用した。新鮮なヘパリン処理全血サンプルを、製造業者のプロトコルに従い(QIAampRNA Blood Mini Kit、Qiagen)トータル細胞RNAの単離のために調製した。抽出したmRNAは、発表されているプロトコルに従いcDNAに転写した。簡単に言うと、10µlの沈殿したRNAを、1.2µlの10×ヘキサヌクレオチドミックス(Roche)と70℃で10分間インキュベートし、氷上で保存した。4µlの5×superscript IIバッファ、0.2µlの0.1Mジチオスレイトール、0.8µlのsuperscript II(Invitrogen)、1.2µlのデソキシリボヌクレオシ

50

ド三リン酸 (25 μ M)、0.8 μ l の RNase Inhibitor (Roche) 及び 1.8 μ l の DNase・RNase フリーウォーター (Roche) からなる反応ミックスを加えた。反応ミックスを、室温で 10 分間インキュベートし、次いで 42 $^{\circ}$ C で 50 分間、90 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。反応を氷上で冷却してから、0.8 μ l の RNase H (1 U/ μ l、Roche) を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。

【0180】

各種からの第 1 鎖 cDNA に、Taq DNA ポリメラーゼ (Sigma) 及びデータベース研究で設計された以下のプライマー組み合わせを利用して、別々な 35 サイクルポリメラーゼ連鎖反応を施した：フォワードプライマー 5'-AGAGTTCTGGGCTCTGCG-3' (配列番号 377)；リバースプライマー 5'-CGGATGGGCTCATAGTCTG-3' (配列番号 378)。増幅された 550 bp バンドをゲル精製し (Gel Extraction Kit、Qiagen)、配列決定した (Sequiseive、Vaterstetten/ドイツ、配列表参照)。

【0181】

CD3 イプシロン、カリスリクス・ジャカス
ヌクレオチド

CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCC
CATATAAAGTTTCCATCTCAGGAACCCACAGTAACACTTGAC
ATGCCCTCGGTATGATGGACATGAAATAAAAATGGCTCGTA
AATAGTCAAAACAAAGAAAGGTCAATGAGGACCCACCTGTTAC
TGGAGGACTTTTTCGGAAATGGAGCAAAGTGGTTATTATGCG
CTGCCCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAAGAGGCGAGCCAT
TATCTCTACCTGAAGGCAAGAGTGTTGTGAGAACTGCGTGG
AGGTGGAT

【0182】

アミノ酸

QDGN EEMGD TTQNPYKVSISGTTVTLLTCPRYDGHEIKWL
VNSQNK EGHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACLSKETPAEEASH
YLYLKARVCENCVEVD

【0183】

CD3 イプシロン、サグイヌス・オイディプス
ヌクレオチド

CAGGACGGTAATGAAGAAATGGGTGATACTACACAGAACCC
CATATAAAGTTTCCATCTCAGGAACCCACAGTAACACTTGAC
ATGCCCTCGGTATGATGGACATGAAATAAAAATGGCTTGT
AATAGTCAAAACAAAGAAAGGTCAATGAGGACCCACCTGTTAC
TGGAGGATTTTTCGGAAATGGAGCAAAGTGGTTATTATGCG
CTGCCCTCTCCAAAGAGACTCCCGCAGAAAGAGGCGAGCCAT
TATCTCTACCTGAAGGCAAGAGTGTTGTGAGAACTGCGTGG
AGGTGGAT

【0184】

アミノ酸

QDGN EEMGD TTQNPYKVSISGTTVTLLTCPRYDGHEIKWL
VNSQNK EGHEDHLLLEDFSEMEQSGYYACLSKETPAEEASH
YLYLKARVCENCVEVD

【0185】

CD3 イプシロン、サイミリ・シウレウス
ヌクレオチド

CAGGACGGTAATGAAGAGATTGGTGATACTACCCAGAACCC

C A T A T A A A G T T T C C A T C T C A G G A A C C A C A G T A A C A C T G A C
 A T G C C C T C G G T A T G A T G G A C A G G A A A T A A A A T G G C T C G T A
 A A T G A T C A A A A C A A A G A A G G T C A T G A G G A C C A C C T G T T A C
 T G G A A G A T T T T T C A G A A A T G G A A C A A A G T G G T T A T T A T G C
 C T G C C T C T C C A A A G A G A C C C C C A C A G A A G A G G C G A G C C A T
 T A T C T C T A C C T G A A G G C A A G A G T G T G T G A G A A C T G C G T G G
 A G G T G G A T

【0186】

アミノ酸

Q D G N E E I G D T T Q N P Y K V S I S G T T V T L T C P R Y D G Q E I K W L V
 N D Q N K E G H E D H L L L E D F S E M E Q S G Y Y A C L S K E T P T E E A S H
 Y L Y L K A R V C E N C V E V D

10

【0187】

2. ヒト及び異なる非チンパンジー霊長類のCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27に結合する異種間特異性単鎖抗体断片(s c F v)の生成

2. 1 異種可溶性タンパク質への融合による、そのナイーブCD3コンテキストから分離されるCD3イプシロンのN末端を利用するマウスの免疫

b a l b / c x c 5 7 黒交配の10週齢のF1マウスを、ヒト及び／又はサイミリ・シウレウスの成熟CD3イプシロン鎖の最もN末端アミノ酸1-27を持つCD3イプシロンFc融合タンパク質(1-27CD3-Fc)で免疫した。このために、マウスあたり300μlのPBS中の40μgの1-27CD3Fc融合タンパク質を、10nmolのチオアート修飾CpG-オリゴヌクレオチド(5'-t c c a t g a c g t t c c t g a t g c t -3')とともに腹腔内に注射した。マウスには、21日後、42日後、任意に63日後に追加免疫を同様に与えた。最初の追加免疫の10日後に、血液サンプルをとり、1-27CD3Fc融合タンパク質に対する抗体血清力価をELISAにより試験した。追加的に、CD3陽性ヒトT細胞株HPBa11に対する力価も、標準プロトコルによりフローサイトメトリーで試験した。血清力価は、非免疫動物よりも免疫動物で著しく高かった。

20

【0188】

2. 2 免疫マウス抗体s c F vライブラリーの生成：コンビナトリアル抗体ライブラリー及びファージディスプレイの構築

30

最後の注射の3日後、マウスの脾臓細胞を、標準プロトコルによりトータルRNAの調製のために摘出した。

【0189】

マウス免疫グロブリン(Ig)軽鎖(カッパ)可変領域(VK)及びIg重鎖可変領域(VH)DNA断片のライブラリーを、VK及びVH特異的なプライマーを利用してマウス脾臓RNAに対するRT-PCRにより構築した。cDNAは、標準プロトコルにより合成した。

【0190】

増幅した重鎖V断片のための5'-X h o l及び3'-B s t E l l認識部位及び増幅したVK DNA断片のための5'-S a c l及び3'-S p e l認識部位を生じるように、プライマーを設計した。

40

【0191】

VH DNA断片のPCR増幅のために、8つの異なる5'-VHファミリー特異性プライマー(MVHI (G C) A G G T G C A G C T C G A G G A G T C A G G A C C T ; MVH2 G A G G T C C A G C T C G A G C A G T C T G G A C C T ; MVH3 C A G G T C C A A C T C G A G C A G C C T G G G G C T ; MVH4 G A G G T T C A G C T C G A G C A G T C T G G G G C A ; MVH5 G A (A G) G T G A A G C T C G A G G A G T C T G G A G G A ; MVH6 G A G G T G A A G C T T C T C G A G T C T G G A G G T ; MVH7 G A A G T G

50

AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA; MVH8 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT) をそれぞれ、1つの3'-VHプライマー (3'MuVH BstEII tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca g) と組み合わせた: VK鎖断片のPCR増幅のために、7つの異なる5'-VKファミリー特異性プライマー (MUVK1 CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT; MUVK2 CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGCAGC CGC CC; MUVK3 CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA; MUVK4 CCA GTT CCG AGCTCC AGA TGA CCC AGT CTC CA; MUVK5 CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA; MUVK6 CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA; MUVK7 CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CACAGT CTC CA) を、それぞれ、1つの3'-VKプライマー (3'MuV kHindIII/BsiW1 tgg tgc act agt cgt acg ttt gat ctc aag ctt ggt ccc) と組み合わせた。

【0192】

以下のPCRプログラムを増幅に利用した: 94℃で20秒間変性; 52℃で50秒間プライマーアニーリング及び72℃で60秒間プライマー伸長及び40サイクル、次いで72℃で10分間の最終伸長。

【0193】

450 ngのカッパ軽鎖断片 (SacI-SpeI消化) を、1400 ngのファージミド pComb3H5Bhis (SacI-SpeI消化; 大きい断片) とライゲーションした。次いで、得られたコンビナトリアル抗体ライブラリーを、エレクトロポレーション (2.5 kV、0.2 cmギャップキュベット、25 uFD、200 オーム、BioRad ジーンパルサー) により300 µlのエレクトロコンピテント大腸菌 (Escherichia coli) XL1 Blue細胞中に形質転換し、10⁷を超える独立クローンのライブラリーサイズを得た。表現型発現の1時間後、陽性形質転換体を、100 mlの液体スーパーブロス (SB) 培地中で一晚、pComb3H5BHISベクターによりコードされるカルベニシリン耐性に関して選択した。次いで、細胞を遠心分離により採取し、市販のプラスミド調製キット (Qiagen) を利用してプラスミド調製を実施した。

【0194】

VKライブラリーを含む2800 ngのこのプラスミドDNA (XhoI-BstEII消化; 大きい断片) を、900 ngの重鎖V断片 (XhoI-BstEII消化) にライゲーションし、エレクトロポリマーレーション (2.5 kV、0.2 cmギャップキュベット、25 uFD、200 オーム) により再びエレクトロコンピテント大腸菌XL1 Blue細胞の2つの300 µlアリコート中に形質転換し、10⁷を超える独立クローンの総VH-VK scFv (単鎖可変断片) ライブラリーサイズを得た。

【0195】

表現型発現及びカルベニシリンへのゆっくりとした適応の後、抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞を、SB-カルベニシリン (50 µg/ml) の選択培地に移した。次いで、抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞を、ヘルパーファージVCSM13の10¹²粒子の感染量に感染させ、繊維状M13ファージの産生及び分泌を得たが、ファージ粒子は、マウス scFv断片をコードする単鎖 pComb3H5BHIS-DNAを含み、ファージコートタンパク質IIIへの翻訳融合として対応する scFvタンパク質を提示した。抗体ライブラリーを提示するファージのプールは、後に抗体結合体の選択に使用した。

【0196】

2. 3ファージディスプレイに基づくCD3特異性バインダーの選択

クロニングされた scFvレパートリーを持つファージライブラリーを、PEG8000/NaCl沈殿及び遠心分離によりそれぞれの培養上清から採取した。およそ10¹¹

から 10^{12} の s c F v ファージ粒子を、0.4 ml の P B S / 0.1 % B S A に再懸濁し、 10^5 から 10^7 の J u r k a t 細胞 (C D 3 陽性ヒト T 細胞株) と共に氷上で 1 時間ゆっくりと攪拌しながらインキュベートした。これらの J u r k a t 細胞は、事前に、ウシ胎児血清 (10 %)、グルタミン及びペニシリン／ストレプトマイシンを富化した R P M I 培地中で生育し、遠心分離により採取し、P B S で洗浄して、P B S / 1 % F C S (アジ化ナトリウム含有) に再懸濁した。J u r k a t 細胞に特異的に結合しない s c F v ファージは、最大 5 回の P B S / 1 % F C S (アジ化ナトリウム含有) による洗浄工程により除去した。洗浄の後、細胞を H C l - グリシン p H 2.2 (10 分間インキュベート、その後ボルテックス処理) に再懸濁して結合体を細胞から溶出し、2 M の T r i s p H 12 で中和の後、溶出液を、新鮮な未感染大腸菌 X L 1 B l u e 培養液 (O D 600 > 0.5) の感染に使用した。ヒト s c F v 断片をコードする、ファージミドコピーによりうまくトランスフェクトされた大腸菌細胞を含む大腸菌培養液を、再びカルベニシリン耐性で選択し、次いで V C M S 13 ヘルパーファージに感染させて、抗体ディスプレイ及びインビトロ選択の第 2 ラウンドを開始した。通常、4 から 5 ラウンドの選択を実施した。

【0197】

2.4 C D 3 特異性バインダーのスクリーニング

4 から 5 ラウンドのパニングに相当するプラスミド D N A を、選択の後大腸菌培養液から単離した。可溶性 s c F v タンパク質の産生のため、V H - V L - D N A 断片をプラスミドから切除した (X h o l - S p e l)。これらの断片を、元々の p C o m b 3 H 5 B H i s とは、発現コンストラクト (例えば s c F v) が s c F v と H i s 6 - タグの間に F l a g タグ (T G D Y K D D D K) を含む点で異なるプラスミド p C o m b 3 H 5 B F l a g / H i s 中で、同じ制限部位によりクローニングし、追加のファージタンパク質を排除した。ライゲーションの後、プラスミド D N A の各プール (異なるパニングのラウンド) を、100 μ l ヒートショックコンピテント大腸菌 T G 1 又は X L 1 - B l u e 中に形質転換し、カルベニシリン L B アガーに播種した。単一のコロニーを 100 μ l の L B c a r b (50 μ g / m l) に選り入れた。

【0198】

V L 及び V H セグメントを含む p C o m b 3 H 5 B H i s により形質転換された大腸菌は、遺伝子 I I I 断片の切除及び 1 m M I P T G による誘導の後、可溶性 s c F v を十分な量産生する。好適なシグナル配列により、s c F v 鎖はペリプラズムにエクスポートされ、機能的コンフォメーションに折り畳まれる。

【0199】

形質転換プレートから単一の大腸菌 T G 1 細菌コロニーを、小スケールペリプラズム調製物のために選り取り、採取の後、20 m M M g C l 2 及びカルベニシリン 50 μ g / m l を補い (及び P B S (例えば 1 m l) に再溶解された) S B 培地 (例えば 10 m l) 中で増殖させた。-70 $^{\circ}$ C での冷凍及び 37 $^{\circ}$ C での解凍の 4 ラウンドにより、細菌の外膜を温度ショックにより破壊し、s c F v を含む可溶性ペリプラズムタンパク質を上清中に放出させた。無傷の細胞及び細胞片を遠心分離で除去した後、ヒト抗ヒト C D 3 - s c F v を含む上清を回収し、さらなる実験に使用した。

【0200】

2.5 C D 3 特異性バインダーの同定

単離した s c F v の結合を、真核細胞上でフローサイトメトリーにより試験したが、真核細胞は、その表面で、その N 末端で C D 3 イプシロンの最初の 27 N 末端アミノ酸を提示する異種タンパク質を発現する。

【0201】

実施例 4 に記載されるとおり、ヒト T 細胞レセプター複合体の成熟 C D 3 イプシロン鎖の N 末端配列の最初のアミノ酸 1 - 27 (アミノ酸配列: Q D G N E E M G G I T Q T P Y K V S I S G T T V I L T) を、N 末端が外部細胞表面に位置するように、膜貫通型タンパク質 E p C A M の N 末端に融合した。さらに、F L A G エピトープを、N 末端 1 - 27 C D 3 イプシロン配列と E p C A M 配列の間に挿入した。この融合産物は、ヒト胎児由

10

20

30

40

50

来腎臓細胞（H E K）及びチャイニーズハムスター卵巣細胞（C H O）中に発現した。

【0202】

他の霊長類種の成熟C D 3 イブシロンの27の最もN末端アミノ酸を提示する真核細胞は、サイミリ・シウレウス（リスザル）（C D 3 イブシロンN末端アミノ酸配列：Q D G N E E I G D T T Q N P Y K V S I S G T T V T L T）、カリスリクス・ジャカス（C D 3 イブシロンN末端アミノ酸配列：Q D G N E E M G D T T Q N P Y K V S I S G T T V T L T）及びサグイヌス・オイディプス（C D 3 イブシロンN末端アミノ酸配列：Q D G N E E M G D T T Q N P Y K V S I S G T T V T L T）に対して同様に調製した。

【0203】

フローサイトメトリーには、 2.5×10^5 細胞を、 $50 \mu\text{l}$ の上清又は2% F C S を含む $50 \mu\text{l}$ のP B S 中で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製コンストラクトと共にインキュベートする。コンストラクトの結合は、2% F C S を含む $50 \mu\text{l}$ のP B S 中で $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で抗H i s 抗体（P e n t a - H i s A n t i b o d y、B S A 不含、Q i a g e n G m b H、ヒルデン、ドイツ）により検出された。第2工程試薬として、2% F C S を含む $50 \mu\text{l}$ P B S 中に1：100で希釈されたRーフィコエリスリン結合アフィニティ精製F（a b'）2断片、ヤギ抗マウスI g G（F cーガンマ断片特異性）（D i a n o v a、ハンプブルグ、ドイツ）を使用した。サンプルを、F A C S s c a n（B D b i o s c i e n c e s、ハイデルブルグ、ドイツ）で測定した。

【0204】

結合は、ヒト及び異なる霊長類（サイミリ・シウレウス、カリスリクス・ジャカス、サグイヌス・オイディプス）の一次T細胞上で前記段落に記載されたとおりフローサイトメトリーにより常に確認した。

【0205】

2. 6 非ヒトC D 3 イブシロン特異性s c F vのヒト／ヒト化等価物の生成

マウス抗C D 3 s c F vのV H領域を、ヒト抗体生殖細胞株アミノ酸配列に対して整理させた。非ヒトV Hに最も近い相同性を有する、ヒト抗体生殖細胞株V H配列を選び、2つのアミノ酸配列の直接整理を実施した。ヒトV Hフレームワーク領域とは異なる、非ヒトV Hのフレームワーク残基が多くあった（「異なるフレームワーク位置」）。これらの残基のいくつかは、標的への抗体の結合及び活性に寄与しているかも知れない。

【0206】

マウスC D Rを含むライブラリーを構築するために、選択されたヒトV H配列とは異なる全てのフレームワーク位置で、両方の可能性（ヒト及び母系マウスアミノ酸残基）、変性したオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、異なる部位で、75%の確率でヒトの残基を、25%の確率でマウスの残基を取り込む。1つのヒトV Hでは、例えば、およそ20ヌクレオチドの末端ストレッチに重複する、これらのオリゴヌクレオチドの6つが合成されなくてはならなかった。このために、1つおきのプライマーはアンチセンスプライマーであった。オリゴヌクレオチド内の後のクローニングに必要な制限部位を削除した。

【0207】

これらのプライマーは、V配列全体に拡がるのに必要とされるプライマーの数により、60から90ヌクレオチドの長さを有することがある。

【0208】

これらの、例えば6つのプライマーを同量（例えば、 $1 \mu\text{l}$ の各プライマー（プライマーストック、20から100 μM ）を20 μl のP C R反応に）で混合し、P C Rバッファ、ヌクレオチド及びT a qポリメラーゼからなるP C Rミックスに加えた。このミックスを94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、72℃で10分間、P C Rサイクラー中でインキュベートした。その後、産物を、アガロースゲル電気泳動にかけ、200から400のサイズの産物を標準法によりゲルから単離した。

【0209】

次いで、このPCR産物を鋳型として、N末端及びC末端好適クローニング制限部位を取り込むプライマーを利用して、標準PCR反応に使用した。適当なサイズのDNA断片（VHではおよそ350ヌクレオチド）を、標準法によりアガロースゲル電気泳動により単離した。このようにして、十分なVH DNA断片を増幅した。このVH断片は、それぞれの異なるフレームワーク位置で、それぞれに異なる量のヒト及びマウス残基を有するVH断片のプールであった（ヒト化VHのプール）。同じ手順を、マウス抗CD3scFvのVL領域にも実施した（ヒト化VLのプール）。

【0210】

次いで、ヒト化VHのプールを、ファージディスプレイベクターpComb3H5Bhis中でヒト化VLのプールと組み合わせ、機能性scFvのライブラリーを形成し、繊維状ファージ上での提示の後、ここから母系非ヒト（マウス）抗CD3scFvに関して上述のとおり抗CD3バインダーを選択し、スクリーニングし、同定し、確認した。次いで、単一のクローンを、望ましい性質及びアミノ酸配列に関して分析した。ヒト生殖細胞株Vセグメントに、アミノ酸配列相同性で最も近いこれらのscFvは好ましく、VHのCDRI及びII並びにVLカッパのCDRI及びII並びにVLラムダのCDRI及びIIの中の少なくとも1つのCDRが、全てのヒト生殖細胞株Vセグメントの最も近いそれぞれのCDRに、80%を超えるアミノ酸配列同一性を示す物が特に好ましい。抗CD3scFvを、以下の実施例10及び16に記載されるとおり組換え二重特異性単鎖抗体に変換し、さらにキャラクタリゼーションした。

【0211】

3. IgG1のFc部に融合したヒトCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27の組換え融合タンパク質の生成（1-27CD3-Fc）

3.1 1-27CD-3Fcのクローニング及び発現

ヒト免疫グロブリンIgG1のヒンジ及びFcガンマ領域並びに6ヒスチジンタグに融合したヒトCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸のコード配列は、標準プロトコルによる遺伝子合成により得た（組換え融合タンパク質のcDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号350及び349に記されている）。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位をまず含み、次いで19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチド、次いでフレームを合わせて成熟ヒトCD3イプシロン鎖の細胞外部分の最初の27アミノ酸のコード配列、次いでフレームを合わせてヒトIgG1のヒンジ領域及びFcガンマ部分のコード配列、次いでフレームを合わせて6ヒスチジンタグのコード配列及び終止コドンを含むように設計した（図1）。遺伝子合成断片は、融合タンパク質をコードするcDNAの最初及び最後に制限部位を導入するようにも設計した。導入された制限部位、5'末端でのEcoRI及び3'末端でのSalIは、以下のクローニング手順で利用する。遺伝子合成断片を、標準プロトコルに従い、EcoRI及びSalIによりpEF-DHFRと称されるプラスミド中にクローニングした（pEF-DHFRは、Mackey et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025に記載されている）。配列実証済みプラスミドを、製造業者のプロトコルに従い、FreeStyle293 Expression System（Invitrogen GmbH、カールスルーエ、ドイツ）でのトランスフェクションに使用した。3日後、トランスフェクタントの細胞培養上清を採取し、ELISAアッセイで組換えコンストラクトの存在を試験した。ヤギ抗ヒトIgG、Fcガンマ断片特異性抗体（Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. ニューマーケット、サフォーク、英国から入手）をPBS中に希釈し5µg/mlとし、MaxiSorp 96ウェルELISAプレート（Nunc GmbH & Co. KG、ヴィースバーデン、ドイツ）にウェルあたり100µlで、4℃で一晩コーティングした。ウェルを、0.05% Tween 20を含むPBS（PBS/Tween）で洗浄し、室温（RT）で60分間PBS中3% BSA（ウシアルブミン、V分画、Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ）でブロックした。その後、ウェルをPBS/Tweenで再び洗浄し、次いで60分間RTで細胞培養上清とともにインキ

ュベートした。洗浄の後、ウェルを、1%BSAを含むPBSに1:500で希釈したペルオキシダーゼ結合抗His6抗体(Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science、マンハイム、ドイツ)とともに60分間RTでインキュベートした。その後、ウェルを200 μ lのPBS/Tweenで洗浄し、100 μ lのSIGMAFAST OPD (SIGMAFAST OPD (o-フェニレンジアミンジヒドロクロライド) 基質溶液 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ))を、製造業者のプロトコルに従い加えた。100 μ lの1MH₂SO₄を加えて反応を停止した。呈色反応を、PowerWave Xマイクロプレート分光光度計 (BioTek Instruments, Inc、ウィヌースキ、バーモント州、米国) で、490nmで測定し、620nmでのバックグラウンド吸収を差し引いた。図2に示されるとおり、ネガティブコントロールとして使用した模擬トランスフェクションHEK293細胞の無関係な上清に比べ、コンストラクトの存在がはっきりと検出できた。

【0212】

3. 2 1-27CD3-Fcへの異種間特異性単鎖抗体の結合アッセイ

1-27CD3-Fcへの、CD3イプシロンに特異的なペリプラズム発現した異種間特異性単鎖抗体の粗調製物の結合を、ELISAアッセイで試験した。ヤギ抗ヒトIgG、Fc-ガンマ断片特異性抗体 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. ニューマーケット、サフォーク、英国) をPBS中に希釈し5 μ g/mlとし、MaxiSorp 96ウェルELISAプレート (Nunc GmbH & Co. KG、ヴィースバーデン、ドイツ) にウェルあたり100 μ lで、4℃で一晩コーティングした。ウェルを、0.05%Tween20を含むPBS (PBS/Tween) で洗浄し、RTで60分間PBS中3%BSA (ウシアルブミン、V分画、Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ) でブロックした。その後、ウェルをPBS/Tweenで洗浄し、次いで60分間RTで1-27CD3-Fcコンストラクトを発現する細胞の上清とともにインキュベートした。ウェルを、PBS/Tweenで洗浄し、ペリプラズム発現した異種間特異性単鎖抗体の粗調製物とともに室温で60分間インキュベートした。PBS/Tweenで洗浄した後、ウェルを1%BSAを含むPBSに1:10000で希釈したペルオキシダーゼ結合抗FlagM2抗体 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ) とともに60分間RTでインキュベートした。その後、ウェルをPBS/Tweenで洗浄し、100 μ lのSIGMAFAST OPD (OPD (o-フェニレンジアミンジヒドロクロライド)) 基質溶液 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ) とともに、製造業者のプロトコルに従いインキュベートした。100 μ lの1MH₂SO₄を加えて呈色反応を停止し、PowerWave Xマイクロプレート分光光度計 (BioTek Instruments, Inc、ウィヌースキ、バーモント州、米国) で、490nmで測定し、620nmでのバックグラウンド吸収を差し引いた。マウス抗CD3単鎖抗体に比べ、1-27CD3-Fcコンストラクトへの、CD3イプシロンに特異的な異種間特異性ヒト単鎖抗体の強い結合を観察した (図3)。

【0213】

4. カニクイザル由来のEpCAMに融合した異なる非チンパンジー霊長類由来のCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27の組換え膜貫通型融合タンパク質の生成 (1-27CD3-EpCAM)

4. 1 1-27CD3-EpCAMのクローニング及び発現

異なる非チンパンジー霊長類 (マーモセット、タマリン、リスザル) 及びブタから、CD3イプシロンを単離した。Flagタグ付きカニクイザルEpCAMのN末端に融合した、成熟ヒト、コモンマーモセット (カリスリックス・ジャカス)、ワタボウシタマリン (サグイヌス・オイディプス)、コモンリスザル (サイミリ・シウレウス) 及び家畜ブタ (サス・スクローファ、Sus Scrofa; ネガティブコントロールとして使用) のCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸のコード配列を、標準プロトコルに従い、遺

伝子合成により得た。組換え融合タンパク質のcDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号351から360に示されている。遺伝子合成断片は、第1に、標的発現ベクターにすでに存在する19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列と正しいリーディングフレームでの融合を可能にするBsrGI部位を含むように、次いで、フレームを合わせて成熟CD3イプシロン鎖の細胞外部分のN末端1-27アミノ酸のコード配列を、次いで、フレームを合わせてFlagタグのコード配列を、次いで、フレームを合わせて、成熟カニクイザルEpCAM膜貫通型融合タンパク質のコード配列を含むように設計した(図4)。遺伝子合成断片を、融合タンパク質をコードするcDNAの末端に制限部位を導入するように設計した。導入された制限部位、5'末端でのBsrGI及び3'末端でのSalIを、以下のクローニング手順に利用した。遺伝子合成断片を、BsrGI及びSalIにより、標準プロトコルに従い、19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列をすでに含む、pEF-DHFRと称されるプラスミドの誘導体中にクローニングした(pEF-DHFRは、Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025に記載されている)。

【0214】

配列実証済みプラスミドを使用して、製造業者のプロトコルに従い、175mlの細胞培養フラスコ中の接着性293-HEK細胞のために、MATra-A試薬(IBA GmbH、ゲッティンゲン、ドイツ)及び12µgのプラスミドDNAを使用し、293-HEK細胞を一過性導入した。細胞培養の3日後、トランスフェクタントを、標準プロトコルに従い、FACSアッセイにより、組換え膜貫通型タンパク質の細胞表面発現に関して試験した。その目的のため、 2.5×10^5 の細胞を、2%FCSを含むPBS中で5µg/mlで抗Flag M2抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ)と共にインキュベートした。結合した抗体を、R-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、2%FCSを含むPBS中で1:100のヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. ニューマーケット、サフォーク、英国)により検出した。サンプルを、FACSCalibur(BD biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ)で測定した。カニクイザルEpCAM及び、それぞれ、ヒト、マーモセット、タマリン、リスザル及びブタのCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸からなるFlagタグ付き組換え膜貫通型融合タンパク質の、トランスフェクトされた細胞上での発現は、はっきりと検出可能であった(図5)。

【0215】

4. 2 1-27CD3-EpCAMへの異種間特異性抗CD3単鎖抗体の結合

カニクイザルEpCAMに融合した、それぞれヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸への、ペリプラズム発現した異種間特異性抗CD3単鎖抗体の粗調製物の結合を、標準プロトコルに従いFACSアッセイで試験した。その目的のため、 2.5×10^5 の細胞を、ペリプラズム発現した異種間特異性抗CD3単鎖抗体(上述のとおり、標準プロトコルに従い調製した)の粗調製物及びネガティブコントロールとしての単鎖マウス抗ヒトCD3抗体とともにインキュベートした。二次抗体として、Penta-His抗体(Qiagen GmbH、ヒルデン、ドイツ)を、2%FCSを含む50µl PBS中で5µg/mlで使用した。抗体の結合は、2%FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国)により検出した。サンプルを、FACSCalibur(BD biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ)で測定した。図6(AからE)に示されるとおり、カニクイザルEpCAMに融合した、それぞれヒト、マーモセット、タマリン及びリスザルのCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸からなる組換え膜貫通型タンパク質を発現するトランスフェクタントへの、単鎖抗体の結合が観察された。異種間特異性単鎖抗体の、ネガティブコントロールとして使用したカニクイザルEpCAMに融合したブタの

1-27 N末端CD3イプシロンからなる融合タンパク質への結合は全く見られなかった。抗CD3単鎖抗体の多霊長類異種間特異性が示された。抗Fla g M2抗体と異種間特異性単鎖抗体で得られたシグナルは同等であり、異種間特異性単鎖抗体のCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27への強い結合活性を示している。

【0216】

5. ヒトCD3イプシロン鎖及びそのアラニン変異体でトランスフェクトされたマウス細胞のアラニンスキャニングによる異種間特異性抗CD3単鎖抗体の結合分析

5.1 ヒト野生型CD3イプシロンのクローニング及び発現

ヒトCD3イプシロン鎖のコード配列は、標準プロトコルに従い遺伝子合成により得た（ヒトCD3イプシロン鎖のcDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号362及び361に記す）。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位及びヒトCD3イプシロンをコードするcDNAの最初と最後に制限部位を含むように設計した。導入された制限部位、5'末端でのEcoRI及び3'末端でのSalIを以下のクローニング手順で利用した。次いで、以下の標準プロトコルに従い、pEFNEOと称されるプラスミド中で、EcoRI及びSalIにより、遺伝子合成断片をクローニングした。pEFNEOは、pEF-DHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) から、従来の分子クローニングにより、DHFRのcDNAをネオマイシン耐性のcDNAに置換することにより誘導した。配列実証済みプラスミドを使用して、10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、1% HEPES、1% ピルビン酸、1% 非必須アミノ酸（全て、Biochrom AG、ベルリン、ドイツ）を補った安定化Lグルタミンを含むRPMI中で、37℃、湿度95%、CO₂ 7%で培養したマウスT細胞株EL4 (ATCC No. TIB-39) にトランスフェクトした。トランスフェクションは、SuperFect Transfection Reagent (Qiagen GmbH、ヒルデン、ドイツ) 及び2 µgのプラスミドDNAにより、製造業者のプロトコルに従って実施した。24時間後、細胞をPBSで洗浄し、再び上述の細胞培養培地で、選択のために600 µg/mlのG418 (PAA Laboratories GmbH、パッシング、オーストリア) とともに培養した。トランスフェクションの16から20日後に、耐性細胞の増殖が観察された。さらに7から14日後、標準プロトコルに従い、ヒトCD3イプシロンの発現に関して、FACS分析により細胞を試験した。2.5 × 10⁵の細胞を、2% FCSを含むPBS中で5 µg/mlで、抗ヒトCD3抗体UCHT-1 (BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ) と共にインキュベートした。抗体の結合は、2% FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国) により検出した。サンプルを、FACSCalibur (BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ) で測定した。トランスフェクトされたEL4細胞上での、ヒト野生型CD3イプシロンの発現が図7に示されている。

【0217】

5.2 IgG1抗体としての異種間特異性抗CD3単鎖抗体のクローニング及び発現

異種間特異性抗CD3単鎖抗体の結合を検出する改善された手段を提供するために、H2CHLP、A2JHLP及びE2MHLPを、マウスIgG1及びヒトラムダ定常部とともにIgG1抗体中に変換した。それぞれのIgG抗体の重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列は、標準プロトコルに従い、遺伝子合成により得た。各特異性の遺伝子合成断片は、まず、コンストラクトの真核細胞発現を可能にするコザック部位を含むように、次いで、19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチド（配列番号364及び363）を、次いで、フレームを合わせて、それぞれの重鎖可変領域又はそれぞれの軽鎖可変領域のコード配列を、次いで、フレームを合わせて、それぞれ、マウスIgG1の重鎖定常領域のコード配列（配列番号366及び365）又はヒトラムダ軽鎖定常領域のコード配列（配列番号368及び367）を含むように設計した。制限部位は、融合タンパク質をコ

ードするcDNAの最初と最後に導入した。制限部位、5'末端でのEcoRI及び3'末端でのSalIを以下のクローニング手順に利用した。遺伝子合成断片は、標準プロトコルに従い、EcoRI及びSalIにより、重鎖コンストラクト用にpEFDHFR (Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) と称されるプラスミド中に、軽鎖コンストラクト用にはpEFADA (pEF ADAは、Raum et al., Cancer Immunol Immunother., 50 (3), (2001), 141-150に記載されている) と称されるプラスミド中にクローニングした。配列実証済みプラスミドを、製造者のプロトコルに従い、FreeStyle 293 Expression System (Invitrogen GmbH、カールスルーエ、ドイツ) 中で、それぞれの軽鎖及び重鎖コンストラクトの同時導入に使用した。3日後、トランスフェクタントの細胞培養上清を採取し、アラニンスキャニング実験に使用した。

【0218】

5. 3 アラニンスキャニングのためのヒトCD3イプシロンのアラニン変異体のクローニング及び発現

ヒトCD3イプシロン鎖をコードする27cDNA断片であって、ヒトCD3イプシロンの野生型配列の1つのコドン、成熟ヒトCD3イプシロン鎖の細胞外領域のアミノ酸1-27の各アミノ酸のアラニン(GCC)をコードするコドンに置換した断片を、遺伝子合成により得た。置換したコドンの他は、cDNA断片は、上述のヒト野生型CD3cDNA断片と同一であった。各コンストラクト中で、上述のヒト野生型CD3cDNA断片に比べ、1つのコドンのみを置換した。制限部位、EcoRI及びSalIを、野生型コンストラクトに比べて同一の部位でcDNA断片中に導入した。全てのアラニンスキャニングコンストラクトを、pEFNEO中にクローニングし、配列実証済みプラスミドを、EL4細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクション及びトランスフェクタントの選択は、上述のとおり実施した。その結果、発現したコンストラクトのパネルが得られ、ヒトCD3イプシロン鎖の第1アミノ酸、位置1でのグルタミン(Q、Gln)をアラニンに置換した。アラニンに置換された最後のアミノ酸は、成熟ヒト野生型CD3イプシロンの位置27でのスレオニン(T、Thr)である。グルタミン1からスレオニン27の間の各アミノ酸で、野生型アミノ酸をアラニンに置換した、それぞれのトランスフェクタントを生成した。

【0219】

5. 4 アラニンスキャニング実験

2)に記載されたキメラIgG抗体及びCD3イプシロンに特異的な異種間特異性単鎖抗体を、アラニンスキャニング実験で試験した。3)に記載されたヒトCD3イプシロンのアラニン変異体コンストラクトでトランスフェクトされたEL4細胞株への抗体の結合は、標準プロトコルに従い、FACSアッセイにより試験した。2.5×10⁵のそれぞれのトランスフェクタントの細胞を、キメラIgG抗体を含む細胞培養上清50μl又はペリプラズム発現した単鎖抗体の粗調製物50μlとともにインキュベートした。ペリプラズム発現した単鎖抗体の粗調製物と共にインキュベートしたサンプルでは、抗Flag M2抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ)を、二次抗体として、2%FCSを含む50μlPBS中で5μg/mlで使用した。キメラIgG抗体と共にインキュベートしたサンプルでは、二次抗体は必要なかった。全てのサンプルで、抗体分子の結合は、2%FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国)により検出した。サンプルを、FACSCalibur(BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ)で測定した。ヒトCD3イプシロンのアラニン変異体によりトランスフェクトされたEL4細胞株への、キメラIgG分子又は異種間特異性単鎖抗体の異なる結合が検出された。ネガティブコントロールとして、アイソタイプコントロール又は関係ない特異性のペリプラ

ズム発現した単鎖抗体の粗調製物をそれぞれ使用した。UCHT-1抗体を、ヒトCD3イプシロンのアラニン変異体の発現レベルのポジティブコントロールとして使用した。成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置15でのチロシン、位置17でのバリン、位置19でのイソロイシン、位置24でのバリン又は位置26でのロイシンのアラニン変異体によりトランスフェクトされたEL4細胞株は、非常に低い発現レベルのため（データ示さず）評価しなかった。異種間特異性単鎖抗体及びキメラIgGフォーマットの単鎖抗体の、ヒトCD3イプシロンのアラニン変異体によりトランスフェクトされたEL4細胞株への結合を、任意単位での相対結合と、全てのそれぞれの幾何平均蛍光サンプル値からそれぞれのネガティブコントロールの幾何平均蛍光値を引いた値とともに、図8A-8Dに示す。発現レベルの違いを補償するため、あるトランスフェクタントの全サンプル値を、それぞれのトランスフェクタントのUCHT-1抗体の幾何平均蛍光値で割った。ある特異性の野生型サンプル値の比較のため、それぞれの特異性の全サンプル値を、野生型サンプル値で最終的に割り、野生型サンプル値を結合の任意単位1に設定した。利用した計算は、以下の式に詳細に示される。

[数1]

$$\text{サンプル値}(x,y) = \frac{\text{サンプル}(x,y) - \text{陰性対照}(x)}{(\text{UCHT-1}(x) - \text{陰性対照}(x)) * \frac{\text{野生型}(y) - \text{陰性対照}(wt)}{\text{UCHT-1}(wt) - \text{陰性対照}(wt)}}$$

この式において、「サンプル値」は、図8Aから8Dに示される特定のアラニン変異体に対する特定の抗CD3抗体の結合の程度を示す任意単位の結合の値を意味し、「サンプル」は、特定のアラニンスキニングトランスフェクタントにアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「ネガティブコントロール」は、特定のアラニン変異体にアッセイされたネガティブコントロールで得られた幾何平均蛍光値を意味し、UCHT-1は、特定のアラニン変異体にアッセイされたUCHT-1抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、「野生型」は、野生型トランスフェクタントでアッセイされた特定の抗CD3抗体で得られた幾何平均蛍光値を意味し、xはそれぞれのトランスフェクタントを明示し、yはそれぞれの抗CD3抗体を明示し、wtはそれぞれのトランスフェクタントが野生型であることを明示する。

【0220】

図8Aから8Dで分かるとおり、IgG抗体A2JHLPは、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置4でのアスパラギン、位置23でのスレオニン、位置25でのイソロイシンに対して、著しい結合の低下を示した。IgG抗体A2JHLPの結合の完全な喪失が、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置1でのグルタミン、位置2でのアスパラギン酸、位置3でのグリシン及び位置5でのグルタミン酸に対して見られた。IgG抗体E2MHL Pは、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置4でのアスパラギン、位置23でのスレオニン及び位置25でのイソロイシンに対して、著しい結合の低下を示した。IgG抗体E2MHL Pは、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置1でのグルタミン、位置2でのアスパラギン酸、位置3でのグリシン及び位置5でのグルタミン酸に対して、結合の完全な喪失を示した。IgG抗体H2CHLPは、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置4でのアスパラギンに対して中程度の結合の低下を示し、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置1でのグルタミン、位置2でのアスパラギン酸、位置3でのグリシン及び位置5でのグルタミン酸に対して、結合の完全な喪失を示した。単鎖抗体F12QHLPは、成熟CD3イプシロン鎖のアミノ酸、位置1でのグルタミン、位置2でのアスパラギン酸、位置3でのグリシン及び成熟CD3イプシロン鎖の位置5でのグルタミン酸に対して、基本的に完全な結合の喪失を示した。

【0221】

6. マウスT細胞株EL4にトランスフェクトされた、N末端His6タグの付いた、

又は付いていないヒトCD3イプシロン鎖への、異種間特異性抗CD3結合分子H2CHLPの結合分析

6. 1 N末端6ヒスチジンタグ(His6タグ)の付いたヒトCD3イプシロン鎖のクローニング及び発現

N末端His6タグの付いたヒトCD3イプシロン鎖をコードするcDNA断片を遺伝子合成により得た。遺伝子合成断片は、まず、コンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位、次いで、フレームを合わせて、19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列、次いで、フレームを合わせて、His6タグのコード配列、次いで、フレームを合わせて、成熟ヒトCD3イプシロン鎖のコード配列を含むように設計した(コンストラクトのcDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号380及び379に記す)。遺伝子合成断片は、cDNAの最初及び最後に制限部位を含むようにも設計した。導入された制限部位、5'末端でのEcoRI及び3'末端でのSalIを、以下のクローニング手順で利用した。次いで、遺伝子合成断片を、EcoRI及びSalIにより、標準プロトコルに従い、pEF-NEO(上述)と称されるプラスミド内にクローニングした。配列実証済みプラスミドを使用して、ネズミT細胞株EL4にトランスフェクトした。トランスフェクション及びトランスフェクタントの選択は、上述のとおり実施した。細胞培養の34日後、トランスフェクタントを、以下に記載されるアッセイに使用した。

【0222】

6. 2 N末端His6タグの付いた、又は付いていないヒトCD3イプシロン鎖への、異種間特異性抗CD3結合分子H2CHLPの結合

CD3イプシロンに特異的な結合特異性H2CHLPを持つ、キメラIgG抗体を、N末端His6タグの付いた、又は付いていないヒトCD3イプシロンへの結合に関して試験した。それぞれ、His6ヒトCD3イプシロン及び野生型ヒトCD3イプシロンによりトランスフェクトされたEL4細胞株への抗体の結合を、標準プロトコルに従いFACSアッセイにより試験した。2.5×10⁵のトランスフェクタントの細胞を、キメラIgG抗体を含む細胞培養上清50μl又は2%FCSを含むPBS中の5μg/mlのそれぞれの対照抗体50μlとともにインキュベートした。ネガティブコントロールとして適当なアイソタイプコントロールを、又はコンストラクトの発現のポジティブコントロールとしてCD3特異性抗体UCHT-1をそれぞれ使用した。抗体の結合は、2%FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国)により検出した。サンプルを、FACSCalibur(BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ)で測定した。野生型ヒトCD3イプシロンにトランスフェクトされたEL4細胞株に比べ、N末端His6タグの付いたヒトCD3イプシロンへの、結合特異性H2CHLPを持つキメラIgGの結合の明らかな低下が検出された。これらの結果は、CD3イプシロンのフリーのN末端が、ヒトCD3イプシロン鎖への、異種間特異性抗CD3結合特異性H2CHLPの結合に必須であることを示した(図9)。

【0223】

7. 蛍光活性化細胞選別機(FACS)により測定するCD3発現PBMCへの結合に比較した、表面プラズモン共鳴測定による融合タンパク質1-27CD3-Fcへの、霊長類EGFR及び霊長類CD3に異種間特異的な二重特異性単鎖抗体(EGFRLHxH2CHLP)の結合定数KDの決定

7. 1 表面プラズモン共鳴測定

ヒトCD3イプシロン鎖のN末端のアミノ酸1-27への、完全に異種間特異的な二重特異性単鎖抗体EGFR-21-63LHxH2CHLPの結合親和性を測定するため、ヒトIgG1のFc部に融合した成熟ヒトCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27からなる組換え融合タンパク質(1-27CD3-Fc)で、表面プラズモン共鳴測定を実施した。このために、Biacore Carboxymethyl-Dextran CM5チップ(Biacore、ウプサラ、スウェーデン)を、Biacore 20

00（登録商標）システム（Biacore、ウプサラ、スウェーデン）に取り付けた。1フローセルを、N-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩／N-ヒドロキシスクシンイミド溶液で、標準プロトコルに従い活性化した。融合タンパク質1-27CD3-Fcの溶液をその後加えると、Biacoreチップのデキストラン層へのタンパク質の安定な共有結合が生じた。結合していないタンパク質を徹底的な洗浄により除去し、次いで、エタノールアミン溶液の添加により、未反応の残存NH₂活性化カルボキシ基をブロックした。カップリングの前のシグナルに比べ、応答単位として測定されるより高いシグナルにより、タンパク質カップリングの成功を確認した。対照セルを、タンパク質溶液を加えずに上述のとおり調製した。

【0224】

精製した二重特異的抗体EGFR-21-63 LH x H2C HLPを、Slide-A-Lyzer（登録商標）Mini Dialysis Unit（Pierce、ロックフォード、イリノイ州、米国）中で、HBS-EPバッファ（Biacore、ウプサラ、スウェーデン）に対して徹底的に透析した。透析後のタンパク質濃度は、UV280nm吸収により測定し、43μg/mlの濃度となった。

【0225】

タンパク質溶液を、96ウェルプレートに移し、さらに10のウェルに1：1の比でHBS-EPバッファで連続的に希釈した。

【0226】

表面プラズモン共鳴測定は、全11ウェルを別々にサンプリングして行った。測定の間で、フローセルをアセテートバッファにより再生し、結合したタンパク質を放出した。

【0227】

二重特異性抗体分子の結合シグナルは、1-27CD3-Fcタンパク質と結合した測定セルのシグナルから対照セルのシグナルを引いて得た。会合及び解離曲線を応答単位として測定し記録した。結合定数は、ラングミュアモデルに基づくBiacore（登録商標）カーブフィッティングソフトウェアを利用して計算した。

【0228】

計算した結合定数KDは、最初の5種の濃度で、 1.52×10^{-7} Mであった。

【0229】

7. 2 FACS測定によるCD3結合定数の決定

ナイーブヒトCD3への結合強度に関して種間特異的二重特異性抗体分子の親和性を試験するため、追加の飽和FACS結合分析を実施した。選択した二重特異性抗体分子EGFR-21-63 LH x H2C HLPを使用し、1：1.5の係数及び出発濃度63.3μg/mlで希釈列を設定した。二重特異性抗体分子を、これらの異なる濃度で、それぞれ 1.25×10^5 のヒトPBMCとともに4℃で1時間インキュベートし、次いで、4℃でPBS中で2回洗浄した。結合した二重特異性抗体分子の検出は、Pentamer-His抗体（Qiagen GmbH、ヒルデン、ドイツ）を、2%FCSを含む50μl PBS中で5μg/mlで使用して実施した。4℃で45分間インキュベーション及び2回の洗浄工程の後、Pentamer-His抗体の結合を、2%FCSを含むPBS中に1：100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異性（Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国）により検出した。フローサイトメトリーは、FACS-Canto II装置で実施し、FACS Divaソフトウェアを利用して、データを取得し分析した（Becton Dickinson biosciences、ハイデルベルグ）。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のとおり実施した。取得した蛍光強度平均値を、使用した二重特異性抗体分子濃度の関数としてプロットし、生物数学ソフトウェアPrismにより、片側結合分析（双曲線）で分析した。ソフトウェアは、質量作

10

20

30

40

50

用の法則に従う、リガンド（二重特異性抗体分子）のレセプター（CD3陽性PBMCサブフラクション）への結合を記載する、対応するKD値を計算した。基礎となる式は以下のとおりである： $Y = B_{max} \times X / (K_d + X)$ 、ここで B_{max} は最大結合である。KDは、半最大結合に達するのに要するリガンドの濃度である。FACS染色は2連で実施し、R2値は0.95より高かった。

【0230】

二重特異性抗体分子EGFR-21-63 LH x H2C HLPの決定した半最大結合は、8472 ng/mlの濃度に達し、55000ダルトンの分子量で154 nM ($1.54 \times 10^{-7} M$)に相当する（図10）。したがって、ネイティブCD3コンテクストから分離されたヒトCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27への、EGFR-21-63 LH x H2C HLPの親和性は、無傷のT細胞上のネイティブCD3へのEGFR-21-63 LH x H2C HLPの親和性と同等であることが証明された。

【0231】

8. ヒトEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞の生成ヒトEGFRに陽性の細胞株、A431（表皮ガン細胞株、CRL-1555、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、メリーランド州）を使用し、キットマニュアル（Qiagen RNeasy Mini Kit、ヒルデン、ドイツ）の説明書に従い単離されたトータルRNAを得た。得られたRNAを、ランダムプライムド逆転写によりcDNA合成に使用した。ヒトEGFR抗原の全長配列のクローニングには、以下のオリゴヌクレオチドを使用した：

5'EGFR AG XbaI 5'-GGTCTAGAGCATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGG-3'

3'EGFR AG SalI 5'-TTTTTAAGTCGACTCATGCTCCAATAAATTCACTGCT-3'

【0232】

コード配列をPCR（最初のサイクルに、94℃で5分間変性、58℃で1分間アニーリング、72℃で2分間伸長；30サイクルに、94℃で1分間変性、58℃で1分間アニーリング、72℃で2分間伸長；72℃で5分間末端伸長）により増幅した。次いで、PCR産物をXbaI及びSalIで消化し、適切に消化された発現ベクターpEF-DHFR（Raumet al., Cancer Immunol Immunother. 2001; 50: 141-150）中にライゲーションし、大腸菌中に形質転換した。

上述の手順を標準的なプロトコルに従い実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)）。配列実証済みヌクレオチド配列を持つクローン（配列番号370、アミノ酸配列番号369）を、コンストラクトの真核細胞発現のためにDHFR欠損CHO細胞中にトランスフェクトした。DHFR欠損CHO細胞中の真核細胞タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566により記載されたとおり実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を20 nM MTXまでの最終濃度に上昇させることにより誘導した。

【0233】

9. カニクイザルEGFRの細胞外ドメインを発現するCHO細胞の生成

カニクイザルEGFRの細胞外ドメインのcDNA配列を、以下の反応条件を利用し、カニクイザル結腸cDNA（カタログ番号C1534090-Cy-BC; BioCat GmbH、ハイデルベルグ、ドイツから入手）への1組の2つのPCRにより得た：94℃で3分間で1サイクル、次いで94℃で1分間で35サイクル、53℃で1分間及び72℃で2分間、次いで72℃で3分間で停止サイクル。以下のプライマーを使用した：

1. フォワードプライマー；5'-CGCTCTGCCCGGCGAGTCGGGC-3' リバースプライマー；5'-CCGTCTTCTCTCCATCTCATAGC-3'

2. フォワードプライマー；5'-ACATCCGGAGGTGACAGATCACGGCTCTGTC-3'

リバースプライマー；5'-CAGGATATCCGAACGATGTGGCGCCTTCGC-3'

【0234】

これらのPCRは、2つの重複する断片を生成し（A：1-869、B：848-1923）、PCRプライマーを使用して標準プロトコルにより単離及び配列決定し、成熟タンパク質のコドン+1の第3ヌクレオチドから膜貫通ドメインの21番コドンまでのカニクイザルEGFRのcDNA配列の1923bp部分を与えた。カニクイザルEGFRの発現のためのコンストラクトを生成するため、cDNA断片を標準プロトコルに従い遺伝子合成により得た（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列は、配列番号372及び371に記す）。このコンストラクトにおいて、成熟EGFRタンパク質のアミノ酸+2から+641のカニクイザルEGFRのコード配列を、ヒトEGFRのコード配列中に融合し、アミノ酸+2から+641のコード配列を置換した。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位を含むように、ヒトEGFRの膜貫通ドメイン及び細胞間ドメインに融合したカニクイザルEGFRの細胞外ドメインを基本的にコードするcDNAの最初と最後に制限部位を含むように設計した。さらに、保存的突然変異をアミノ酸627（膜貫通ドメインの第4のアミノ酸）に導入し、バリンをロイシンに変異し、クローニング目的の制限部位（SphI）を生成した。導入された制限部位、5'末端でのXbaI及び3'末端でのSalIを以下のクローニング手順に利用した。次いで、遺伝子合成断片を、XbaI及びSalIにより、pEF-DHFR（pEF-DHFRはMacKett al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92（1995）7021-7025に記載されている）と称されるプラスミド中にクローニングした。このプラスミドの配列実証済みクローンを使用して、上述のとおりCHO/dhfr-細胞にトランスフェクトした。

【0235】

10. EGFR及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の生成

10.1 異種間特異性結合分子のクローニング

一般的に、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して異種間特異的な結合特異性を有するドメイン並びにヒト及び非チンパンジー霊長類EGFRに対して異種間特異的な結合特異性を有するドメインをそれぞれ含む、二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表1に記載のとおり設計した。

【0236】

【表 1】

表 1 抗CD3及び抗EGFR種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
294/293	EGFR-21-63 LH x H2C HL
296/295	EGFR-21-63 LH x H2C HLP
302/301	EGFR-21-63 LH x A2J HLP
298/297	EGFR-21-63 LH x H1E HLP
306/305	EGFR-21-63 LH x E2M HLP
308/307	EGFR-21-63 LH x F7O HLP
864/863	EGFR-21-63 LH x I2C HL
900/899	E291C4 HL x I2C HL
898/897	E291C4 HL x F12Q HL
896/895	E291C4 HL x H2C HL
882/881	E291H8 HL x I2C HL
918/917	E292F3 HL x I2C HL
936/935	E98H5 HL x I2C HL
932/931	E98H5 HL x H2C HL
934/933	E98H5 HL x F12Q HL
972/971	E97H9 HL x I2C HL
970/969	E97H9 HL x F12Q HL
968/967	E97H9 HL x H2C HL
954/953	E98C3 HL x I2C HL
952/951	E98C3 HL x F12Q HL
950/949	E98C3 HL x H2C HL
990/989	E97B11 HL x I2C HL
988/987	E97B11 HL x F12Q HL
986/985	E97B11 HL x H2C HL
1018/1017	E12E3 HL x I2C HL
1032/1031	E12B7 HL x I2C HL
1046/1045	E12E6 HL x I2C HL
1060/1059	E12F12 HL x I2C HL
1004/1003	E13B4 HL x I2C HL
1074/1073	E13H7 HL x I2C HL
1088/1087	E13E6 HL x I2C HL
1102/1101	E13E2 HL x I2C HL

【0237】

ヒト及びカニクイザルEGFRに対して異種間特異的な可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメインを含む上述のコンストラクトは、遺伝子合成により得た。遺伝子合成断片は、まず、コンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位を含むように、次いで19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチド、次いで、フレームを合わせて、それぞれの二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、次いで、フレームを合わせて、6ヒスチジンタグのコード配列及び終止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初及び

最後に好適な制限部位を導入するようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローニング手順で使用した。遺伝子合成断片は、好適なN及びC末端制限部位を導入するようにも設計した。遺伝子合成断片を、これらの制限部位により、標準プロトコルに従い（Sambrook、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、3rd edition、Cold Spring Harbour Laboratory Press、Cold Spring Harbour、New York（2001））、pEF-DHFR（pEF-DHFRはRaum et al.、Cancer Immunol Immunother. 50（2001）141-150に記載されている）と称されるプラスミドにクローニングした。配列実証済みヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核細胞発現のために、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）欠損チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞中にトランスフェクトした。

10

【0238】

コンストラクトを、DHFR欠損CHO細胞（ATCC No. CRL 9096）にエレクトロポレーションにより安定導入又は一過性導入し、或いは、標準プロトコルに従い一過性にHEK 293（ヒト胎児由来腎臓細胞、ATCC番号CRL 1573）にトランスフェクトした。

【0239】

10. 2 二重特異性単鎖抗体分子の発現及び精製

二重特異性単鎖抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）中で発現した。DHFR欠損CHO細胞での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566に記載されているとおり実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、MTXの最終濃度を20 nMまで上昇させて誘導した。静置培養の2回の継代後、細胞を、ヌクレオシドを含まないHyQ PH CHO液体大豆培地により（4.0 mMのL-グルタミン及び0.1%のプルロニックF-68、HyCloneを含む）回転瓶中で7日間生育してから、採取した。細胞を遠心分離により除去し、発現したタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。或いは、コンストラクトを、HEK 293細胞中で一過性発現させた。トランスフェクションは製造業者のプロトコルに従い、293fectin試薬（Invitrogen、12347-019番）により実施した。

20

30

【0240】

Akta（登録商標）Explorer System（GE Health Systems）及びUnicorn（登録商標）Softwareをクロマトグラフィに使用した。製造業者が提供するプロトコルに従い、ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate（登録商標）（Merck）を使用して、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ（「IMAC」）を実施した。バッファA（20 mMリン酸ナトリウムバッファ、pH 7.2、0.1 M NaCl）によりカラムを平衡化し、細胞培養上清（500 ml）を、3 ml/分の流速で、カラム（10 ml）に注いだ。カラムをバッファAで洗浄して結合していないサンプルを除いた。結合したタンパク質を、バッファB（20 mMリン酸ナトリウムバッファ、pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール）の2段階勾配を利用して、以下のとおり溶離した：

40

工程1：6カラム容積の20%バッファB

工程2：6カラム容積の100%バッファB

【0241】

工程2から溶離したタンパク質分画を、さらなる精製のために貯蔵した。全ての試薬は、研究用グレードであり、Sigma（ダイゼンホーフェン）又はMerck（ダルムシュタット）から購入した。

【0242】

Equi-buffer（25 mM シトレート、200 mM リジン、5%グリセロール、pH 7.2）により平衡化したHi Load 16/60 Superdex 200分

50

取用カラム (GE/Amersham) で、ゲル濾過クロマトグラフィを実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速 1 ml/分) を、検出のため、標準的な SDS-PAGE 及びウェスタンブロットにかけた。精製の前に、分子量測定のために (分子量マーカーキット、Sigma、MWGF-200) カラムを平衡化した。タンパク質濃度は、OD_{280nm}を利用して測定した。

【0243】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質を、プレキャスト 4-12% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) により実施した還元条件下で SDS-PAGE で分析した。サンプル調製及び適用は、製造業者が提供するプロトコルに従って実施した。分子量は、MultiMark タンパク質標準物質 (Invitrogen) により測定した。ゲルを、コロイド状クマシー (Invitrogen プロトコル) により染色した。単離したタンパク質の純度は、SDS-PAGE により測定して 95% を超えていた。

10

【0244】

天然条件下で PBS 中のゲル濾過により測定して、二重特異性単鎖抗体の分子量は約 52 kDa である。コンストラクトは全てこの方法により精製した。

【0245】

ウェスタンブロットは、Optitran (登録商標) BA-S83 メンブレン及び Invitrogen Blot Module を利用して、製造業者が提供するプロトコルにより実施した。使用した抗体に、His Tag (Pent His、Qiagen) 及びアルカリホスファターゼ (AP) 標識ヤギ抗マウス Ig (Sigma) 及び基質としての BCIP/NBT (Sigma) を作用させた。精製した二重特異性単鎖抗体に相当する 52 kD でシングルバンドを検出した。

20

【0246】

11. 表面プラズモン共鳴測定による、融合タンパク質 1-27CD3-Fc への、完全に種間特異的な二重特異性単鎖抗体の結合定数 KD の決定

成熟ヒト CD3 イプシロン鎖の N 末端のアミノ酸 1-27 への、霊長類 EGF R 及び霊長類 CD3 に異種間特異的な二重特異性単鎖抗体分子の結合親和性を測定するため、表面プラズモン共鳴測定を、ヒト IgG1 の Fc 部に融合したヒト CD3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1-27 からなる組換え融合タンパク質で実施した (1-27CD3-Fc)。このために、Biacore Carboxymethyl-Dextran CM5 チップ (Biacore、ウプサラ、スウェーデン) を、Biacore 2000 (登録商標) システム (Biacore、ウプサラ、スウェーデン) に取り付けた。フローセルを、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩/N-ヒドロキシスクシンイミド溶液で、標準プロトコルに従い活性化した。融合タンパク質 1-27CD3-Fc の溶液をその後加えると、Biacore チップのデキストラン層へのタンパク質の安定な共有結合が生じた。結合していないタンパク質を徹底的な洗浄により除去し、次いで、エタノールアミン溶液の添加により、未反応の残存 NHS 活性化カルボキシ基をブロックした。カップリングの前のシグナルに比べ、応答単位として測定されるより高いシグナルの検出により、タンパク質カップリングの成功を確認した。対照セルを、タンパク質溶液を加えずに上述のとおり調製した。

30

40

【0247】

以下に列記する精製した二重特異性単鎖抗体は、HBS-EP バッファ (Biacore、ウプサラ、スウェーデン) で 5 µg/ml に調整し、それぞれ 150 µl の体積で 96 ウェルプレートに移した。

【0248】

全サンプルに表面プラズモン共鳴測定を実施し、測定の間フローセルをアセテートバッファで再生し、結合したタンパク質を放出した (全て標準プロトコルによる)。

【0249】

二重特異性単鎖抗体の結合シグナルは、1-27CD3-Fc タンパク質に結合した測定セルのシグナルから、対照セルのシグナルを引いて得た。

50

【0250】

会合及び解離曲線を応答単位として測定し記録した。結合定数は、ラングミュアモデルに基づくBiacore（登録商標）カーブフィッティングソフトウェアを利用して計算した。ヒトCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27への、試験した完全に種間特異的二重特異性の単鎖分子の親和性計算値は、以下のKD値として与えられ、 2.54×10^{-6} Mから 2.49×10^{-7} Mの範囲である。「LH」は、VL-VHの順の可変ドメインの配置を意味する。「HL」は、VH-VLの順の可変ドメインの配置を意味する。G4H、F70、A2J、E1L、E2M、H1E及びF6Aは、異なる異種間特異性CD3結合分子を意味する。

【0251】

10

二重特異性抗体分子	KD(M)
EGFR LH x F70 HLP	1.01×10^{-6}
EGFR LH x A2J HLP	2.49×10^{-7}
EGFR LH x E2M HLP	2.46×10^{-6}
EGFR LH x H1E HLP	2.54×10^{-6}

20

【0252】

12. EGFR及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

それぞれ、ヒト及びカニクイザルのEGFR及びCD3へ結合能に関して、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能性を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のため、実施例8に記載したヒトEGFRによりトランスフェクトされたCHO細胞及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL（DSMZ、ブラウンシュヴァイク、ACC483）を使用し、ヒト抗原への結合を試験した。カニクイザル抗原の結合反応性は、実施例9に記載された生成したカニクイザルEGFRトランスフェクタント及びマカクザルT細胞株4119LnPx（Fickenscher教授による提供に感謝、Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nürnberg; Knappe A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61に発表）を使用して試験した。それぞれの細胞集団の20万の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト（ $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の精製タンパク質 $50 \mu\text{l}$ とともに氷上で30分間インキュベートした。或いは、一過的に産生したタンパク質の細胞培養上清を使用した。細胞をPBSで2回洗浄し、コンストラクトの結合を、マウスPentahis抗体（Qiagen; 2% FCSを含む $50 \mu\text{l}$ PBSで1:20に希釈）により検出した。洗浄の後、結合した抗His抗体を、2% FCSを含むPBSに1:100で希釈された、フィコエリスリンに結合したFcガンマ特異性抗体（Dianova）により検出した。新鮮な培地をネガティブコントロールとして使用した。

30

40

【0253】

フローサイトメトリーをFACS-Calibur装置で実施し、CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson biosciences、ハイデルベルグ）を利用してデータを取得し分析した。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruijsbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のとおり実施した。

【0254】

50

E G F Rに特異的でヒト及び非チンパンジー霊長類C D 3に異種間特異的であるいくつかの二重特異性単鎖分子の結合能は、図11に示されるとおり、明らかに検出可能であった。F A C S分析において、全コンストラクトが、ネガティブコントロールとしての培地及び1次・2次抗体に比べ、C D 3及びE G F Rへの結合を示した。ヒト及びカニクイザルC D 3及びE G F R抗原に対する二重特異性抗体の異種間特異性が示された。

【0255】

13. E G F R及びC D 3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生理活性

生成した二重特異性単鎖抗体の生理活性を、実施例8及び9に記載されたE G F R陽性細胞株を利用して、インビトロ細胞障害アッセイにおいてクロム51 (51Cr) の放出により分析した。エフェクター細胞として、刺激を受けたヒトC D 8陽性T細胞又はマカクT細胞株4119LnPxをそれぞれ使用した。

10

【0256】

刺激を受けたC D 8 + T細胞の生成は以下のとおり実施した：

ペトリ皿（直径145mm、Greiner）を、市販の抗C D 3特異性抗体により、最終濃度1 μ g/mlで1時間37℃でプレコートした。未結合のタンパク質を、PBSでの1洗浄工程で除去した。新鮮なPBMCを、標準プロトコルに従い、Ficoll勾配遠心分離により末梢血（30～50ml、ヒトの血液）から単離した。3～5 $\times 10^7$ PBMCを、プレコートされたペトリ皿に、120mlのRPMI 1640/10% FCS/IL-2 20U/ml（Proleukin、Chiron）に加え、2日間刺激した。3日目に、細胞を回収し、RPMI 1640で1回洗浄した。IL-2を20U/mlの最終濃度で加え、1日間再び培養した。C D 4 + T細胞及びC D 5 6 + NK細胞の除去により、C D 8 + 細胞障害性Tリンパ球（CTL）を単離した。

20

【0257】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50% FCSを含む100 μ lのRPMIの最終体積で、37℃で45分間、11.1 MBq ^{51} Crで標識した。次いで、標識した標的細胞を、5mlのRPMIで3回洗浄し、次いで、細胞障害性アッセイに使用した。アッセイは、10：1のE：T比で、RPMI（上述）を補った総体積250 μ lで96ウェルプレート中で実施した。1 μ g/mlの種間特異的二重特異性単鎖抗体分子及びその20回の3倍希釈体を利用した。或いは、一過性産生されたタンパク質の細胞培養上清を、1：2ステップで連続的に希釈した。アッセイ時間は18時間であり、細胞障害性は、最大溶解（Triton Xの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）の差に関連する上清中の放出クロムの相対値として測定した。測定は全て4連で実施した。上清中のクロム活性の測定を、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH、ケルン、ドイツ）で実施した。実験データの分析は、Windows（登録商標）用Prism 4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国）で実施した。S字状の用量応答曲線の R^2 値は、該ソフトウェアにより測定して、通常0.90を超えた。分析プログラムにより計算されたEC₅₀値を、生理活性の比較に使用した。

30

【0258】

図12及び13に示されるように、生成した全ての種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトは、ヒトC D 8 + 細胞により誘発されたヒトE G F R陽性標的細胞及びマカクザルT細胞株4119LnPxにより誘発されたカニクイザルE G F R陽性標的細胞に対して、細胞障害活性を現した。異なる標的特異性を持つ二重特異性単鎖抗体をネガティブコントロールとして使用した。

40

【0259】

14. ヒトMCSPのC末端の膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインのクローニング及び発現

ヒトMCSPのC末端の膜貫通及び先端切断型細胞外ドメイン（アミノ酸1538～2322）のコード配列を、標準プロトコルに従い遺伝子合成により得た（ヒトMCSP（ヒトD3と称される）のC末端の、膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインの発現のための

50

組換えコンストラクトのcDNA配列及びアミノ酸配列は配列番号374及び373に記す)。遺伝子合成断片は、まず、コンストラクトの真核細胞発現を可能にするコザック部位、次いで、19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列、次いで、フレームを合わせて、FLAGタグ、次いで、フレームを合わせて、クローニング目的のいくつかの制限部位を含み9アミノ酸人工リンカー(SRTRSGSQL)をコードする配列、次いで、フレームを合わせて、ヒトMCSPのC末端膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインのコード配列及び終止コドンを含むように設計した。DNA断片の最初と最後に制限部位を導入した。制限部位、5'末端でのEcoRI及び3'末端でのSalIを以下のクローニング手順で使用した。断片をEcoRI及びSalIにより消化し、pEF-DHFR(pEF-DHFRはMack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025に記載されている)に以下の標準プロトコルでクローニングした。配列実証済みプラスミドを使用し、CHO/dhfr-細胞(ATCC No. CRL 9096)にトランスフェクトした。細胞を、10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン(全て、Biochrom AG、ベルリン、ドイツから入手)及び細胞培養グレード試薬(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ)のストック溶液から10 µg/mlのアデノシン、10 µg/mlのデオキシアデノシン及び10 µg/mlのチミジンの最終濃度にヌクレオシドを補い安定化グルタミンを含むRPMI 1640中で、37℃、湿度95%、CO₂ 7%でインキュベーター中で培養した。トランスフェクションは、Polyfect Transfection Reagent (Qiagen GmbH、ヒルデン、ドイツ)及び5 µgのプラスミドDNAを製造業者のプロトコルに従い使用して実施した。24時間培養の後、細胞をPBSで1回洗浄し、安定化グルタミン及び1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中で再び培養した。このように、細胞培地はヌクレオシドを含んでおらず、選択はトランスフェクトされた細胞に行われた。トランスフェクションのおよそ14日後、耐性細胞の増殖が観察された。さらに7から14日後、トランスフェクタントを、FACSによりコンストラクトの発現に関して試験した。2.5×10⁵の細胞を、2% FCSを含むPBS中で5 µg/mlに希釈された抗Flag M2抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ)50 µlとともにインキュベートした。抗体の結合を、2% FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的(ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国)により検出した。サンプルを、FACSCalibur(BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ)で測定した。

【0260】

15. マカクMCSPのC末端の膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインのクローニング及び発現

マカクザルMCSP(マカクD3と称される)C末端の膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインのcDNA配列を、以下の反応条件により、マカクザル皮膚cDNA(カタログ番号C1534218-Cy-BC; BioCat GmbH、ハイデルベルグ、ドイツ)への1組の3つのPCRにより得た: 94℃で3分間で1サイクル、40サイクルを94℃で0.5分間、52℃で0.5分間、そして72℃で1.75分間、72℃で3分間の停止サイクル。以下のプライマーを使用した:

フォワードプライマー: 5'-GATCTGGTCTACACCATCGAGC-3'

リバースプライマー: 5'-GGAGCTGCTGCTGGCTCAGTGAGG-3'

フォワードプライマー: 5'-TTCCAGCTGAGCATGTCTGATGG-3'

リバースプライマー: 5'-CGATCAGCATCTGGGCCCCAGG-3'

フォワードプライマー: 5'-GTGGAGCAGTTTCACTCAGCAGGACC-3'

リバースプライマー: 5'-GCCCTTCACACCCAGTACTGGCC-3'

【0261】

これらのPCRは、3つの重複断片を生成したが（A：1-1329、B：1229-2428、C：1782-2547）、PCRプライマーを使用して標準プロトコルにより単離及び配列決定し、C末端ドメインのコード配列の74bp上流から終止コドンの121bp下流まで、マカクザルMCSPのcDNA配列の2547bp部分を与えた（マカクザルMCSPのこの部分のcDNA配列及びアミノ酸配列は、配列番号376及び375に記す）。以下の反応条件を利用するもう1つのPCRを使用して、上述の反応A及びBのPCR産物を融合した：94℃で3分間で1サイクル、10サイクルを94℃で1分間で10サイクル、52℃で1分間及び72℃で2.5分間、72℃で3分間の停止サイクル。以下のプライマーを使用する：

フォワードプライマー：5'-tcccgtagagatctggatcccaattggatggcggactcgtgctgttctcacacagagg-3' リバースプライマー：5'-agtgggtcgaactcacacccagtagtactggccattctttaaggcgagg-3'

【0262】

このPCRのプライマーは、マカクザルMCSPのC末端膜貫通及び先端切断型細胞ドメインをコードするcDNA配列の最初と最後に制限部位を導入するように設計した。導入された制限部位、5'末端でのMfeI及び3'末端でのSalIを以下のクローニング手順で使用した。次いで、PCR断片を、MfeI及びSalIにより、ヒトMCSPのC末端膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインを置換することにより、上述のプラスミドpEF-DHFR（pEF-DHFRは、Raumet al., Cancer Immunol Immunother. 50 (2001) 141-150に記載されている）のEcoRI/MfeI断片を含むBlueScriptプラスミド中にクローニングした。遺伝子合成断片は、免疫グロブリンリーダーペプチド及びFlagタグのコード配列並びにマカクザルMCSPのC末端膜貫通及び先端切断型細胞外ドメインをコードするcDNA断片の5'末端にフレームを合わせて人工リンカー（SRTRSGSQL）を含んでいた。このベクターを使用して、CHO/dhfr-細胞（ATCC No. CRL 9096）にトランスフェクトした。細胞を、10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（全て、Biochrom AG、ベルリン、ドイツから入手）及び細胞培養グレード試薬（Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ）のストック溶液から10µg/mlのアデノシン、10µg/mlのデオキシアデノシン及び10µg/mlのチミジンの最終濃度にヌクレオシドを補い安定化グルタミンを含むRPMI 1640中で、37℃、湿度95% CO2 7%でインキュベーター中で培養した。トランスフェクションは、Polyfect Transfection Reagent（Qiagen GmbH、ヒルデン、ドイツ）及び5µgのプラスミドDNAを製造業者のプロトコルに従い使用して実施した。24時間培養の後、細胞をPBSで1回洗浄し、安定化グルタミン及び1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640中で再び培養した。このように、細胞培地はヌクレオシドを含んでおらず、選択はトランスフェクトされた細胞に行われた。トランスフェクションのおよそ14日後、耐性細胞の増殖が観察された。さらに7から14日後、トランスフェクタントを、FACSにより組換えコンストラクトの発現に関して試験した。2.5×10⁵の細胞を、2% FCSを含むPBS中で5µg/mlに希釈された抗Flag-M2抗体（Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ）50µlとともにインキュベートした。結合した抗体を、2% FCSを含むPBS中に1:100で希釈されたR-フィコエリスリン結合アフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的（Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.、ニューマーケット、サフォーク、英国）により検出した。サンプルを、FACSCalibur（BD Biosciences、ハイデルベルグ、ドイツ）で測定した。

【0263】

16. MCSP及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の生成及びキャラクタリゼーション

ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに異種間特異的な結合ドメイン並びにヒト及び非チンパンジー霊長類MCSPに異種間特異的な結合ドメインをそれぞれ含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表2に記載のとおり設計する。

【0264】

【表2】

表2 MCSP及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
310/309	MCSP-G4 HL x H2C HL
312/311	MCSP-G4 HL x F12Q HL
314/313	MCSP-G4 HL x I2C HL
316/315	MCSP-G4 HLP x F6A HLP
318/317	MCSP-G4 HLP x H2C HLP
322/321	MCSP-G4 HLP x G4H HLP
326/325	MCSP-G4 HLP x E1L HLP
328/327	MCSP-G4 HLP x E2M HLP
332/331	MCSP-G4 HLP x F12Q HL
334/333	MCSP-G4 HLP x I2C HL
336/335	MCSP-D2 HL x H2C HL
338/337	MCSP-D2 HL x F12Q HL
340/339	MCSP-D2 HL x I2C HL
342/341	MCSP-D2 HLP x H2C HLP
344/343	MCSP-F9 HL x H2C HL
346/345	MCSP-F9 HLP x H2C HLP
348/347	MCSP-F9 HLP x G4H HLP
1355/1354	MCSP-A9 HL x H2C HL
1357/1356	MCSP-A9 HL x F12Q HL
1359/1358	MCSP-A9 HL x I2C HL
1373/1372	MCSP-C8 HL x I2C HL
1401/1400	MCSP-B7 HL x I2C HL
1387/1386	MCSP-B8 HL x I2C HL
1415/1414	MCSP-G8 HL x I2C HL
1429/1428	MCSP-D5 HL x I2C HL
1443/1442	MCSP-F7 HL x I2C HL
1457/1456	MCSP-G5 HL x I2C HL
1471/1470	MCSP-F8 HL x I2C HL
1485/1484	MCSP-G10 HL x I2C HL

【0265】

ヒト及びマカクザルMCSP D3に異種間特異的な可変重鎖(VH)及び可変軽鎖(VL)ドメイン及びヒト及びマカクザルCD3に異種間特異的なVH及びVLドメインを含む上述のコンストラクトを、遺伝子合成により得た。遺伝子合成断片を、まずコンストラクトの真核細胞発現のためのコザック部位を含むように、次いで、19アミノ酸免疫グ

ロブリンリーダーペプチドを、次いで、フレームを合わせて、それぞれの二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、次いで、フレームを合わせて、ヒスチジン6タグのコード配列及び終止コドンを含むように、設計した。遺伝子合成断片を、好適なN末端及びC末端制限部位を導入するようにも設計した。遺伝子合成断片を、これらの制限部位により、pEF-DHFRと称されるプラスミド (pEF-DHFRは、Raumet al., Cancer Immunol Immunother., 50 (2001) 141-150 に記載されている) 中に、標準プロトコルに従い (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)) クローニングした。コンストラクトを、エレクトロポレーションによりDHFR欠損CHO細胞 (ATCC No. CRL 9096) に安定導入又は一過性導入し、或いはHEK293 (ヒト胎児由来腎臓細胞、ATCC番号 CRL-1573) に標準プロトコルに従い一過性導入させた。

10

【0266】

DHFR欠損CHO細胞での真核細胞タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566により記載されるとおりに実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を、20nmのMTX最終濃度まで上昇することにより誘導した。静置培養の2回の継代後、細胞を、ヌクレオシドを含まないHyQPH CHO液体大豆培地により (4.0mMのL-グルタミン及び0.1%のブロッコニックF-68、HyCloneを含む) 回転瓶中で7日間生育してから、採取した。細胞を遠心分離により除去し、発現したタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。

20

【0267】

Akta (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareをクロマトグラフィに使用した。製造業者が提供するプロトコルに従い、ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を使用して、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファA (20mMリン酸ナトリウムバッファ、pH7.2、0.1M NaCl) によりカラムを平衡化し、細胞培養上清 (500ml) を、3ml/分の流速で、カラム (10ml) に注いだ。カラムをバッファAで洗浄して結合してないサンプルを除いた。結合したタンパク質を、バッファB (20mMリン酸ナトリウムバッファ、pH7.2、0.1M NaCl、0.5M イミダゾール) の2段階勾配を利用して、以下のとおり溶離した：

30

工程1：6カラム容積の20%バッファB

工程2：6カラム容積の100%バッファB

【0268】

工程2から溶離したタンパク質分画を、さらなる精製のために貯蔵した。全ての試薬は、研究用グレードであり、Sigma (ダイゼンホーフェン) 又はMerck (ダルムシュタット) から購入した。

40

【0269】

Equi-buffer (25mM シトレート、200mM リジン、5%グリセロール、pH7.2) により平衡化したHiLoad16/60 Superdex 200分取用カラム (GE/Amersham) で、ゲル濾過クロマトグラフィを実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速1ml/分) を、検出のため、標準的なSDS-PAGE及びウェスタンブロットにかけた。精製の前に、分子量測定のために (分子量マーカーキット、Sigma、MWGF-200) カラムを平衡化した。タンパク質濃度は、OD_{280nm}を利用して測定した。

【0270】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質を、プレキャスト4-12% Bis-Tris

50

ゲル (Invitrogen) により実施した還元条件下で SDS-PAGE で分析した。サンプル調製及び適用は、製造業者が提供するプロトコルに従って実施した。分子量は、MultiMark タンパク質標準物質 (Invitrogen) により測定した。ゲルを、コロイド状クマシー (Invitrogen プロトコル) により染色した。単離したタンパク質の純度は、SDS-PAGE により測定して 95% を超える。

【0271】

天然条件下でリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中のゲル濾過により測定して、二重特異性単鎖抗体の分子量は約 52 kDa である。コンストラクトは全てこの方法により精製した。

【0272】

ウェスタンブロットは、Optitran (登録商標) BA-S83 メンブレン及び Invitrogen Blot Module を利用して、製造業者が提供するプロトコルにより実施した。二重特異性単鎖抗体タンパク質抗体の検出には、抗 His Tag 抗体 (Penta His, Qiagen) を使用した。アルカリホスファターゼ (AP) 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Sigma) を二次抗体として使用し、基質として BCIP/NBT (Sigma) を使用した。精製した二重特異性単鎖抗体に相当する 52 kD でシングルバンドを検出した。

【0273】

或いは、コンストラクトは、DHFR 欠損 CHO 細胞中に一過性発現した。簡単に言うと、コンストラクト当たり 4×10^5 の細胞を、10% 胎児ウシ血清、1% ペニシリン/ストレプトマイシン及び細胞培養グレード試薬 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、タウフキルヒェン、ドイツ) のストック溶液から $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアデノシン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のデオキシアデノシン及び $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチミジンの最終濃度にヌクレオシドを補い安定化グルタミンを含む 3 ml の RPMI 1640 all medium 中で、 37°C 、湿度 95%、 CO_2 7% でインキュベーター中で、トランスフェクションの 1 日前に培養した。トランスフェクションは、製造業者のプロトコルに従い、Fugene 6 Transfection Reagent (Roche、番号 11815091001) により実施した。 $94 \mu\text{l}$ の OptiMEM 培地 (Invitrogen) 及び $6 \mu\text{l}$ の Fugene 6 を混合し、室温で 5 分間インキュベートする。その後、コンストラクト当たり $1.5 \mu\text{g}$ の DNA を加え、混合し、室温で 15 分間インキュベートした。その間、DHFR 欠損 CHO 細胞を、 $1 \times \text{PBS}$ で洗浄し、 1.5ml の RPMI 1640 all medium に再懸濁した。トランスフェクションミックスを、 $600 \mu\text{l}$ の RPMI 1640 all medium で希釈し、細胞に加え、 37°C で、湿度 95%、 CO_2 7% で一晩インキュベートした。トランスフェクションの翌日、各アプローチのインキュベーション容積を 5 ml の RPMI all medium に増量した。インキュベーションの 3 日後に上清を採取した。

【0274】

17. MCS P 及び CD 3 種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

それぞれヒト及びマカクザル MCS P D 3 及び CD 3 に結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能性を試験するため、FACS 分析を実施した。この目的のため、ヒト MCS P D 3 でトランスフェクトされた CHO 細胞 (実施例 14 に記載のとおり) 及びヒト CD 3 陽性 T 細胞白血病細胞株 HPB-ALL (DSMZ、ブラウンシュヴァイク、ACC 483) を使用して、ヒト抗原への結合を試験した。マカクザル抗原への結合反応性は、生成したマカクザル MCS P D 3 トランスフェクタント (実施例 15 に記載のとおり) 及びマカクザル T 細胞株 4119 LnPx (Fickensch er 教授による提供に感謝、Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg; Knappe A, et al., and Fickensch er H., Blood 2000, 95, 3256-61 に発表) を使用して試験した。それぞれの細胞株の 20 万の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) の精製タンパク質 $50 \mu\text{l}$ 又は種間特異的二重特異性抗体コン

ストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養上清とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞を、2% FCSを含むPBSで2回洗浄し、コンストラクトの結合を、マウス抗His抗体（PentaHis抗体；Qiagen, 2% FCSを含む50 μ l PBSで1:20に希釈）により検出した。洗浄の後、結合した抗His抗体を、2% FCSを含むPBSに1:100で希釈された、フィコエリスリンに結合したFcガンマ特異性抗体（Dianova）により検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を、T細胞株への結合のネガティブコントロールとして使用した。無関係な標的特異性を持つ単鎖コンストラクトを、MCS P-D3にトランスフェクトされたCHO細胞への結合のネガティブコントロールとして使用した。

【0275】

フローサイトメトリーをFACS-Calibur装置で実施し、CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson biosciences、ハイデルベルグ）を利用してデータを取得し分析した。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruijsbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のとおり実施した。

【0276】

MCS P-D3に異種間特異的でヒト及びマカクザルCD3に異種間特異的である、先に列記した単鎖分子の二重特異性結合は、図14、15、16及び58に示されるとおり、明らかに検出可能であった。FACS分析において、全コンストラクトが、それぞれのネガティブコントロールに比べ、CD3及びMCS P-D3への結合を示した。ヒト及びマカクザルCD3及びMCS P-D3抗原に対する二重特異性抗体の異種間特異性が示された。

【0277】

18. MCS P及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例14及び15で述べるMCS P-D3陽性細胞株を用いるクロム51（⁵¹Cr）放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。それぞれの図に示すように、エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC、刺激されたヒトPBMC、又はマカクT細胞株4119 LnPxを用いる。

【0278】

刺激されたCD4/CD56除去PBMCの作製は以下のようにして実施した：ペトリ皿（直径145mm、Greiner bio-one GmbH, クレムスミンスター）のコーティングを、最終濃度1 μ g/mlの市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により37℃にて1時間行った。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll 1 勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン/10% FCS/IL-220U/ml（Proleukin, Chiron）を含む120mlのRPMI 1640中、3-5 $\times$ 10⁷個のPBMCをあらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI 1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。標準的なプロトコルに従ってCD4+T細胞及びCD56+NK細胞を除去することにより、CD8+細胞障害性Tリンパ球（CTLs）を濃縮した。

【0279】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50% FCSを含む最終容量100 μ lのRPMI中、11.1MBqの⁵¹Crにて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250 μ lの補足RPMI（上記のように）中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子1 μ g/ml及びその3倍希釈

10

20

30

40

50

物 20 個を適用した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子を含む上清を用いる場合、マカク、及びヒト細胞障害性アッセイに対してそれぞれ、2 倍希釈物 21 個、及び 3 倍希釈物 20 個を適用した。アッセイの時間は 18 時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトン X の添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて 4 個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用 Prism 4（バージョン 4.02、Graph Pad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定される S 字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 > 0.90 である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

10

【0280】

図 17 乃至 21、及び 59 に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されたヒト CD4/CD56 除去 PBMC 又は刺激された PBMC によって誘発されたヒト MCS PD3 陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカク T 細胞株 4119 LnPx によって誘発されたマカク MCS PD3 陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示している。

【0281】

19. MCS P 及び CD3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の血漿中安定性

20

作製された二重特異性単鎖抗体のヒト血漿中での安定性を、50% ヒト血漿中、37℃ 及び 4℃ にて 24 時間の二重特異性単鎖抗体のインキュベーション、及びこれに続く生物活性の試験を行うことによって分析した。生物活性は、MCS P 陽性 CHO 細胞株（実施例 14 又は 15 に従い、クローンとして MCS P を発現）を標的として、刺激されたヒト CD8 陽性 T 細胞をエフェクター細胞として用いるクロム 51 (^{51}Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。

【0282】

上述の解析プログラムによって算出された EC_{50} 値を用いて、50% ヒト血漿と共に 24 時間、37℃ 及び 4℃ にてインキュベートされた二重特異性単鎖抗体のそれぞれの生物活性を、血漿を添加しない二重特異性単鎖抗体又はアッセイの直前に同量の血漿を混合した二重特異性単鎖抗体と比較した。

30

【0283】

図 22 及び表 3 に示すように、二重特異性抗体 G4 H-L x I2C H-L、G4 H-L x H2C H-L、及び G4 H-L x F12QH-L の生物活性は、血漿を添加しない又は生物活性の試験の直前に血漿を添加したコントロールと比較して著しく低下するという事はなかった。

【0284】

【表 3】

表 3：血漿の添加の有無による二重特異性抗体の生物活性

40

コンストラクト	血漿なし	血漿あり	血漿 37℃	血漿 4℃
G4 H-L x I2C H-L	300	796	902	867
G4 H-L x H2C H-L	496	575	2363	1449
G4 H-L x F12Q H-L	493	358	1521	1040

【0285】

50

20. 循環する標的細胞の非存在下における、従来の、すなわち、コンテキスト依存性CD3エピトープに指向されたCD3結合分子への最初の曝露による循環するT細胞の再分布は、治療の開始と関連する有害なイベントに対する主たるリスク因子である。

従来のCD3結合分子による治療開始に続くB細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）の患者のT細胞再分布

従来のCD19×CD3結合分子は、二重特異性タンデムscFv型（bispecific tandem scFv format）のCD3結合分子である（Löffler（2000, Blood, Volume 95, Number 6）、又は国際公開第99/54440号）。これは、（i）正常及び悪性ヒトB細胞の表面上のCD19、並びに（ii）ヒトT細胞上のCD3に指向される2つの異なる結合部分から成る。T細胞上のCD3をB細胞上のCD19と架橋させることにより、このコンストラクトは、T細胞の細胞障害活性によって正常及び悪性B細胞の再指向された溶解を誘発する。そのような従来のCD3結合分子によって認識されるCD3エピトープは、CD3イプシロン鎖上に局在化しており、そこでは、イプシロン鎖の残りの部分内に埋め込まれてCD3ガンマ鎖又はデルタ鎖のいずれかとのイプシロン鎖のヘテロ二量体化によって正しい位置に保持される場合は、正しいコンフォメーションしか取れない。この非常にコンテキスト依存性であるエピトープと従来のCD3結合分子（例えば、Löffler（2000, Blood, Volume 95, Number 6）、又は国際公開第99/54440号を参照）との相互作用は、完全に一価の形態で架橋をまったく伴わずに発生する場合であっても、CD3のコンフォメーションにアロステリックな変化を誘発し、CD3イプシロンの細胞質ドメイン内に通常は隠れているプロリンリッチ領域の露出を引き起こし得る。一旦露出されると、このプロリンリッチ領域はシグナル伝達分子Nck2を動員することができ、この分子はさらなる細胞内シグナルを誘発する能力を有する。これは、T細胞表面上のいくつかのCD3分子の架橋、例えば、B細胞の表面上のいくつかのCD19分子によるT細胞上のいくつかのCD3分子と結合したいくつかの抗CD3分子の架橋、を必ず必要とする完全なT細胞活性化には不十分ではあるが、それでも、従来のCD3結合分子とそのCD3イプシロン上のコンテキスト依存性エピトープとの完全に一価である相互作用は、シグナル伝達という点でT細胞に対して不活性ではない。理論に束縛されるものではないが、一価の従来のCD3結合分子（本技術分野で公知である）は、CD3架橋のための循環する標的細胞が存在しない場合であっても、ヒトに注入されるとある程度のT細胞の反応を誘発する場合がある。一価の従来のCD19×CD3結合分子を、実質的に循環するCD19陽性B細胞を持たないB-NHL患者へ静脈内注入した場合のこれに対する重要なT細胞の反応は、治療開始後のT細胞の再分布である。フェーズI臨床試験では、CD19×CD3結合分子の静脈内注入の開始フェーズの間に、循環するCD19陽性標的B細胞を持たないすべての個人にこのT細胞の反応が発生し、これは実質的にCD19×CD3結合分子の投与量に依存しないことが分かった（図23）。しかし、CD19×CD3結合分子への曝露の急な増加が、治療開始時におけるCD19×CD3結合分子へのT細胞の最初の曝露とほぼ同一のT細胞の再分布反応をこれらの患者に引き起こすことが分かり（図24A）、そしてCD19×CD3結合分子への曝露のゆるやかな増加でさえも循環するT細胞への再分布効果を持ち得る（図25）。さらに、循環する標的細胞の非存在下におけるこの実質的に投与量に依存しないT細胞の再分布反応は、CD19×CD3結合分子（例：国際公開第99/54440号に開示のもの）のような従来のCD3結合分子により、治療を受けた全個人のうちの100%で引き起こされるため、治療の開始と関連する有害なイベントに対する主たるリスク因子であることが分かった。

【0286】

この研究プロトコルに従い、マントル細胞リンパ腫を含む、再発し組織学的に確認された低悪性度B細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）を持つ患者を、非盲検、多施設フェーズI個人内投与量漸増試験（multi-center phase I interpatient dose-escalation trial）に採用した。研究プロトコルは、参加するすべての施設の独立倫理委員会によって承認され、管轄の監督当局へ届けら

10

20

30

40

50

れた。CTスキャンによって実証される測定可能な疾患 ($\geq 1.5 \text{ cm}$ の病変部を少なくとも1つ) を持つことを研究に含める条件とした。患者は、携帯用ミニポンプシステムにより、従来のCD19×CD3結合分子を一定の流量 (すなわち投与量レベル) にて4週間超にわたって連続静脈内注入された。患者は治療の最初の2週間は入院し、その後退院して自宅で治療を続けた。4週間後に疾患の進行の証拠が見られない患者は、さらに4週間の治療の継続が提供された。これまでのところ、最大耐投与量 (MTD) には達しない6つの異なる投与量レベル、0.5、1.5、5、15、30、及び60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間についての試験を行った。この研究プロトコルによってDLT (投与量規制毒性) として定義される有害なイベントが観察されなかった場合、コホートは各々3人の患者から構成した。最初の3人の患者のうち1人でDLTが見られた場合、コホートは患者6人に拡大し、2人目のDLTがない場合、ここで投与量をさらに増加させた。従って、患者3人のコホートでDLTが見られないか、又は患者6人のコホートでDLTが1人である投与量レベルを安全と見なした。研究治療はDLTを発症したすべての患者で停止した。15及び30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間では、いくつかの追加のコホートにて最初の24時間の治療開始モードを変えた試験: (i) 最初の24時間の5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間の後、15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間の維持投与量まで段階的に増加 (患者コホート15 - ステップ)、(ii) ほぼ0から15又は30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間まで流量を均等に連続的に増加 (患者コホート15 - ランプ及び30 - ランプ)、並びに (iii) 一番最初から維持投与量で開始 (患者コホート15 - フラット、30 - フラット、及び60 - フラット)、を行った。投与量レベルが0.5、1.5、及び5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間の患者コホートは、すべて一番最初から維持投与量で開始した (すなわち、フラットな開始)。

【0287】

経時での末梢血液中の絶対B細胞数及びT細胞数は、以下に示すように4色FACS (four color FACS) 分析によって測定した。

【0288】

血液サンプルの採取及びルーチン分析

患者コホート15 - ランプ、15 - フラット、30 - ランプ、30 - フラット、及び60 - フラットでは、血液サンプル (6 ml) は、CD19×CD3結合分子 (国際公開第99/54440号に開示) の注入前、及び注入開始後0.75、2、6、12、24、30、48時間、さらには治療の第8、15、17、22、24、29、36、43、50、57日、並びに従来のCD19×CD3結合分子注入終了の4週間後に、EDTA含有Vacutainer (商標) チューブ (Becton Dickinson) を用いて採取し、4℃で分析へ送った。患者コホート15 - ステップでは、血液サンプル (6 ml) は、CD19×CD3結合分子の注入前、及び注入開始後6、24、30、48時間、さらには治療の第8、15、22、29、36、43、50、57日、並びにCD19×CD3結合分子注入終了の4週間後に採取した。投与量レベル0.5、1.5、及び5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間では、血液サンプル (6 ml) は、CD19×CD3結合分子の注入前、及び注入開始後6、24、48時間、さらには治療の第8、15、22、29、36、43、50、57日、並びにCD19×CD3結合分子注入終了の4週間後に採取した。作業上の理由からこれらの時間点が僅かに変更される場合もあった。リンパ球亜集団のFACS分析は、血液サンプル採取後24乃至48時間以内に実施した。血液サンプル中の白血球亜集団の絶対数は、Coulter Counter (商標) (Coulter) 上での分画血液分析 (differential blood analysis) によって測定した。

【0289】

血液サンプルからのPBMCの単離

PBMC (末梢血液単核細胞) の単離は、Ficoll (商標) 勾配分離プロトコルを適合させることで実施した。あらかじめBiocoll (商標) 溶液 (Biochrom) 3 mlを充填した10 mlのLeucosep (商標) チューブ (Greiner) へ血液を室温で移した。遠心分離は、スイングアウトローター (swing-out rotor) 50

r) により、 $1700 \times g$ 及び 22°C で 15 分間、減速なしで行った。Biocontrol (商標) 層の上にある PBMC を単離し、FACS バッファー (PBS / 2% FBS [ウシ胎仔血清; Biochrom]) で 1 回洗浄し、遠心分離し、FACS バッファー中へ再懸濁した。すべての洗浄工程における遠心分離は、スイングアウトローターにより、 $800 \times g$ 及び 4°C で 4 分間行った。必要に応じて、単離した PBMC を 3 ml の赤血球溶解バッファー ($8.29 \text{ g NH}_4\text{Cl}$ 、 1.00 g KHCO_3 、 0.037 g EDTA 、 $\text{ad } 1.0 \text{ l H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 、 $\text{pH } 7.5$) 中にて 5 分間室温でインキュベートし、続いて FACS バッファーで洗浄することにより赤血球の溶解を行った。

【0290】

細胞表面分子に対する蛍光標識抗体による PBMC の染色

モノクローナル抗体を Invitrogen (¹カタログ番号 MHCD1301、²カタログ番号 MHCD1401)、Dako (⁵カタログ番号 C7224)、又は Becton Dickinson (³カタログ番号 555516、⁴カタログ番号 345766) より入手し、製造元の推奨事項に従って使用した。 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 個の細胞を以下の抗体の組み合わせによって染色した：抗 CD13¹ / 抗 CD14² (FITC) $\times$ 抗 CD56³ (PE) $\times$ 抗 CD3⁴ (PerCP) $\times$ 抗 CD19⁵ (APC)。細胞を V 字型 96 ウェルマルチタイタープレート (Greiner) 中でペレット化し、上清を除去した。細胞のペレットを、FACS バッファーで希釈した特異的な抗体を含む全量 $100 \mu\text{l}$ 中に再懸濁した。インキュベーションを暗所にて 4°C で 30 分間行った。続いて、FACS バッファーでサンプルを 2 回洗浄し、フローサイトメトリー分析のために細胞ペレットを FACS バッファー中へ再懸濁した。

【0291】

染色されたリンパ球の FACS によるフローサイトメトリー検出

4 色 BD FACSCalibur (商標) (Becton Dickinson) を用いてデータの収集を行った。各測定について、同定されたリンパ球亜集団の 1×10^4 個の細胞を得た。プログラム CellQuest Pro (商標) (Becton Dickinson) を用いて統計的解析を実施することにより、リンパ球亜集団のパーセントを得ると共に、細胞表面分子の発現強度を分類した。続いて、FACS によって測定された全リンパ球 (すなわち、CD13 / 14 染色によるいずれの骨髄系細胞も除いた B プラス T プラス NK 細胞) に対する単一のリンパ球のサブセットのパーセントを分画血液分析からのリンパ球数と相関させることにより、T 細胞 (CD3⁺、CD56⁻、CD13 / 14⁻) 及び B 細胞 (CD19⁺、CD13 / 14⁻) の絶対細胞数を算出した。

【0292】

治療開始時に循環する CD19 陽性 B 細胞を実質的に持たなかったすべての患者における、従来の CD19 $\times$ CD3 結合分子 (例：国際公開第 99 / 54440 号に開示) による治療の開始フェーズの間の T 細胞再分布を (図 23) に示す。比較のために、相当数の循環する CD19 陽性 B 細胞を持つ患者における、CD19 $\times$ CD3 結合分子による治療の開始フェーズの間の T 細胞再分布の代表例を図 26 に示す。

【0293】

いずれの場合でも (すなわち、循環する B 細胞が実質的に存在しなくても、又は多く存在しても)、循環する T 細胞数は治療の開始と共に急速に減少する。しかし、循環する B 細胞が存在しない場合、T 細胞は非常に早い段階で循環血液中に戻る傾向にあり、一方、治療開始時に相当数の循環する B 細胞を持つ患者の循環血液中への T 細胞の戻りは、通常これらの循環する B 細胞が除去されるまで遅延される。従って、T 細胞再分布のパターンは主として、循環血液中の T 細胞再出現の動態という点で異なる。

【0294】

CT スキャンに基づいた効力の評価を、4 週間の治療後、及び追加の 4 週間の治療を受けた患者はさらに 8 週間の治療後、プラスいずれの場合に対しても治療終了から 4 週間後に、中央標準放射線医学 (central reference radiology) により実施した。すべての既知の病変 (脾腫を含む) の消滅及び / 又はサイズの正常化、プ

ラス骨髓浸潤の場合は骨髓中のリンパ腫細胞のクリアランスを完全寛解（CR）とみなした。ベースラインである既定の各標的病変の2つの最大直径の積の総和（SPD）からの少なくとも50%の減少を部分寛解（PR）と定義し；少なくとも25%の減少を最小応答（MR）と見なした。進行性疾患（PD）は、ベースラインからのSPDの増加が $\geq 50\%$ と定義した。ベースラインからのSPDの偏差が $+50\%$ と -25% との間である状態を安定疾患（SD）と見なした。

【0295】

34人の患者の患者個体群統計、投与量、及び臨床結果を表4にまとめる。CD19×CD3結合分子の臨床的抗腫瘍活性は明らかに投与量依存であった。5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間からそれ以上では、末梢血液からの循環するCD19陽性B（リンパ腫）細胞の除去が一貫して観察された。15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間及び30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間で、最初 10
の他覚的な臨床応答（PR及びCR）が記録され、さらにはBリンパ腫細胞が浸潤骨髓から部分的及び完全に除去されるケースもあった。最後に、60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間では、応答率は100%まで上昇し（PR及びCR）、評価可能なすべてのケースにおいて、骨髓中のBリンパ腫細胞のクリアランスは完全であった。

【0296】

CD19×CD3結合分子は、大部分の患者が十分な耐受性を示した。34人の患者に最も多く発生したグレード1乃至4の有害イベントを、原因に関わらず表5にまとめる。CD19×CD3結合分子に関連する有害イベントは、通常は一過性であり完全に回復可能である。特に、実質的に循環するCD19陽性B細胞を持たない2人の患者（表4中の患者番号19及び24）では、CD19×CD3結合分子注入の開始フェーズの間の繰り返されるT細胞再分布と関連するCNS有害イベント（代表的な症状：錯乱及び見当識障 20
害）のために治療が早期に中止された。

【0297】

このうちの1人（番号19）は、コホート15-ステップであった。この患者は、最初の24時間は5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間のCD19×CD3結合分子の投与を受け、続いて15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間の維持投与量へ急に増加させた。対応するT細胞再分布パターンにより、5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間での注入の開始と共に循環するT細胞数は急速に減少し、続いて、実質的に循環するCD19陽性B細胞が存在しない循環血液中にT細胞が早期に再出現したことが分かる。結果として、CD19×CD3結合分子の投与量が24時間後に5から15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間へ増加された際には、末梢T細胞数は完全に回復 30
していた。従って、図24Aに示すように、投与工程がT細胞再分布の第二のエピソードを引き起こすことが可能であった。この患者では、この繰り返されるT細胞再分布はCNS副作用（代表的な症状：錯乱及び見当識障害）と関連しており、このために注入が中止された。繰り返されるT細胞再分布とこのようなCNS有害イベントとの関係は、各々2乃至4時間のボラス注入を、通常はこれに続いて2日間の治療を行わない間隔を置いて繰り返すことにより、CD19×CD3結合分子（例：国際公開第99/54440号に開示）の投与を受けたB-NHLの患者での過去のフェーズI臨床試験でも観察された（図24B）。各回のボラス注入すべてが、循環するT細胞数の急速な減少及び次のボラス注入の前のT細胞の回復から成るT細胞再分布の1つのエピソードを引き起こした。 40
まとめると、繰り返されるT細胞再分布と関連するCNS有害イベントは、21人の患者のうち5人で観察された。図24Bは、ボラス注入試験において、第三のT細胞再分布エピソードの後にCNS症状を発症した1人の患者の代表的な例を示す。通常、ボラス注入試験においてCNS有害イベントを起こした患者は、循環するB細胞数も低かった。

【0298】

CD19×CD3結合分子注入の開始フェーズの間の繰り返されるT細胞再分布と関連するCNS有害イベント（代表的な症状：錯乱及び見当識障害）のために治療が早期に中止された連続注入試験のもう1人の患者（番号24）は、コホート15-フラットであった。手違いにより、この患者は、薬剤の安定化に必要であるHSAが追加されないCD19×CD3結合分子の注入を受けた。その結果としての不均一な薬剤の流れによって1回 50

のみではなく繰り返されるT細胞再分布のエピソードが引き起こされ（図27A）、CNS症状の発症により注入を中止しなければならない結果となった。しかし、同じ患者で、薬剤の安定化のためのHSAを追加して含有するCD19×CD3結合分子溶液（例：国際公開第99/54440号に開示）により正しく再開したところ、繰り返されるT細胞再分布は観察されず、この患者が再度CNS症状を発症することはなかった（図27B）。この患者も実質的に循環するB細胞を有していなかったため、観察されたように、薬剤への曝露の僅かな変化に対してさえも、循環するT細胞は急速な再分布動態で反応することが可能であった。実質的に循環する標的細胞を持たない患者におけるT細胞再分布と関連するCNS有害イベントは、内皮細胞へのT細胞の接着性の一時的な上昇、それに続く血管壁への循環するT細胞の同時発生的な大量の接着、そしてその結果としての観察されたような循環血液中のT細胞数の低下によって説明することができる。血管壁へのT細胞の同時発生的な大量の接着は、内皮透過性の上昇及び内皮細胞の活性化を引き起こすことができる。内皮透過性の上昇の結果、血管内コンパートメントからCNS間質を含む間質コンパートメントへ体液が移動する。T細胞の接着による内皮細胞の活性化は凝血促進効果をもたらすことができ（Monaco et al. J Leukoc Biol 71 (2002) 659-668）、血流（脳血流を含む）の乱れを伴うことが、特に毛細血管の微小循環に関して考えられる。従って、実質的に循環する標的細胞を持たない患者におけるT細胞再分布と関連するCNS有害イベントは、T細胞の内皮細胞への接着による毛細血管漏出及び／又は毛細血管の微小循環の乱れによる結果であり得る。T細胞再分布の1回のエピソードに起因する内皮ストレス（endothelial stress）に対しては、大部分の患者が耐容性を示すが、一方、繰り返されるT細胞再分布に起因する高められた内皮ストレスは、CNS有害イベントを引き起こすことが多い。T細胞再分布の2回以上のエピソードは、循環するT細胞のベースライン数が低い患者の場合にのみ、そのリスクが低い場合がある。しかし、T細胞再分布の1回のエピソードに起因する限定的な内皮ストレスも、CD19×CD3結合分子のボラス注入試験における21人の患者のうちの1人で観察されたように、このようなイベントに対する感受性の高い稀なケースでは、CNS有害イベントを引き起こす場合がある。

【0299】

理論に束縛されるものではないが、実質的に循環する標的細胞を持たない患者におけるT細胞の内皮細胞への接着性の一時的な上昇は、上述のように、CD19×CD3結合分子（例：国際公開第99/54440号）のような従来のCD3結合分子とそのCD3イプシロン上のコンテクスト依存性エピトープとが一価の相互作用を起こし、その結果CD3のコンフォメーションがアロステリックに変化し、続いてCD3イプシロンの細胞質ドメインへNck2が動員されることに対してT細胞が反応することで説明することができる。Nck2はPINCH及びILK（図28）を介してインテグリンと直接結合していることから、CD19×CD3結合分子のような従来のCD3結合分子とそのCD3イプシロン上のコンテクスト依存性エピトープとの結合を通してのCD3のコンフォメーションのアロステリックな変化に続いてCD3イプシロンの細胞質ドメインへNck2が動員されると、内側からのシグナル伝達を通してT細胞表面上のインテグリンがより接着性の高いアイソフォームへと一時的に変換され、T細胞の内皮細胞への接着性を高めることができる。

【0300】

【表 4】

表 4. 患者個体群統計及び臨床結果

コホート	患者	年齢/ 性別	疾患 (Ann Arbor 分類)	投与量レベル [mg/m ² /日]	骨髄の クリアランス	最良応答* (CRの期間は 月又は週で 示す)
1	1	71/m	IC, Binet C	0.0005	なし	SD
	2	67/f	MCL, ステージ IV/A/E	0.0005	n.d.	PD
	3	67/m	CLL, ステージ IV/B/E	0.0005	n.d.	MR
2	4	69/m	MCL, ステージ IV/B	0.0015	n.i.	SD
	5	49/m	MCL, ステージ IV/A/S	0.0015	n.d.	SD
	6	71/m	MCL, ステージ IV/B/E	0.0015	n.i.	PD
	7	77/m	MCL, ステージ IV/B/E/S	0.0015	n.i.	SD
	8	65/m	CLL, ステージ IV/B/E/S	0.0015	n.d.	PD
	9	75/m	FL, ステージ II/B	0.0015	n.i.	SD
	10	58/m	MCL, ステージ III/B/S	0.005	n.i.	PD
	11	68/f	FL, ステージ IV/B	0.005	n.d.	SD
	12	65/m	MCL, ステージ III/A/E	0.005	n.i.	SD
	13	60/m	SLL, ステージ IV/B/S	0.015	完全	PR
	14	73/m	MCL, ステージ II/A/E	0.015	n.i.	SD
	15	44/m	FL, ステージ IV/B/E/S	0.015	部分的	PR
	16	61/m	FL, ステージ IV/A/S	0.015	完全	CR (7ヶ月)
	17	67/m	MZL, ステージ IV/B/S	0.015	n.i.	n.e.
	18	64/m	FL, ステージ IV/A/E	0.015	n.i.	PD
	19	75/m	MCL, ステージ III/A	0.015	n.i.	n.e.
	20	65/f	FL, ステージ III/A	0.015	n.i.	SD
	21	60/m	MCL, ステージ IV/A/E	0.015	なし	SD
	22	67/f	FL, ステージ IV/B	0.015	完全	MR
	23	67/m	DLBCL, ステージ III/B	0.015	n.i.	n.e.
	24	65/f	FL, ステージ III/A	0.015	n.d.	SD
	25	74/f	WD, ステージ IV/B	0.015	部分的	SD
	26	67/m	MCL, ステージ IV/A	0.03	完全	SD
	27	48/m	FL, ステージ III/A	0.03	n.i.	PD
	28	58/m	MCL, ステージ III/A	0.03	n.i.	CR (10ヶ月+)
	29	45/f	MCL, ステージ IV/B	0.03	部分的	PD
	30	59/m	MZL, ステージ III/A	0.03	n.i.	n.e.
	31	43/m	FL, ステージ III/A	0.03	n.i.	MR
	32	72/m	MCL, ステージ IV/A	0.06	完全	PR
	33	55/m	MCL, ステージ IV/B	0.06	完全	CR (4ヶ月+)
	34	52/m	FL, ステージ IV/A	0.06	n.i.	CR ^b (1週間+)

* 太字は、中央で確認されたチェソン基準 (Cheson criteria) による完全

10

20

30

40

50

寛解（C R）及び部分寛解（P R）；M R、最小応答（ ≥ 25 乃至 $<50\%$ ）；S D、安定疾患；P D、進行性疾患；カッコ内は最初の応答の記録からの期間；＋は進行中の応答を表す。

^a コホート 4 は、3 種類の異なる治療開始スケジュールの研究のために拡大した。

^b 8 週間の治療後は P R であるが、治療を行わない 7 週間の間隔を空けた後、同一の投与量での 4 週間の追加の治療サイクル後に C R となった。

n. e. : 治療期間が 7 日未満のため評価不可。

n. d. : 測定せず（浸潤していたが、治療の最後に第二の生検を実施せず）。

n. i. : 治療開始時に浸潤していなかった。

【 0 3 0 1 】

【表 5】

表 5. 治療期間中に観察された有害イベントの発生

関係に関わらず3人以上の患者で発生した有害イベント (N=34)	グレード 1-4 N (%)	グレード 3-4 N (%)
発熱	22 (64.7)	2 (5.9)
白血球減少	21 (61.8)	11 (32.4)
リンパ球減少症	21 (61.8)	21 (61.8)
凝固障害 (Dダイマーの増加)	16 (47.1)	6 (17.6)
酵素異常 (AP, LDH, CRP)	16 (47.1)	10 (29.4)
肝機能異常 (ALT, AST, GGT)	16 (47.1)	1 (2.9)
貧血	13 (38.2)	5 (14.7)
悪寒	13 (38.2)	0 (0.0)
頭痛	12 (35.3)	1 (2.9)
低カリウム血症	12 (35.3)	2 (5.9)
血小板減少症	12 (35.3)	6 (17.6)
体重増加	12 (35.3)	0 (0.0)
高血糖症	11 (32.4)	2 (5.9)
好中球減少症	11 (32.4)	8 (23.5)
血尿	10 (29.4)	0 (0.0)
末梢性浮腫	10 (29.4)	2 (5.9)
食欲不振	9 (26.5)	1 (2.9)
下痢	9 (26.5)	0 (0.0)
体重減少	9 (26.5)	0 (0.0)
疲労	8 (23.5)	1 (2.9)
タンパク尿症	8 (23.5)	0 (0.0)
低カルシウム血症	7 (20.6)	2 (5.9)
酵素異常	7 (20.6)	0 (0.0)
咳	6 (17.6)	0 (0.0)
呼吸困難	6 (17.6)	0 (0.0)
背痛	5 (14.7)	0 (0.0)
カテーテル留置部痛	5 (14.7)	0 (0.0)
高ビリルビン血症	5 (14.7)	2 (5.9)
低アルブミン血症	5 (14.7)	0 (0.0)
低ガンマグロブリン血症	5 (14.7)	1 (2.9)
低タンパク血症	5 (14.7)	0 (0.0)
胸水	5 (14.7)	1 (2.9)
嘔吐	5 (14.7)	0 (0.0)
無力症	4 (11.8)	1 (2.9)
錯乱状態	4 (11.8)	0 (0.0)
便秘	4 (11.8)	0 (0.0)
眩暈	4 (11.8)	0 (0.0)
高血圧症	4 (11.8)	0 (0.0)
低ナトリウム血症	4 (11.8)	2 (5.9)
粘膜乾燥症	4 (11.8)	0 (0.0)
筋痙攣	4 (11.8)	0 (0.0)
悪心	4 (11.8)	0 (0.0)
寝汗	4 (11.8)	0 (0.0)
腹部痛	3 (8.8)	1 (2.9)
腹水症	3 (8.8)	0 (0.0)
凝固亢進	3 (8.8)	0 (0.0)
多汗症	3 (8.8)	0 (0.0)
低グロブリン血症	3 (8.8)	0 (0.0)
不眠症	3 (8.8)	0 (0.0)
肝障害	3 (8.8)	1 (2.9)
上咽頭炎	3 (8.8)	0 (0.0)
そう痒症	3 (8.8)	0 (0.0)

用いた略号は：A E、有害イベント；A P、アルカリホスファターゼ；L D H、乳酸デヒドロゲナーゼ；C R P、C反応性タンパク質；A L T、アラニントランスアミナーゼ；A S T、アスパラギン酸トランスアミナーゼ；G G T、ガンマグルタミルトランスフェラーゼであり；患者34の追加の治療サイクルからのA Eデータはまだ含まれていない。

【0303】

上記で説明したように、コンテクスト依存性エピトープと結合する能力を有する従来のC D 3結合分子（例：国際公開第99/54440号に開示）は、機能的ではあるが、患者にT細胞再分布という望ましくない作用を引き起こし、C N S有害イベントの原因となる。対照的に、本発明の結合分子は、C D 3 イプシロン鎖のコンテクスト非依存性N末端アミノ酸1 - 27と結合することにより、そのようなT細胞再分布作用を引き起こさない。結果として、本発明のC D 3結合分子は、従来のC D 3結合分子と比較して、より安全性の高いプロファイルを伴う。

【0304】

21. 表面標的抗原を認識することによってT細胞媒介標的細胞溶解を誘発する本発明の二重特異性C D 3結合分子は、インビボにて標的抗原陽性細胞を除去する。

標的抗原としてC D 33を認識する本発明の二重特異性C D 3結合分子は、カニクイザルの末梢血液から循環するC D 33陽性単球を除去する。

C D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V L（アミノ酸配列：配列番号415）を、配列番号416のコードヌクレオチド配列を用いたC H O細胞内での発現によって産生させた。（i）コザック（K o z a k）コンセンサス配列内に埋め込まれた開始コドンを含むN末端免疫グロブリン重鎖リーダーのコード配列、及び（i i）停止コドンが続くC末端H i s 6タグのコード配列の両方を、配列番号416のヌクレオチド配列へフレームを揃えて結合し、その後、遺伝子合成によって得られたこのDNA断片を発現ベクターp E F - D H F Rのマルチクロニング部位へ挿入した（R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 50（2001）141 - 150）。D H F R欠失C H O細胞の安定なトランスフェクション、C D 3結合分子C D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V Lを培養物の上清中へ分泌するD H F R陽性トランスフェクタントの選択、及び発現レベルを高めるためのメトトレキサートによる遺伝子増幅は記述（M a c k e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 92（1995）7021 - 7025）に従って実施した。カニクイザルの処理のための試験物質は、20リットルの発酵槽中で作製した。3回の作製工程の回収物からのタンパク質精製は、C D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V LのC末端H i s 6タグを標的とするI M A Cアフィニティクロマトグラフィ、及びこれに続く分取用分子ふるいクロマトグラフィ（S E C）に基づいて行った。最終的な内毒素を含まない試験物質の総収量は60mgであった。カニクイザルに使用するためのC D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V Lの分析用S E Cプロファイルより、この試験物質がほとんど単量体のみから構成されていることが分かった。この試験物質の効力は、カニクイザルC D 33でトランスフェクトされたC H O細胞を標的細胞として、マカクT細胞株4119 L n P xをエフェクター細胞源として用いた実施例23. 5で述べる細胞障害性アッセイにより測定した（図29）。エフェクターT細胞による標的細胞溶解の最大半減に要するC D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V Lの濃度（E C 50）は、2. 7 n g / m lであると測定された。

【0305】

若年（およそ3歳）の成体カニクイザル（M a c a c a f a s c i c u l a r i s）を、種々の流量（すなわち投与量レベル）によるC D 3結合分子C D 33 - A F 5 V H - V L × I 2 C V H - V Lの連続静脈内注入によって処理し、循環するC D 33陽性単球の末梢血液からの除去を調べた。この状況は、循環するC D 19陽性標的B細胞を持つB - N H L患者を従来のC D 3結合分子C D 19 × C D 3（B細胞上のC D 19及びT細胞上のC D 3に特異的）で治療するものと同様である（例えば、国際公開第99/54440号を参照）。末梢血液からの循環するC D 19陽性標的B細胞の除去は、B - N H Lの

10

20

30

40

50

ようなCD19陽性B細胞マリグノーマ (malignomas) を持つ患者における従来のCD3結合分子 (国際公開第99/54440号に記載のCD19×CD3) の一般的な臨床効果に対する有効なサロゲートであることが分かっている。同様に、循環するCD33陽性単球の末梢血液からの除去は、AML (急性骨髄性白血病) のようなCD33陽性骨髄性マリグノーマを持つ患者におけるCD33 - AF5VH - VL×I2C VH - VLのような本発明のCD33指向性二重特異性CD3結合分子の一般的な臨床効果に対する有効なサロゲートであると見なされる。

【0306】

連続注入は、Swivel法に従い以下のようにして実施した：サルを、静脈カテーテルを用いて大腿静脈を通して尾側大静脈へカテーテル処理する。カテーテルを、背側の肩領域まで皮下を通し、尾側の肩甲骨で外へ出す。次に、チューブをジャケット及び保護スプリングに通す。ジャケットを動物の周りに固定し、カテーテルをチューブを経由して注入ポンプへ接続する。

10

【0307】

試験物質を含まない投与溶液 (1.25M リジン、0.1% tween 80、pH 7) を処理開始前の7日間、48ml/24時間で連続的に注入し、動物を注入条件に順応させた。処理は、試験物質CD33 - AF5VH - VL×I2C VH - VLを、試験すべき個々の各投与量レベルに要する量 (すなわち、CD33 - AF5VH - VL×I2C VH - VLの流量) で投与溶液へ添加することで開始した。注入リザーバーは、順応及び処理の全フェーズを通して毎日取り替えた。予定された処理期間は7日間であったが、ただし、120µg/m²/24時間の投与量レベルについては動物に14日間の処理を受けさせた。

20

【0308】

循環するT細胞及びCD33陽性単球の絶対数の経時変化は、それぞれ4色又は3色FACS分析によって測定した。

【0309】

血液サンプルの採取及びルーチン分析

血液サンプル (1ml) は、MCSP - G4 VH - VL×I2C VH - VLの連続注入前、及び注入開始後0.75、2、6、12、24、30、48、72時間、並びに7及び14日間の処理の後 (及び、120µg/m²/24時間の投与量レベルでは9日間の処理の後) に、EDTA含有Vacutainer (商標) チューブ (Becton Dickinson) を用いて採取し、4℃で分析へ送った。作業上の理由からこれらの時間点が僅かに変更される場合もあった。リンパ球亜集団のFACS分析は、血液サンプル採取後24乃至48時間以内に実施した。血液サンプル中の白血球亜集団の絶対数は、通常の獣医学研究室にて分画血液分析によって測定した。

30

【0310】

血液サンプルからのPBMCの単離

PBMC (末梢血液単核細胞) の単離は、Ficoll (商標) 勾配分離プロトコルを適合させることで実施した。あらかじめBiocoll (商標) 溶液 (Biochrom) 1mlを充填した5mlのFalcon (商標) チューブへ血液を室温で移した。遠心分離は、スイングアウトローターにより、1700×g及び22℃で15分間、減速なしで行った。Biocoll (商標) 層の上にあるPBMCを単離し、FACSバッファー (PBS/2% FBS [ウシ胎仔血清; Biochrom]) で1回洗浄し、遠心分離し、FACSバッファー中へ再懸濁した。すべての洗浄工程における遠心分離は、スイングアウトローターにより、800×g及び4℃で4分間行った。必要に応じて、単離したPBMCを3mlの赤血球溶解バッファー (8.29g NH₄Cl、1.00g KHCO₃、0.037g EDTA、ad 1.0l H₂O_{bidest}、pH 7.5) 中にて5分間室温でインキュベートし、続いてFACSバッファーで洗浄することにより赤血球の溶解を行った。

40

【0311】

50

細胞表面分子に対する蛍光標識抗体によるPBM Cの染色

カニクイザル抗原と反応性を持つモノクローナル抗体をBecton Dickinson (1カタログ番号345784、2カタログ番号556647、3カタログ番号552851、6カタログ番号557710)、Beckman Coulter (4カタログ番号IM2470)、及びMiltenyi (5カタログ番号130-091-732)より入手し、製造元の推奨事項に従って使用した。 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 個の細胞を以下の抗体の組み合わせによって染色した：抗CD14¹(FITC)×抗CD56²(PE)×抗CD3³(PerCP)×抗CD19⁴(APC)、及び抗CD14¹(FITC)×抗CD33⁵(PE)×抗CD16⁶(Alexa Fluor 647(商標))。細胞をV字型96ウェルマルチタイタープレート(Greiner)中でペレット化し、上清を除去した。細胞のペレットを、FACSバッファーで希釈した特異的な抗体を含む全量100 μ l中に再懸濁した。インキュベーションを暗所にて4℃で30分間行った。続いて、FACSバッファーでサンプルを2回洗浄し、フローサイトメトリー分析のために細胞ペレットをFACSバッファー中へ再懸濁した。

【0312】

染色されたリンパ球のFACSによるフローサイトメトリー検出

4色BD FACSCalibur(商標)(Becton Dickinson)を用いてデータの収集を行った。各測定について、同定されたリンパ球亜集団の 1×10^4 個の細胞を得た。プログラムCellQuest Pro(商標)(Becton Dickinson)を用いて統計的解析を実施することにより、リンパ球亜集団のパーセントを得ると共に、細胞表面分子の発現強度を分類した。続いて、FACSによって測定された全リンパ球(すなわち、CD14染色による骨髓系細胞を除いたBプラスTプラスNK細胞)に対する単一のリンパ球のサブセットのパーセントを分画血液分析からのリンパ球数と関連させることにより、T細胞(CD3⁺、CD56⁻、CD14⁻)の絶対細胞数を算出した。CD33陽性単球の絶対数は、分画血液分析からの単球数を、FACSによって測定された全単球(CD14⁺)に対するCD33陽性単球(CD33⁺、CD14⁺)の対応する比と掛け合わせるによって算出した。

【0313】

2匹のカニクイザルの4つのコホートにてコホート間の投与量の増加を30から60及び240を通して $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間までとしたCD33-AF5 VH-VL×I2C VH-VLによる処理終了時のベースライン(すなわち100%)と比較した循環するCD33陽性単球の絶対数のパーセントを図30Aに示す。

【0314】

図30Aに示すように、CD33-AF5 VH-VL×I2C VH-VLの連続静脈内注入により、循環するCD33陽性単球の除去が投与量に依存する形で誘発されている。30 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間では循環するCD33陽性単球の除去はまだ検出可能ではなかったが、CD33陽性単球数の減少へ向かう最初の傾向は、60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間での7日間の処理後に明らかとなった。240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間では、循環するCD33陽性単球は、3日間の処理後に末梢血液からほぼ完全に除去された。1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間ではさらに素早くそこまで到達しており、循環するCD33陽性単球の末梢血液からの除去は、1日の処理後にすでに完了していた。この発見は、CD33-AF5 VH-VL×I2C VH-VLを120 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間で14日間連続注入して処理した2匹のカニクイザルにおいて、循環するCD33陽性単球がそれぞれの対応するベースラインと比較して3分の2及び50%除去されたことを示す図30Bの結果によって確認された。

【0315】

この結果は、特にAMLのようなCD33陽性マリグノーマの治療に対して、本発明のCD3結合分子全般の、及び本発明の二重特異性CD33指向性CD3結合分子の臨床効果を明らかに示すものである。さらに、循環する標的細胞(すなわち、CD33陽性単球)の存在下でのCD33-AF5 VH-VL×I2C VH-VLによる治療の開始フェ

ーズの間のT細胞再分布は、図26に示す相当数の循環する標的細胞（すなわち、CD19陽性B細胞）を持つB-NHL患者における国際公開第99/54440号に記載の従来のCD19×CD3コンストラクトによる治療の開始フェーズの間のT細胞再分布と比べてそれほど明白ではないように思われる。CD19×CD3の注入の開始と共に循環からT細胞が完全に消滅し、末梢血液から循環するCD19陽性標的B細胞が除去されるまで再出現しないのに対し（図26）、CD33-AF5VH-VL×I2C VH-VLによる注入の開始時の循環するT細胞の最初の消滅は不完全であり、循環するCD33陽性標的細胞の存在下ですでにT細胞数は回復している（図30B）。このことから、本発明のCD3結合分子（ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3ε（イプシロン）鎖のエピトープに対して指向され、作製され、配列番号2、4、6、若しくは8で提供されるアミノ酸配列の一部、又は断片、又は完全長である）は、コンテキスト非依存性CD3エピトープを認識することによって、国際公開第99/54440号で提供される結合分子のようなコンテキスト依存性CD3エピトープを認識する従来のCD3結合分子よりも有利なT細胞再分布プロファイルを示すことが確認される。

【0316】

22. 実質的にコンテキスト非依存性CD3エピトープに指向される本発明のCD3結合分子は、循環する標的細胞の非存在下にて循環するT細胞の再分布の低減を誘発することにより、治療の開始と関連する有害イベントのリスクを低下させる。

本発明の代表的な種間特異的CD3結合分子による処理の開始に続くカニクイザルにおけるT細胞再分布の低減

MCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VL（アミノ酸配列：配列番号313）を、配列番号314のコードヌクレオチド配列を用いたCHO細胞内での発現によって産生させた。（i）コザックコンセンサス配列内に埋め込まれた開始コドンを含むN末端免疫グロブリン重鎖リーダーのコード配列、及び（ii）停止コドンが続くC末端His6タグのコード配列の両方を、配列番号314のヌクレオチド配列へフレームを揃えて結合し、その後、遺伝子合成によって得られたこのDNA断片を発現ベクターpEF-DHFRのマルチクロニング部位へ挿入した（Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150）。DHFR欠失CHO細胞の安定なトランスフェクション、CD3結合分子MCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VLを培養物の上清中へ分泌するDHFR陽性トランスフェクタントの選択、及び発現レベルを高めるためのメトトレキサートによる遺伝子増幅は記述（Mack et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92（1995）7021-7025）に従って実施した。カニクイザルの処理のための試験物質は、200リットルの発酵槽中で作製した。回収物からのタンパク質精製は、MCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VLのC末端His6タグを標的とするIMACアフィニティークロマトグラフィ、及びこれに続く分取用分子ふるいクロマトグラフィ（SEC）に基づいて行った。最終的な内毒素を含まない試験物質の総収量は40mgであった。この試験物質は、70%の単量体、30%の二量体、及び少量混入したこれより高い多量体から構成されていた。この試験物質の効力は、カニクイザルMCSPでトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として、マカクT細胞株4119 LnPxをエフェクター細胞源として用いた実施例18で述べる細胞障害性アッセイにより測定した（図31）。エフェクターT細胞による標的細胞溶解の最大半減に要するMCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VLの濃度（EC50）は、1.9 ng/mlであると測定された。

【0317】

若年（およそ3歳）の成体カニクイザル（Macaca fascicularis）を、種々の流量（すなわち投与量レベル）によるCD3結合分子MCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VLの連続静脈内注入によって処理し、循環する標的細胞の非存在下での処理の開始に続く循環するT細胞の再分布を調べた。CD3結合分子MCSP-G4 VH-VL×I2C VH-VLはカニクイザルMCSP及びカニクイザルCD3の両方を認識することができるが、MCSPを発現する循環する血液細胞は存在しない。従って

、循環血液中での考えられる唯一の相互作用は、MCSP - G4 VH - VL × I2C VH - VLのCD3特異的アームとT細胞上のCD3との結合である。この状況は、実施例20で述べるように、循環するCD19陽性標的B細胞を持たないB - NHL患者を従来のCD3結合分子（B細胞上のCD19及びT細胞上のCD3に特異的なCD19 × CD3）で治療するものと同等である。

【0318】

連続注入は、Swivel法に従い以下のようにして実施した：サルを、静脈カテーテルを用いて大腿静脈を通して尾側大静脈へカテーテル処理する。カテーテルを、背側の肩領域まで皮下を通し、尾側の肩甲骨で外へ出す。次に、チューブをジャケット及び保護スプリングに通す。ジャケットを動物の周りに固定し、カテーテルをチューブを経由して注入ポンプへ接続する。

10

【0319】

試験物質を含まない投与溶液（1.25M リジン、0.1% tween 80、pH7）を処理開始前の7日間、48ml / 24時間で連続的に注入し、動物を注入条件に順応させた。処理は、試験物質MCSP - G4 VH - VL × I2C VH - VLを、試験すべき個々の各投与量レベルに要する量（すなわち、MCSP - G4 VH - VL × I2C VH - VLの流量）で投与溶液へ添加することで開始した。注入リザーバーは、順応及び処理の全フェーズを通して毎日取り替えた。処理期間は7日間とした。

【0320】

末梢血液中の絶対T細胞数の経時変化は、以下のように4色FACS分析によって測定した。

20

【0321】

血液サンプルの採取及びルーチン分析

血液サンプル（1ml）は、MCSP - G4 VH - VL × I2C VH - VLの連続注入前、及び注入開始後0.75、2、6、12、24、30、48、72時間、並びに7日間の処理の後に、EDTA含有Vacutainer（商標）チューブ（Becton Dickinson）を用いて採取し、4℃で分析へ送った。作業上の理由からこれらの時間点が僅かに変更される場合もあった。リンパ球亜集団のFACS分析は、血液サンプル採取後24乃至48時間以内に実施した。血液サンプル中の白血球亜集団の絶対数は、通常の獣医学研究室にて分画血液分析によって測定した。

30

【0322】

血液サンプルからのPBMCの単離

PBMC（末梢血液単核細胞）の単離は、Ficoll（商標）勾配分離プロトコルを適合させることで実施した。あらかじめBiocoll（商標）溶液（Biochrom）1mlを充填した5mlのFalcon（商標）チューブへ血液を室温で移した。遠心分離は、スイングアウトローターにより、1700 × g及び22℃で15分間、減速なしで行った。Biocoll（商標）層の上にあるPBMCを単離し、FACSバッファー（PBS / 2% FBS [ウシ胎仔血清；Biochrom]）で1回洗浄し、遠心分離し、FACSバッファー中へ再懸濁した。すべての洗浄工程における遠心分離は、スイングアウトローターにより、800 × g及び4℃で4分間行った。必要に応じて、単離したPBMCを3mlの赤血球溶解バッファー（8.29g NH₄Cl、1.00g KHCO₃、0.037g EDTA、ad 1.0l H₂O_{bidest}、pH7.5）中にて5分間室温でインキュベートし、続いてFACSバッファーで洗浄することにより赤血球の溶解を行った。

40

【0323】

細胞表面分子に対する蛍光標識抗体によるPBMCの染色

カニクイザル抗原との反応性を持つモノクローナル抗体をBecton Dickinson（¹カタログ番号345784、²カタログ番号556647、³カタログ番号552851）、及びBeckman Coulter（⁴カタログ番号IM2470）より入手し、製造元の推奨事項に従って使用した。5 × 10⁵ - 1 × 10⁶個の細胞を以下の抗体

50

の組み合わせによって染色した：抗CD14¹（FITC）×抗CD56²（PE）×抗CD3³（PerCP）×抗CD19⁴（APC）。細胞をV字型96ウェルマルチタイタープレート（Greiner）中でペレット化し、上清を除去した。細胞のペレットを、FACSバッファーで希釈した特異的抗体を含む全量100μl中に再懸濁した。インキュベーションを暗所にて4℃で30分間行った。続いて、FACSバッファーでサンプルを2回洗浄し、フローサイトメトリー分析のために細胞ペレットをFACSバッファー中へ再懸濁した。

【0324】

染色されたリンパ球のFACSによるフローサイトメトリー検出

4色BD FACSCalibur（商標）（Becton Dickinson）を用いてデータの収集を行った。各測定について、同定されたリンパ球亜集団の 1×10^4 個の細胞を得た。プログラムCellQuest Pro（商標）（Becton Dickinson）を用いて統計的解析を実施することにより、リンパ球亜集団のパーセントを得ると共に、細胞表面分子の発現強度を分類した。続いて、FACSによって測定された全リンパ球（すなわち、CD14染色による骨髓系細胞を除いたBプラスTプラスNK細胞）に対する単一のリンパ球のサブセットのパーセントを分画血液分析からのリンパ球数と関連させることにより、T細胞（CD3⁺、CD56⁻、CD14⁻）の絶対細胞数を算出した。

【0325】

カニクイザルを60、240、及び1000μg/m²/24時間の投与量レベルのMCSP-G4VH-VL×I2C VH-VLで処理した際の開始フェーズの間のT細胞再分布を図32に示す。これらの動物は、処理の開始フェーズの間のT細胞再分布は全く示さず、すなわち、T細胞数は、処理の開始と共に減少するどころかむしろ増加した。循環する標的細胞を持たない全患者の100%で、コンテクスト依存性CD3エピトープに対する従来のCD3結合分子（例：国際公開第99/54440号に記載のCD19×CD3コンストラクト）での治療開始時にT細胞再分布が一貫して観察されることを考えると、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロン鎖に対して指向され作製された配列番号2、4、6、若しくは8のいずれか1つ、又はこれらの断片のアミノ酸配列で定義される本発明のCD3結合分子により、循環する標的細胞の非存在下において治療開始時に非常に低いT細胞再分布を観察することができることが実証された。これは、国際公開第99/54440号に記載のコンストラクトのようなコンテクスト依存性CD3エピトープに対して指向されたCD3結合分子とは明らかに対照的である。（とりわけ）配列番号2、4、6、若しくは8のいずれか1つ（又はこれらの配列の断片）で与えられるコンテクスト非依存性CD3エピトープに対する結合分子が、（有害で望ましくない）T細胞再分布のこの著しい低下をもたらす。CD3結合分子による治療の開始フェーズの間のT細胞再分布はCNS有害イベントの主たるリスク因子であることから、本明細書で提供されコンテクスト非依存性CD3エピトープを認識する能力を有するCD3結合分子は、本技術分野で公知でありコンテクスト依存性CD3エピトープに対して指向されるCD3結合分子に対して優れる大きな利点を持つ。実際、MCSP-G4VH-VL×I2C VH-VLで処理したカニクイザルでCNS症状の徴候を示したものはなかった。

【0326】

CD3エピトープのコンテクスト非依存性は本発明で提供され、CD3イプシロン）の最初のN末端の27アミノ酸、又はこの27アミノ酸の範囲の断片に対応する。このコンテクスト非依存性エピトープはCD3複合体内の自然の環境から取り出され、その構造の完全性を失うことなく異種アミノ酸配列へ融合される。本明細書で提供され、コンテクスト非依存性CD3エピトープに対して作製（及び指向）された抗CD3結合分子は、T細胞再分布に関して驚くべき臨床的な改善を、従って、より有利な安全性プロファイルをもたらす。理論に束縛されるものではないが、そのCD3エピトープがコンテクスト非依存性であり、CD3複合体の残りの部分に大きな影響を与えることなく自律的で自己充足的であるサブドメインを形成することから、本明細書で提供するCD3結合分子は、国際公

10

20

30

40

50

開第 99/54440 号で提供される分子のようにコンテキスト依存性 CD3 エピトープを認識する従来の CD3 結合分子（国際公開第 99/54440 号で提供される分子のような）と比べてそれ程の CD3 コンフォメーションのアロステリックな変化を誘発しない。結果として（やはり理論に束縛されるものではないが）、本明細書で提供される CD3 結合分子による細胞内 N c K 2 動員の誘発も低減され、その結果 T 細胞インテグリンのアイソフォームへの変換が減少し、内皮細胞への T 細胞の接着も低下する。本発明の CD3 結合分子の製剤（本明細書で定義するコンテキスト非依存性エピトープに対して指向され作製された）は、実質的に単量体分子から成ることが好ましい。このような単量体分子は、T 細胞再分布の回避、従って治療の開始フェーズの間の CNS 有害イベントのリスクの回避においてさらにより効率的（二量体又は多量体分子と比べて）である。

10

【0327】

23. CD33 及び CD3 種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

23.1 ヒト CD33 を発現する CHO 細胞の作製

GenBank（受託番号 NM_001772）で公開されているヒト CD33 のコード配列は、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位（Kozaksite）を含み、続いて 19 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて成熟ヒト CD33 タンパク質のコード配列を、続いてフレームを揃えてセリングリシンジペプチドのコード配列、ヒスチジン 6-タグ、及び停止コドンを含むように設計した（コンストラクトの cDNA 及びアミノ酸配列を配列番号 525 及び 526 に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5' 末端には EcoRI 及び 3' 末端には SalI であり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、EcoRI 及び SalI を介して、pEF-DHFR（pEF-DHFR については、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために DHFR 欠失 CHO 細胞へトランスフェクトした。DHFR 欠失 CHO 細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufman R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大 20 nM MTX までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

20

30

【0328】

23.2 マカク CD33 の細胞外ドメインを発現する CHO 細胞の作製

マカク CD33 の cDNA 配列は、標準的なプロトコルに従って調製したマカクザル骨髓からの cDNA に 3 回の PCR をセットで施すことによって得た。以下の反応条件：94 °C で 3 分間の 1 サイクル、続いて 94 °C で 1 分間、53 °C で 1 分間、及び 72 °C で 2 分間の 35 サイクル、続いて 72 °C で 3 分間の最終サイクル、を用い、並びに以下のプライマー：

40

3. フォワードプライマー：5' - gaggaatttcacccatgccgctgctgctactgctgccccctgctgtgggcaggggccctggctatgg - 3'

リバースプライマー：5' - gatttgtaactgtattttgggtactttcc - 3'

4. フォワードプライマー：5' - attccgcctccttggggatcc - 3'

リバースプライマー：5' - gcataggagacattgagctggatgg - 3'

5. フォワードプライマー：5' - gcaccaacctgacctgtcagg - 3'

50

リバースプライマー：5' - a g t g g g t c g a c t c a c t g g g t c c t g a c c
t c t g a g t a t t c g - 3'

を用いた。

【0329】

これらのPCRによって3個のオーバーラップ断片が作製され、これらを標準的なプロトコルに従ってPCRプライマーを用いて単離及び配列決定し、それによって、成熟タンパク質のコドン+2の二番目のヌクレオチドからコドン+340の三番目のヌクレオチドまでのマカクCD33のcDNA配列の部分を得た。マカクCD33の発現のためのコンストラクトを作製するために、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によってcDNA断片を得た（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号527及び528に挙げる）。このコンストラクトでは、成熟CD33タンパク質のアミノ酸+3から+340までのマカクCD33のコード配列が、アミノ酸+3から+340までのヒトのコード配列を置換する形でヒトCD33のコード配列へ融合された。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位、並びに実質的にマカクCD33の全細胞外ドメイン、マカクCD33膜貫通ドメイン、及びマカク-ヒトキメラ細胞内CD33ドメインをコードするcDNAを含む断片の最初と最後に制限部位を含むようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は次に、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへクローン化した。上述のように、このプラスミドの配列が確認されたクローンを用いて、CHO/dhfr-細胞をトランスフェクトした。

【0330】

23.3 CD33及びCD3種間特異的二重特異性抗体分子の作製

種間特異的結合分子のクローン化

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類CD33に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性抗体分子を、以下の表6に挙げるように設計した。

【0331】

10

20

30

【表 6】

表 6：抗CD3及び抗CD3 3種間特異的二重特異性分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
448/447	AH11HLxH2CHL
394/393	AH3HLxH2CHL
430/429	AC8HLxH2CHL
412/411	AF5HLxH2CHL
484/483	F2HLxH2CHL
520/519	E11HLxH2CHL
466/465	B3HLxH2CHL
502/501	B10HLxH2CHL
450/449	AH11HLxF12QHL
396/395	AH3HLxF12QHL
432/431	AC8HLxF12QHL
414/413	AF5HLxF12QHL
486/485	F2HLxF12QHL
522/521	E11HLxF12QHL
468/467	B3HLxF12QHL
504/503	B10HLxF12QHL
452/451	AH11HLxi2CHL
398/397	AH3HLxi2CHL
434/433	AC8HLxi2CHL
416/415	AF5HLxi2CHL
488/487	F2HLxi2CHL
524/523	E11HLxi2CHL
470/469	B3HLxi2CHL
506/505	B10HLxi2CHL

【0332】

ヒト及びマカクCD33に対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒスチジン₆-タグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを

、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート(MTX)の濃度を最大20nMMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0333】

二重特異性抗体分子の発現及び精製二重特異性抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)中で発現させる。DHFR欠失CHO細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20nM MTXの最終濃度まで増加する濃度のMTXを添加することによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQPF CHO液体大豆培地(0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む;HyClone)により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。別の選択肢として、コンストラクトを一過性にHEK293細胞中で発現させた。トランスフェクションは、293fectin試薬(Invitrogen, #12347-019)を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。

【0334】

クロマトグラフィにはAkt a (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck)を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ(「IMAC」)を実施した。バッファーA(20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl)でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清(500ml)を流速3ml/分でカラム(10ml)に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB(20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl、0.5M イミダゾール)の以下に示す2段階の勾配:

段階1: 6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2: 6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma(ダイゼンホフエン)又はMerck(ダルムシュタット)より購入した。

【0335】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー(Equi-buffer)(25mM クエン酸塩、200mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2)で平衡状態としたHiLoad16/60 Superdex 200 分取グレードカラム(GE/アマーシャム)上で実施した。溶離したタンパク質サンプル(流速1ml/分)を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した(分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD280nmを用いて測定した。

【0336】

精製した二重特異性抗体タンパク質は、還元性条件下、4-12%ビストリスゲル(Invitrogen)をプレキャストしたSDS PAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード(Invitrogen)を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クーマシーを用いた(Invitrogenプロトコル)。SDS-PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95%である。

【0337】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性抗体の分子量は約52 kDaである。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

【0338】

ウエスタンブロットは、Optitran（登録商標）BA-S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性抗体タンパク質抗体の検出には、抗Hisタグ抗体を用いた（PentaHis, Qiagen）。アルカリホスファターゼ（AP）で標識したヤギ抗マウスIg抗体（Sigma）を二次抗体として用い、BCIP/NBT（Sigma）を基質として用いた。精製された二重特異性抗体に対応する52 kDに単一のバンドを検出した。

【0339】

23.4 CD33及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

ヒト及びマカクCD33並びにCD3のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のために、実施例23.1で述べるようにヒトCD33でトランスフェクトされたCHO細胞、及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL（DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483）を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例23.2で述べる作製されたマカクCD33トランスフェクタント、及びマカクPBMC（マカクPBMCの調製は、標準的なプロトコルに従い、マカクザルからの末梢血液のFicoll勾配遠心分離によって行った）を用いて試験した。PBMCのそれぞれの細胞株の200,000個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト（5 µg/ml）の精製タンパク質50 µlと共に、又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共に、30分間氷上にてインキュベートした。細胞を2% FCSを含むPBSで2回洗浄し、マウス抗His抗体（PentaHis抗体; Qiagen; 2% FCSを含むPBS 50 µl中にて1:20に希釈）でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2% FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体（Dianova）で検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。

【0340】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し; CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った（Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク）。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のようにして実施した。

【0341】

本発明のCD3結合分子のヒト及び非チンパンジー霊長類CD3との特異的結合は、図33に示すように明らかに検出可能であった。FACS分析では、対応するネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びCD33への結合を示している。二重特異性抗体のヒト及びマカクCD3並びにCD33抗原への種間特異性が実証される。

【0342】

23.5 CD33及びCD3種間特異的二重特異性抗体の生物活性
作製された二重特異性抗体の生物活性を、実施例23.1及び23.2で述べるCD33陽性細胞株を用いるクロム51（⁵¹Cr）放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。それぞれの図に示すように、エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC、又はマカクT細胞株4119LnPxを用いた。

【0343】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のようにして実施した：

ペトリ皿（直径85mm、Nunc）を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により 37°C にて1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll 1勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン/ $10\%\text{FCS}/\text{IL}-220\text{U}/\text{ml}$ （Proleukin, Chiron）を含む50mlのRPMI 1640中、 $3-5\times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI 1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を $20\text{U}/\text{ml}$ とし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0344】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、 $50\%\text{FCS}$ を含む最終容量 $100\mu\text{l}$ のRPMI中、 11.1MBq の ^{51}Cr にて 37°C で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量 $250\mu\text{l}$ の補足RPMI（上記と同様）中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性抗体分子 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism 4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 >0.90 である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

【0345】

図34に示すように、作製された種間特異的二重特異性コンストラクトはすべて、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMCによって誘発されたヒトCD33陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマクT細胞株4119LnPxによって誘発されたマクCD33陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示している。

【0346】

24. CAIX及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

24.1 ヒトCAIXを発現するCHO細胞の作製

GenBank（受託番号NM_001216）で公開されているヒトCAIXのコード配列は、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、そのリーダーペプチドを含むヒトCAIXタンパク質のコード配列を含むように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号604及び605に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537 -

10

20

30

40

50

566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0347】

24.2 マカクCAIXを発現するCHO細胞の作製

GenBank（受託番号XM_001088481）で公開されているマカクCAIXのコード配列は、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、そのリーダーペプチドを含むマカクCAIXタンパク質のコード配列を含むように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号606及び607に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞ヘトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0348】

24.3 CAIX及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

種間特異的結合分子のクローン化

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類CAIXに対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表7に挙げるように設計した。

【0349】

【表7】

表7：抗CD3及び抗CAIX種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
539/538	CA9-A8 HL x H2C HL
571/570	CA9-B2 HL x H2C HL
557/556	CA9-E8 HL x I2C HL
543/542	CA9-A8 HL x I2C HL
575/574	CA9-B2 HL x I2C HL
541/540	CA9-A8 HL x F12Q HL
573/572	CA9-B2 HL x F12Q HL

【0350】

ヒト及びマカクCAIXに対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）

ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えて6ヒスチジンタグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR (pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている) と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大20 nM MTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

10

20

【0351】

24.4 二重特異性単鎖抗体分子の発現及び精製

二重特異性単鎖抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 中で発現させた。DHFR欠失CHO細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20 nM MTXの最終濃度まで増加する濃度のMTXを添加することによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQPF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68 含有 L-グルタミン 4.0 mMを含む; HyClone) により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。別の選択肢として、コンストラクトを一過性にHEK293細胞中で発現させた。トランスフェクションは、293fectin試薬 (Invitrogen, #12347-019) を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。

30

【0352】

クロマトグラフィにはAkt a (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファーA (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速3 ml/分でカラム (10 ml) に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール) の以下に示す2段階の勾配：

40

段階1：6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2：6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン) 又はMerck (ダルムシュタット) より購入した。

【0353】

50

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー（25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5 % グリセロール、pH 7.2）で平衡状態としたHi Load 16/60 Superdex 200 分取グレードカラム（GE/アマーシャム）上で実施した。溶離したタンパク質サンプル（流速1 ml/分）を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した（分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200）。タンパク質濃度は、OD_{280 nm}を用いて測定した。

【0354】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質は、還元性条件下、4-12 %ビストリスゲル（Invitrogen）をプレキャストしたSDSPAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード（Invitrogen）を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた（Invitrogenプロトコル）。SDS-PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95 %である。

10

【0355】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性単鎖抗体の分子量は約52 kDaである。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

【0356】

ウエスタンブロットは、Optitran（登録商標）BA-S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性単鎖抗体タンパク質抗体の検出には、抗Hisタグ抗体を用いた（PentaHis, Qiagen）。アルカリホスファターゼ（AP）で標識したヤギ抗マウスIg抗体（Sigma）を二次抗体として用い、BCIP/NBT（Sigma）を基質として用いた。精製された二重特異性単鎖抗体に対応する52 kDに単一のバンドを検出した。

20

【0357】

24.5 CAIX及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

ヒト及びマカクCAIX並びにCD3のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のために、実施例24.1で述べるようにヒトCAIXでトランスフェクトされたCHO細胞、及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL（DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483）を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例24.2で述べる作製されたマカクCAIXトランスフェクタント、及びマカクT細胞株4119 LnPx（Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg, よりご提供頂いた；Knapp A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61、にて発表）を用いて試験した。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト（2 µg/ml）の精製タンパク質50 µlと共に、又は種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共に、30分間氷上にてインキュベートした。2 % FCSを含むPBSで細胞を2回洗浄し、マウス抗His抗体（PentaHis抗体；Qiagen；2 % FCSを含むPBS 50 µl中にて1:20に希釈）でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2 % FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体（Dianova）で検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を、T細胞株への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを、CAIXでトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。

30

40

【0358】

50

フローサイトメトリーはFACS - Calibur装置上で実施し; Cell Questソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った(Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley - Interscience, 2002)に記載のようにして実施した。

【0359】

CAIXに対して種間特異的であり、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3に対して種間特異的である上記に挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図35に示すように明らかに検出可能であった。FACS分析では、対応するネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びCAIXへの結合を示した。二重特異性抗体のヒト及び非チンパンジー霊長類CD3並びにCAIX抗原に対する種間特異性が実証された。

【0360】

24.6 CAIX及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例24.1及び24.2で述べるCAIX陽性細胞株を用いるクロム51 (^{51}Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。それぞれの図に示すように、エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC、刺激されたヒトPBMC、又はマカクT細胞株4119 LnPxを用いた。

【0361】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のようにして実施した：

ペトリ皿（直径145mm、Greiner）を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により 37°C にて1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン/10%FCS/IL-220U/ml (Proleukin, Chiron)を含む120mlのRPMI1640中、 $3-5\times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0362】

刺激されたCD4/CD56除去PBMCの作製は以下のようにして実施した：

ペトリ皿（直径145mm、Greiner）を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により 37°C にて1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン/10%FCS/IL-220U/ml (Proleukin, Chiron)を含む120mlのRPMI1640中、 $3-5\times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。CD4+T細胞及びCD56+NK細胞を標準的なプロトコルに従って除去することにより、CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTLs) を濃縮した。

【0363】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50%FCSを含む最終容量100 μl のRPMI中、11.1MBqの ^{51}Cr にて 37°C で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250 μl の補足RPMI（上記と同様）中にて、それぞれの図に示す5:1から50:1までの種々のE:T比で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は16時

間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用 Prism 4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 >0.90 である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

【0364】

図36に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC又は刺激されたPBMCによって誘発されたヒトCAIX陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカクT細胞株4119 LnPxによって誘発されたマカクCAIX陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

【0365】

25. EpCAM及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

EpCAM特異的二重特異性抗体の構築

EpCAM特異的二重特異性抗体の構築のための基礎は、完全ヒトEpCAM特異的抗体HD69とした（Raum et al., Cancer Immunol Immunother（2001）50：141以降）。VH及びVLは、標準的な方法に従ってHD69 DNAからPCR増幅した。VH及びVLは、標準的なプロトコルに従って順にプラスミドへクローン化され、それによって機能的scFv（配向VH-リンカー-VL）を形成した。このscFvコンストラクトは、次に、二重特異性抗体フォーマットへの機能的なクローン化に有用であるN末端Bsrg1及びC末端BspE1制限部位を導入するプライマーを用いてPCR増幅した（5'-HD69-Bsrg1：5'-gacagggtgtacactccgagggtgcagctgctcgcaggtcttgg-3'；3'-HD69-BspE1：5'-tgatagttccggattttgatcttccagcttgggtcc-3'）。次にこのPCR生成物を、ヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを各々が1つ含む3種類の適切な発現ベクターへクローン化し（それぞれ、H2CHL、F12QHL、及びI2C）、それによって、3種類の機能的二重特異性コンストラクト、HD69HL×H2CHL、HD69HL×F12QHL、及びHD69HL×I2CHLがコードされた。続いてこれらのコンストラクトを、標準的な手順に従い安定なトランスフェクションのためにエレクトロポレーションによってDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトし、結果として各々が3種類の二重特異性産物のうちの1つを発現するプールである3種類のトランスフェクトされた細胞のプールを得た。

【0366】

【表8】

表8：ヒト-カニクイザル種間特異的抗CD3部分を含む抗EpCAM二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N→C)
589/588	HD69 HL x H2C HL
591/590	HD69 HL x F12Q HL
593/592	HD69 HL x I2C HL

10

20

30

40

50

【0367】

作製された二重特異性単鎖抗体（それぞれの二重特異性コンストラクトを発現するCHO細胞の培養物の上清中）の生物活性を、トランスフェクトされたEpCAM陽性細胞株CHO-EpCAM（表面に結合したヒトEpCAMを発現、Raumet al., Cancer Immunol Immunother (2001) 50: 141以降に発表）を標的細胞として用いるクロム51放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD8陽性T細胞を用いた。図37に示すように、作製した二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、ヒトCD8+細胞によって誘発されたヒトEpCAM陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。ネガティブコントロールとしては、トランスフェクトされていないCHO細胞の培養物の上清を用い、これは検出可能な細胞障害性を示さなかった。

10

【0368】

作製した二重特異性コンストラクトのCD3アームへの種間特異的活性を示すためにフローサイトメトリー分析を実施し、それによって、ヒトCD3を発現する細胞及びマカクCD3を発現する細胞へのコンストラクトの結合を確認した。さらに、EpCAM陽性細胞への特異性も調べた。

【0369】

簡潔に述べると、単離されたヒトPBMC中のヒトEpCAMでトランスフェクトされたCHO細胞及びヒトCD3陽性T細胞を用いてヒト抗原への結合の試験を行った。マカクCD3抗原に対する結合反応性は、マカクT細胞株4119LnPx (Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg、よりご提供頂いた; Knappe A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61、にて発表)を用いて試験した。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、CD3種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清と共に、30分間氷上にてインキュベートした。2%FCSを含むPBSで細胞を2回洗浄し、マウス抗His抗体 (PentaHis抗体; Qiagen; 2%FCSを含むPBS 50 µl 中にて1:20に希釈) でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2%FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体 (Dianova) で検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を、T細胞株への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。

20

30

【0370】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し、CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002) に記載のようにして実施した。

【0371】

ヒトEpCAMに対して特異的であり、ヒト及びマカクCD3に対して種間特異的である単鎖分子の二重特異性結合は、図38に示すように明らかに検出可能であった。フローサイトメトリー分析では、対応するネガティブコントロール及びEpCAM/CD3陰性CHO細胞株と比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びEpCAMへの結合を示した。

40

【0372】

26. EGFRvIII及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

26.1 ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞の作製及び発現
細胞外ドメインの267個のアミノ酸が欠失した変異上皮成長因子受容体 (デルタEGFR、de2-7EGFR、又はEGFRvIIIは同義で用いる) のC末端、膜貫通及

50

び細胞質ドメインのコード配列 (Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD: EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy; Endocr Relat Cancer. 2001 Jun; 8 (2): 83-96) を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて24アミノ酸リーダーペプチドのコード配列を、続いてフレームを揃えてヒトC末端細胞外ドメイン、膜貫通及び細胞質ドメインのコード配列、並びに停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、DNA断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。クローン化の目的のために、Xba I 及び Sal I 制限酵素認識部位を、それぞれ5'末端及び3'末端に付加した。合成遺伝子DNAは続いてXba I 及び Sal I によって消化され、適切に消化された発現ベクター pEF-DHFRへ連結され、大腸菌へ形質転換される。確認されたヌクレオチド配列を有するクローン (組換えコンストラクトのcDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号599及び598に挙げる) を、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は上記で述べるようにして実施した。

10

【0373】

26. 2 カニクイザルEGFRvIIIの作製及び発現

実施例26. 1と同様に、カニクイザルEGFRvIII変異体を、細胞外ドメインの267個のアミノ酸の欠失及び融合部位への新規なアミノ酸グリシンの挿入 (アミノ酸番号6) によって作製した。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて24アミノ酸リーダーペプチドのコード配列を、続いてフレームを揃えてカニクイザルC末端細胞外ドメイン、膜貫通及び細胞質ドメイン (いずれもヒト) のコード配列、並びに停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、DNA断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位、5'末端のXba I 及び3'末端のSal I は、以下のクローン化の手順に利用した。標準的なプロトコルに従い、断片をXba I / Sal I で消化し、pEF-DHFRへクローン化した。配列が確認されているプラスミドを用いてCHO/dhfr⁻細胞 (ATCC No. CRL 9096; いずれもBiochrom AG, ベルリン, ドイツから入手した10% FCS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、及びSigma-Aldrich Chemie GmbH, タウフキルヘン (Taufkirchen), ドイツから入手した細胞培養グレード試薬のストック液からのヌクレオシドを補充して最終濃度を10 µg/ml アデノシン、10 µg/ml デオキシアデノシン、及び10 µg/ml チミジンとした、Biochrom AG, ベルリン, ドイツから入手した安定化グルタミンを含むRPMI 1640中、インキュベーター内で37°C、湿度95%、及び7% CO₂にて培養) をトランスフェクトした。トランスフェクションは、Polyfect トランスフェクション試薬 (Qiagen GmbH, ヒルデン, ドイツ) 及び5 µg のプラスミドDNAを用い、製造元のプロトコルに従って実施した。24時間の培養後、細胞をPBSで1回洗浄し、ヌクレオシド及び透析FCS (Biochrom AG, ベルリン, ドイツより入手) を補充しないこと以外は前述と同様の細胞培地で再度培養した。従って、細胞培地はヌクレオシドを含有せず、それによって選別はトランスフェクトされた細胞に適用された。トランスフェクションからおよそ14日の後、耐性細胞の成長が観察された。さらに7乃至14日後、トランスフェクタントはFACSの試験によりコンストラクトの発現について陽性を示した。

20

30

40

【0374】

26. 3 EGFRvIII及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3抗原に対して結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類EGFRvIII抗原に対して結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表9に挙げるように設計した。

50

【 0 3 7 5 】

【 表 9 】

表9：抗CD3及び抗EGFRvIII種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
708/707	V90F5 HL x I2C HL
680/679	V96A9 HL x I2C HL
694/693	V98B11 HL x I2C HL
722/721	V11A11 HL x I2C HL
736/735	V11F6 HL x I2C HL
750/749	V11G7 HL x I2C HL
764/763	V17F5 HL x I2C HL
778/777	V11A4 HL x I2C HL
792/791	V17C8 HL x I2C HL
806/805	V17G9 HL x I2C HL
820/819	V17B11 HL x I2C HL
834/833	V17F11 HL x I2C HL
848/847	V16B7 HL x I2C HL
862/861	V17A4 HL x I2C HL
648/647	V207C12 HL x I2C HL

10

20

【 0 3 7 6 】

ヒト及びカニクイザルEGFRvIIIに対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えて6ヒスチジンタグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFRRと称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFRR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFRR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。別の選択肢として、コンストラクトを、標準的なプロトコルに従ってDHFRR欠失CHO細胞へ一過性にトランスフェクトした。

30

40

【 0 3 7 7 】

ヒトEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞株でFACS結合実験を行い、ヒトEGFRvIII抗原に対するその結合能力を評価した。カニクイザルEGFRvIIIでトランスフェクトされたCHO細胞を用いてカニクイザル組織に対する種間特異性を試験した。EGFRvIII及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体で行う細胞

50

障害性アッセイに対して、細胞株に同一の変化を適用する。これ以外は、実施例 4 及び 5 で述べるようにしてアッセイを行った。

【0378】

図 39 に示すように、作製された E G F R v I I I 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖抗体は、ヒト及びカニクイザル両方の抗原に対する結合を示し、完全に種間特異的であることが証明された。

【0379】

図 40 に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、ヒト C D 8 + 細胞によって誘発されたヒト E G F R v I I I 陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x によって誘発されたカニクイザル E G F R v I I I 陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。ネガティブコントロールとしては、関連性のない二重特異性単鎖抗体を用いた。

【0380】

27. I g E 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

27. 1 ヒト及びマカク膜結合型 I g E のクローン化及び発現

ラムダ軽鎖を合成、分泌する自然重鎖欠損変異骨髓腫細胞株であるマウス細胞株 J 5 8 L (I n t e r l a b P r o j e c t , I s t i t u t o N a z i o n a l e p e r l a R i c e r c a s u l C a n c r o , ジェノバ, イタリア、より入手、E C A C C 8 8 0 3 2 9 0 2) を用い、ヒト及びマカク I g E のそれぞれの膜結合型重鎖変異体で補完した。そのようなコンストラクトを作製するために、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって合成分子を得た (コンストラクトのヌクレオチド配列を配列番号 5 9 5 及び 5 9 4 に挙げる)。これらのコンストラクトでは、ヒト及びマカク C D 3 イプシロン鎖に対するコード配列が、それぞれ I g E のヒト膜貫通領域と融合していた。V H 鎖の組み込まれた特異性は、ハプテン (4 - ヒドロキシ - 3 - ニトロ - フェニル) アセチル (N P) に対して指向されている。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位、及び免疫グロブリンリーダー、及び D N A の最初と最後に制限部位を含むようにも設計した。導入された制限部位は、5' 末端に E c o R I 及び 3' 末端に S a l I であり、p E F - D H F R と称する発現プラスミドへのクローン化工程に利用した。配列の確認後 (マカク: X M _ 0 0 1 1 1 6 7 3 4 アカゲザル (m a c a c a m u l a t t a) I g イプシロン C 領域、m R N A ; ヒト: N C _ 0 0 0 0 1 4 ヒト (H o m o s a p i e n s) 第 1 4 番染色体、全配列、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) 、このプラスミドを用いて上述のようにして C H O / d h f r - 細胞をトランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R . J . (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5 , 5 3 7 - 5 6 6 、の記載に従って実施する。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (M T X) の濃度を最大 2 0 n M M T X までの最終濃度へ上昇させることによって誘発する。

【0381】

27. 2 I g E 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 3 抗原に対して結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類 I g E 抗原に対して結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表 10 に挙げるように設計した。

【0382】

【表 10】

表 10 : 抗 CD 3 及び抗 I g E 種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1549/1548	IgE G9 HL x I2C HL
1547/1546	IgE G9 HL x F12Q HL
1545/1544	IgE G9 HL x H2C HL
1555/1554	IgE G9 LH x I2C HL
1553/1552	IgE G9 LH x F12Q HL
1551/1550	IgE G9 LH x H2C HL
1529/1528	IgE D4 LH x I2C HL
1527/1526	IgE D4 LH x F12Q HL
1525/1524	IgE D4 LH x H2C HL
1523/1522	IgE D4 HL x I2C HL
1521/1520	IgE D4 HL x F12Q HL
1519/1518	IgE D4 HL x H2C HL
1557/1556	H2C HL x IgE-G9 HL
1559/1558	F12Q HL x IgE-G9 HL
1567/1566	IgE G9 LH x I2C LH
1561/1560	I2C HL x IgE G9 HL
1563/1562	I2C HL x IgE G9 LH
1565/1564	I2C LH x IgE G9 LH

【0383】

ヒト及びマカク I g E に対して種間特異的である可変軽鎖 (L) 及び可変重鎖 (H) ドメイン、並びにヒト及びマカク CD 3 に対して種間特異的である CD 3 特異的 V H 及び V L の組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて 19 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えて 6 ヒスチジンタグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、p E F - D H F R と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために D H F R 欠失 C H O 細胞へトランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R. J. (1990) M e t h o d s E n z y m o l. 185, 537 - 566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (M T X) の濃度を最大 20 n M M T X までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。別の選択肢として、コンストラクトを、標準的なプロトコルに従って D H F R 欠失 C H O 細胞へ一過性にトランスフェクトした。

【0384】

ヒトIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞株でFACS結合実験を行い、ヒトIgEに対するその結合能力を評価した。マカクIgEでトランスフェクトされたJ558L細胞を用いてマカクIgE陽性細胞に対する種間特異性を試験した。J558L細胞株は、IgE及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体で実施した細胞障害性アッセイにも用いた。この結合実験並びに細胞障害性アッセイは上述のようにして実施した。

【0385】

図41に示すように、作製されたIgE及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体は、ヒト及びカニクイザル両方の抗原に対する結合を示し、完全に種間特異的であることが証明された。

10

【0386】

図42に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、ヒトCD8+細胞によって誘発されたヒトIgE陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカクT細胞株4119LnPxによって誘発されたマカクIgE陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。ネガティブコントロールとしては、関連性のない二重特異性単鎖抗体を用いた。

【0387】

28. CD44及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

28. 1 ヒトCD44を発現するCHO細胞の作製

GenBank（受託番号AJ251595）で公開されているヒトCD44のコード配列で、CD44v6エクソンも含むものを、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いてヒトCD44タンパク質のコード配列及び停止コドンを含むように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号608及び609に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはEcoRI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローニングの手順に利用した。遺伝子合成断片は、EcoRI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載された）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローニングした。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

20

30

40

【0388】

28. 2 v6エクソンを持たないヒトCD44を発現するCHO細胞の作製

GenBank（受託番号AJ251595）で公開されているヒトCD44のコード配列で、v6エクソンをコードする配列が欠失したものを、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いてv6エクソンを持たないヒトCD44タンパク質のコード配列及び停止コドンを含むように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号610及び611に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはEcoRI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローニングの手順に利用した。遺伝子合成断片は、E

50

o R I 及び S a l I を介して、p E F - D H F R (p E F - D H F R については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0 (2 0 0 1) 1 4 1 - 1 5 0、に記載されている) と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (S a m b r o o k, M o l e c u l a r C l o n i n g ; A L a b o r a t o r y M a n u a l , 3 r d e d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o u r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o u r , N e w Y o r k (2 0 0 1)) 。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために D H F R 欠失 C H O 細胞へトランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R . J . (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5 , 5 3 7 - 5 6 6、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (M T X) の濃度を最大 2 0 n M M T X までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0389】

28. 3 マカク C D 4 4 を発現する C H O 細胞の作製

G e n B a n k (受託番号 X M _ 0 0 1 1 1 5 3 5 9) で公開されているマカク C D 4 4 のコード配列で、C D 4 4 v 6 エクソンも含むものを、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。(コンストラクトの c D N A 及びアミノ酸配列を配列番号 6 1 2 及び 6 1 3 に挙げる)。用いたコンストラクトにおいて、コード配列は、C D 4 4 タンパク質のシグナルペプチドの 5 番目のアミノ酸のコードンの第 1 位での点変異以外はマカク C D 4 4 に対応しており、その結果、ヒト配列に対応するアルギニンからトリプトファンへの変異が得られる。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位、及び断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5' 末端には E c o R I 及び 3' 末端には S a l I であり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、次に、E c o R I 及び S a l I を介して、p E F - D H F R (p E F - D H F R については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0 (2 0 0 1) 1 4 1 - 1 5 0、に記載されている) と称するプラスミドへクローン化した。このプラスミドの配列が確認されたクローンを用いて、上述のように C H O / d h f r - 細胞をトランスフェクトした。

【0390】

28. 4 C D 4 4 v 6 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 3 イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類 C D 4 4 v 6 に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表 1 1 に挙げるように設計する。

【0391】

【表 1 1】

表 1 1 : 抗 C D 3 及び抗 C D 4 4 v 6 種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1589/1588	CD44-A8LHxI2C HL
1587/1586	CD44-A8HLxI2C HL

【0392】

ヒト及びマカク C D 4 4 に対して種間特異的である可変軽鎖 (L) 及び可変重鎖 (H) ドメイン、並びにヒト及びマカク C D 3 に対して種間特異的である C D 3 特異的 V H 及び V L の組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成

断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒスチジン₆-タグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR (pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている) と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大20 nM MTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

10

【0393】

28. 5. 二重特異性単鎖抗体分子の発現及び精製

20

二重特異性単鎖抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 中で発現させた。DHFR欠失CHO細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20 nM MTXの最終濃度まで増加する濃度のMTXを添加することによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQPF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0 mMを含む; HyClone) により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。別の選択肢として、コンストラクトを一過性にHEK293細胞中で発現させた。トランスフェクションは、293fectin試薬 (Invitrogen, #12347-019) を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。

30

【0394】

クロマトグラフィにはAkt a (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファーA (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速3 ml/分でカラム (10 ml) に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール) の以下に示す2段階の勾配:

40

段階1: 6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2: 6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールのした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン) 又はMerck (ダルムシュタット) より購入した。

【0395】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー (25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2) で平衡状態としたHiLoad 16/60 Su

50

perdex 200 分取グレードカラム (GE/アマーシャム) 上で実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速 1 ml/分) を標準的な SDS-PAGE 及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した (分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD 280 nm を用いて測定した。

【0396】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質は、還元性条件下、4-12%ビストリスゲル (Invitrogen) をプレキャストした SDS PAGE で分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量は MultiMark タンパク質スタンダード (Invitrogen) を用いて決定する。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた (Invitrogen プロトコル)。SDS-PAGE によって測定された単離したタンパク質の純度は >95% であった。

10

【0397】

PBS 中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性単鎖抗体の分子量は約 52 kDa である。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

【0398】

ウエスタンブロットは、Optitran (登録商標) BA-S83 膜及び Invitrogen Blot Module を用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。用いた抗体は、ヒスチジン6-タグ (Penta His, Qiagen) とアルカリホスファターゼ (AP) で標識したヤギ抗マウス Ig (Sigma) に対するものであり、基質として BCIP/NBT (Sigma) を用いた。精製された二重特異性単鎖抗体に対応する 52 kD に単一のバンドを検出した。

20

【0399】

28.6 CD44 及び CD3 種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

ヒト及びマカク CD44 並びに CD3 のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS 分析を実施した。この目的のために、実施例 28.1 で述べるようにヒト CD44 でトランスフェクトされた CHO 細胞、及びヒト CD3 陽性 T 細胞白血病細胞株 HPB-ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483) を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例 28.3 で述べる作製されたマカク CD44 トランスフェクタント、及びマカク PBMC (マカク PBMC の調製は、標準的なプロトコルに従い、マカクザルからの末梢血液の Ficoll 勾配遠心分離によって行った) を用いて試験した。CD44 の v6 エクソンに対する特異性は、実施例 28.2 で述べるようにして作製された v6 エクソンを持たないヒト CD44 を発現するトランスフェクトされた CHO 細胞を用いて試験した。それぞれの細胞株又はマカク PBMC の 200,000 個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト (5 µg/ml) の精製タンパク質 50 µl と共に、又は市販の抗 CD44 抗体 (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク; 同じく 5 µg/ml) の 50 µl と共に、30 分間氷上にてインキュベートした。細胞を 2% FCS を含む PBS で 2 回洗浄し、マウス抗 His 抗体 (Penta His 抗体; Qiagen; 2% FCS を含む PBS 50 µl 中にて 1:20 に希釈) でコンストラクトの結合を検出した。市販の抗 CD44 抗体と共にインキュベートしたサンプルについては抗 His 抗体を省略した。洗浄後、結合した抗 His 抗体又は抗 CD44 抗体を、2% FCS を含む PBS で 1:100 に希釈したフィコエリトリンに結合した Fc ガンマ特異的抗体 (Dianova) で検出した。2% FCS を含む PBS をネガティブコントロールとして用いた。

30

40

【0400】

フローサイトメトリーは FACS-Calibur 装置上で実施し; Cell Quest ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS 染色及び蛍光強度の測定は、

50

Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strobe, Wiley-Interscience, 2002)に記載のようにして実施した。

【0401】

CD44に対して種間特異的でありヒト及び非チンパンジー霊長類CD3に対して種間特異的である上記で挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図43に示すように明らかに検出可能であった。FACS分析では、対応するネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びCD44への結合を示した。二重特異性抗体のヒト及びマカクCD3並びにCD44抗原への種間特異性が実証された。

【0402】

CD44のv6エクソンに対する特異性は、図44より、v6エクソンを持たないヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞に対するコンストラクトの結合が存在しないことによって示された。これらの細胞によるCD44の発現は、これらの細胞、及び完全長ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞に対する市販の抗CD44抗体の結合が同等であることによって示された。

【0403】

28.7 CD44及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性
作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例28.1で述べるCD44陽性細胞株を用いるクロム51 (^{51}Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMCを用いた。

【0404】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のようにして実施した：
ペトリ皿（直径145mm、Greiner）を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により37℃にて1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン/ $10\%\text{FCS}/\text{IL-2}$ $200\text{U}/\text{ml}$ （Proleukin, Chiron）を含む 120ml のRPMI1640中、 $3-5\times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を $20\text{U}/\text{ml}$ とし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0405】

CD4+T細胞及びCD56+NK細胞を標準的なプロトコルに従って除去することにより、CD8+細胞障害性Tリンパ球（CTLs）を濃縮した。

【0406】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、 $50\%\text{FCS}$ を含む最終容量 $100\mu\text{l}$ のRPMI中、 1.1×10^6 個の ^{51}Cr にて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を 5ml のRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量 $250\mu\text{l}$ の補足RPMI（上記と同様）中にて、 $10:1$ のE:T比で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism4（バージョン4.02, GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 >0.90 である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

10

20

30

40

50

【0407】

図45に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトは、刺激されたヒトCD4／CD56除去PBMCによって誘発されたヒトCD4陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

【0408】

29. CD30及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

29.1 ヒトCD30を発現するCHO細胞の作製

GenBank（受託番号M83554）で公開されているヒトCD30のコード配列を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて成熟ヒトCD30タンパク質のコード配列及び停止コドンを含むように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号1103及び1104に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはEcoRI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。内部制限部位を遺伝子合成断片のコード配列のサイレント変異によって除去した（BsrGI：ヌクレオチド243TからCへ；SalI：ヌクレオチド327AからGへ；SalI：ヌクレオチド852AからGへ；EcoRI：ヌクレオチド1248TからCへ）。遺伝子合成断片は、EcoRI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nM MTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0409】

29.2 マカクCD30を発現するCHO細胞の作製

マカクCD30のcDNA配列を、標準的なプロトコルに従って調製したマカクザル骨髄からのcDNAに4回のPCRをセットで施すことによって得た。以下の反応条件：94℃で2分間の1サイクル、続いて94℃で1分間、55℃で1分間、及び72℃で1分間の35サイクル、続いて72℃で3分間の最終サイクル、を用い、並びに以下のプライマー：

6. フォワードプライマー：5'-cctcgccgcgctgggactgc-3'

リバープライマー：5'-ggtgccactggagggttccttgc-3'

7. フォワードプライマー：5'-gcttcttccattctgtctgcccagcagg-3'

リバープライマー：5'-ggtaggggacacagcggggcacaggagtgg-3'

8. フォワードプライマー：5'-cctggcatgatctgtgccacatcaggcc-3'

リバープライマー：5'-gcgttgagctcctcctgggtctgg-3'

9. フォワードプライマー：5'-cctcccrgcccaagctagagcttgg-3'

リバープライマー：5'-cgactctagagcggccgctcactttcc

a g a g g c a g c t g t g g g c a a g g g g t c t t c t t t c c c t t c c - 3'

を用いた。

【0410】

PCR反応は、PCRグレードのベタインを最終濃度1Mまで添加した状態で実施した。これらのPCRによって4個のオーバーラップ断片が作製され、これらを標準的なプロトコルに従ってPCRプライマーを用いて単離及び配列決定し、それによって、リーダーペプチドのコドン12から成熟タンパク質のコドン562までのマカクCD30をコードするcDNA配列の部分を得た。マカクCD30の発現のためのコンストラクトを作製するために、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によってcDNA断片を得た（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号1105及び1106に挙げる）。このコンストラクトでは、リーダーペプチドのアミノ酸12から成熟CD30タンパク質のアミノ酸562までのマカクCD30のコード配列が、対応するヒトのコード配列を置換する形でヒトCD30のコード配列へ融合された。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位、並びにマカクCD30の全細胞外ドメイン、マカクCD30膜貫通ドメイン、及びマカク-ヒトキメラ細胞内CD30ドメインをコードするcDNAを含む断片の最初と最後に制限部位を含むようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。次に遺伝子合成断片は、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている）と称するプラスミドへクローン化した。上述のように、このプラスミドの配列が確認されたクローンを用いて、CHO/dhfr-細胞をトランスフェクトした。

【0411】

29. 3 CD30及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

種間特異的結合分子のクローン化

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及び非チンパンジー霊長類CD30に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表12に挙げるように設計した。

【0412】

【表12】

表12：抗CD3及び抗CD30種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1126/1125	M911HLxI2CHL
1139/1138	SR3HLxI2CHL

【0413】

ヒト及びマカクCD30に対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて対応する二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えて6ヒスチジンタグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に

利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR (pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている) と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大20 nM MTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

10

【0414】

29. 4 二重特異性単鎖抗体分子の発現及び精製

二重特異性単鎖抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 中で発現させた。DHFR欠失CHO細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20 nM MTXの最終濃度まで増加する濃度のMTXを添加することによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQPF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0 mMを含む; HyClone) により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。別の選択肢として、コンストラクトを一過性にHEK293細胞中で発現させた。トランスフェクションは、293fectin試薬 (Invitrogen, #12347-019) を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。

20

【0415】

クロマトグラフィにはAkt a (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファーA (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速3 ml/分でカラム (10 ml) に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB (20 mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール) の以下に示す2段階の勾配：

30

段階1：6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2：6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールのした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン) 又はMerck (ダルムシュタット) より購入した。

40

【0416】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー (25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2) で平衡状態としたHiLoad 16/60 Superdex 200 分取グレードカラム (GE/アマーシャム) 上で実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速1 ml/分) を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した (分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD_{280 nm}を用いて測定した。

50

【0417】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質は、還元性条件下、4 - 12 %ビストリスゲル (Invitrogen) をプレキャストしたSDSPAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード (Invitrogen) を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた (Invitrogenプロトコル)。SDS - PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95%であった。

【0418】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性単鎖抗体の分子量は約52kDaである。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

10

【0419】

ウエスタンブロットは、Optitran (登録商標) BA - S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。用いた抗体は、Hisタグに対して指向されたもの (PentaHis, Qiagen)、及びアルカリホスファターゼ (AP) で標識したヤギ抗マウスIg (Sigma)、及び基質としてのBCIP/NBT (Sigma) であった。精製された二重特異性単鎖抗体に対応する52kDに単一のバンドを検出した。

【0420】

29. 5 CD30及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

20

ヒト及びマカクCD30並びにCD3のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のために、実施例29. 1で述べるようにヒトCD30でトランスフェクトされたCHO細胞、ヒトCD30陽性B細胞株MEC - 1 (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC497)、及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB - ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483) を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例29. 2で述べる作製されたマカクCD30トランスフェクタント、及びマカクT細胞株4119LnPx (Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen - Nuerenberg、よりご提供頂いた; Knappe A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256 - 61、にて発表) を用いて試験した。それぞれの細胞株の200, 000個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト (5 µg/ml) の精製タンパク質50 µlと共に、30分間氷上にてインキュベートした。細胞を2% FCSを含むPBSで2回洗浄し、マウスPentaHis抗体 (Qiagen; 2% FCSを含むPBS 50 µl中にて1:20に希釈) でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2% FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体 (Dianova) で検出した。2% FCSを含むPBSをネガティブコントロールとして用いた。

30

【0421】

フローサイトメトリーはFACS - Calibur装置上で実施し; CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley - Interscience, 2002) に記載のようにして実施した。

40

【0422】

CD30に対して種間特異的であり、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3に対して種間特異的である上記に挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図46に示すように明らかに検出可能であった。FACS分析では、ネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びCD30への結合を示した。二重特異性抗体のヒト及びマカク

50

C D 3 並びに C D 3 0 抗原に対する種間特異性が実証された。

【0423】

29. 6 C D 3 0 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例 29. 2 で述べたヒト C D 3 0 陽性 B 細胞株 M E C - 1 (D S M Z , ブラウンシュバイク , A C C 4 9 7) 及びマカク C D 3 0 でトランスフェクトされた C H O 細胞を用いるクロム 5 1 (^{51}Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。エフェクター細胞としては、刺激されたヒト C D 4 / C D 5 6 除去 P B M C 、又はマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x をそれぞれ用いた。

【0424】

刺激されたヒト P B M C の作製は以下のようにして実施した：

ペトリ皿（直径 145mm、Greiner bio-one GmbH, クレムスミュンスター）を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗 C D 3 特異的抗体（例：O K T 3 , O t h o c l o n e ）により 37°C にて 1 時間コーティングした。非結合タンパク質を P B S による 1 段階の洗浄によって除去した。新鮮な P B M C を、F i c o l l 勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン / 10% F C S / I L - 2 20 U / ml (P r o l e u k i n , C h i r o n) を含む 120ml の R P M I 1640 中、 $3 - 5 \times 10^7$ 個の P B M C を、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、R P M I 1640 で 1 回洗浄した。I L - 2 を添加して最終濃度を 20 U / ml とし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度 1 日培養した。

【0425】

標準的なプロトコルに従って C D 4 + T 細胞及び C D 5 6 + N K 細胞を除去することにより、C D 8 + 細胞障害性 T リンパ球 (C T L s) を濃縮した。

【0426】

標的細胞を P B S で 2 回洗浄し、50% F C S を含む最終容量 $100\mu\text{l}$ の R P M I 中、 11.1MBq の ^{51}Cr にて 37°C で 60 分間標識した。続いて、標識された標的細胞を 5ml の R P M I で 3 回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96 ウェルプレート上、全容量 $250\mu\text{l}$ の補足 R P M I （上記のように）中にて、E : T 比 10 : 1 で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びその 3 倍希釈物 20 個を適用した。アッセイの時間は、M E C - 1 及びヒト C D 4 / C D 5 6 除去 P B M C を用いるアッセイに対しては 4 時間、マカク C D 3 0 でトランスフェクトされた C H O 細胞及びマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x を用いるアッセイに対しては 18 時間とした。細胞障害性は、最大溶解（トリトン X の添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて 4 個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、W i z a r d 3 " ガンマカウンター (P e r k i n E l m e r L i f e S c i e n c e s G m b H , ケルン , ドイツ) を用いて実施した。実験データの解析は、Windows (登録商標) 用 P r i s m 4 (バージョン 4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国) を用いて実施した。このソフトウェアによって決定される S 字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 > 0.90 である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

【0427】

図 47 に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されたヒト C D 4 / C D 5 6 除去 P B M C によって誘発されたヒト C D 3 0 陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカク T 細胞株 4 1 1 9 L n P x によって誘発されたマカク C D 3 0 陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

【0428】

30. H E R 2 及び C D 3 種間特異的二重特異性単鎖分子の作製並びに同定

30. 1 ヒト H E R 2 を発現する C H O 細胞の作製

G e n B a n k (受託番号 X 0 3 3 6 3) で公開されているヒト H E R 2 のコード配列

を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、そのリーダーペプチドを含むヒトHER2タンパク質のコード配列が含まれるように設計した（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号1107及び1108に挙げる）。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

10

【0429】

20

30. 2 マカクHER2の細胞外ドメインを発現するCHO細胞の作製

上述のヒトHER2のコード配列を、GenBank（受託番号XP_001090430）で公開されているようにマカクHER2タンパク質のアミノ酸123乃至1038をコードするように修飾した。このキメラタンパク質に対するコード配列は、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た（コンストラクトのcDNA及びアミノ酸配列を配列番号1109及び1110に挙げる）。遺伝子合成断片は、コンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位、及び断片の最初と最後に制限部位を含むようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはXbaI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、XbaI及びSalIを介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへクローン化した。このプラスミドの配列が確認されたクローンをを用いて、上述のようにCHO/dhfr⁻細胞をトランスフェクトした。

30

【0430】

30. 3 HER2及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

種間特異的結合分子のクローン化

全般的には、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及びマカクHER2に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表13に挙げるように設計する。

40

【0431】

【表 1 3】

表 1 3：抗CD 3 及び抗HER 2 種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1153/1152	2D3 HL x I2C HL
1167/1166	3E1 HL x I2C HL

10

【0 4 3 2】

ヒト及びマカクHER 2 に対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD 3 に対して種間特異的であるCD 3 特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えてそれぞれの二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えて6ヒスチジンタグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（MTX）の濃度を最大20nMMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

20

30

【0 4 3 3】

30. 4 二重特異性単鎖抗体分子の発現及び精製

二重特異性単鎖抗体分子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）中で発現させた。DHFR欠失CHO細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J.（1990）Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20nM MTXの最終濃度まで増加する濃度のMTXを添加することによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQPF CHO液体大豆培地（0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む；HyClone）により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させる。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-80℃で保存した。トランスフェクションは、293fectin試薬（Invitrogen, #12347-019）を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。

40

【0 4 3 4】

クロマトグラフィにはAkt a（登録商標）Explorer System（GE Health Systems）及びUnicorn（登録商標）Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate（登録商標）（Merck）を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマ

50

トグラフィ（「IMAC」）を実施した。バッファーA（20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl）でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清（500ml）を流速3ml／分でカラム（10ml）に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB（20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl、0.5M イミダゾール）の以下に示す2段階の勾配：

段階1：6カラム分の容量の20％バッファーB

段階2：6カラム分の容量の100％バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールのした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma（ダイゼンホフエン）又はMerck（ダルムシュタット）より購入した。

10

【0435】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー（25mM クエン酸塩、200mM リジン、5％グリセロール、pH7.2）で平衡状態としたHiLoad16／60 Superdex 200 分取グレードカラム（GE／アマーシャム）上で実施した。溶離したタンパク質サンプル（流速1ml／分）を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した（分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200）。タンパク質濃度は、OD280nmを用いて測定した。

20

【0436】

精製した二重特異性単鎖抗体タンパク質は、還元性条件下、4-12％ビストリスゲル（Invitrogen）をプレキャストしたSDSPAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード（Invitrogen）を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた（Invitrogenプロトコル）。SDS-PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95％であった。

【0437】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性単鎖抗体の分子量は約52kDaである。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

【0438】

ウエスタンブロットは、Optitran（登録商標）BA-S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性単鎖抗体タンパク質抗体の検出には、抗Hisタグ抗体を用いた（PentaHis, Qiagen）。アルカリホスファターゼ（AP）で標識したヤギ抗マウスIg抗体（Sigma）を二次抗体として用い、BCIP／NBT（Sigma）を基質として用いた。精製された二重特異性単鎖抗体に対応する52kDに単一のバンドを検出した。

30

【0439】

30.5 HER2及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

40

ヒト及びマカクHER2並びにCD3のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のために、実施例30.1で述べるようにヒトHER2でトランスフェクトされたCHO細胞、及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL（DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483）を用いてヒト抗原への結合について試験する。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例30.2で述べる作製されたマカクHER2トランスフェクタント、及びマカクT細胞株4119LnPx（Prof. Fickenscher, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg、よりご提供頂いた；Knapp A, et al., and Fickenscher H., Blood 2000, 95, 3256-61、にて発表）を用いて

50

試験した。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクト(2 µg/ml)の精製タンパク質50 µlと共に、30分間氷上にてインキュベートした。2% FCSを含むPBSで細胞を2回洗浄し、マウス抗His抗体(PentaHis抗体; Qiagen; 2% FCSを含むPBS 50 µl中にて1:20に希釈)でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2% FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体(Dianova)で検出した。2% FCSを含むPBSを、T細胞株並びにHER2でトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。

【0440】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し; CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った(Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002)に記載のようにして実施した。

【0441】

HER2に対して種間特異的であり、ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3に対して種間特異的である上記に挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図48に示すように明らかに検出可能であった。FACS分析では、それぞれのネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトがCD3及びHER2への結合を示した。二重特異性抗体のヒト及びマカクCD3並びにHER2抗原に対する種間特異性が実証された。

【0442】

30. 6 HER2及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例30.1及び30.2で述べるHER2陽性B細胞株を用いるクロム51(⁵¹Cr)放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。エフェクター細胞としては、それぞれの図に示すように、刺激されていないヒトCD56除去PBMC、又はマカクT細胞株4119LnPxを用いた。

【0443】

刺激されていないヒトCD56除去PBMCの作製は以下のようにして実施した：新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液(30乃至50 mlのヒト血液)から単離した。CD56+NK細胞の除去は標準的なプロトコルに従って実施した。

【0444】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50% FCSを含む最終容量100 µlのRPMI中、11.1 MBqの⁵¹Crにて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5 mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250 µlの補足RPMI(上記のように)中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子1 µg/ml及びその5倍希釈物15乃至21個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解(トリトンXの添加)と自然溶解(エフェクター細胞なし)との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター(Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ)を用いて実施した。実験データの解析は、Windows(登録商標)用Prism4(バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国)を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線のR²値は、通常>0.90である。この解析プログラムによって算出されるEC₅₀値を用いて生物活性を比較した。

【0445】

図49に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されていないCD56除去PBMCによって誘発されたヒトHER2陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカクT細胞株4119LnPxによって誘発されたマカクHER2陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

【0446】

31. N末端アミノ酸1-27に対応するコンテクスト非依存性CD3イプシロンエピトープに基づくアフィニティ法による種間特異的二重特異性単鎖分子の精製

31. 1 単離されたN末端アミノ酸1-27に対応するコンテクスト非依存性ヒトCD3イプシロンエピトープを提示するアフィニティカラムの作製

上述のヒト免疫グロブリンIgG1のヒンジ及びFcガンマ領域と融合したヒトCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸から成るコンストラクト1-27CD3-Fc（実施例3；組換え融合タンパク質のcDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号350及び349に挙げる）の発現のためのプラスミドを、このコンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート(MTX)の濃度を最大20nMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地(0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン4.0mMを含む；HyClone)により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。融合タンパク質の単離のために、ウシ、ウマ、及びマウス血清タンパク質との交差反応が最小限である市販のアフィニティ精製ヤギ抗ヒトIgGfc断片特異的抗体(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.)を用いて、ヤギ抗ヒトFcアフィニティカラムを標準的なプロトコルに従って調製した。このアフィニティカラムを用いて、Akt a Explorer System (GE アマーシャム)上にて細胞培養物の上清から融合タンパク質を単離し、クエン酸で溶離した。溶離液を中和し、濃縮した。アミンを含まないカップリングバッファーに対する透析の後、精製された融合タンパク質を、N-ヒドロキシスクシンイミドNHS活性化1ml HiTrapカラム (GE アマーシャム)へカップリングさせた。

【0447】

カップリング後、残留NHS基をブロックし、カラムを洗浄し、0.1%ナトリウムアジドを含有する保存バッファー中にて5℃で保存した。

【0448】

31. 2 ヒトCD3ペプチドアフィニティカラムを用いた種間特異的二重特異性単鎖分子の精製

種間特異的二重特異性単鎖分子を発現する細胞の細胞培養物の上清200mlに0.2µmの滅菌ろ過を施し、Akt a Explorer System (GE アマーシャム)を用いてCD3ペプチドアフィニティカラムへ適用した。

【0449】

次にカラムをpH7.4のリン酸緩衝生理食塩水PBSで洗浄し、非結合サンプルを洗い流した。20mMクエン酸及び1M塩化ナトリウムを含むpH3.0の酸性バッファーで溶離を行った。溶離されたタンパク質は、フラクションコレクターのコレクションチューブ(collection tubes)内に収容しておいたpH8.3の1MトリスヒドロキシメチルアミンTRISで直ちに中和した。

【0450】

タンパク質の分析は、SDS PAGE及びウエスタンブロットで行った。

【0451】

SDS PAGEでは、ビストリスゲル4-12%を用いる(Invitrogen)。ランニングバッファーは1×MES-SDS-Puffer (Invitrogen)。

とした。タンパク質スタンダードとしては、15 μ l の染色 Sharp Protein Standard (Invitrogen) を適用した。電気泳動は、最大200ボルト120mAにて60分間行った。ゲルを脱塩水で洗浄し、クーマシーで1時間染色した。ゲルの脱染は脱塩水中で3時間行う。画像の撮影は、Syngene Gelドキュメンテーションシステムで行う。

【0452】

ウェスタンブロットでは、2倍のSDS PAGEゲルを作製し、タンパク質をニトロセルロース膜上にエレクトロブロットした。この膜をPBS中の2%ウシ血清アルブミンでブロックし、ビオチン化マウスPentahis抗体(Qiagen)と共にインキュベートした。二次試薬としては、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ複合体(DAKO)を用いた。ブロットは、BCIP/NBT基質溶液(Pierce)で発色させた。

10

【0453】

図50、51、及び52に示すように、上述のようにしてヒトCD3ペプチドアフィニティカラムを用いることにより、細胞培養物の上清からの二重特異性単鎖分子の効率の高い精製が可能となる。二重特異性単鎖分子に含まれる種間特異的抗CD3単鎖抗体は、従って、その特異的結合特性により、精製目的のためだけに結合されるタグをまったく必要としない種間特異的二重特異性単鎖分子のための効率的で汎用的な1段階精製法を可能とする。

【0454】

20

32. 種間特異的二重特異性単鎖分子のための汎用的な薬物動態アッセイ

32.1 薬物動態アッセイに用いる1-27CD3-Fcの作製

ヒト免疫グロブリンIgG1のヒンジ及びFcガンマ領域と融合したヒトCD3イプシロン鎖の1-27N末端アミノ酸のコード配列を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た(組換え融合タンパク質のcDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号1111及び1112に挙げる)。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて成熟ヒトCD3イプシロン鎖の細胞外部分の最初の27個のアミノ酸のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒトIgG1のヒンジ領域及びFcガンマ部分のコード配列、並びに停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、この融合タンパク質をコードするcDNAの最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはEcoRI及び3'末端にはSalIであり、以下のクローニングの手順に利用した。遺伝子合成断片は、EcoRI及びSalIを介して、pEF-DHFR(pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている)と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローニングした。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した(Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにDHFR欠失CHO細胞へトランスフェクトした。DHFR欠失CHO細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート(MTX)の濃度を最大20nMTXまでの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。2継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地(0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン4.0mMを含む; HyClone)により、ローラーボトル中、回収まで7日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を-20℃で保存した。融合タンパク質の単離のために、ウシ、ウマ、及びマウス血清タンパク質との交差反応が最小限である市

30

40

50

販のアフィニティ精製ヤギ抗ヒトIgGfc断片特異的抗体（Jackson Immuno Research Europe Ltd.）を用いて、ヤギ抗ヒトfcアフィニティカラムを標準的なプロトコルに従って調製した。このアフィニティカラムを用いて、Akt Explorer System（GE アマーシャム）上にて細胞培養物の上清から融合タンパク質を単離し、クエン酸で溶離した。溶離液を中和し、濃縮した。

【0455】

32. 2 種間特異的二重特異性単鎖分子のための薬物動態アッセイ

このアッセイは、Sektor Imagerデバイス（MSD）上で測定するカーボンプレート上のルテニウム標識検出を用いるECL-ELISA法に基づくものである。第一の工程では、カーボンプレート（MSD High Bind Plate 96ウェル Cat: L15XB-3）を、50 ng/mlの実施例32.1で述べる精製した1-27 CD3-Fcにより5 µl/ウェルでコーティングした。次に、プレートを25℃で一晩乾燥した。続いて、PBS中の5% BSA（Paesel & Lorei #100568）150 µl/ウェルにより、25℃で1時間、攪拌しながら（700 rpm）インキュベーター中にてプレートをブロックした。次の工程では、PBS中の0.05% Tweenによりプレートを3回洗浄した。PBS中50%のマカク血清中での検量線を、このアッセイで検出すべきそれぞれの種間特異的二重特異性単鎖分子100 ng/mlから始めて段階的な1:4希釈によって作成した。品質管理（QC）サンプルを、PBS中50%のマカク血清中にて、予想されるサンプル血清濃度に応じて、それぞれの種間特異的二重特異性単鎖分子の1 ng/mlから50 ng/mlまでの範囲で調製した。スタンダード、QC、又は未知サンプルを10 µl/ウェルでカーボンプレートへ移し、25℃で90分間、振とうしながら（700 rpm）インキュベーター中でインキュベートした。続いてPBS中の0.05% Tweenによりプレートを3回洗浄した。検出には、25 µl/ウェルのペンタ-His-ビオチン抗体（Qiagen、PBS中の0.05% Tween中200 µg/ml）を添加し、25℃で1時間、振とうしながら（700 rpm）インキュベーター中でインキュベートした。第二の検出工程では、ストレプトアビジン-スルホタグ溶液（Streptavidin-SulfoTag solution）（MSD; Cat: R32AD-1; Lot: W0010903）を添加し、25℃で1時間、振とうしながら（700 rpm）インキュベーター中でインキュベートした。続いてPBS中の0.05% Tweenによりプレートを3回洗浄した。最後に、150 µl/ウェルのMSD Reading Buffer（MSD、Cat: R9ZC-1）を添加し、プレートをSektor Imagerデバイスで読み取った。

【0456】

図53及び54は、種間特異的二重特異性単鎖分子が、マカクザル血清サンプル中の種間特異的二重特異性単鎖分子の検出に使用可能であることを示している。二重特異性単鎖分子に含まれる種間特異的抗CD3単鎖抗体は、従って、その特異的結合特性により、種間特異的二重特異性単鎖分子の検出のための高感度である汎用的なアッセイを可能とする。上記に示すアッセイは、薬剤の開発に必要な正式な毒性試験に関連して使用することができ、種間特異的二重特異性単鎖分子の臨床的応用と関連する患者のサンプルの測定に容易に適合させることができる。

【0457】

33. カニクイザルからのEpCAMと融合した種々の非チンパンジー霊長類からのCD3イプシロンのN末端アミノ酸1-27である組換え膜貫通融合タンパク質の作製（1-27 CD3-EpCAM）

33.1 1-27 CD3-EpCAMのクローン化及び発現

種々の非チンパンジー霊長類（マーモセット、タマリン、リスザル）及びブタからCD3イプシロンを単離した。ヒト成体、コモンマーモセット（Callithrix jacchus）、ワタボウシタマリン（Saguinus oedipus）、コモンリスザル（Saimiri sciureus）、及び家畜ブタ（Sus scrofa; ネガティブコントロールとして用いた）のCD3イプシロン鎖のN末端アミノ酸1-27がFl

a g タグカニクイザル E p C A M の N 末端へ融合したもののコード配列を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た（組換え融合タンパク質の c D N A 配列及びアミノ酸配列を配列番号 3 5 1 乃至 3 6 0 に挙げる）。遺伝子合成断片は、標的発現ベクターに既に存在する 1 9 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列との正しいリーディングフレーム内での融合を可能とするための B s r G I 部位をまず含み、続いてフレームを揃えて成熟 C D 3 イプシロン鎖の細胞外部分の N 末端 1 - 2 7 アミノ酸のコード配列を、続いてフレームを揃えて F l a g タグのコード配列を、続いてフレームを揃えて成熟カニクイザル E p C A M 膜貫通タンパク質のコード配列を含むように設計した。遺伝子合成断片は、融合タンパク質をコードする c D N A の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端には B s r G I 及び 3'末端には S a l I であり、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、次に B s r G I 及び S a l I を介して、1 9 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドのコード配列をすでに含んでいる p E F - D H F R（p E F - D H F R については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0（2 0 0 1）1 4 1 - 1 5 0、に記載されている）と称するプラスミドの誘導体へ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。配列が確認されたプラスミドを用いて、コンストラクトの真核生物発現のために D H F R 欠失 C H O 細胞をトランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R . J .（1 9 9 0）M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5, 5 3 7 - 5 6 6、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート（M T X）の濃度を最大 2 0 n M M T X までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

10

20

【0 4 5 8】

標準的なプロトコルに従う F A C S アッセイにより、トランスフェクタントを、組換え膜貫通タンパク質の細胞表面発現について試験した。この目的のために、 2.5×10^5 個の細胞を、2 % F C S を含む P B S 中 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 F l a g M 2 抗体（S i g m a - A l d r i c h C h e m i e G m b H, タウフキルヘン, ドイツ） $50 \mu\text{l}$ と共に数多くインキュベートした。結合した抗体は、R - フィコエリトリンと結合したアフィニティ精製 F（a b'）2 断片、ヤギ抗マウス I g G、F c - ガンマ断片特異的、を 2 % F C S を含む P B S 中 1 : 1 0 0 に希釈したもの（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h E u r o p e L t d . , ニューマーケット, サフォーク, 英国）で検出した。フローサイトメトリーは F A C S - C a l i b u r 装置上で実施し、C e l l Q u e s t ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った（B e c t o n D i c k i n s o n b i o s c i e n c e s , ハイデルベルク）。F A C S 染色及び蛍光強度の測定は、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y（C o l i g a n , K r u i s b e e k , M a r g u l i e s , S h e v a c h a n d S t r o b e r , W i l e y - I n t e r s c i e n c e , 2 0 0 2）に記載のようにして実施した。

30

【0 4 5 9】

カニクイザル E p C A M、並びにヒト、マーモセット、タマリン、リスザル、及びブタの C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1 - 2 7 のそれぞれから成る F l a g タグ組換え膜貫通融合タンパク質の、トランスフェクトされた細胞上での発現は明らかに検出可能である（図 5 5）。

40

【0 4 6 0】

3 3 . 2 I g G 1 抗体の形での種間特異的抗 C D 3 単鎖抗体 I 2 C H L のクローン化及び発現

種間特異的単鎖抗 C D 3 抗体の結合の検出法を改良するために、I 2 C V H V L 特異性を、マウス I g G 1 及びマウスカッパ定常領域を有する I g G 1 抗体へ転換する。I g G 抗体の重鎖をコードする c D N A 配列を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて 1 9 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のコード配列を、続いてフレームを揃えて G e n B a n k

50

(受託番号 A B 0 9 7 8 4 9) で公開されているマウス I g G 1 の重鎖定常領域のコード配列又は G e n B a n k (受託番号 D 1 4 6 3 0) で公開されているマウスカッパ軽鎖定常領域のコード配列をそれぞれ含むように設計した。

【0461】

融合タンパク質をコードする c D N A の最初と最後に制限部位を導入した。制限部位は 5'末端に E c o R I 及び 3'末端に S a l I であり、以下のクローン化の手順に用いた。遺伝子合成断片は、E c o R I 及び S a l I を介し、重鎖コンストラクトに対しては p E F - D H F R (p E F - D H F R については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0 (2001) 141-150、に記載されている) と称するプラスミドへ、及び軽鎖コンストラクトに対しては p E F A D A (p E F A D A については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0 (2001) 141-150、に記載されている) と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。配列が確認されたプラスミドを用いて、軽鎖及び重鎖コンストラクトのそれぞれを、コンストラクトの真核生物発現のために D H F R 欠失 C H O 細胞へ共トランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R . J . (1990) M e t h o d s E n z y m o l . 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (M T X) の濃度を最大 20 n M M T X までの最終濃度へ、及びデオキシコホルマイシン (d C F) の濃度を最大 300 n M d C F までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。2 継代の静置培養後、細胞培養物の上清を回収して続い

10

20

【0462】

33. 3 I g G 1 抗体の形の種間特異的抗 C D 3 単鎖抗体 I 2 C H L の 1 - 27 C D 3 - E p C A M に対する結合

実施例 33. 1 で述べるカニクイザル E p - C A M に融合したヒト、マーモセット、タマリン、及びリスザルの C D 3 イプシロン鎖の N 末端アミノ酸 1 - 27 のそれぞれに対する作製した I 2 C I g G 1 コンストラクトの結合を、標準的なプロトコルに従って F A C S アッセイで試験した。この目的のために、 2.5×10^5 個の細胞を、実施例 33. 2 で述べる I 2 C I g G 1 コンストラクトを含む細胞培養物の上清 50 μ l 共に数多くインキュベートした。抗体の結合は、R - フィコエリトリンと結合したアフィニティ精製 F (a b') 2 断片、ヤギ抗マウス I g G、F c - ガンマ断片特異的、を 2 % F C S を含む P B S 中 1 : 100 に希釈したもの (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h E u r o p e L t d . , ニューマーケット, サフォーク, 英国) で検出した。フローサイトメトリーは F A C S - C a l i b u r 装置上で実施し、C e l l Q u e s t ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (B e c t o n D i c k i n s o n b i o s c i e n c e s , ハイデルベルク)。F A C S 染色及び蛍光強度の測定は、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y (C o l i g a n , K r u i s b e e k , M a r g u l i e s , S h e v a c h a n d S t r o b e r , W i l e y - I n t e r s c i e n c e , 2002) に記載のようにして実施した。

30

【0463】

図 56 に示すように、カニクイザル E p C A M に融合したブタの C D 3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1 - 27 から成るネガティブコントロールと比較して、カニクイザル E p C A M に融合したヒト、マーモセット、タマリン、又はリスザルの C D 3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1 - 27 から成る組換え膜貫通融合タンパク質を発現するトランスフェクタントに対する I 2 C I g G 1 コンストラクトの結合が観察された。従って、I 2 C の多霊長類 (m u l t i - p r i m a t e) 種間特異性が実証された。抗 F l a g M 2 抗体及び I 2 C I g G 1 コンストラクトによって得られたシグナルは同等であり、このことは、C D 3 イプシロンの N 末端アミノ酸 1 - 27 に対する種間特異的特異性 I 2 C の強い結合活性を示している。

40

【0464】

50

34. N末端His6タグを持つ及び持たないヒトCD3イプシロン鎖に対する種間特異的抗CD3結合分子I2Cの結合

CD3イプシロンに特異的である実施例33.2で述べる結合特異性I2Cを持つキメラIgG1抗体を、N末端His6タグを持つ及び持たないヒトCD3イプシロンに対する結合について試験した。実施例6.1で述べるHis6-ヒトCD3イプシロンで、及び実施例5.1で述べる野生型ヒトCD3イプシロンでそれぞれトランスフェクトされたEL4細胞株に対する抗体の結合を、FACSアッセイにより標準的なプロトコルに従って試験した。トランスフェクタントの 2.5×10^5 個の細胞を、I2C IgG1コンストラクトを含む細胞培養物の上清50 μ l共に、又は2%FCSを含むPBS中5 μ g/mlのそれぞれのコントロール抗体50 μ lと共にインキュベートした。ネガティブコントロールとしては適切なアイソタイプコントロールを、コンストラクトの発現に対するポジティブコントロールとしてはCD3特異的抗体UCHT-1をそれぞれ用いた。His6タグの検出は、ペンタHis抗体(Qiagen)で行った。抗体の結合は、R-フィコエリトリンと結合したアフィニティ精製F(ab')₂断片、ヤギ抗マウスIgG、Fc-ガンマ断片特異的、を2%FCSを含むPBS中1:100に希釈したもの(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., ニューマーケット, サフォーク, 英国)で検出した。フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し、Cell Questソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った(Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002)に記載のようにして実施した。

【0465】

抗ヒトCD3抗体UCHT-1の結合が両トランスフェクタントに対して同等であることは、コンストラクトの発現がおおよそ同レベルであることを示している。ペンタHis抗体の結合により、His6タグが野生型コンストラクト上には存在しないがHis6-ヒトCD3コンストラクト上には存在することが確認された

【0466】

野生型ヒトCD3イプシロンでトランスフェクトされたEL4細胞株と比較して、N末端His6タグを持つヒトCD3イプシロンに対するI2C IgG1コンストラクトの結合の明らかな喪失が検出された。これらの結果は、CD3イプシロンの遊離N末端が、ヒトCD3イプシロン鎖に対する種間特異的抗CD3結合特異性I2Cの結合に不可欠であることを示している(図57)。

【0467】

35. ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3、並びにMuc-1の腫瘍特異的エピトープに指向された二重特異性単鎖抗体コンストラクト

ヒト抗体生殖系列VH配列VH33-72(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を、CDRH1(配列番号1486)、CDRH2(配列番号1487)、及びCDRH3(配列番号1488)に対するフレームワークコンテキストとして選択した。同様に、ヒト抗体生殖系列VH配列VH33-73(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を、CDRH1(配列番号1492)、CDRH2(配列番号1493)、及びCDRH3(配列番号1494)に対するフレームワークコンテキストとして選択した。各々のヒトVHについて、およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間でオーバーラップするいくつかの縮重オリゴヌクレオチドを合成する必要があった。このために、第二のプライマーはすべてアンチセンスプライマーであった。VH33-72に対しては以下のオリゴヌクレオチドを用いた:

5'VH72-A-XhoI

GAAGTGAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAAC
CTGGAGGATCCMTGARACTCTCTTGTGCTGCT

3'VH72 - B

CTGGCGGACCCAGTCCATCCAGGCATCACTAAAAGTGAAAT
CCAGAAGCAGCACAAAGAGAG

5'VH72 - C

GACTGGGTCCGCCAGKCTCCAGRGAAGGGGCTTGAGTGGG
TTGSTGAAATTAGAAACAAAGCCAAAT

3'VH72 - D

TTTGGAATCATCTCTTTGAGATGGTGAAACCTCCCTTTTCACA
GACTCATCATATAATATGTTGCATGATTATTGGCTTTTGTTC
T

10

5'VH72 - E

AGAGATGATTCCAAAARTAGMSTGTACCTGCAAATGAWMA
GCTTAARARCTGAAGACACTGSCSTTTATTACTGTACTGG
G

3'VH72 - F - BstEII

GACCGTGGTGACCCAGAGTCCCCCTGGCCCCCAGTTAGCAAAAC
TCCCCAGTACAGTAATA

【0468】

VH3 3 - 73 に対しては以下のオリゴヌクレオチドを用いた：

5'VH73 - A - XhoI

20

CAAGTTTCAGCTGCTCGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAAC
CTGGAGGATCC

3'VH73 - B

CCAGTTTCATCCAGTAGTTACTGAAAGTGAAATCCAGAGGCA
RCACAGGAGAGTTTCAKGGATCCTCCAGGTTG

5'VH73 - C

TACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGKCTYCAGRGAAGGGGC
TTGAGTGGGTGTTGSTGAAATTAGATTGAAATCTAAT

3'VH73 - D

TTTGGAATCATCTCTTTGAGATGGTGAAACCTCCCTTTTCACA
GACTCCGCATAATGTGTTGCATAATTATTAGATTTCAATC
T

30

5'VH73 - E

AGAGATGATTCCAAAARTASTGYCTACCTGCAAATGAACA
RCTTAARARCTGAAGACACTGSCRTTTATTACTGTACGGG
A

3'VH73 - F - BstEII

GACCGTGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCCAGTAAGCAAAAT
TGTCCCCACTCCCGTACAGTAATA

【0469】

40

これらのプライマーセットの各々は、対応するVH配列全体の範囲を含んでいる。
各セット内では、同量のプライマー（例：20 μ l PCR反応に対して1 μ lの各プライ
マー（プライマーストック20乃至100 μ M））を混合し、PCRバッファー、ヌクレ
オチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCR
サイクラー中にて94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、
56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベ
ートした。続いて生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃
至400のサイズの生成物をゲルから単離した。

【0470】

次に、各VH PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み

50

込まれたプライマーを用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VHに対してはおよそ350ヌクレオチド）を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なVH DNA断片が増幅された。

【0471】

ヒト抗体生殖系列VL配列VkII A18 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を、CDRL1（配列番号1489）、CDRL2（配列番号1490）、及びCDRL3（配列番号1491）に対するフレームワークコンテキストとして選択した。同様に、ヒト抗体生殖系列VL配列VL77a (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を、CDRL1（配列番号1495）、CDRL2（配列番号1496）、及びCDRL3（配列番号1497）に対するフレームワークコンテキストとして選択した。各々のヒトVLについて、およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間でオーバーラップするいくつかの縮重オリゴヌクレオチドを合成する必要があった。このために、第二のプライマーはすべてアンチセンスプライマーであった。後のクローン化に必要であるオリゴヌクレオチド内の制限部位を除去した。VkII A18に対しては以下のオリゴヌクレオチドを用いた：

5'Vk2A18 - A - SacI CCTGATGAGCTCGTGATGACCCAAA
CTCCACTCTCCCTGYCTGTCASTCYTTGGASAKCMAGCTTTC
CATCTCTTTGC

3'Vk2A18 - B
CCAATATAAATAGGTGTTTCCATTGTTGTGTACCAAGGTTTC
TGACTAGATCTGCAAGAGATGGAAGC

5'Vk2A18 - C
ACCTATTTATATTTGGTWCCTGCAAGAGYCAAGGCCAGTCTTC
CAMAGCTCCTGATTTATAGGGCTTCCATC

3'Vk2A18 - D
CTTGAGTGTGAAATCTGTCTCYCTGATCCACTGCCACTGAAAC
CTGTCTGGGACCCCAAGAAAATCGGATGGAAGCCCTATA

5'Vk2A18 - E
ACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG
ATSTGGGAGTTTATTTWCTGCTTTTCAAGGTACACAT

3'Vk2A18 - F - BsiWI/SpeI
CCCGATACTAGTCTGTCGTACGTTTGTATTTCCAGCTTTGGTGCCT
TGACCGAACGTCCACGGAACATGTGTACCTTGAAAGCA

【0472】

VL77aに対しては以下のオリゴヌクレオチドを用いた：

5'Vlam7a - A - SacI
CCTGCAGAGCTCGTTGTGACTCAGGAAYCTKCACTCACCR
YATCACCTGGTGRAACAGTCCACACTCACTTTGT

3'Vlam7a - B
CCAGTTTGGCATAGTTACTTTGTTGTAAACAGCCCCAGTACTT
GAGCGACAAGTGAGTGTGACTGT

5'Vlam7a - C
AACTATGCCAACTGGKTCCAAASAAAAAACCAAGRTC AKKYAY
YCMSTGSTCTAATAKRTGGTACCAACAACCGA

3'Vlam7a - D
GGTGAGGGGCAGCCCTTGYCTCCAAKCAAGGGAGCCCTGAGAAAT
CTGGCAGGAR YMCMTGGTGTCTCGGTTTGTGTTGGTACC

5'Vlam7a - E
AAGGCTGCCCTCACCMTCWCAGGGGYACAGMCTGAGGATG

AGGCARWATATTWCTGTGCTCTATGGTACAGC

3'Vlam7a-F-BsiWI/SpeI

CCAGTAAC TAGTCGTACGTAGGACAGTCAAGTTTGGTTCC T
CCACCGAACACCCCAATGGTTTGTGTACCATAGAGCACACA

【0473】

これらのプライマーセットの各々は、対応するVL配列全体の範囲を含んでいる。各セット内では、同量のプライマー（例：20 μl PCR反応に対して1 μlの各プライマー（プライマーストック20乃至100 μM））を混合し、PCRバッファー、ヌクレオチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCRサイクラー中にて94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベートした。続いて生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃至400のサイズの生成物をゲルから単離した。

【0474】

次に、各VL PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み込まれたプライマーを用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VLに対してはおよそ330ヌクレオチド）を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なVL DNA断片が増幅された。

【0475】

次に、最終的なVH33-72に基づくVH PCR生成物（すなわち、ヒト/ヒト化VHのレパートリー）を最終的なVkII A18に基づくVL PCR生成物（すなわち、ヒト/ヒト化VLのレパートリー）と、並びに最終的なVH33-73に基づくVH PCR生成物（すなわち、ヒト/ヒト化VHのレパートリー）を最終的なVL77aに基づくVL PCR生成物（すなわち、ヒト/ヒト化VLのレパートリー）と、ファージディスプレイベクターpComb3H5Bhis中で組み合わせて機能的scFvsの2種類の異なるライブラリーを形成し、そこから、繊維状ファージ上での提示後、以下で述べるようにして抗Muc-1バインダーを選別し、スクリーニングし、同定し、確認した：軽鎖断片（SacI-SpeIで消化）450 ngをファージミドpComb3H5Bhis（SacI-SpeIで消化；長断片）1400 ngとライゲートさせた。次に、得られたコンビナトリアル抗体ライブラリーを、300 μlのエレクトロコンピテント大腸菌XL1Blue細胞へエレクトロポレーションによって形質転換し（2.5 kV、0.2 cmギャップキュベット、25 μFD、200 オーム、Biorad gene-pulser）、独立したクローンが10⁷を超えるライブラリーサイズを得た。1時間の表現型の発現の後、pComb3H5Bhisベクターによってコードされたカルベニシリン耐性に対して陽性である形質転換体を100 mlの液体スーパーブロス（SB）培地中で一晚選別した。次に、細胞を遠心分離によって回収し、市販のプラスミド調製キット（Qiagen）を用いてプラスミドの調製を行った。

【0476】

VL-ライブラリーを含むこのプラスミド-DNA（XhoI-BstEIIで消化；長断片）2800 ngを重鎖V断片（XhoI-BstEIIで消化）900 ngとライゲートさせ、再度エレクトロコンピテント大腸菌XL1Blue細胞300 μlの2つのアリコートへエレクトロポレーションによって形質転換し（2.5 kV、0.2 cmギャップキュベット、25 μFD、200 オーム）、独立したクローンが10⁷を超えるVH-VL scFv（単鎖可変断片）の全ライブラリーサイズを得た。

【0477】

表現型の発現及びカルベニシリンへのゆるやかな適応の後、抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞をSB-カルベニシリン（50 μg/mL）選択培地へ移した。抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞は、次にヘルパーファージVCSM13の粒子の感染量10¹²個で感染させて繊維状M13ファージを産生及び分泌させ、ここでファージ粒子はscFv断片

をコードする一本鎖 p C o m b 3 H 5 B H i s - D N A を含み、そして対応する s c F v タンパク質をファージコートタンパク質 I I I への翻訳融合物として提示した。抗体ライブラリーを提示するファージのこのプールを抗原結合要素の選別に用いた。

【0478】

ヒト M U C - 1 を発現する C H O 細胞の作製

G e n B a n k (受託番号 J 0 5 5 8 1) で公開されているヒト M U C - 1 のコード配列を、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いてヒト M U C - 1 タンパク質のコード配列及び停止コドンを含むように設計した(コンストラクトの c D N A 及びアミノ酸配列を配列番号 1 4 9 8 及び 1 4 9 9 に挙げる)。この遺伝子合成断片には、G e n B a n k に受託されているバージョンでは 1 回分しか含まれない M U C - 1 の内部反復配列(ヌクレオチド 3 8 2 から 4 4 1)が 1 6 回分含まれており、生理的に発現される M U C - 1 の複数の反復を反映している。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端には E c o R I 及び 3'末端には S a l I であり、以下のクローン化の手順に利用した。内部 X m a I 制限部位を遺伝子合成断片中のコード配列のサイレント変異によって除去した(ヌクレオチド 4 4 1 C から T へ; これは第一の反復の最後のヌクレオチドであり、従って続く 1 5 の反復配列において全く同様に変異された; 並びに、ヌクレオチド 2 1 6 0 G から C へ)。遺伝子合成断片は、E c o R I 及び S a l I を介して、p E F - D H F R (p E F - D H F R については、R a u m e t a l . C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 5 0 (2 0 0 1) 1 4 1 - 1 5 0、に記載されている)と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した(S a m b r o o k , M o l e c u l a r C l o n i n g ; A L a b o r a t o r y M a n u a l , 3 r d e d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o u r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o u r , N e w Y o r k (2 0 0 1))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために D H F R 欠失 C H O 細胞へトランスフェクトした。D H F R 欠失 C H O 細胞中での真核生物タンパク質発現は、K a u f m a n n R . J . (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 5 , 5 3 7 - 5 6 6、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート(M T X)の濃度を最大 2 0 n M M T X までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0479】

抗原結合要素の選別のために、クローン化された s c F v レパートリーを持つファージライブラリーを、それぞれの培養物の上清から P E G 8 0 0 0 / N a C l 沈殿及び遠心分離によって回収した。およそ 10^{11} 乃至 10^{12} の s c F v ファージ粒子を 0.4 ml の P B S / 0.1% B S A 中に再懸濁させ、 10^5 乃至 10^7 の M u c - 1 でトランスフェクトされた C H O 細胞(例えば M u c - 1 R o K を参照)と共に氷上で 1 時間ゆっくり攪拌しながらインキュベートした。この M u c - 1 でトランスフェクトされた C H O 細胞を前もって遠心分離によって回収し、P B S で洗浄し、P B S / 1% F C S (N a アジド含有)中に再懸濁させた。M u c - 1 でトランスフェクトされた C H O 細胞と特異的に結合しない s c F v ファージを、P B S / 1% F C S (N a アジド含有)による最大 5 回の洗浄工程によって除去した。洗浄後、細胞を p H 2.2 の H C l - グリシン中に再懸濁させることによって(10 分間のインキュベーションとそれに続くボルテックス攪拌)結合要素を細胞から溶離させ、p H 12 の 2 M トリスによる中和の後、その溶離液を新鮮な感染させていない大腸菌 X L 1 B l u e 培養物($O D_{600} > 0.5$)の感染に用いた。ヒト/ヒト化 s c F v 断片をコードするファージミドコピーでの形質導入に成功した大腸菌細胞を含む大腸菌培養物をカルベニシリン耐性について再度選別し、続いて V C M S 1 3 ヘルパーファージで感染させることで、抗体提示及びインビトロ選別の第二ラウンドを開始した。通常は、合計で 4 乃至 5 ラウンドの選別を実施した。

【0480】

選別後、Muc - 1 特異的バインダーについてのスクリーニングを行うために、4 及び 5 ラウンドのパニングに対応するプラスミド DNA を大腸菌培養物から単離した。可溶性 s c F v タンパク質の作製のために V H - V L - DNA 断片をプラスミドから切除した (X h o I - S p e I)。これらの断片を、元の p C o m b 3 H 5 B H i s とは発現コンストラクト (例: s c F v) が F l a g タグ (D Y K D D D D K) を s c F v と H i s 6 タグとの間に有するという点で異なる、プラスミド p C o m b 3 H 5 B F l a g / H i s へ同じ制限部位を介してクローン化し、さらなるファージタンパク質を除去した。ライゲーションの後、プラスミド DNA の各プール (パニングのラウンドが異なる) を、1 0 0 μ l のヒートショックコンピテント (h e a t s h o c k c o m p e t e n t) 大腸菌 T G 1 又は X L I b l u e へ形質転換し、カルベニシリン L B - 寒天へ播種した。単一コロニーを 1 0 0 μ l の L B カルベニシリン (c a r b) (5 0 μ g / m l) 中へ取り出した。

10

【0481】

V L 及び V H セグメントを含む p C o m b 3 H 5 B H i s で形質転換された大腸菌は、遺伝子 I I I 断片の切除及び 1 m M I P T G による誘発の後、十分な量の可溶性 s c F v を産生する。適切なシグナル配列のために、s c F v 鎖は周辺質へ放出され、そこで機能的コンフォメーションへフォールドする。

【0482】

形質転換プレートから単一の大腸菌 T G 1 細菌コロニーを周辺質の小スケール製剤のために取り出し、2 0 m M M g C l 2 及びカルベニシリン 5 0 μ g / m l を補充した S B 培地 (例: 1 0 m l) 中で増殖させ、回収後 P B S 中 (例: 1 m l) へ再溶解した。− 7 0 ° C での凍結及び 3 7 ° C での解凍を 4 ラウンド行うことにより、細菌の外膜を温度ショックで破壊し、s c F v s を含む可溶性周辺質タンパク質を上清中へ遊離させた。遠心分離によって無傷の細胞及び細胞片を除去した後、抗 Muc - 1 s c F v s を含む上清を回収し、それを用いて Muc - 1 特異的バインダーの同定を以下のようにして行った: s c F v s の Muc - 1 に対する結合を、Muc - 1 でトランスフェクトされた C H O 細胞上でのフローサイトメトリーで試験し; ネガティブコントロールとしてトランスフェクトされていない C H O 細胞を用いた。

20

【0483】

フローサイトメトリーのために、2 . 5 × 1 0 ⁵ 個の細胞を、5 0 μ l の s c F v 周辺質製剤と共に、又は 2 % F C S を含む P B S 5 0 μ l 中 5 μ g / m l の精製 s c F v と共にインキュベートした。s c F v の結合は、抗 H i s 抗体 (P e n t a - H i s 抗体、B S A 非含有、Q i a g e n G m b H, ヒルデン, ドイツ連邦共和国) により 2 % F C S を含む P B S 5 0 μ l 中 2 μ g / m l にて検出した。第二の工程の試薬としては、R - フィコエリトリンと結合したアフィニティ精製 F (a b') 2 断片、ヤギ抗マウス I g G (F c - ガンマ断片特異的) を 2 % F C S を含む P B S 5 0 μ l 中 1 : 1 0 0 に希釈したもの (D i a n o v a, ハンブルク, ドイツ連邦共和国) を用いる。サンプルは、F A C S s c a n (B D b i o s c i e n c e s, ハイデルベルク, ドイツ連邦共和国) 上で測定した。

30

【0484】

次に単一のクローンを有利な特性及びアミノ酸配列について分析した。Muc - 1 特異的 s c F v s を、G l y 4 S e r 1 - リンカーを介して C D 3 特異的 s c F v I 2 C と (配列番号 1 8 5)、又は本発明のその他のいずれかの C D 3 特異的 s c F v と連結することで、組換え二重特異性単鎖抗体へ変換し、その結果としてドメイン配置が V H_{Muc1} - (G l y 4 S e r 1)₃ - V L_{Muc1} - G l y 4 S e r 1 - V H_{CD3} - (G l y 4 S e r 1)₃ - V L_{CD3} 又は別のドメイン配置であるコンストラクトを得た。C H O 細胞中での発現のために、(i) コザックコンセンサス配列内に埋め込まれた開始コドンを含む N 末端免疫グロブリン重鎖リーダーのコード配列、及び (i i) 停止コドンが続く C 末端 H i s₆ タグのコード配列の両方を、二重特異性単鎖抗体をコードするヌクレオチド配列へフレームを揃えて結合し、その後、遺伝子合成によって得られたこの DNA 断片を発現ベクター p E F - D

40

50

HFR (Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) のマルチクローニング部位へ挿入した。DHFR 欠失 CHO 細胞の安定なトランスフェクション、二重特異性単鎖抗体を培養物の上清中へ分泌する DHFR 陽性トランスフェクタントの選別、及び発現レベルを高めるためのメトトレキサートによる遺伝子増幅は記述 (Macket al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) に従って実施した。その他の最新の手順はすべて標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。 10

【0485】

機能的二重特異性単鎖抗体コンストラクトの同定は、トランスフェクトされた CHO 細胞の培養物の上清のフローサイトメトリー分析によって行った。この目的のために、CD 3 結合を、ヒト CD 3 陽性 T 細胞白血病細胞株 HPB-ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC 483) 及びマカク T 細胞株 4119 LnPx 上にて試験した。腫瘍特異的 Muc-1 エピトープに対する結合は、Muc-1 でトランスフェクトされた CHO 細胞上で試験した。それぞれの細胞株の 200,000 個の細胞を、50 µl の細胞培養物の上清と共に 30 分間氷上にてインキュベートした。細胞を 2% FCS を含む PBS で 2 回洗浄し、マウス抗 His 抗体 (PentaHis 抗体; Qiagen; 2% FCS を含む PBS 50 µl 中にて 1:20 に希釈) により、結合した二重特異性単鎖抗体コンストラクトを検出した。洗浄後、結合した抗 His 抗体を、2% FCS を含む PBS で 1:100 に希釈したフィコエリトリンに結合した Fc ガンマ特異的抗体 (Dianova) によって検出した。トランスフェクトされていない CHO 細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。 20

【0486】

フローサイトメトリーは FACS-Calibur 装置上で実施し; Cell Quest ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS 染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002) に記載のようにして実施した。 30

【0487】

ヒト及びマカク CD 3 に対して、並びに Muc-1 の腫瘍特異的エピトープに対して二重特異性結合を示すコンストラクトだけを、さらなる使用のために選別した。

【0488】

タンパク質の産生のために、完全に機能的である二重特異性単鎖抗体を発現し、ヌクレオシドを含まない HyQ PF CHO 液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68 含有 L-グルタミン 4.0 mM を含む; HyClone) に適応させた CHO 細胞を、ヌクレオシドを含まない HyQ PF CHO 液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68 含有 L-グルタミン 4.0 mM を含む; HyClone) によりローラーボトル中にて 7 日間増殖させた。遠心分離により培養物の上清を細胞から除去し、精製まで -20 °C で保存した。培養物の上清からの二重特異性単鎖抗体の精製のためのクロマトグラフィ装置としては、Akt a (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及び Unicorn (登録商標) Software を用いた。ZnCl₂ を充填した Fractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファー A (20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速 3 ml/分でカラム (10 ml) に適用した。バッファー A でカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファー B (20 mM リン 40 50

酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール)の以下に従う2段階の勾配:

段階1: 6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2: 6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールのした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン)又はMerck (ダルムシュタット)より購入した。

【0489】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー(25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2)で平衡状態としたHi Load 16/60 Superdex 200 分取グレードカラム(GE/アマーシャム)上で実施した。溶離したタンパク質サンプル(流速1 ml/分)を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した(分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD_{280 nm}を用いて測定した。

【0490】

精製した二重特異性抗体タンパク質は、還元性条件下、4-12%ビストリスゲル(Invitrogen)をプレキャストしたSDS PAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード(Invitrogen)を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた(Invitrogenプロトコル)。SDS-PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95%である。

【0491】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性単鎖抗体の分子量は約52 kDaである。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

【0492】

ウエスタンブロットは、Optitran(登録商標)BA-S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性単鎖抗体タンパク質抗体の検出には、抗Hisタグ抗体を用いた(PentaHis, Qiagen)。アルカリホスファターゼ(AP)で標識したヤギ抗マウスIg抗体(Sigma)を二次抗体として用い、BCIP/NBT(Sigma)を基質として用いた。精製された二重特異性単鎖抗体に対応する52 kDに単一のバンドを検出した。

【0493】

ヒト及び非チンパンジー霊長類系において二重特異性単鎖抗体がヒト及びマカクCD3と、並びにMuc-1の腫瘍特異的エピトープと相互作用する効力を、Muc-1でトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC又はマカクT細胞株4119 LnPxをエフェクター細胞として用いるクロム51(⁵¹Cr)の放出に基づく細胞障害性アッセイによって測定した。

【0494】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のようにして行った:

ペトリ皿(直径145 mm、Nunc)を、最終濃度1 µg/mlの市販の抗CD3特異的抗体(例: OKT3, Othoclone)により37°Cで1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液(30乃至50 mlのヒト血液)から単離した。安定化グルタミン/10% FCS/IL-2 20 U/ml(Proleukin, Chiron)を含む120 mlのRPMI 1640中、3-5×10⁷個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI 1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20 U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0495】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50%FCSを含む最終容量100 μ lのRPMI中、11.1MBqの⁵¹Crにて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250 μ lの補足RPMI（上記のように）中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子1 μ g/ml及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線のR²値は、通常>0.90である。この解析プログラムにより、効力の尺度としてのEC₅₀値を算出した。

10

【0496】

36. CD33及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

36.1 CD33及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

全般的には、ヒト及びマカクCD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及びマカクCD33に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表14に挙げるように設計した。

20

【0497】

【表14】

表14：抗CD3及び抗CD33種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1341/1340	I2CHLxAF5HL
1339/1338	F12QHLxAF5HL
1337/1336	H2CHLxAF5HL

30

【0498】

ヒト及びマカクCD33に対して種間特異的である可変軽鎖（L）及び可変重鎖（H）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるCD3特異的VH及びVLの組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えてそれぞれの二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒスチジン₆-タグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Ha

40

50

rbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために DHFR 欠失 CHO 細胞へトランスフェクトした。DHFR 欠失 CHO 細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大 20 nM MTX までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。2 継代の静置培養後、細胞培養物の上清を回収して続いての実験に用いた。

【0499】

36. 2 CD33 及び CD3 種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

ヒト及びマカク CD33 並びに CD3 のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS 分析を実施する。この目的のために、実施例 23. 1 で述べるようにヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO 細胞、及びヒト CD3 陽性 T 細胞白血病細胞株 HPB-ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483) を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、実施例 23. 2 で述べる作製されたマカク CD33 トランスフェクタント、及びマカク PBMC (マカク PBMC の調製は、標準的なプロトコルに従い、マカクザルからの末梢血液の Ficoll 勾配遠心分離によって行った) を用いて試験した。それぞれの細胞株又は PBMC の 200000 個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清 50 µl と共に、30 分間氷上にてインキュベートした。細胞を 2% FCS を含む PBS で 2 回洗浄し、マウス抗 His 抗体 (PentaHis 抗体; Qiagen; 2% FCS を含む PBS 50 µl 中にて 1:20 に希釈) でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗 His 抗体を、2% FCS を含む PBS で 1:100 に希釈したフィコエリトリンに結合した Fc ガンマ特異的抗体 (Dianova) で検出した。トランスフェクトされていない CHO 細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。

【0500】

フローサイトメトリーは FACS-Calibur 装置上で実施し; CellQuest ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS 染色及び蛍光強度の測定は、*Current Protocols in Immunology* (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002) に記載のようにして実施した。

【0501】

CD33 に対して種間特異的であり、ヒト及び非チンパンジー霊長類 CD3 に対して種間特異的であった上記に挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図 60 に示すように明らかに検出可能であった。FACS 分析では、それぞれのネガティブコントロールと比較して、すべてのコンストラクトが CD3 及び CD33 への結合を示した。二重特異性抗体のヒト及びマカク CD33 並びに CD3 抗原への種間特異性が実証された。

【0502】

36. 3 CD33 及び CD3 種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例 23. 1 及び 23. 2 で述べる CD33 陽性細胞株を用いるクロム 51 (⁵¹Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。それぞれの図に示すように、エフェクター細胞としては、刺激されたヒト CD4/CD56 除去 PBMC、又はマカク T 細胞株 4119 LnPx を用いた。

【0503】

ペトリ皿 (直径 145 mm、Greiner bio-one GmbH, クレムスミュンスター) を、最終濃度 1 µg/ml の市販の抗 CD3 特異的抗体 (例: OKT3, Othoclone) により 37°C にて 1 時間コーティングした。非結合タンパク質を PBS

による1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン／10%FCS／IL-220U/ml（Proleukin, Chiron）を含む120mlのRPMI1640中、 $3-5 \times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0504】

CD4+T細胞及びCD56+NK細胞を標準的なプロトコルに従って除去することにより、CD8+細胞障害性Tリンパ球（CTLs）を濃縮した。

10

【0505】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50%FCSを含む最終容量100 μ lのRPMI中、 1.1×10^6 の51Crにて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250 μ lの補足RPMI（上記と同様）中にて、E:T比10:1で実施した。最終濃度50%の種間特異的二重特異性単鎖抗体分子を発現する細胞の上清、及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間であり、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism 4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常>0.90である。この解析プログラムによって算出されるEC₅₀値を用いて生物活性を比較した。

20

【0506】

図61に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMCによって誘発されたヒトCD33陽性標的細胞に対する細胞障害活性、並びにマカクT細胞株4119LnPxによって誘発されたマカクCD33陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示している。

30

【0507】

37. 循環する血液細胞には存在しない標的分子に指向された従来の二重特異性CD3結合分子への曝露による循環するチンパンジーT細胞の再分布

雄のチンパンジー一匹に、単鎖EpCAM/CD3二重特異性抗体コンストラクト（Schlereth（2005）Cancer Res 65: 2882）の静脈内注入による用量増加試験を施した。従来の単鎖CD19/CD3二重特異性抗体コンストラクト（Loffler（2000, Blood, Volume 95, Number 6））、又は国際公開第99/54440号）と同様に、該EpCAM/CD3コンストラクトのCD3アームも、従来のヒト及びチンパンジーCD3のコンテクスト依存性エピトープに対して指向されている。第0日には、この動物は試験物質を含まない50mlのPBS/5%HSAを受け、続いて、PBS/5%HSAプラス1.6、2.0、3.0、及び4.5 μ g/kg単鎖EpCAM/CD3二重特異性抗体コンストラクトの50mlをそれぞれ第7、14、21、及び28日に受けた。注入時間は各投与につき2時間とした。各週の注入では、チンパンジーを2乃至3mg/kgのTelazolの筋肉内投与によって鎮静化させ、挿管し、平均血圧が安定したイソフルラン/O₂による麻酔状態とした。第二の静脈内カテーテルを逆側の肢に配置し、循環する血液細胞のFACS分析のために図62に示す時間点で（ヘパリン処理）全血サンプルを採取した。標準的な赤血球溶解の後、チンパンジーCD2（Becton Dickinson）と反応するFITC標識抗体でT細胞を染色し、全リンパ球に対するT細胞のパーセントをフローサイトメトリー

40

50

で測定した。図62に示すように、単鎖E p C A M / C D 3二重特異性抗体コンストラクトの投与すべてにおいて循環するT細胞の急激な低下が誘発されており、これは、実質的に循環する標的B（リンパ腫）細胞を持たないB - N H L患者内において単鎖C D 1 9 / C D 3二重特異性抗体コンストラクトで観察されたものと同様であった。ヒト及びチンパンジーの循環血液中にはE p C A M - 陽性標的細胞が存在しないことから、単鎖E p C A M / C D 3二重特異性抗体コンストラクトへの曝露による循環するT細胞の低下は、標的細胞を介しての架橋の非存在下でのコンストラクトのC D 3アームと従来のコンテクスト依存性C D 3エピトープとの純粋な相互作用を通してT細胞が受けるシグナルのみに起因し得る。実質的に循環する標的B（リンパ腫）細胞を持たないB - N H L患者において単鎖C D 1 9 / C D 3二重特異性抗体コンストラクトへの曝露を通して誘発されるT細胞の再分布と同様に、単鎖E p C A M / C D 3二重特異性抗体コンストラクトへの曝露によるチンパンジーでのT細胞の再分布は、コンテクスト依存性C D 3エピトープへの結合イベントに続くC D 3のコンフォメーションの変化、そしてさらにその結果としての一時的な血管内皮へのT細胞の接着性の上昇によって説明することができる（実施例20参照）。この発見により、コンテクスト依存性C D 3エピトープへ指向された従来のC D 3結合分子は、この相互作用のみを通して、末梢血液T細胞の再分布パターン引き起こすことができ、このことが実施例20で述べるようにヒトのC N S有害イベントのリスクと関連していることが確認される。

10

【0508】

38. ヒトC D 3 イプシロンのN末端に対するs c F vクローンの特異的結合

20

38. 1 大腸菌X L 1 B l u e内でのs c F vコンストラクトの細菌発現

前述のように、V L及びV Hセグメントを含むp C o m b 3 H 5 B h i s / F l a gで形質転換された大腸菌X L 1 B l u eは、遺伝子I I I断片の切除及び1 m M I P T Gによる誘発の後、十分な量の可溶性s c F vを産生する。s c F v鎖は周辺質へ放出され、そこで機能的コンフォメーションへフォールドする。

【0509】

本実験では、以下のs c F vクローンを選択した：

i) 国際公開第2004/106380号に記載の、S c F v s 4 - 1 0、3 - 1 0 6、3 - 1 1 4、3 - 1 4 8、4 - 4 8、3 - 1 9 0、及び3 - 2 7 1

i i) 本明細書で述べる、ヒト抗C D 3 イプシロン結合クローンH 2 C、F 1 2 Q、及びI 2 CからのS c F v s

30

【0510】

周辺質製剤については、ペリプラズム発現を可能にするプラスミドを含むそれぞれのs c F vで形質転換された細菌細胞を、20 m MのM g C l 2及びカルベニシリン50 μ g / m lを補充したS B培地で増殖させ、回収後にP B Sへ再溶解した。−70℃での凍結及び37℃での解凍を4ラウンド行うことにより、細菌の外膜を温度ショックで破壊し、s c F v sを含む可溶性周辺質タンパク質を上清中へ遊離させた。遠心分離によって無傷の細胞及び細胞片を除去した後、ヒト抗ヒトC D 3 - s c F v sを含む上清を回収し、それをさらなる分析に用いた。s c F vを含むこれらの粗上清を、今後周辺質製剤（P P P）と称する。

40

【0511】

38. 2 ヒトC D 3 イプシロン（a a 1 - 2 7）- F c融合タンパク質に対するs c F v sの結合

E L I S A実験を、96ウェルプラスチックプレート（N u n c , m a x i s o r b）のウェルへヒトC D 3 イプシロン（a a 1 - 2 7）- F c融合タンパク質を通常は4℃にて一晚コーティングすることによって行った。次に抗原コーティング溶液を除去し、ウェルをP B S / 0.05% T w e e n 2 0で1回洗浄し、続いてP B S / 3% B S Aで少なくとも1時間ブロックした。ブロッキング溶液の除去後、P P P及びコントロール溶液をウェルに添加し、室温にて通常は1時間インキュベートした。次にウェルをP B S / 0.05% T w e e n 2 0で3回洗浄した。固定化抗原に結合したs c F v sの検出は、ビ

50

オチン標識抗FLAGタグ抗体（M2抗Flag-Bio, Sigma、通常は最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS）を用いて行い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Dianova、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS）で検出した。ABTS基質溶液を添加することでシグナルを発色させ、405nmの波長で測定した。ブロッキング剤及び／又はヒトCD3イプシロン（aa1-27）-Fc融合タンパク質のヒトIgG1部分に対する試験サンプルの非特異的結合は、ヒトIgG1（Sigma）でコーティングしたELISAプレート上にて同一の試薬及び同一のタイミングによる同一のアッセイを実施することによって分析した。ネガティブコントロールとしてPBSを用いた。

【0512】

図63に示すように、scFvs H2C、F12Q、及びI2Cは、ヒトCD3イプシロン（aa1-27）-Fc融合タンパク質に対して強い結合シグナルを示している。ヒトscFvs 3-106、3-114、3-148、3-190、3-271、4-10、及び4-48（国際公開第2004/106380号に記載）は、ネガティブコントロールレベルを超えるような有意な結合はまったく示していない。

【0513】

ヒトCD3イプシロン（aa1-27）-Fc融合タンパク質でコーティングしたウェルに対するscFvs H2C、F12Q、及びI2Cの陽性結合が、BSA（ブロッキング剤として使用）及び／又はヒトCD3イプシロン（aa1-27）-Fc融合タンパク質のヒトIgG1 Fc-ガンマ部分によるものであり得るという可能性を排除するために、第二のELISA実験を平行して実施した。この第二のELISA実験では、ヒトCD3イプシロン（aa1-27）-Fc融合タンパク質の代わりにIgG1（Sigma）でコーティングしたこと以外は、すべてのパラメータを第一のELISA実験と同一とした。図64に示すように、試験したscFvsはいずれも、BSA及び／又はヒトIgG1に対してバックグラウンドレベルを超えるような有意な結合をまったく示さなかった。

【0514】

まとめると、これらの結果から、CD3イプシロンのコンテキスト依存性エピトープを認識する従来のCD3結合分子（例：国際公開第2004/106380号に開示）は、ヒトCD3イプシロン（aa1-27）領域と特異的な結合をせず、一方CD3イプシロンのコンテキスト非依存性エピトープと結合するscFvs H2C、F12Q、及びI2Cは、ヒトCD3イプシロンのN末端の27アミノ酸に対する特異的な結合を明らかに示すと結論付けることができる。

【0515】

39. CD44及びCD3種間特異的二重特異性単鎖分子の作製

39.1 種間特異的結合分子のクローン化

全般的には、ヒト及びマカクCD3イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びにヒト及びマカクCD44に対して種間特異的である結合特異性を持つドメインを各々が含む二重特異性単鎖抗体分子を、以下の表15に挙げるように設計する。

【0516】

【表 15】

表 15：抗CD3及び抗CD4 4種間特異的二重特異性単鎖抗体分子のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1589/1588	CD44-A8 LH x I2C HL
1603/1602	CD44-C2 HL x I2C HL
1631/1630	CD44-H3 HL x I2C HL
1617/1616	CD44-F6 HL x I2C HL

10

【0517】

ヒト及びマカクCD44に対して種間特異的である可変重鎖（VH）及び可変軽鎖（VL）ドメイン、並びにヒト及びマカクCD3に対して種間特異的であるVH及びVLドメインを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて19アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えてそれぞれの二重特異性単鎖抗体分子のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒスチジン₆-タグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、適切なN末端及びC末端制限部位が導入されるようにも設計した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF-DHFR（pEF-DHFRについては、Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50（2001）141-150、に記載されている）と称するプラスミドへ標準的なプロトコル（Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York（2001））に従ってクローン化した。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のためにジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）欠失チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞へトランスフェクトした。

20

30

【0518】

39. 2 二重特異性単鎖抗体分子の発現

二重特異性コンストラクトは、DHFR欠失CHO細胞中で一過性に発現させた。簡潔に述べると、コンストラクトあたり4×10⁵個の細胞を、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、及び細胞培養グレード試薬のストック液からのヌクレオシド（Sigma-Aldrich Chemie GmbH, タウフキルヘン, ドイツ）を補充して最終濃度を10μg/mlアデノシン、10μg/mlデオキシアデノシン、及び10μg/mlチミジンとした安定化グルタミンを含む3mlのRPMI 1640全培地（all medium）中、インキュベーター内で37℃、湿度95%、及び7%CO₂にてトランスフェクションの一日前に培養した。トランスフェクションは、FugeneHDトランスフェクション試薬（Roche, #04709691001）を用いて製造元のプロトコルに従って行った。94μlのOptiMEM培地（Invitrogen）及び6μlのFugeneHDを混合し、室温で5分間インキュベートした。続いて、コンストラクトあたり1.5μgのDNAを添加し、混合し、室温で15分間インキュベートした。その間、DHFR欠失CHO細胞を1×PBSで洗浄し、1.5mlのRPMI 1640全培地に再懸濁した。トランスフェクション混合物を600μlのRPMI 1640全培地で希釈し、細胞へ添加し、37℃、湿度95%、及び7%CO₂にて一晚インキュベートした。トランスフェクションの翌日、各手法のインキュベーション容量をRPMI 1640全培地5mlへ拡張した。3日間のインキュベーションの後、上清を回収した。

40

50

【0519】

39. 3 CD44及びCD3種間特異的二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合分析

ヒト及びマカクCD44並びにCD3のそれぞれへ結合する能力に関して種間特異的二重特異性抗体コンストラクトの機能を試験するために、FACS分析を実施した。この目的のために、ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO細胞（実施例28.1で述べるように）、及びヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL（DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483）を用いてヒト抗原への結合について試験した。マカク抗原に対する結合反応性は、作製されたマカクCD44トランスフェクタント（実施例28.3で述べる）、及びマカクT細胞株4119LnPx（Prof. Fickenschner, Hygiene Institute, Virology, Erlangen-Nuernberg、よりご提供頂いた；Knappe A, et al., and Fickenschner H., Blood 2000, 95, 3256-61、にて発表）を用いて試験した。種間特異的二重特異性抗体コンストラクトのCD44に対する特異性を示すために、ヒトCD44delv6（v6エクソンを欠失させたCD44）に対する結合を、ヒトCD44delv6（作製法は実施例28.2で述べる）でトランスフェクトしたCHO細胞を用いて試験した。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞上清50µlと共に、30分間氷上にてインキュベートした。2%FCSを含むPBSで細胞を2回洗浄し、マウス抗His抗体（PentaHis抗体；Qiagen；2%FCSを含むPBS50µl中にて1:20に希釈）でコンストラクトの結合を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2%FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体（Dianova）で検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清を、T細胞株への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。関連性のない標的特異性を有する単鎖コンストラクトを、CD44及びCD44delv6でトランスフェクトされたCHO細胞への結合に対するネガティブコントロールとして用いた。

【0520】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し；CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った（Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク）。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のようにして実施した。

【0521】

CD44に対して種間特異的であり、ヒト及びマカクCD3に対して種間特異的である上記に挙げた単鎖分子の二重特異性結合は、図65a-dに示すように明らかに検出可能であった。図65eでは、CD44delv6に対するこの分子の結合は見られなかった。従って、二重特異性抗体のヒト及びマカクCD3並びにCD44抗原に対する種間特異性が明らかに実証された。

【0522】

39. 4 CD44及びCD3種間特異的二重特異性単鎖抗体の生物活性

作製された二重特異性単鎖抗体の生物活性を、実施例28.1で述べるヒトCD44陽性細胞株を用いるクロム51（⁵¹Cr）放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。それぞれの図に示すように、エフェクター細胞としては、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC、刺激されたヒトPBMCを用いた。

【0523】

刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMCの作製は以下のようにして実施した：ペトリ皿（直径145mm、Greiner bio-one GmbH, クレムスミンスター）のコーティングは、最終濃度1µg/mlの市販の抗CD3特異的抗体（例：O

K T 3, O t h o c l o n e) により 37℃にて1時間行った。非結合タンパク質をP B Sによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なP B M Cを、F i c o l l 勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液(30乃至50mlのヒト血液)から単離した。安定化グルタミン/10%F C S/I L - 220U/ml (P r o l e u k i n, C h i r o n)を含む120mlのR P M I 1640中、 $3 - 5 \times 10^7$ 個のP B M Cを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、R P M I 1640で1回洗浄した。I L - 2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。標準的なプロトコルに従ってC D 4 + T細胞及びC D 56 + N K細胞を除去することにより、C D 8 + 細胞障害性Tリンパ球(C T L s)を濃縮した。

10

【0524】

標的細胞をP B Sで2回洗浄し、50%F C Sを含む最終容量100μlのR P M I 中、11.1MBqの ^{51}Cr にて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのR P M Iで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250μlの補足R P M I(上記のように)中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性単鎖抗体分子を含む細胞上清及びその2倍希釈物20個をヒト細胞障害性アッセイに適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解(トリトンXの添加)と自然溶解(エフェクター細胞なし)との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、W i z a r d 3"ガンマカウンター (P e r k i n E l m e r L i f e S c i e n c e s G m b H, ケルン, ドイツ)を用いて実施した。実験データの解析は、W i n d o w s (登録商標)用P r i s m 4 (バージョン4.02、G r a p h P a d S o f t w a r e I n c., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国)を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常>0.90である。この解析プログラムによって算出される EC_{50} 値を用いて生物活性を比較した。

20

【0525】

図66に示すように、作製された種間特異的二重特異性単鎖抗体コンストラクトはすべて、刺激されたヒトC D 4 / C D 56 除去P B M Cによって誘発されたC D 4 4陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

30

【0526】

40. H C V抗原及びC D 3種間特異的二重特異性タンデム(t a n d e m)単鎖抗体断片の作製

40.1 H C Vエンベロープ糖タンパク質E 2 (H C V遺伝子型1 a及び1 b)を発現するC H O細胞の作製

C型肝炎ウイルス(H C V)エンベロープ糖タンパク質E 2 (H C V遺伝子型1 a及び1 b、それぞれのサブタイプのH C V単離物;標準的なプロトコルに従って配列を決定)のコード配列を、各々ヒトC D 4膜貫通及び細胞内ドメインとの翻訳融合タンパク質として、標準的なプロトコルに従う遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて14アミノ酸シグナルペプチドのコード配列を、続いてH C V E 2エンベロープ糖タンパク質の最初の278個(遺伝子型1 a)又は279個(遺伝子型1 b)のアミノ酸のコード配列、2倍のm y cエピトープ配列、及び成熟タンパク質の372乃至433のアミノ酸に対応するヒトC D 4膜貫通及び細胞内ドメインのコード配列(G e n B a n k受託番号M12807で公開)、並びに停止コドンを含むように設計した(コンストラクトのc D N A及びアミノ酸配列を、それぞれ遺伝子型1 a及び1 bである配列番号H C V - 1乃至H C V - 4に挙げた)。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、5'末端にはE c o R I及び3'末端にはS a l Iであり、以下のクローニングの手順に利用した。遺伝子合成断片は、E c o R I及びS a l Iを介して、p E F - D H F R (p E F - D H F Rについては、R a u m e t a l. C a n c e r I m m u

40

50

nol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている)と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、コンストラクトの真核生物発現のために DHFR 欠失 CHO 細胞へトランスフェクトした。DHFR 欠失 CHO 細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大 20 nM MTX までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。最終的に、表面に発現された HCV E2 ドメイン遺伝子型 1a を有する CHO 細胞株、及び表面に発現された HCV E2 ドメイン遺伝子型 1b を有する CHO 細胞株、の 2 種類の細胞株が作製された。

【0527】

40. 2 種間二重特異性タンデム単鎖抗体断片のクローン化

全般的には、ヒト及びマカク CD3 イプシロンに対して種間特異的である結合特異性を持つドメイン、並びに HCV に対しての結合特異性を持つドメインを含む二重特異性タンデム単鎖抗体断片を、以下の表 16 に挙げるように設計した。

【0528】

【表 16】

表 16 : 抗 CD3 種間特異的及び抗 HCV 抗原特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片のフォーマット

配列番号 (核酸/タンパク質)	タンパク質コンストラクトのフォーマット (N → C)
1664/1663	HC1LHxI2CHL

【0529】

HCV 抗原に対して特異的である可変軽鎖 (L) 及び可変重鎖 (H) ドメイン、並びにヒト及びマカク CD3 に対して種間特異的である VH 及び VL の組み合わせを含む前記のコンストラクトを、遺伝子合成によって得た。遺伝子合成断片は、まずコンストラクトの真核生物発現のためのコザック部位を含み、続いて 19 アミノ酸免疫グロブリンリーダーペプチドを、続いてフレームを揃えて二重特異性タンデム単鎖抗体断片のコード配列を、続いてフレームを揃えてヒスチジン 6 - タグのコード配列及び停止コドンを含むように設計した。遺伝子合成断片は、断片の最初と最後に適切な制限部位が導入されるようにも設計した。導入された制限部位は、以下のクローン化の手順に利用した。遺伝子合成断片は、これらの制限部位を介して、pEF - DHFR (pEF - DHFR については、Rau et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150、に記載されている)と称するプラスミドへ標準的なプロトコルに従ってクローン化した。前記の手順は標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。配列が確認されたヌクレオチド配列を有するクローンを、二重特異性タンデム単鎖抗体断片の真核生物発現のために DHFR 欠失 CHO 細胞へトランスフェクトした。DHFR 欠失 CHO 細胞中での真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1

990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、メトトレキサート (MTX) の濃度を最大 20 nM MTX までの最終濃度へ上昇させることによって誘発した。

【0530】

40. 3 二重特異性タンデム単鎖抗体断片の発現及び精製

二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 中で発現させた。DHFR 欠失 CHO 細胞中の真核生物タンパク質発現は、Kaufmann R. J. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 537-566、の記載に従って実施した。コンストラクトの遺伝子増幅は、20 nM MTX の最終濃度まで増加する濃度の MTX を添加することによって誘発した。2 継代の静置培養後、ヌクレオシドを含まない HyQPF CHO 液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68 含有 L-グルタミン 4.0 mM を含む; HyClone) により、ローラーボトル中、回収まで 7 日間細胞を増殖させた。細胞を遠心分離で除去し、発現されたタンパク質を含む上清を -20 °C で保存した。別の選択肢として、コンストラクトを一過性に HEK 293 細胞中で発現させた。トランスフェクションは、293fectin 試薬 (Invitrogen, #12347-019) を用い、製造元のプロトコルに従って実施する。

10

【0531】

クロマトグラフィには Akta (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及び Unicorn (登録商標) Software を用いた。ZnCl₂ を充填した Fractogel EMD Chelate (登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファー A (20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速 3 ml/分 でカラム (10 ml) に適用した。バッファー A でカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファー B (20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1 M NaCl、0.5 M イミダゾール) の以下に示す 2 段階の勾配：

20

段階 1：6 カラム分の容量の 20% バッファー B

段階 2：6 カラム分の容量の 100% バッファー B

30

を用いて溶離させた。段階 2 からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにブールした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン) 又は Merck (ダルムシュタット) より購入した。

【0532】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー (25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2) で平衡状態とした HiLoad 16/60 Superdex 200 分取グレードカラム (GE/アマーシャム) 上で実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速 1 ml/分) を標準的な SDS-PAGE 及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した (分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD_{280 nm} を用いて測定した。

40

【0533】

精製した二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、還元性条件下、4-12% ビストリスゲル (Invitrogen) をプレキャストした SDS PAGE で分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量は MultiMark タンパク質スタンダード (Invitrogen) を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた (Invitrogen プロトコル)。SDS-PAGE によって測定された単離したタンパク質の純度は >95% であった。

【0534】

PBS 中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性タンデム単鎖抗体断片

50

の分子量は約 52 kDa である。

【0535】

ウェスタンブロットは、Optitran（登録商標）BA-S83 膜及び Invitrogen Blot Module を用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。用いた抗体は、His タグに対して指向されたもの（PentaHis, Qiagen）、及びアルカリホスファターゼ（AP）で標識したヤギ抗マウス Ig（Sigma）、及び基質としての BCIP/NBT（Sigma）である。精製された二重特異性タンデム単鎖抗体断片に対応する 52 kD に単一のバンドを検出した。

【0536】

40. 4 HCV 抗原及び CD3 種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片のフローサイトメトリー結合分析

10

HCV 抗原並びにヒト及びマカク CD3 のそれぞれに結合する能力に関して種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片の機能を試験するために、FACS 分析を実施した。この目的のために、実施例 40. 1 で述べる 2 種類の異なる HCV 遺伝子型（1a 及び 1b）からの HCV 抗原 E2 でトランスフェクトされた CHO 細胞、ヒト CD3 陽性 T 細胞白血病細胞株 HPB-ALL（DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483）、及びマカク T 細胞株 4119 LnPx を用いてそれぞれの抗原への結合について試験した。それぞれの細胞株の 200, 000 個の細胞を、種間特異的二重特異性抗体コンストラクトを発現するトランスフェクトされた細胞の細胞培養物の上清 50 µl と共に、30 分間氷上にてインキュベートした。細胞を 2% FCS を含む PBS で 2 回洗浄し、マウス抗 His 抗体（PentaHis 抗体; Qiagen; 2% FCS を含む PBS 50 µl 中にて 1:20 に希釈）で二重特異性タンデム単鎖抗体断片の結合を検出した。洗浄後、結合した抗 His 抗体を、2% FCS を含む PBS で 1:100 に希釈したフィコエリトリンに結合した Fc ガンマ特異的抗体（Dianova）で検出した。

20

【0537】

フローサイトメトリーは FACS-Calibur 装置上で実施し; CellQuest ソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った（Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク）。FACS 染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology（Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002）に記載のようにして実施した。

30

【0538】

HCV 抗原及び及び非チンパンジー霊長類 CD3 に対する二重特異性タンデム単鎖抗体断片の二重特異性結合は、図 67 に示すように明らかに検出可能であった。FACS 分析では、対応するネガティブコントロールと比較して、二重特異性タンデム単鎖抗体断片は CD3 及び HCV 抗原への結合を示した。二重特異性タンデム単鎖抗体断片の、一方ではヒト及びマカク CD3 に対する種間特異性が、並びにもう一方では HCV 特異性が実証された。

【0539】

40. 5 HCV 抗原及び CD3 種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片の生物活性

40

二重特異性タンデム単鎖抗体断片の生物活性を、実施例 40. 1 で述べる HCV 抗原陽性細胞株を用いるクロム 51 (⁵¹Cr) 放出インビトロ細胞障害性アッセイによって分析した。エフェクター細胞としては、異なるドナー 2 人から採取した刺激されたヒト CD4/CD56 除去 PBMC を用いた。

【0540】

ペトリ皿（直径 145 mm、Greiner bio-one GmbH, クレムスミュンスター）を、最終濃度 1 µg/ml の市販の抗 CD3 特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により 37 °C にて 1 時間コーティングした。非結合タンパク質を PBS による 1 段階の洗浄によって除去した。新鮮な PBMC を、Ficoll 勾配遠心分離に

50

より標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン／10%FCS／IL-220U/ml（Proleukin, Chiron）を含む120mlのRPMI1640中、 $3-5 \times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0541】

標準的なプロトコルに従ってCD4+T細胞及びCD56+NK細胞を除去することにより、CD8+細胞障害性Tリンパ球（CTLs）を濃縮した。

【0542】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50%FCSを含む最終容量100μlのRPMI中、11.1MBqの⁵¹Crにて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250μlの補足RPMI（上記のように）中にて、E:T比10:1で実施した。76.4μg/mlの種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片及びその2倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。

【0543】

図68に示すように、種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、ヒトHCV抗原陽性標的細胞に対する細胞障害活性を示した。

【0544】

41. ヒト及び非チンパンジー霊長類CD3、並びに感染した細胞の表面に提示された肝炎ウイルス抗原に指向された二重特異性タンデム単鎖抗体断片

41.1 B型肝炎ウイルス（HBV）

およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1（配列番号1634）、CDRH2（配列番号1635）、及びCDRH3（配列番号1636）に対するヒトVH配列コンテクストを得た：

5'C8-VH-A-XhoI

CCACTTCTCTCGAGTCTTGGCGSGRASTGMWGMAGCCTGGCG
SCTCCSTGMRGSTGTCTCTGCRMGGCCTCCGGC

3'C8-VH-B

CCCTGGAGCCTTGCCGCGACCCAGGACATGGCGGTAGCCGGWG
AAGGTGWAGCCGGAGGCGCKYGCAGGA

5'C8-VH-C

CGGCAGGCTCCAGGGMAGGGACTTGGAAATGGRTTGRGCTCCA
TCTCCGGGCTCCGGCGGGCTCCACCTACTACGCCGACTCCGT
GAAGGGCCGG

3'C8-VH-D

CTTGGCGCGAGTAGTACASGGCGGTGTCTCTCGGMCCGCAGG
GAGYTCAKCTSCAKGTACASGGTGYTCKTGGAGKGTGTCCC
GGSTTSATTGTGAMCCGGGCCCTTCAAGGA

3'C8-VH-E-BstEII

GACCGTGGTGACCAAGGGTGGCCCTGGCCCCAGTTGCCCAAGA

10

20

30

40

50

G G G A A G T A G T A G A T G G A G G A G C C G T A G T A T T C C T G C C G G C
C A G G A G G C T T G G C G C A G T A G T A

【0545】

このプライマーセットは、VH配列全体の範囲を含んでいる。このセット内で、同量のプライマー（例：20 μl PCR反応に対して1 μlの各プライマー（プライマーストック20乃至100 μM））を混合し、PCRバッファー、ヌクレオチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCRサイクラー中にて94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベートした。続いて生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃至400のサイズの生成物をゲルから単離した。

10

【0546】

次に、得られたVH PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み込まれたプライマー（プライマー5'-C8-VH-A-XhoI及びプライマー3'-C8-VH-E-BstEII）を用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VHに対してはおよそ350ヌクレオチド）を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なVH DNA断片が増幅された。

【0547】

およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1（配列番号1634）、CDRH2（配列番号1635）、及びCDRH3（配列番号1636）に付随するCDRL1（配列番号1639）、CDRL2（配列番号1640）、及びCDRL3（配列番号1641）に対するヒトVL配列コンテキストを得た：

20

5'-C8-V1-A-SacI

C C T C A A G A G C T C G C C C T G A Y G C A G C C T S C C T C C G T G T C C G
T G K C C C Y T G G C M A G A C C G C C M G C A T C A C C T G C G G C G G C A A
C

3'-C8-V1-B

C A G C A C A G G G M C T G T C C T G G C T T C T G C T G A T A C C A G T G C
A C G G A C T T G G A G C C G A T G T T G T T G C C G C C G C A G G T G A T

30

5'-C8-V1-CCAGAAGCCAGGACAGKCCCCCTGTGCTGGTCTCR
T A T A C G A C G A C T C C G A C C G C C C T T C C G G C A T C C C T G A G C G
G T T C T C C G G C T C C

3'-C8-V1-D

G A C C T G G C A G T A G T A G T C G G C C T C G T C C M Y G G C C T S C R C C
C S G G A G A T G G T C A G G G T G R C G G T G K T G C C G G A G Y T G G A G C
C G G A G A A C C G

3'-C8-V1-E-BsiWI/SpeI

C C C G A T A C T A G T C G T A C G C A G C A C G G T C A G C T T T G T T C C G
C C G C C A A A C A C C A C C A G G T C G G A G G A G G A G T C C C A G A C C T
G G C A G T A G T A G T C G G C

40

【0548】

このプライマーセットは、対応するVL配列全体の範囲を含んでいる。このセット内で、同量のプライマー（例：20 μl PCR反応に対して1 μlの各プライマー（プライマーストック20乃至100 μM））を混合し、PCRバッファー、ヌクレオチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCRサイクラー中にて94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベートした。続いて

50

生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃至400のサイズの生成物をゲルから単離する。

【0549】

次に、得られたVL PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み込まれたプライマー（プライマー5' C8 - V l - A - S a c I 及びプライマー3' C8 - V l - E - B s i W I / S p e I）を用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VLに対してはおよそ330ヌクレオチド）を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なVL DNA断片が増幅された。

【0550】

次に、最終的なVH PCR生成物（すなわち、ヒト／ヒト化VHのレパートリー）を、そのそれぞれの最終的なVL PCR生成物（すなわち、ヒト／ヒト化VLのレパートリー）と、ファージディスプレイベクターpComb3H5Bhis中で組み合わせて機能的scFv抗体断片のライブラリーを形成し、そこから、繊維状ファージ上でのディスプレイ後、以下で述べるようにして抗HBsバインダーを選別し、スクリーニングし、同定し、確認した：

【0551】

軽鎖断片（SacI - SpeIで消化）450ngをファージミドpComb3H5Bhis（SacI - SpeIで消化；長断片）1400ngとライゲートさせた。次に、得られたコンビナトリアル抗体ライブラリーを、300μlのエレクトロコンピテント大腸菌XL1Blue細胞へエレクトロポレーションによって形質転換し（2.5kV、0.2cmギャップキュベット、25μFD、200オーム、Biorad gene-pulser）、独立したクローンが10⁷を超えるライブラリーサイズを得た。1時間の表現型の発現の後、pComb3H5Bhisベクターによってコードされたカルベニシリン耐性に対して陽性である形質転換体を100mlの液体スーパーブロス（SB）培地中で一晚選別した。次に、細胞を遠心分離によって回収し、市販のプラスミド調製キット（Qiagen）を用いてプラスミドの調製を行った。

【0552】

VL - ライブラリーを含むこのプラスミド - DNA（XhoI - BstEIIで消化；長断片）2800ngを重鎖V断片（XhoI - BstEIIで消化）900ngとライゲートさせ、再度エレクトロコンピテント大腸菌XL1Blue細胞300μlの2つのアリコートへエレクトロポレーションによって形質転換し（2.5kV、0.2cmギャップキュベット、25μFD、200オーム）、独立したクローンが10⁷を超えるVH - VL scFv抗体断片の全ライブラリーサイズを得た。

【0553】

表現型の発現及びカルベニシリンへのゆるやかな適応の後、抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞をSB - カルベニシリン（50μg/mL）選択培地へ移した。抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞は、次にヘルパーファージVCSM13の粒子の感染量10¹²個で感染させて繊維状M13ファージを産生及び分泌させ、ここでファージ粒子は、scFv抗体断片をコードする一本鎖pComb3H5BHIS - DNAを含み、そして対応するscFv抗体断片をファージコートタンパク質IIIへの翻訳融合物として提示した。抗体ライブラリーを提示するファージのこのプールを抗原結合要素の選別に用いた。

【0554】

同様に、前述の手順を別の標的バインダーに適用した。この目的のために、およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1（配列番号1669）、CDRH2（配列番号1670）、及びCDRH3（配列番号1671）に対するヒトVH配列コンテキストを得た：

5' C9 - VH - A - XhoI

CCACTTCTCTCGAGTCTGGGGSAGRGGTGRWGMAGCCTGGGR

SGTCCSTGARASTCTCCTGTGTCAGCCTCTTGA

3'C9 - VH - B

C C A C T C C A G C C C C T K G C C T G G A G C C T G G C G G A C C C A G T G T
A T G C C A T A A T T A C T G A A G G T G W A T C C A G A G G C T G C A C A G G
A

5'C9 - VH - C

G C T C C A G G C M A G G G G C T G G A G T G G R T G G S A C T T A T A T C A T
A T G A T G G A A A T A A G A A A T T C T A T G C A G A C T C C G T G A A G G G
C C G A

3'C9 - VH - D

G T A A T A T A C A G C C G T G T C C T C A G R T C T C A G G C T G C T C A K T
T S C A K A T M C A C C G T G Y T C K T A G A A G T G T C T C T G G T S A T G G
Y G A M T C G G C C C T T C A C G G A G T C

3'C9 - VH - E - B s t E I I

G A C C G T G G T G A C C A G G G T T C C C T G G C C C C A G T A G T C A A A T
T C C C C C C A G T A C A A G G C A A T A C C C C C A G A T T T C G C A C A G T
A A T A T A C A G C C G T G T C

【0555】

N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位をVHへ組み込むための最後の標準的なPCR反応のためのプライマーとして、5'C9 - VH - A - X h o I及び3'C9 - VH - E - B s t E I Iのオリゴヌクレオチドを用いた。

【0556】

VHと同様に、およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1（配列番号1669）、CDRH2（配列番号1670）、及びCDRH3（配列番号1671）に付随するCDRL1（配列番号1672）、CDRL2（配列番号1673）、及びCDRL3（配列番号1674）に対するヒトVL配列コンテキストを得た：

5'C9 - V l - A - S a c I

C C T C A A G A G C T C G W A C T G A C T C A G C C A C C C T C G G T G T C A G
Y G G C C C C A G G A C A G A M G G Y C A Y G A T T T C C T G T G G G G G A A A
C 3'C9 - V l - B

G C C T G G C W K C T G C T G A T A C C A G T G C A C G G T T G T A C T T C C A
A T G T T G T T T C C C C C A C A G G A A A T

5'C9 - V l - C

T G G T A T C A G C A G M W G C C A G G C M M G G C C C C T R W G C T G S T C R
T C T A T G A T G A T A A C G A G C G A C C C T C A G G G A T C C C T G A S C G
A T T C T C T G G C T C C

3'C9 - V l - D

C A C T T G A C A A T A A T A G T C G G C C T C A T C C C C G G Y T T S G A S C
C Y G K T G A T G S Y C A G G G T G G C C G A G G T C C C A G A S T T G G A G C
C A G A G A A T C G

3'C9 - V l - E - B s i W I / S p e I

C C C G A T A C T A G T C G T A C G T A G G A C G G T C A G C T T C G T C C C T
C C G C C G A A T A C C A C A T G A T C A C T A C C A C T A T C C C A C A C T T
G A C A A T A A T A G T C

【0557】

N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位をVLへ組み込むための最後の標準的なPCR反応のためのプライマーとして、5'C9 - V l - A - S a c I及び3'C9 - V l - E - B s i W I / S p e Iのオリゴヌクレオチドを用いた。

【0558】

抗原結合要素の選別のために、クローン化されたs c F vレパートリーを持つファージライブラリーを、それぞれの培養物の上清からPEG（ポリエチレングリコール）8000／NaCl沈殿及び遠心分離によって回収した。およそ 10^{11} 乃至 10^{12} 個のs c F vファージ粒子を0.4 mlのPBS／0.1%BSA中に再懸濁させ、固定化HBS抗原（例：Engerix R - B, GlaxoSmithKline, ドイツ；HBvax Pro（商標）, Aventis Pasteur MSD SNC, フランス）と共に37℃で2時間ゆっくり攪拌しながらインキュベートする。この固定化HBS抗原（例：5 µg／ml PBS）をウェルにコーティングし、続いてこのウェルを標準的なプロトコルに従ってブロックした。

10

【0559】

標的抗原に対して特異的に結合しないs c F v抗体断片を提示するファージ粒子は、PBS／0.1%BSA（洗浄の厳密性を向上させるために洗浄溶液にTween 20を添加してもよい）による洗浄工程によって除去した。洗浄後、pH 2.2のHCl - グリシンを用いて結合要素を溶離し、pH 12の2 Mトリスによる中和の後、その溶離液を新鮮な感染させていない大腸菌XL1 Blue培養物の感染に用いた。

【0560】

溶離処理したウェル中に残留する強く結合した要素を溶離するために、200 µlの新鮮な大腸菌XL1 blue培養物（OD600>0.5）を溶離処理したウェルに添加し、ゆっくり攪拌しながらさらに10分間インキュベートした。両方の大腸菌培養物を次に混合し、ヒトs c F v抗体断片をコードするファージミドコピーでの形質導入に成功した細胞をカルベニシリン耐性について再度選別し、続いてVCMS13ヘルパーファージで感染させることで、抗体提示及びインビトロ選別の第二ラウンドを開始した。通常は、合計で4乃至5ラウンドの選別を実施した。

20

【0561】

選別後、HBS特異的バインダーについてのスクリーニングを行うために、4及び5ラウンドのパンニングに対応するプラスミドDNAを大腸菌培養物から単離した。可溶性s c F v抗体断片の産生のためにVH - VL - DNA断片をプラスミドから切除した（XhoI - SpeI）。これらの断片を、元のpComb3H5BHIsとは発現コンストラクト（例：s c F v抗体断片）がFlagタグ（DYKDDDDK）をs c F v抗体断片とHis6タグとの間に有するという点で異なるプラスミドpComb3H5BFlag／Hisへ同じ制限部位を介してクローン化し、さらなるファージタンパク質を除去した。ライゲーションの後、プラスミドDNAの各プール（パンニングのラウンドが異なる）を、100 µlのヒートショックコンピテント（heat shock competent）大腸菌TG1又はXL1 blueへ形質転換し、カルベニシリンLB - 寒天へ播種した。単一コロニーを100 µlのLBカルベニシリン（50 µg／ml）中へ取り出した。

30

【0562】

VL及びVHセグメントを含むpComb3H5BHIsで形質転換された大腸菌は、遺伝子III断片の切除及び1 mM IPTGによる誘発の後、十分な量の可溶性s c F v抗体断片を産生する。適切なシグナル配列のために、s c F v抗体断片は周辺質へ放出され、そこで機能的コンフォメーションへフォールドする。

40

【0563】

形質転換プレートから単一の大腸菌TG1細菌コロニーを周辺質の小スケール製剤のために取り出し、20 mM MgCl₂及びカルベニシリン50 µg／mlを補充したSB培地（例：10 ml）中で増殖させ、回収後PBS中（例：1 ml）へ再溶解した。−70℃での凍結及び37℃での解凍を4ラウンド行うことにより、細菌の外膜を温度ショックで破壊し、s c F v抗体断片を含む可溶性周辺質タンパク質を上清中へ遊離させた。遠心分離によって無傷の細胞及び細胞片を除去した後、抗HBS s c F v抗体断片を含む上清を回収し、それを用いてHBS特異的バインダーの同定を以下のようにして行った：

【0564】

50

96ウェルプラスチックプレート (Nunc, maxisorb) のウェル上へHBs抗原を通常は4℃にて一晚コーティングした。ウェルをPBS/0.05% Tween 20で1回洗浄し、続いてPBS/3% BSAで少なくとも1時間ブロックした。ブロッキング溶液の除去後、周辺質製剤及びコントロール溶液をウェルに添加し、室温にて通常は1時間インキュベートした。次にウェルをPBS/0.05% Tween 20で3回洗浄した。固定化抗原に結合したscFv抗体断片及びコントロール抗体の検出は、モノクローナルマウス抗His6又は抗FLAGタグ抗体 (Qiagen 抗PentaHis及びM2抗Flag Sigma、通常は各々最終濃度1µg/ml PBS) を用いて行い、ペルオキシダーゼ標識ポリクローナルヤギ抗マウスFab断片抗体 (Dianova、1µg/ml PBS) で検出した。ABTS基質溶液を添加することでシグナルを発色させ、405nmの波長で測定した。ブロッキング剤に対する試験サンプルの非特異的結合は、抗原によるコーティングを行わずBSAによるブロッキングだけを行ったELISAプレート上にて同一の試薬及び同一のタイミングによる同一のアッセイを実施することによって分析した。

10

【0565】

陽性の結合が、BSA (第一のELISA実験にてブロッキング剤として使用) に対する結合によるものであり得るという可能性を排除するために、第二のELISA実験を平行して実施した。この第二のELISA実験では、抗原によるコーティングを行わずBSAによるブロッキングだけを行ったこと以外は、すべてのパラメータを第一のELISA実験と同一とした。

20

【0566】

ELISAによって同定され、HBV感染細胞の表面に提示されたHBs抗原にも結合するこれらのHBs特異的scFv抗体断片を同定するために、FLAGタグscFv抗体断片、及びそれに続くHepG2. 2. 15細胞上のFITC結合抗FLAG抗体 (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. Gastroenterology 2008; 134: 239 - 47) を用いる間接免疫蛍光法を標準的なプロトコル (例: Current Protocols in Immunology, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002, unit 21. 3) に従って実施した。感染させていないHepG2細胞をネガティブコントロールとして用いた。細胞表面にHBs抗原を最適に提示させるためのHepG2. 2. 15細胞の培養条件は、Bohne et al. によって報告された (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against the hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. Gastroenterology 2008; 134: 239 - 47) 。

30

【0567】

HBV感染細胞の表面上のHBs抗原に対して特異的に結合することが確認されたクローンは、次に、有利なタンパク質特性及びアミノ酸配列について分析した。HBs特異的scFv抗体断片を、Gly₄Ser₁-リンカーを介してCD3特異的scFv抗体断片I2C (配列番号185) と、又は本発明のその他のいずれかのCD3特異的scFv抗体断片と連結することで、組換え二重特異性タンデム単鎖抗体断片へ変換し、その結果としてドメイン配置がVH_{Muc1}-(Gly₄Ser₁)₃-VL_{Muc1}-Gly₄Ser₁-VH_{CD3}-(Gly₄Ser₁)₃-VL_{CD3}又は別のドメイン配置であるコンストラクトを得た。CHO細胞中での発現のために、(i) コザックコンセンサス配列内に埋め込まれた開始コドンを含むN末端免疫グロブリン重鎖リーダーのコード配列、及び(ii) 停止コドンが続くC末端His₆タグのコード配列の両方を、二重特異性タンデム単鎖抗体断片をコードするヌクレオチド配列へフレームを揃えて結合し、その後、遺伝子合成によって得ら

40

50

れたこのDNA断片を発現ベクターpEF-DHFR (Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) のマルチクローニング部位へ挿入した。DHFR欠失CHO細胞の安定なトランスフェクション、二重特異性単鎖抗体を培養物の上清中へ分泌するDHFR陽性トランスフェクタントの選別、及び発現レベルを高めるためのメトトレキサートによる遺伝子増幅は記述 (Macket al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) に従って実施した。その他の最新の手順はすべて標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。

10

【0568】

機能的二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、トランスフェクトされたCHO細胞の培養物の上清を用いるELISA及びフローサイトメトリーによって同定した。この目的のために、CD3結合を、ヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483) 及びマカクT細胞株4119LnPx上にて試験した。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、50µlの細胞培養物の上清と共に30分間氷上にてインキュベートした。細胞を2%FCSを含むPBSで2回洗浄し、マウス抗His抗体 (PentaHis抗体; Qiagen; 2%FCSを含むPBS50µl中にて1:20に希釈) により、結合した二重特異性タンデム単鎖抗体断片を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2%FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体 (Dianova) によって検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。

20

【0569】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し; CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行う (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002) に記載のようにして実施する。HBs抗原への結合は、上述のようにしてELISAによって試験した。結合した二重特異性タンデム単鎖抗体断片の検出は、モノクローナルマウス抗His₆抗体 (Qiagen 抗PentaHis、通常は最終濃度1µg/ml PBS) を用い、続いてペルオキシダーゼ標識ポリクローナルヤギ抗マウスFab断片抗体 (Dianova、1µg/ml PBS) を用いて行った。

30

【0570】

ヒト及びマカクCD3に対して、並びにHBs抗原に対して二重特異性結合を示すコンストラクトだけを、さらなる使用のために選別した。

【0571】

タンパク質の産生のために、完全に機能的である二重特異性タンデム単鎖抗体断片を発現し、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む; HyClone) に適応させたCHO細胞を、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む; HyClone) によりローラーボトル中にて7日間増殖させた。遠心分離により培養物の上清を細胞から除去し、精製まで-20℃で保存した。培養物の上清からの二重特異性タンデム単鎖抗体断片の精製のためのクロマトグラフィ装置としては、Aktal (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Softwareを用いた。ZnCl₂を充填したFractogel EMD Chelate (

40

50

登録商標) (Merck) を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティークロマトグラフィ (「IMAC」) を実施した。バッファー A (20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2, 0.1 M NaCl) でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清 (500 ml) を流速 3 ml / 分でカラム (10 ml) に適用した。バッファー A でカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファー B (20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2, 0.1 M NaCl, 0.5 M イミダゾール) の以下に従う 2 段階の勾配:

段階 1: 6 カラム分の容量の 20 % バッファー B

段階 2: 6 カラム分の容量の 100 % バッファー B

を用いて溶離させた。段階 2 からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールのした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma (ダイゼンホフエン) 又は Merck (ダルムシュタット) より購入する。

10

【0572】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー (25 mM クエン酸塩、200 mM リジン、5 % グリセロール、pH 7.2) で平衡状態とした Hi Load 16 / 60 Superdex 200 分取グレードカラム (GE / アマーシャム) 上で実施した。溶離したタンパク質サンプル (流速 1 ml / 分) を標準的な SDS-PAGE 及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した (分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200)。タンパク質濃度は、OD_{280nm} を用いて測定する。

20

【0573】

精製した二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、還元性条件下、4 - 12 % ビストリスゲル (Invitrogen) をプレキャストした SDS PAGE で分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量は MultiMark タンパク質スタンダード (Invitrogen) を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クーマシーを用いた (Invitrogen プロトコル)。SDS-PAGE によって測定された単離したタンパク質の純度は > 95 % である。

【0574】

PBS 中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性タンデム単鎖抗体断片の分子量は約 52 kDa である。コンストラクトはすべてこの方法に従って精製した。

30

【0575】

ウエスタンブロットは、Optitran (登録商標) BA-S83 膜及び Invitrogen Blot Module を用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性タンデム単鎖抗体断片の検出には、抗 His タグ抗体を用いた (PentaHis, Qiagen)。アルカリホスファターゼ (AP) で標識したヤギ抗マウス IgG 抗体 (Sigma) を二次抗体として用い、BCIP / NBT (Sigma) を基質として用いた。精製された二重特異性タンデム単鎖抗体断片に対応する 52 kD に単一のバンドを検出した。

【0576】

ヒト及び非チンパンジー霊長類系において二重特異性タンデム単鎖抗体断片がヒト及びマカク CD3 と、並びに HBS 抗原と相互作用する効力を、Bohne et al. による記述のように Hep G2. 2.15 細胞を標的細胞として用い (Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminated infected hepatocytes. Gastroenterology 2008; 134: 239 - 47)、キメラ T 細胞受容体で形質導入された T 細胞ではなく、刺激されたヒト CD4 / CD56 除去 PBMC 又はマカク T 細胞株 4119 LnPx をエフェクター細胞として用いる非放射性細胞障害性アッセイによって測定した。用量反応曲線を得るために、細胞障害性アッセイにおける各二重特異性タンデム単鎖抗体断片の濃度を (Bohne et al. による記述の E : T 比ではな

40

50

く)、固定したE:T比(例:10:1又は5:1)で滴定した。

【0577】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のように行った:

ペトリ皿(直径85mm、Nunc)を、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の市販の抗CD3特異的抗体(例:OKT3, Othoclone)により 37°C で1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Ficoll勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液(30乃至50mlのヒト血液)から単離した。安定化グルタミン/10%FCS/IL-220U/ml(Prol leukin, Chiron)を含む50mlのRPMI1640中、 $3-5\times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

【0578】

細胞障害性アッセイからの実験データの解析は、Windows(登録商標)用Prism4(バージョン4.02、GraphPadSoftware Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国)を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 >0.90 である。この解析プログラムにより、 EC_{50} 値を効力の尺度として算出した。

【0579】

41. 2 C型肝炎ウイルス(HCV)

およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1(配列番号1652)、CDRH2(配列番号1653)、及びCDRH3(配列番号1654)に対するヒトVH配列コンテクストを得る:

5'HC1-VH-A-XhoI

CAGCTACTCGAGTSGGGCGSAGGACTGKTGMAGCCTKSGG
RGTCCTTGAGWCTCTCTCTGCGCTG

3'HC1-VH-B

CCACTCCAGCCCCCTTCCAGGGGMCTGGCGGAYCCAGGTC
CAGAAGTAACCACTWAAGGTAMMACCAKAGRCAGCGCAGG
AGAGWCTCAGGGAC5'HC1-VH-C

CTGGGAAGGGGCTGGAGTTGGRTTTRGTGAAAGCAATTATAG
TGGAAGTACCAAGGTACAACCCGTCCTCTCAAGAGTTCGAKTCA
ACCATATCA

3'HC1-VH-D

ATACAGCCGTGTCTCKCGGCTSTCASAGAAAYTCAKCTKCAG
GKAGARCKKGTCTCKGGAGKTGTCTMYTGATATGGTGAMT
CGACTCTTG

5'HC1-VH-E

AGCCGMGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGTTGG
GCGGTGGACGGTATGGACGTCTGGGGCCGAGGGACCTTGG
TCACCGTCTC

3'HC1-VH-F-BstEII

GAGACGGTGACCAAGGTCCCTCGGGCCCCAGACGTCCATAC
C

【0580】

このプライマーセットは、VH配列全体の範囲を含んでいる。このセット内で、同量のプライマー(例:20 μl PCR反応に対して1 μl の各プライマー(プライマーストック20乃至100 μM))を混合し、PCRバッファー、ヌクレオチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCRサイクラー中にて 94°C

で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベートした。続いて生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃至400のサイズの生成物をゲルから単離した。

【0581】

次に、得られたVH PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み込まれたプライマー（プライマー5'HC1-VH-A-XhoI及びプライマー3'HC1-VH-F-BstEII）を用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VHに対してはおよそ350ヌクレオチド）を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なVH DNA断片が増幅された。

10

【0582】

およそ15乃至20ヌクレオチドの末端区間で互いにオーバーラップし、第二のプライマーがすべてアンチセンスプライマーである以下の縮重オリゴヌクレオチドを用いて、CDRH1（配列番号1652）、CDRH2（配列番号1653）、及びCDRH3（配列番号1654）に付随するCDRL1（配列番号1657）、CDRL2（配列番号1658）、及びCDRL3（配列番号1659）に対するヒトVL配列コンテキストを得た：

5'HC1-VI-A-SacI

ACTAGCGAGCTCGWGCCTGACACAGCCACCCCTCG

20

5'HC1-VI-B

GCTGACACAGCCACCCCTCGGYGTCTAGKGACCCCAAGGACAG
ASGGYCASGATCTCTCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAGC
AATATGC

3'HC1-VI-C

CCCTGAGGGGCCTCTCATTTATCTTTATATATCASCACWYA
GGGGCCCKKGCCTGGCCKCTGCTGATACCAAGTAAGCATATT
GCTTTGGCAATGC

5'HC1-VI-D

GATAATGAGAGGCCCTCAGGGRTCCCTGASCGATTCTCTG
GCTCCARGTCAGGGACATCAGYCTCGTTGRCCATCAGTGG
ASTCMRGKCAAGAACGAGGCTGACTA

30

3'HC1-VI-E-BsiWI/SpeI

GCTACTACTAGTCTGCTACGTAGGACGGTCTAGCTGGGTCCCT
CCGCCGAACACCCAGGAAGAACCACTGCTGTCTGCTGATT
GACAGTAATAGTCAAGCCTCGTCTTTCTG

【0583】

このプライマーセットは、対応するVL配列全体の範囲を含んでいる。このセット内で、同量のプライマー（例：20µl PCR反応に対して1µlの各プライマー（プライマーストック20乃至100µM））を混合し、PCRバッファー、ヌクレオチド、及びTaqポリメラーゼから成るPCR混合物へ添加した。この混合物をPCRサイクラー中にて94℃で3分間、65℃で1分間、62℃で1分間、59℃で1分間、56℃で1分間、52℃で1分間、50℃で1分間、及び72℃で10分間インキュベートした。続いて生成物をアガロースゲル電気泳動に掛け、標準的な方法に従って200乃至400のサイズの生成物をゲルから単離した。

40

【0584】

次に、得られたVL PCR生成物を、N末端及びC末端の適切なクローン化制限部位を組み込まれたプライマー（プライマー5'HC1-VI-A-SacI及びプライマー3'HC1-VI-E-BsiWI/SpeI）を用いる標準的なPCR反応のテンプレートとして用いた。適切なサイズのDNA断片（VLに対してはおよそ330ヌクレオチ

50

ド)を、標準的な方法に従うアガロースゲル電気泳動によって単離した。この方法により、十分なV L DNA断片が増幅された。

【0585】

次に、最終的なV H PCR生成物(すなわち、ヒト/ヒト化V Hのレパートリー)を、そのそれぞれの最終的なV L PCR生成物(すなわち、ヒト/ヒト化V Lのレパートリー)と、ファージディスプレイベクターp C o m b 3 H 5 B h i s中で組み合わせて機能的s c F v抗体断片のライブラリーを形成し、そこから、繊維状ファージ上での提示後、以下で述べるようにして抗H B S バインダーを選別し、スクリーニングし、同定し、確認した:

【0586】

軽鎖断片(S a c I - S p e Iで消化)450ngをファージミドp C o m b 3 H 5 B h i s (S a c I - S p e Iで消化;長断片)1400ngとライゲートさせる。次に、得られたコンビナトリアル抗体ライブラリーを、300μlのエレクトロコンピテント大腸菌X L 1 B l u e細胞へエレクトロポレーションによって形質転換し(2.5kV、0.2cmギャップキュベット、25μFD、200オーム、B i o r a d g e n e - p u l s e r)、独立したクローンが10⁷を超えるライブラリーサイズを得た。1時間の表現型の発現の後、p C o m b 3 H 5 B h i sベクターによってコードされたカルベニシリン耐性に対して陽性である形質転換体を100mlの液体スーパーブロス(SB)培地中で一晚選別した。次に、細胞を遠心分離によって回収し、市販のプラスミド調製キット(Q i a g e n)を用いてプラスミドの調製を行った。

【0587】

V L -ライブラリーを含むこのプラスミド-DNA(X h o I - B s t E I Iで消化;長断片)2800ngを重鎖V断片(X h o I - B s t E I Iで消化)900ngとライゲートさせ、再度エレクトロコンピテント大腸菌X L 1 B l u e細胞300μlの2つのアリコートへエレクトロポレーションによって形質転換し(2.5kV、0.2cmギャップキュベット、25μFD、200オーム)、独立したクローンが10⁷を超える全V H - V L s c F v(単鎖可変断片)ライブラリーサイズを得た。

【0588】

表現型の発現及びカルベニシリンへのゆるやかな適応の後、抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞をSB-カルベニシリン(50μg/mL)選択培地へ移した。抗体ライブラリーを含む大腸菌細胞は、次にヘルパーファージV C S M 1 3の粒子の感染量10¹²個で感染させて繊維状M 1 3ファージを産生及び分泌させ、ここでファージ粒子は、s c F v抗体断片をコードする一本鎖p C o m b 3 H 5 B H i s - DNAを含み、そして対応するs c F v抗体断片をファージコートタンパク質I I Iへの翻訳融合物として提示した。抗体ライブラリーを提示するファージのこのプールを抗原結合要素の選別に用いた。

【0589】

この目的のために、クローン化されたs c F v抗体断片のレパートリーを持つファージライブラリーを、それぞれの培養物の上清からP E G 8 0 0 0 / N a C l沈殿及び遠心分離によって回収した。s c F v抗体断片を提示するおよそ10¹¹乃至10¹²個のファージ粒子を0.4mlのP B S / 0.1% B S A中に再懸濁させ、実施例40.1で述べるH C V遺伝子型1a及び/又は1bからのH C V抗原E2でトランスフェクトされた10⁵乃至10⁷個のC H O細胞と共に氷上で1時間ゆっくり攪拌しながらインキュベートした。このH C V抗原でトランスフェクトされたC H O細胞を前もって遠心分離によって回収し、P B Sで洗浄し、P B S / 1% F C S (N aアジド含有)中に再懸濁させた。H C V抗原でトランスフェクトされたC H O細胞と特異的に結合しないs c F v抗体断片を提示するファージ粒子を、P B S / 1% F C S (N aアジド含有)による最大5回の洗浄工程によって除去した。洗浄後、細胞をp H 2.2のH C l - グリシン中に再懸濁させることによって(10分間のインキュベーションとそれに続くボルテックス攪拌)結合要素を細胞から溶離させ、p H 12の2Mトリスによる中和の後、その溶離液を新鮮な感染させていない大腸菌X L 1 B l u e培養物(O D 6 0 0 > 0.5)の感染に用いた。ヒト/ヒト

10

20

30

40

50

化 s c F v 抗体断片をコードするファージミドコピーでの形質導入に成功した大腸菌細胞を含む大腸菌培養物をカルベニシリン耐性について再度選別し、続いて V C M S 1 3 ヘルパーファージで感染させることで、抗体提示及びインビトロ選別の第二ラウンドを開始した。通常は、合計で 4 乃至 5 ラウンドの選別を実施した。

【0590】

選別後、H C V 抗原特異的バインダーについてのスクリーニングを行うために、4 及び 5 ラウンドのパニングに対応するプラスミド D N A を大腸菌培養物から単離した。可溶性 s c F v 抗体断片の産生のために V H - V L - D N A 断片をプラスミドから切除した (X h o I - S p e I)。これらの断片を、元の p C o m b 3 H 5 B H i s とは発現コンストラクト (例: s c F v 抗体断片) が F l a g タグ (D Y K D D D D K) を s c F v 抗体断片と H i s₆ タグとの間に有するという点で異なるプラスミド p C o m b 3 H 5 B F l a g / H i s へ、同じ制限部位を介してクローン化し、さらなるファージタンパク質を除去した。ライゲーションの後、プラスミド D N A の各プール (パニングのラウンドが異なる) を、100 μ l のヒートショックコンピテント (h e a t s h o c k c o m p e t e n t) 大腸菌 T G 1 又は X L I b l u e へ形質転換し、カルベニシリン L B - 寒天へ播種した。単一コロニーを 100 μ l の L B カルベニシリン (50 μ g / m l) 中へ取り出した。

【0591】

V L 及び V H セグメントを含む p C o m b 3 H 5 B H i s で形質転換された大腸菌は、遺伝子 I I I 断片の切除及び 1 m M I P T G による誘発の後、十分な量の可溶性 s c F v 抗体断片を産生する。適切なシグナル配列のために、s c F v 抗体断片は周辺質へ放出され、そこで機能的コンフォメーションへフォールドする。

【0592】

形質転換プレートから単一の大腸菌 T G 1 細菌コロニーを周辺質の小スケール製剤のために取り出し、20 m M M g C l₂ 及びカルベニシリン 50 μ g / m l を補充した S B 培地 (例: 10 m l) 中で増殖させ、回収後 P B S 中 (例: 1 m l) へ再溶解した。-70 °C での凍結及び 37 °C での解凍を 4 ラウンド行うことにより、細菌の外膜を温度ショックで破壊し、s c F v 抗体断片を含む可溶性周辺質タンパク質を上清中へ遊離させる。遠心分離によって無傷の細胞及び細胞片を除去した後、抗 H C V s c F v 抗体断片を含む上清を回収し、それを用いて H C V 抗原特異的バインダーの同定を以下のようにして行った: s c F v 抗体断片の H C V に対する結合を、H C V 抗原でトランスフェクトされた C H O 細胞上でのフローサイトメトリーで試験し (実施例 40. 1 参照); ネガティブコントロールとしてトランスフェクトされていない C H O 細胞を用いた。

【0593】

フローサイトメトリーのために、2. 5 × 10⁵ 個の細胞を、50 μ l の周辺質製剤 s c F v 抗体断片と共に、又は 2 % F C S を含む P B S 50 μ l 中 5 μ g / m l の精製 s c F v 抗体断片と共にインキュベートした。s c F v 抗体断片の結合は、抗 H i s 抗体 (P e n t a - H i s 抗体、B S A 非含有、Q i a g e n G m b H, ヒルデン, ドイツ連邦共和国) により 2 % F C S を含む P B S 50 μ l 中 2 μ g / m l にて検出した。第二の工程の試薬としては、R - フィコエリトリンと結合したアフィニティ精製 F (a b')₂ 断片、ヤギ抗マウス I g G (F c - ガンマ断片特異的) を 2 % F C S を含む P B S 50 μ l 中 1 : 100 に希釈したもの (D i a n o v a, ハンブルク, ドイツ連邦共和国) を用いた。サンプルは、F A C S s c a n (B D b i o s c i e n c e s, ハイデルベルク, ドイツ連邦共和国) 上で測定した。

【0594】

次に単一のクローンを有利な特性及びアミノ酸配列について分析した。H C V 特異的 s c F v 抗体断片を、G l y₄ S e r₁ - リンカーを介して C D 3 特異的 s c F v 抗体断片 I 2 C (配列番号 185) と、又は本発明のその他のいずれかの C D 3 特異的 s c F v 抗体断片と連結することで、組換え二重特異性タンデム単鎖抗体断片へ変換し、その結果としてドメイン配置が V H_{Muc1} - (G l y₄ S e r₁)₃ - V L_{Muc1} - G l y₄ S e r₁ - V H_{CD3}

- (Gly₄Ser₁)₃-VL_{CD3}又は別のドメイン配置であるコンストラクトを得た。CHO細胞中での発現のために、(i) コザックコンセンサス配列内に埋め込まれた開始コドンを含むN末端免疫グロブリン重鎖リーダーのコード配列、及び(ii) 停止コドンが続くC末端His₆タグのコード配列の両方を、二重特異性タンデム単鎖抗体断片をコードするヌクレオチド配列へフレームを揃えて結合し、その後、遺伝子合成によって得られたこのDNA断片を発現ベクターpEF-DHFR (Raumet al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150) のマルチクローニング部位へ挿入した。DHFR欠失CHO細胞の安定なトランスフェクション、二重特異性タンデム単鎖抗体断片を培養物の上清中へ分泌するDHFR陽性トランスフェクタントの選別、及び発現レベルを高めるためのメトトレキサートによる遺伝子増幅は記述 (Macket al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) に従って実施した。その他の最新の手順はすべて標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))。

10

【0595】

機能的二重特異性タンデム単鎖抗体断片の同定は、トランスフェクトされたCHO細胞の培養物の上清のフローサイトメトリー分析によって行った。この目的のために、CD3結合を、ヒトCD3陽性T細胞白血病細胞株HPB-ALL (DSMZ, ブラウンシュバイク, ACC483) 及びマカクT細胞株4119LnPx上にて試験した。HCVへの結合は、HCV抗原でトランスフェクトされたCHO細胞上で試験した (実施例40.1参照)。それぞれの細胞株の200,000個の細胞を、50µlの細胞培養物の上清と共に30分間氷上にてインキュベートした。細胞を2%FCSを含むPBSで2回洗浄し、マウス抗His抗体 (PentaHis抗体; Qiagen; 2%FCSを含むPBS 50µl中にて1:20に希釈) により、結合した二重特異性タンデム単鎖抗体断片を検出した。洗浄後、結合した抗His抗体を、2%FCSを含むPBSで1:100に希釈したフィコエリトリンに結合したFcガンマ特異的抗体 (Dianova) によって検出した。トランスフェクトされていないCHO細胞の上清をネガティブコントロールとして用いた。

20

30

【0596】

フローサイトメトリーはFACS-Calibur装置上で実施し; CellQuestソフトウェアを用いてデータの取得及び解析を行った (Becton Dickinson biosciences, ハイデルベルク)。FACS染色及び蛍光強度の測定は、Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002) に記載のようにして実施した。

【0597】

ヒト及びマカクCD3に対して、並びにHCV抗原に対して二重特異性結合を示すコンストラクトだけを、さらなる使用のために選別した。

40

【0598】

タンパク質の産生のために、完全に機能的である二重特異性タンデム単鎖抗体断片を発現し、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む; HyClone) に適応させたCHO細胞を、ヌクレオシドを含まないHyQ PF CHO液体大豆培地 (0.1% Pluronic F-68含有L-グルタミン 4.0mMを含む; HyClone) によりローラーボトル中にて7日間増殖させた。遠心分離により培養物の上清を細胞から除去し、精製まで-20℃で保存した。培養物の上清からの二重特異性タンデム単鎖抗体断片の精製のためのクロマトグラフィ装置としては、Akta (登録商標) Explorer System (GE Health Systems) 及びUnicorn (登録商標) Sof

50

wareを用いた。ZnCl₂を充填Fractogel EMD Chelate（登録商標）（Merck）を用い、製造元が提供するプロトコルに従って固定化金属アフィニティクロマトグラフィ（「IMAC」）を実施した。バッファーA（20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl）でカラムを平衡状態とし、細胞培養物の上清（500ml）を流速3ml/分でカラム（10ml）に適用した。バッファーAでカラムを洗浄して非結合サンプルを除去した。結合したタンパク質を、バッファーB（20mMリン酸ナトリウムバッファー pH 7.2、0.1M NaCl、0.5M イミダゾール）の以下に従う2段階の勾配：

段階1：6カラム分の容量の20%バッファーB

段階2：6カラム分の容量の100%バッファーB

を用いて溶離させた。段階2からの溶離したタンパク質画分をさらなる精製のためにプールした。化学薬品はすべて研究グレードであり、Sigma（ダイゼンホフエン）又はMerck（ダルムシュタット）より購入する。

【0599】

ゲル濾過クロマトグラフィを、平衡バッファー（25mM クエン酸塩、200mM リジン、5% グリセロール、pH 7.2）で平衡状態としたHiLoad 16/60 Superdex 200 分取グレードカラム（GE/アマーシャム）上で実施した。溶離したタンパク質サンプル（流速1ml/分）を標準的なSDS-PAGE及びウエスタンブロットによる検出に掛けた。精製の前に、分子量測定のためにカラムを校正した（分子量マーカーキット、Sigma MW GF-200）。タンパク質濃度は、OD_{280nm}を用いて測定した。

【0600】

精製した二重特異性タンデム単鎖抗体断片は、還元性条件下、4-12%ビストリスゲル（Invitrogen）をプレキャストしたSDSPAGEで分析した。サンプルの調製及び適用は製造元が提供するプロトコルに従って実施した。分子量はMultiMarkタンパク質スタンダード（Invitrogen）を用いて決定した。ゲルの染色にはコロイド状クマシーを用いた（Invitrogenプロトコル）。SDS-PAGEによって測定された単離したタンパク質の純度は>95%である。

【0601】

PBS中のゲル濾過によって測定する自然条件下での二重特異性タンデム単鎖抗体断片の分子量は約52kDaである。すべてのコンストラクトをこの方法に従って精製した。

【0602】

ウエスタンブロットは、Optitran（登録商標）BA-S83膜及びInvitrogen Blot Moduleを用い、製造元が提供するプロトコルに従って実施した。二重特異性タンデム単鎖抗体断片の検出には、抗Hisタグ抗体を用いた（PentaHis, Qiagen）。アルカリホスファターゼ（AP）で標識したヤギ抗マウスIg抗体（Sigma）を二次抗体として用い、BCIP/NBT（Sigma）を基質として用いた。精製された二重特異性タンデム単鎖抗体断片に対応する52kDに単一のバンドを検出した。

【0603】

ヒト及び非チンパンジー霊長類系において二重特異性タンデム単鎖抗体断片がヒト及びマカクCD3と、並びにHCV抗原と相互作用する効力を、HCV抗原でトランスフェクトされたCHO細胞を標的細胞として（実施例40.1参照）、刺激されたヒトCD4/CD56除去PBMC又はマカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞として用いるクロム51（⁵¹Cr）の放出に基づく細胞障害性アッセイによって測定した。

【0604】

刺激されたヒトPBMCの作製は以下のようにして行った：

ペトリ皿（直径85mm、Nunc）を、最終濃度1μg/mlの市販の抗CD3特異的抗体（例：OKT3, Othoclone）により37℃で1時間コーティングした。非結合タンパク質をPBSによる1段階の洗浄によって除去した。新鮮なPBMCを、Fi

10

20

30

40

50

c o l l 勾配遠心分離により標準的なプロトコルに従って末梢血液（30乃至50mlのヒト血液）から単離した。安定化グルタミン／10% FCS／IL-220U/ml（P r o l e u k i n , C h i r o n）を含む50mlのRPMI1640中、 $3-5 \times 10^7$ 個のPBMCを、あらかじめコーティングしたペトリ皿に添加し、2日間刺激した。3日目に細胞を回収し、RPMI1640で1回洗浄した。IL-2を添加して最終濃度を20U/mlとし、上記と同じ細胞培地中にて細胞を再度1日培養した。

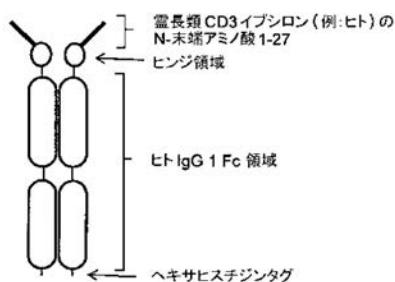
【0605】

標的細胞をPBSで2回洗浄し、50% FCSを含む最終容量100μlのRPMI中、11.1MBqの ^{51}Cr にて37℃で45分間標識した。続いて、標識された標的細胞を5mlのRPMIで3回洗浄し、次に細胞障害性アッセイに用いた。アッセイは、96ウェルプレート上、全容量250μlの補足RPMI（上記のように）中にて、E:T比10:1で実施した。種間特異的二重特異性タンデム単鎖抗体断片1μg/ml及びその3倍希釈物20個を適用した。アッセイの時間は18時間とし、細胞障害性は、最大溶解（トリトンXの添加）と自然溶解（エフェクター細胞なし）との差に関連する上清中の放出されたクロムの相対値として測定した。測定はすべて4個の反復サンプルで行った。上清中のクロムの放射能の測定は、Wizard 3"ガンマカウンター（Perkin Elmer Life Sciences GmbH, ケルン, ドイツ）を用いて実施した。実験データの解析は、Windows（登録商標）用Prism4（バージョン4.02、GraphPad Software Inc., サンディエゴ, カリフォルニア州, 米国）を用いて実施した。このソフトウェアによって決定されるS字型用量反応曲線の R^2 値は、通常 >0.90 である。この解析プログラムにより、 EC_{50} 値を効力の尺度として算出した。

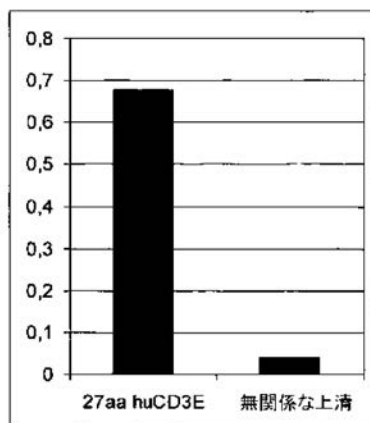
10

20

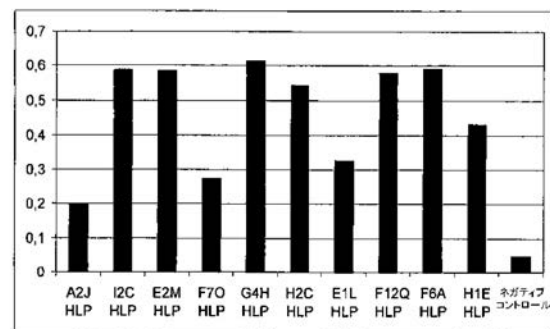
【図1】



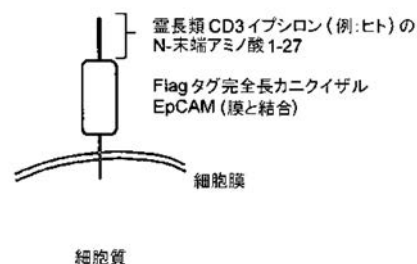
【図2】



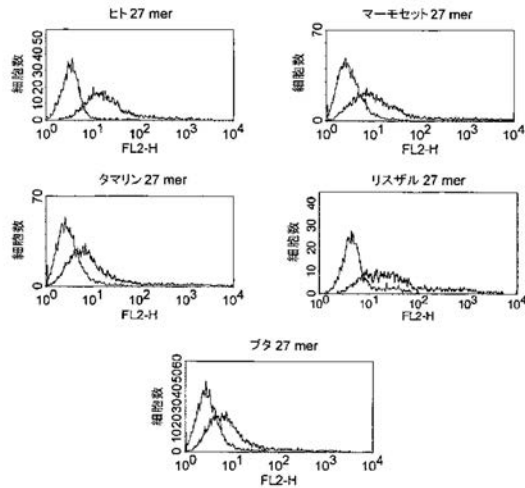
【図3】



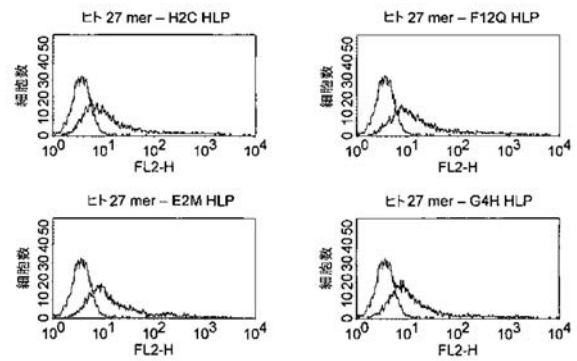
【図4】



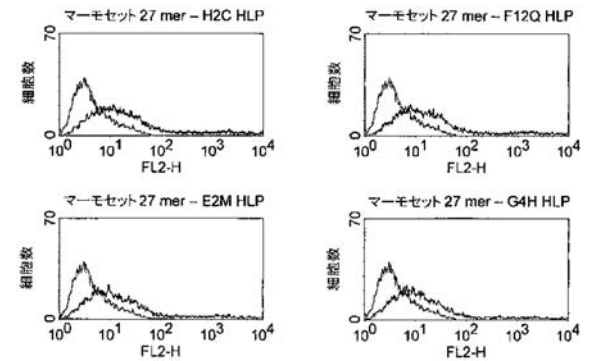
【図 5】



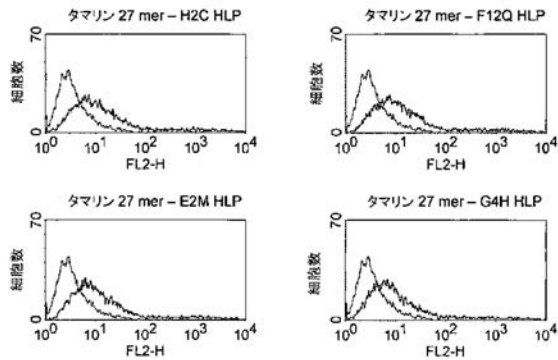
【図 6 A】



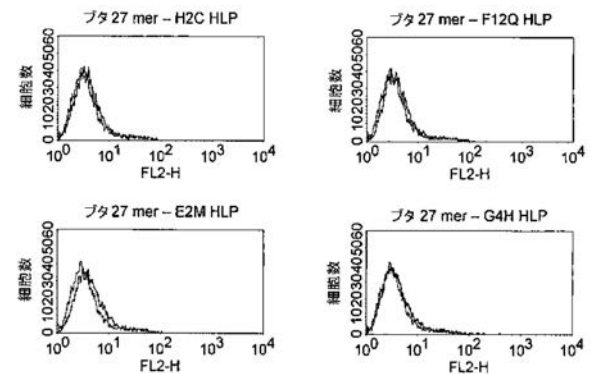
【図 6 B】



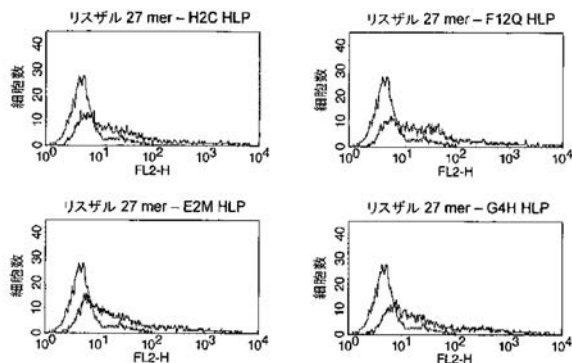
【図 6 C】



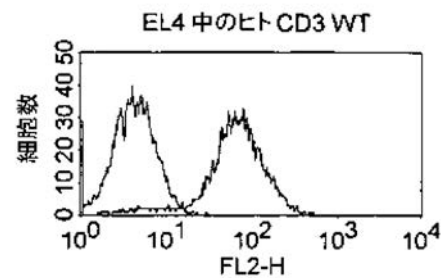
【図 6 E】



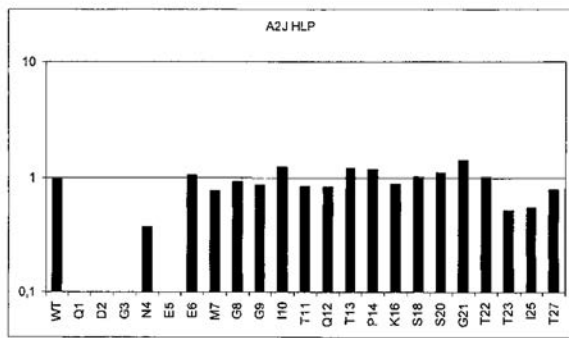
【図 6 D】



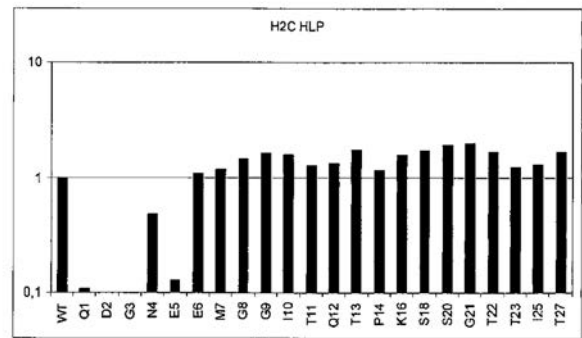
【図 7】



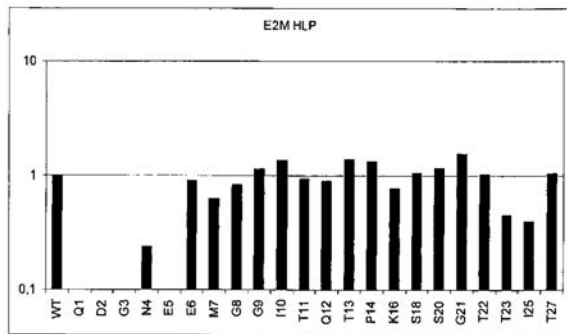
【図 8 A】



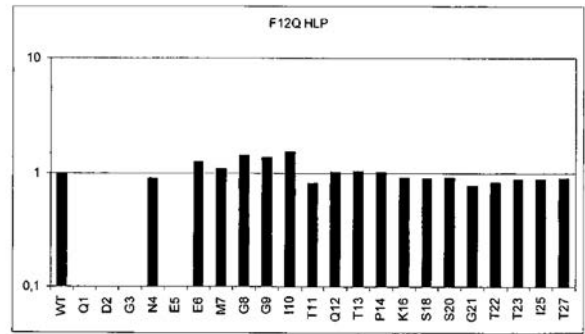
【図 8 C】



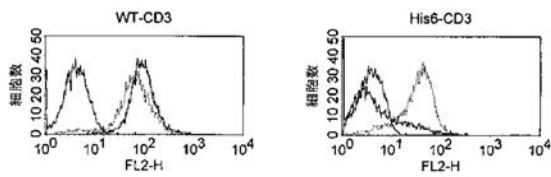
【図 8 B】



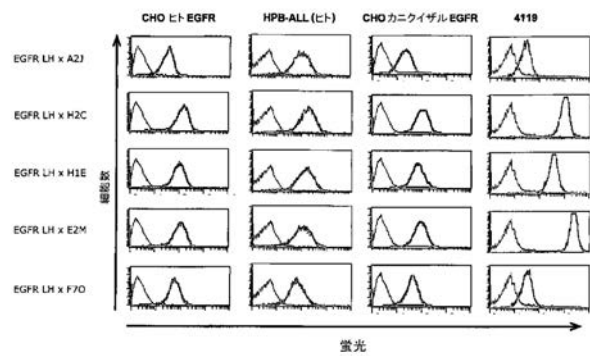
【図 8 D】



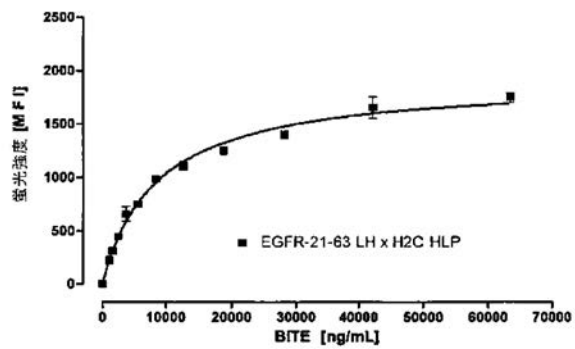
【図 9】



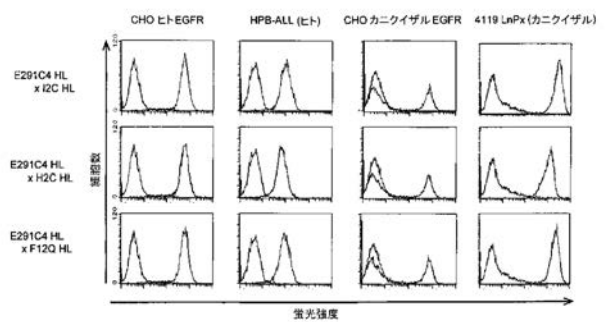
【図 11 a】



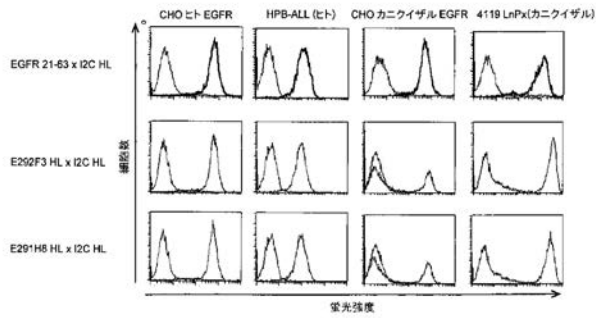
【図 10】



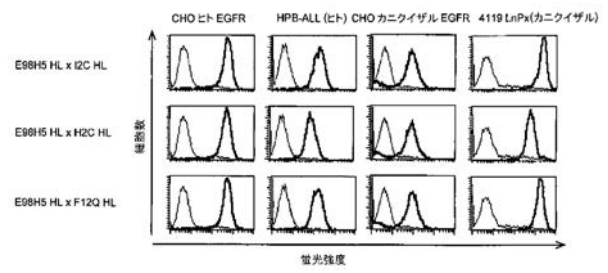
【図 11 b】



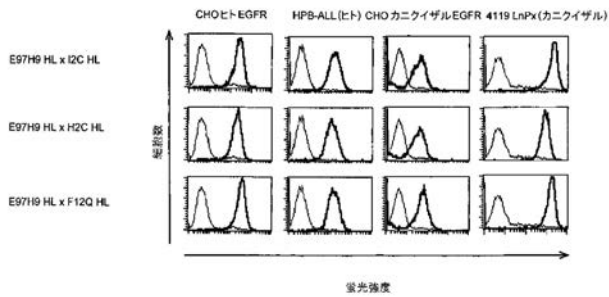
【図 1 1 c】



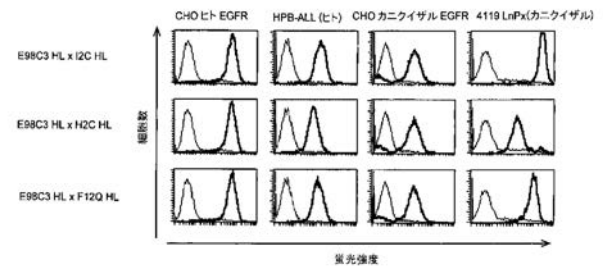
【図 1 1 e】



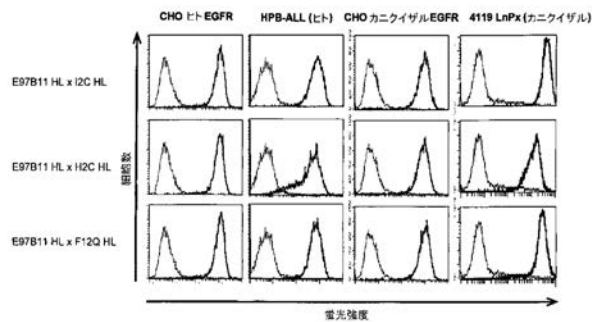
【図 1 1 d】



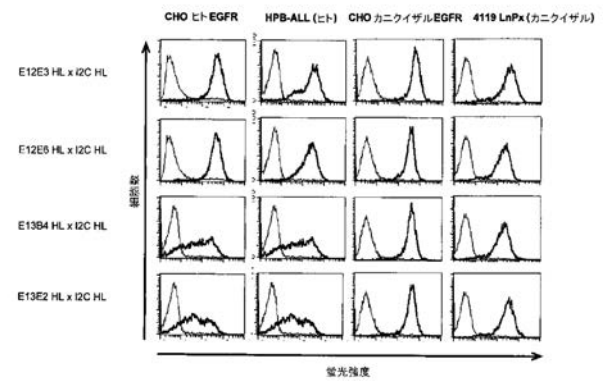
【図 1 1 f】



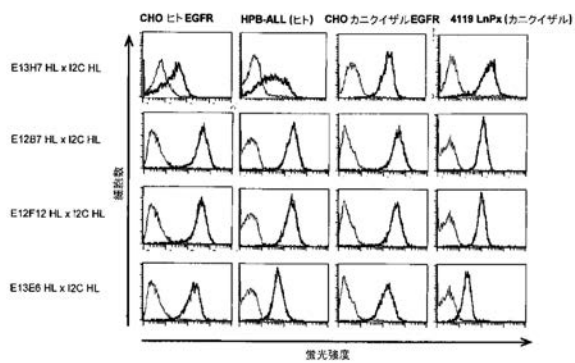
【図 1 1 g】



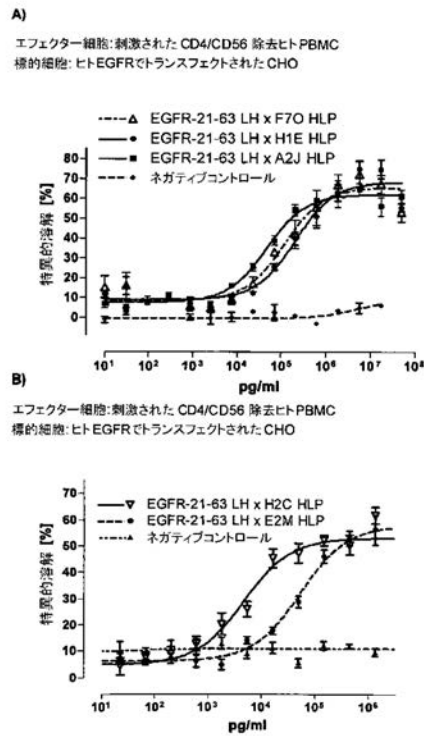
【図 1 1 i】



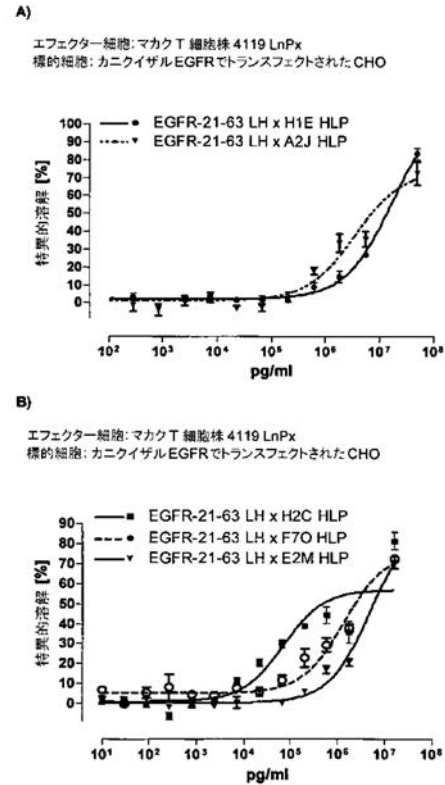
【図 1 1 h】



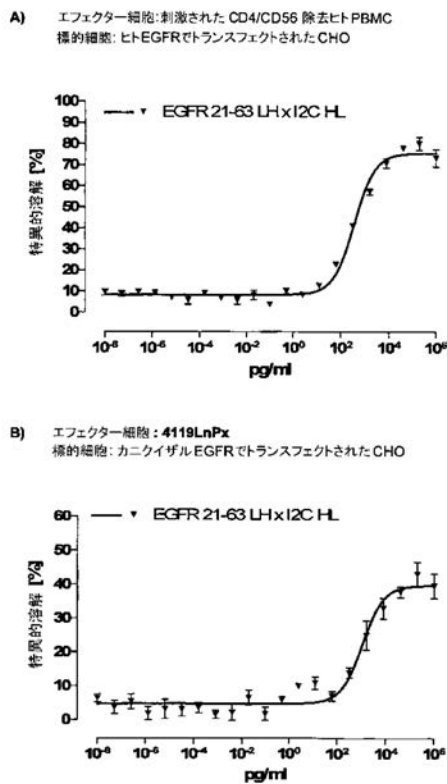
【図 1 2】



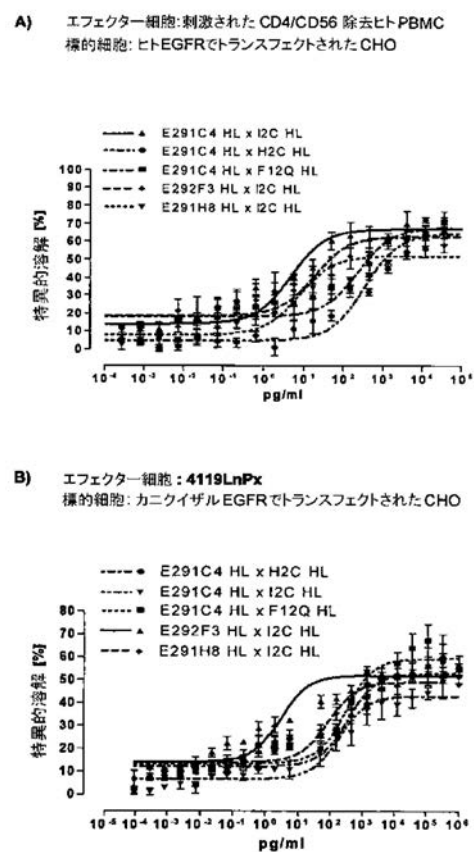
【図 1 3 a】



【図 1 3 b】

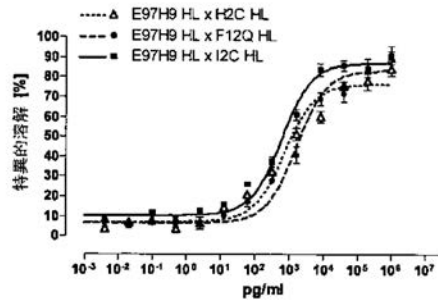


【図 1 3 c】

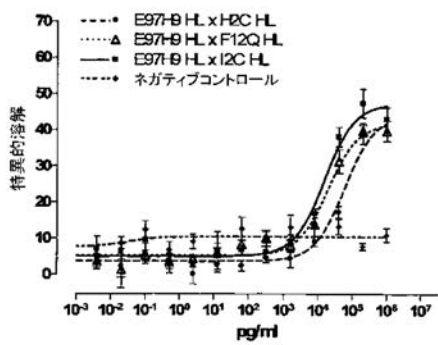


【図 1 3 d】

A) エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒトEGFRでトランスフェクトされた CHO

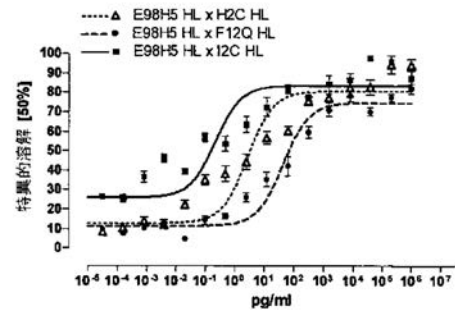


B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRでトランスフェクトされた CHO

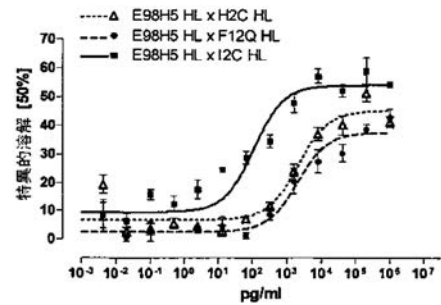


【図 1 3 e】

A) エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒトEGFRでトランスフェクトされた CHO

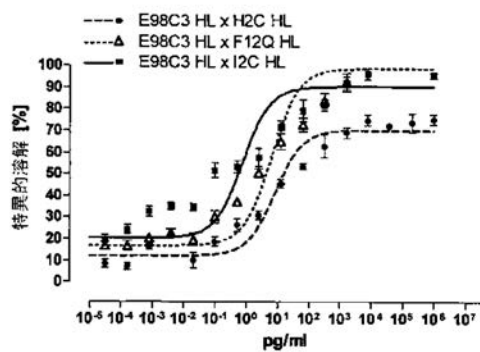


B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRでトランスフェクトされた CHO

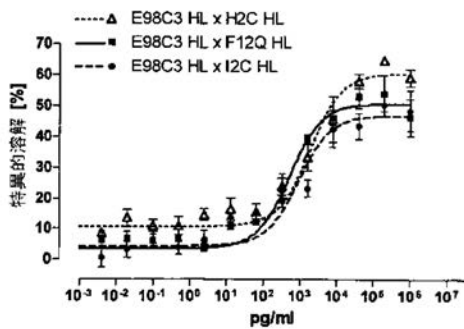


【図 1 3 f】

A) エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒトEGFRでトランスフェクトされた CHO

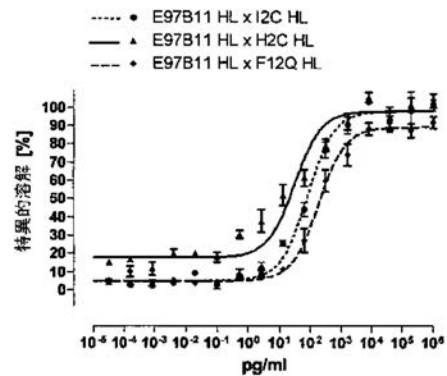


B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRでトランスフェクトされた CHO

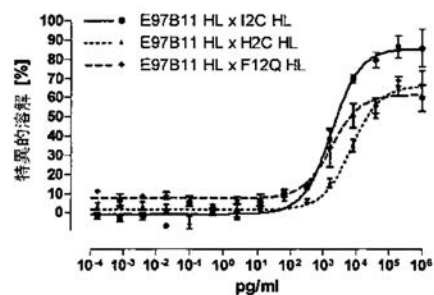


【図 1 3 g】

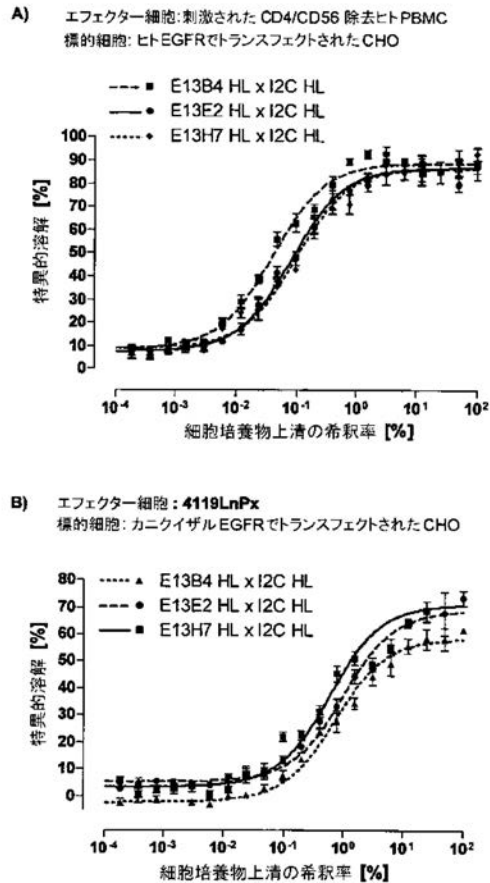
A) エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒトEGFRでトランスフェクトされた CHO



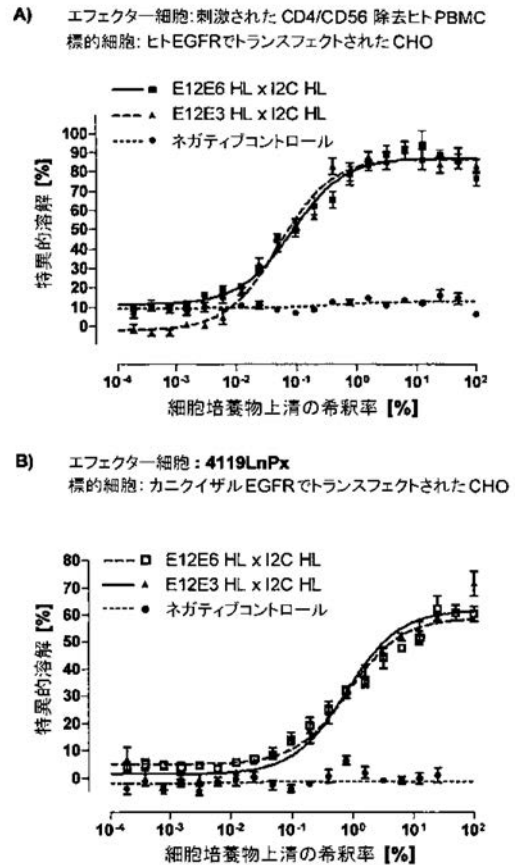
B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRでトランスフェクトされた CHO



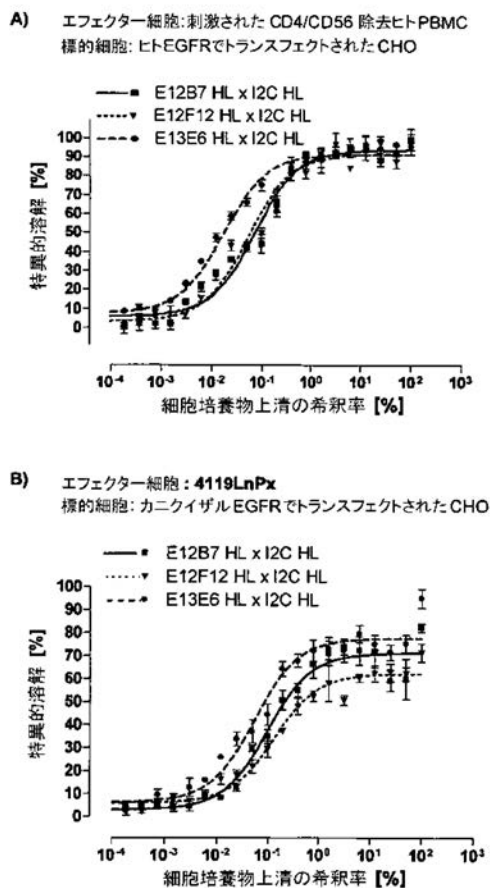
【図 1 3 h】



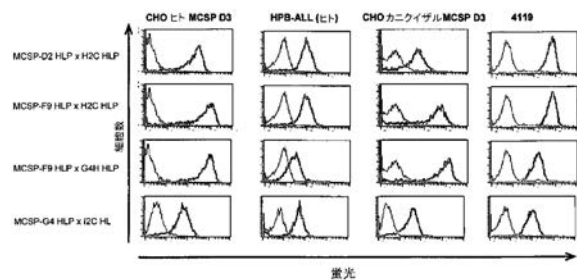
【図 1 3 i】



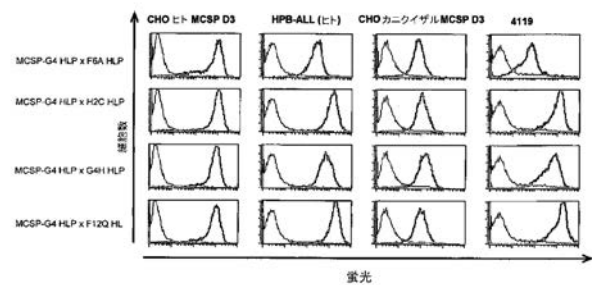
【図 1 3 j】



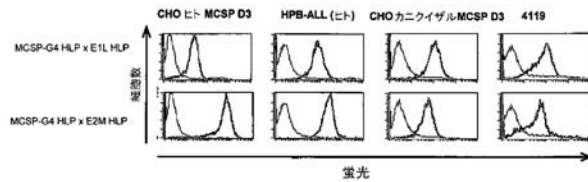
【図 1 4】



【図 1 5】



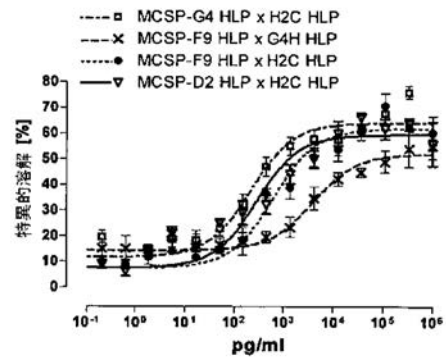
【図 16】



【図 17】

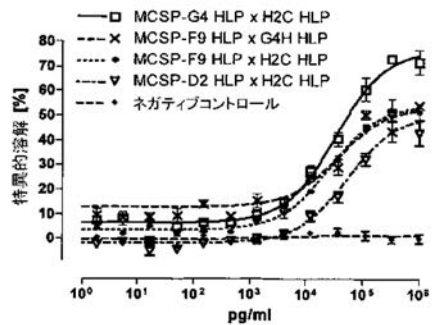
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



B)

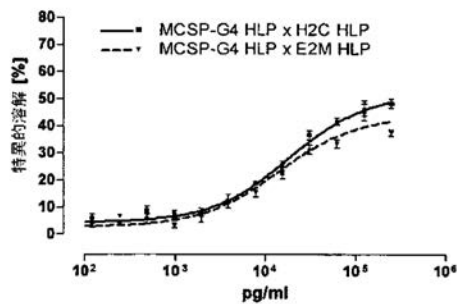
エフェクター細胞: マカク T 細胞株 4119 LnPx
標的細胞: カニクイザル MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



【図 18】

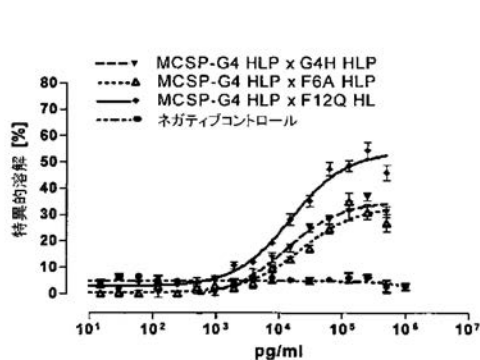
A)

エフェクター細胞: マカク T 細胞株 4119 LnPx
標的細胞: カニクイザル MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



B)

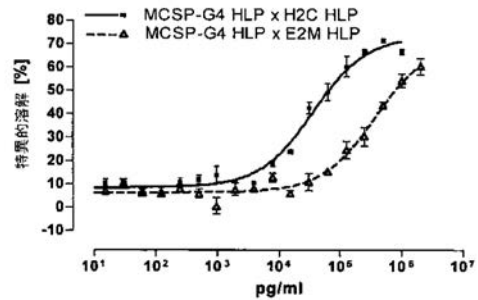
エフェクター細胞: マカク T 細胞株 4119 LnPx
標的細胞: カニクイザル MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



【図 19】

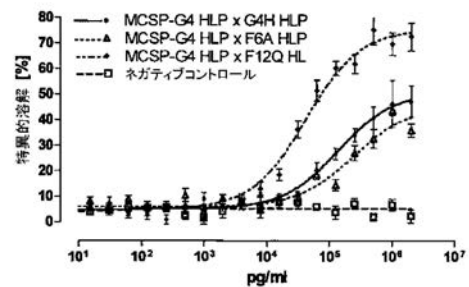
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



B)

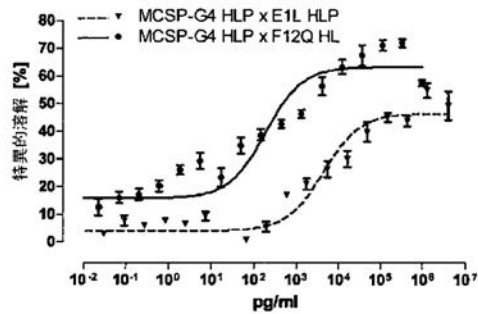
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO



【図 20】

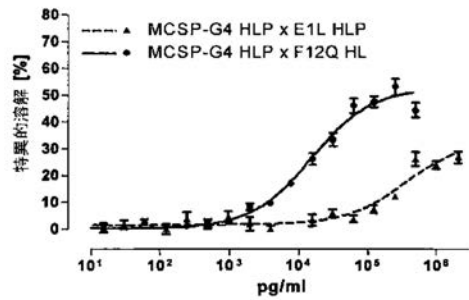
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
 標的細胞: ヒトMCSP D3でトランスフェクトされた CHO



B)

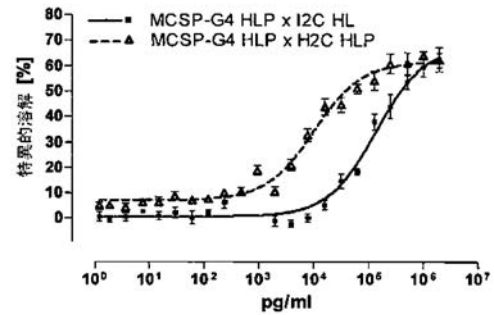
エフェクター細胞: マカクT細胞株 4119 LnPx
 標的細胞: カニクイザルMCSP Dでトランスフェクトされた CHO



【図 21】

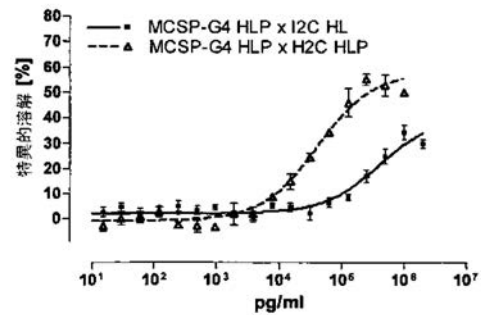
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
 標的細胞: ヒトMCSP D3でトランスフェクトされた CHO

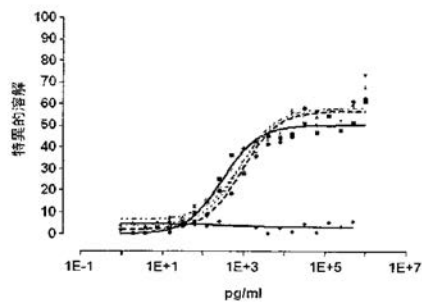


B)

エフェクター細胞: マカクT細胞株 4119 LnPx
 標的細胞: カニクイザルMCSP D3でトランスフェクトされた CHO

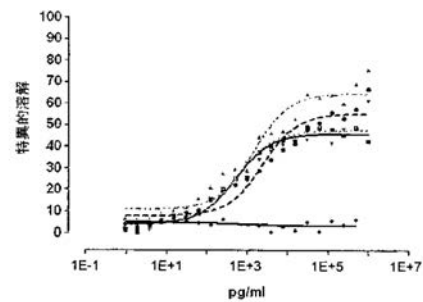


【図 22-1】



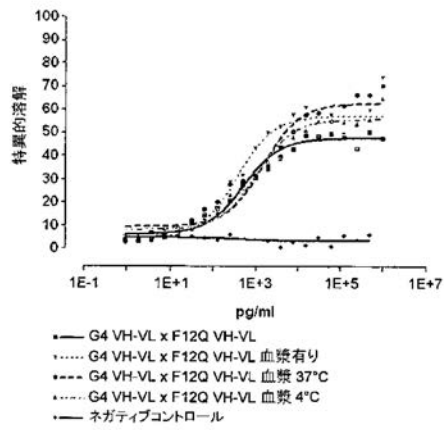
● G4 VH-VL x I2C VH-VL
 ○ G4 VH-VL x I2C VH-VL 血漿有り
 ▲ G4 VH-VL x I2C VH-VL 血漿 37°C
 △ G4 VH-VL x I2C VH-VL 血漿 4°C
 ● ネガティブコントロール

【図 22-2】

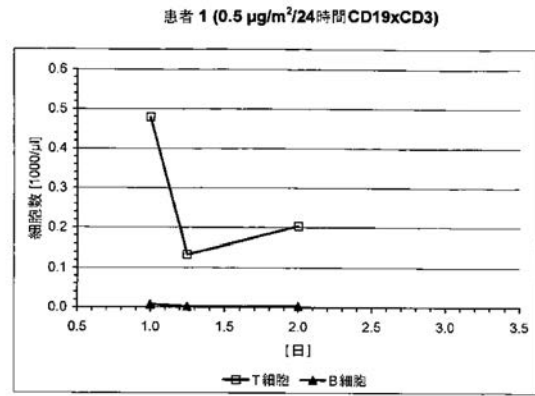


● G4 VH-VL x H2C VH-VL
 ○ G4 VH-VL x H2C VH-VL 血漿有り
 ▲ G4 VH-VL x H2C VH-VL 血漿 37°C
 △ G4 VH-VL x H2C VH-VL 血漿 4°C
 ● ネガティブコントロール

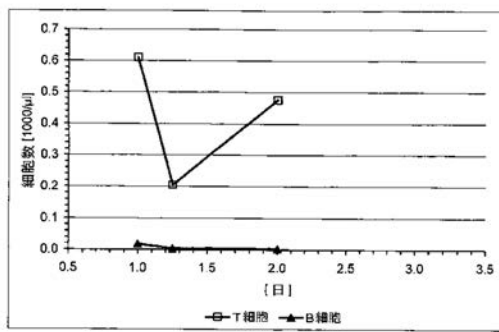
【図 2 2 - 3】



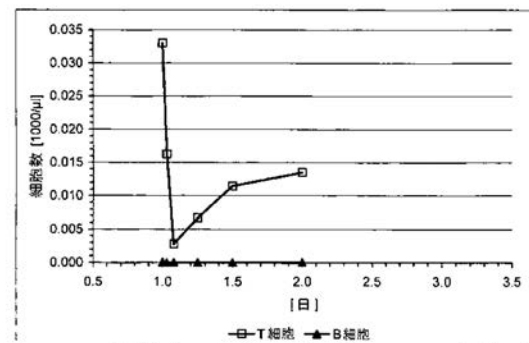
【図 2 3 a】

患者 7 ($1.5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間CD19xCD3}$)

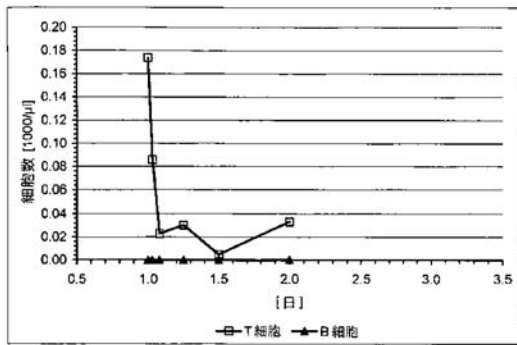
【図 2 3 b】

患者 23 ($15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間CD19xCD3}$)

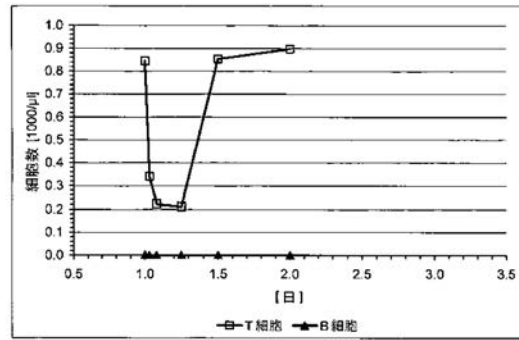
【図 2 3 c】

患者 30 ($30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{時間CD19xCD3}$)

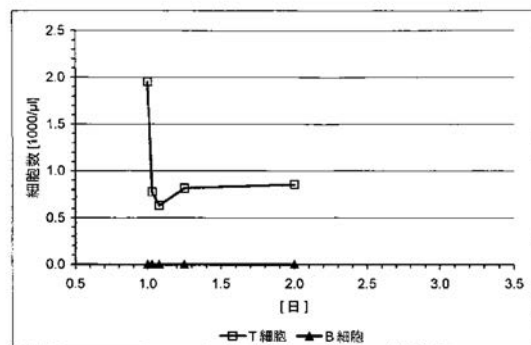
【図 2 3 d】

患者 31 ($30 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間 CD19xCD3)

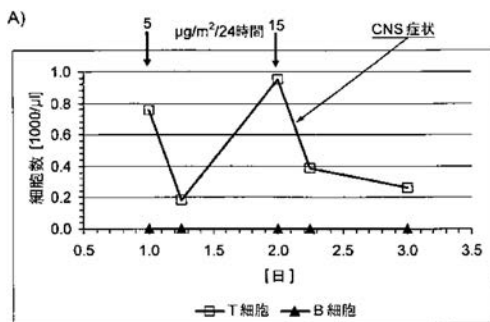
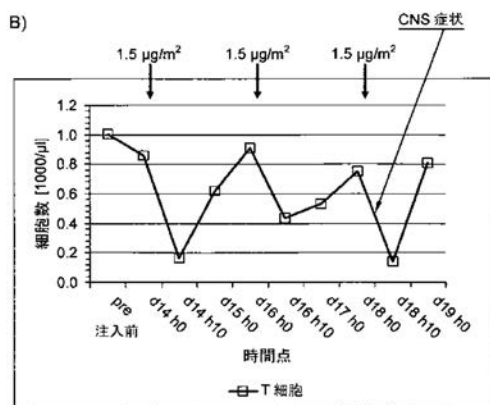
【図 2 3 e】

患者 33 ($60 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間 CD19xCD3)

【図 2 3 f】

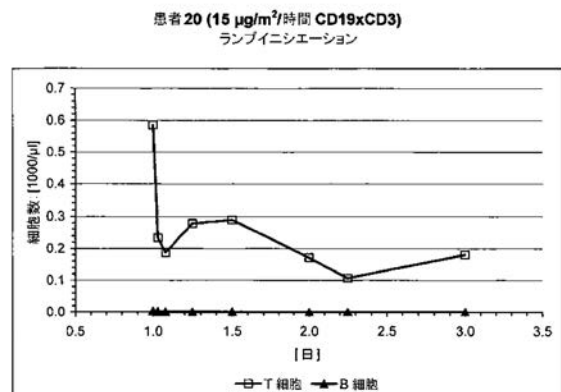


【図 2 4】

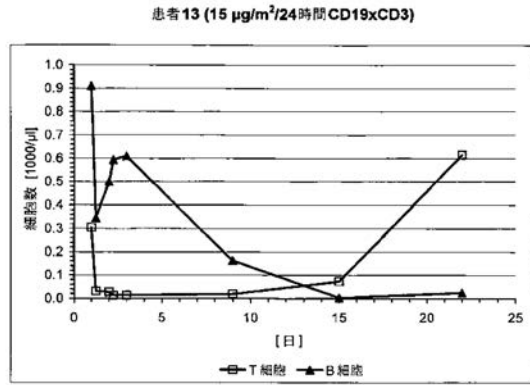
患者19 (連続注入: 最初の1日は $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間の CD19xCD3、続いて $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間を維持)

患者 003002 (ボラス注入試験)

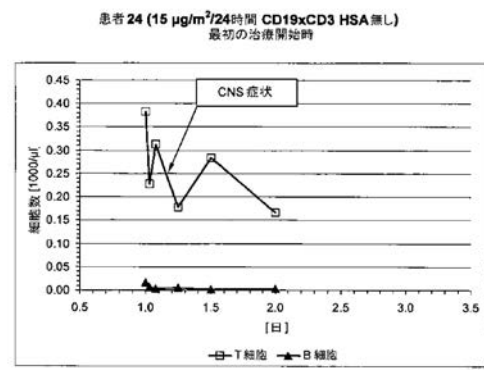
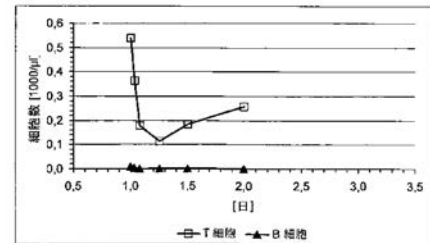
【図 2 5】



【図 26】

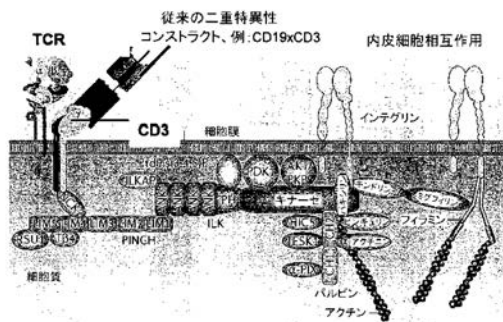


【図 27】

患者 24 ($15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24$ 時間 CD19xCD3 HSA 有り)
2 回目の治療開始時

【図 28】

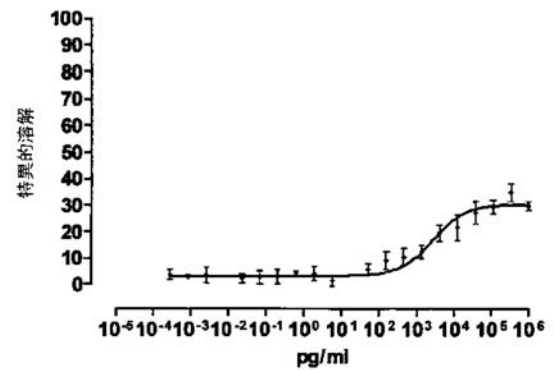
コンテキスト依存的 CD3 エピトープへの一面の結合によって誘発する
内皮細胞への T 細胞の接着モデル



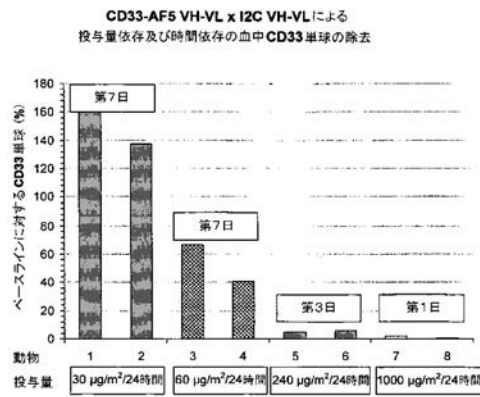
【図 29】

カニクイザルの試験物質 CD33-AF5 VH-VL x I2C VH-VL
の細胞障害活性

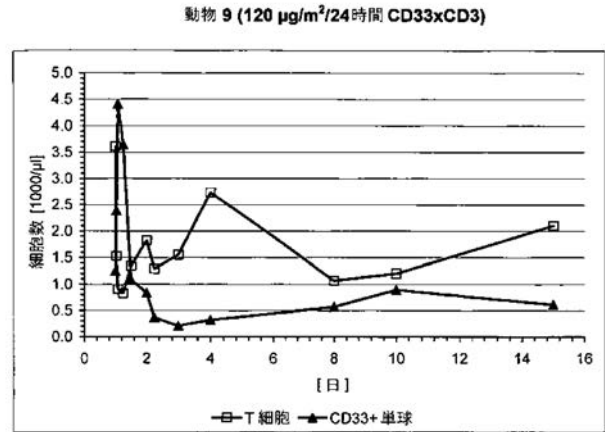
標的細胞: カニクイザル CD33 CHO; エフェクター細胞: 4119 LnPx
E:T 比 10:1; アッセイ時間: 18 時間
EC50: 2.7 ng/ml



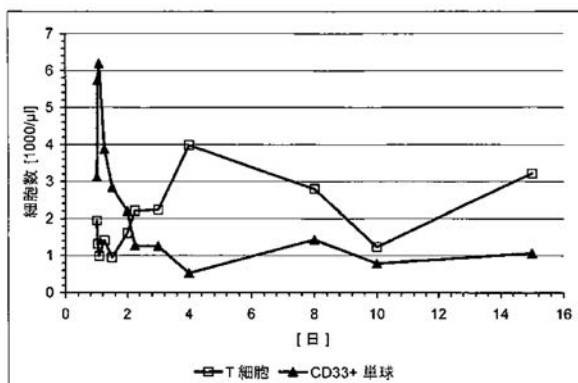
【図 30 A】



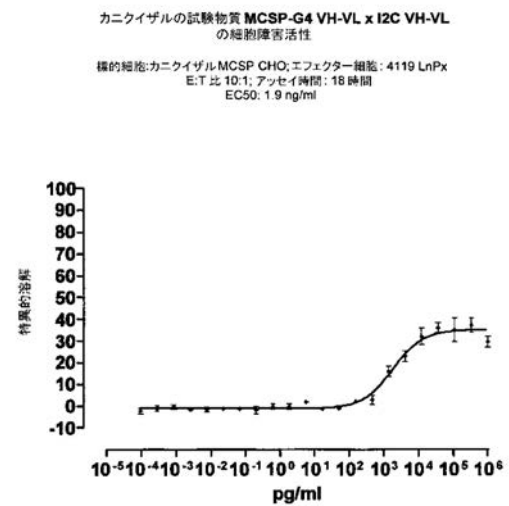
【図 30 B - 1】



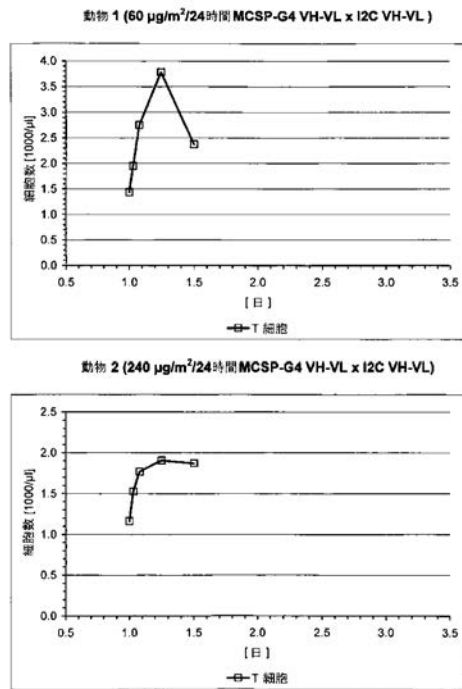
【図 30 B - 2】



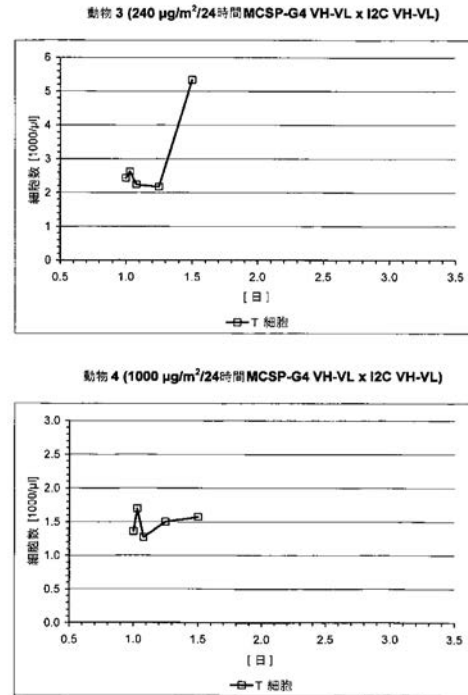
【図 31】



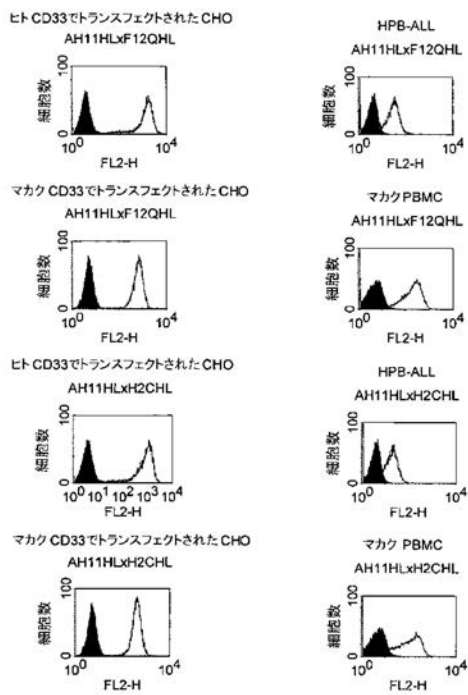
【図 3 2 - 1】



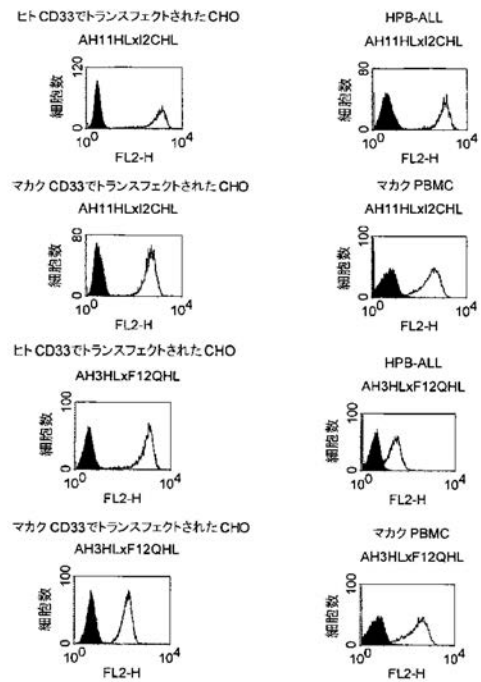
【図 3 2 - 2】



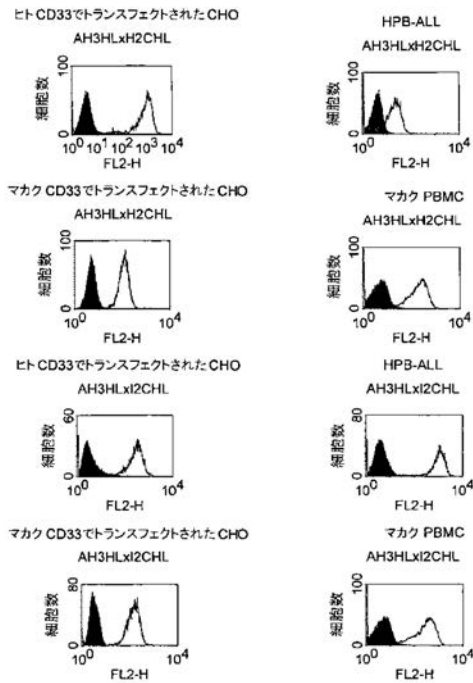
【図 3 3 - 1】



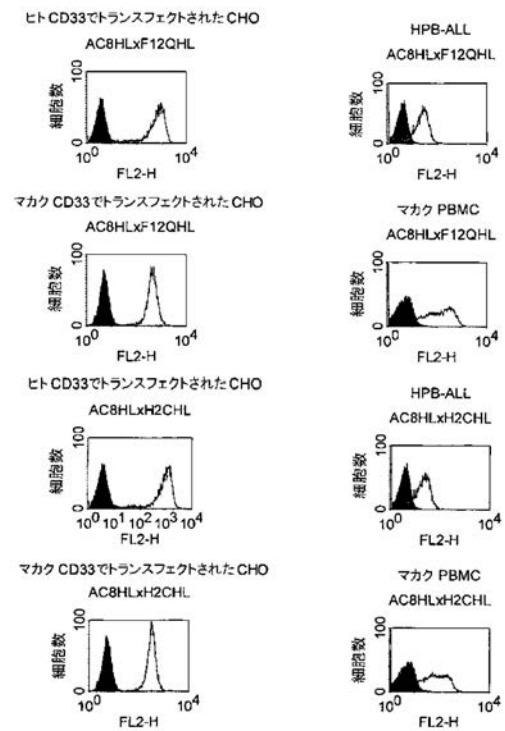
【図 3 3 - 2】



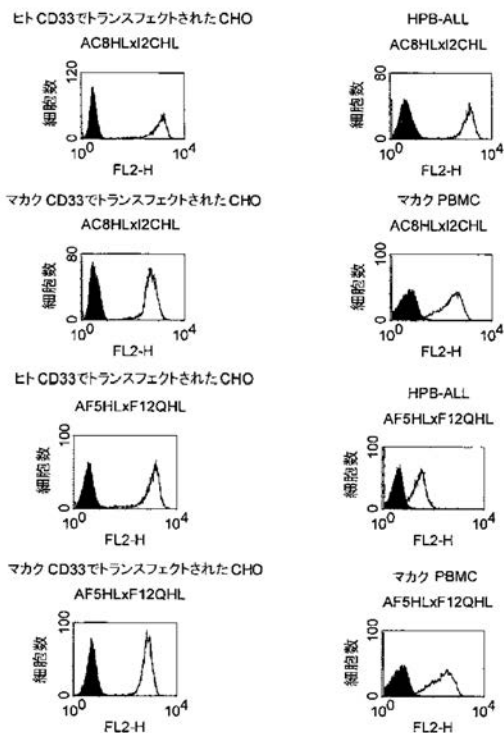
【図 3 3 - 3】



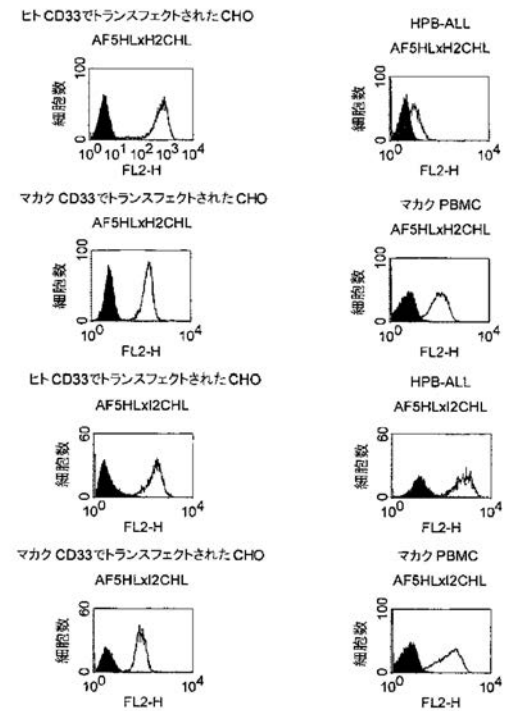
【図 3 3 - 4】



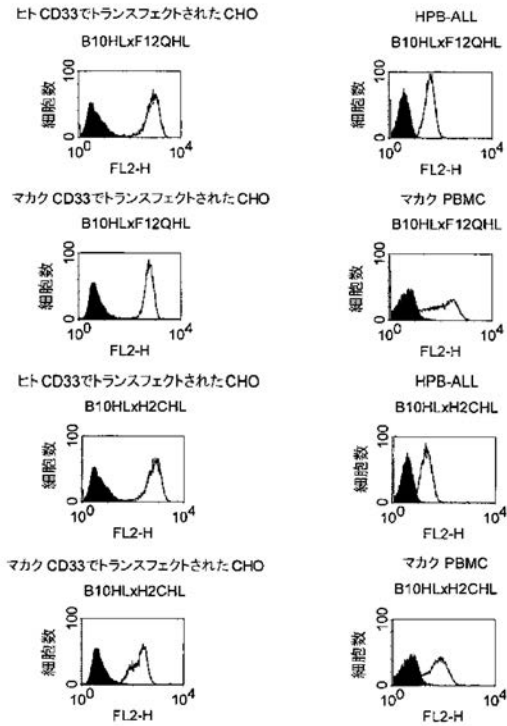
【図 3 3 - 5】



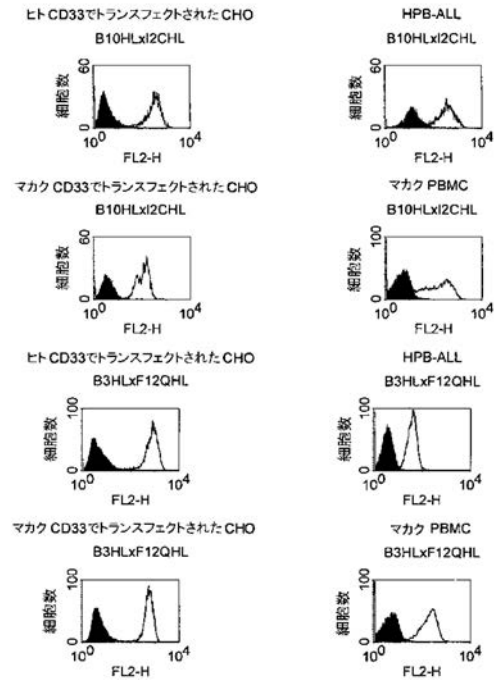
【図 3 3 - 6】



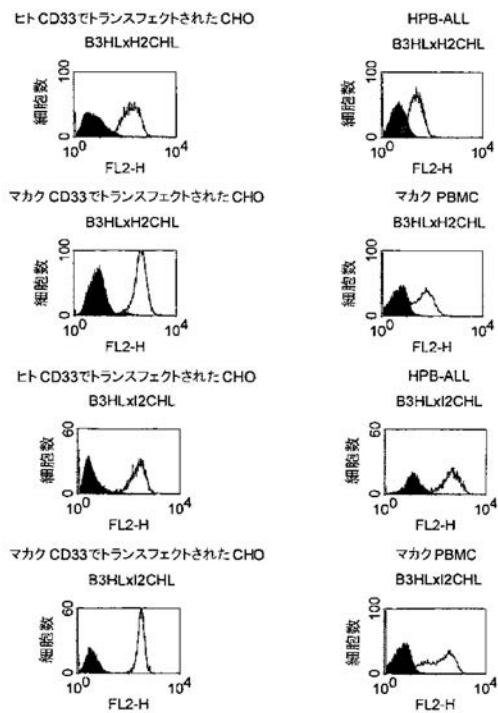
【図 3 3 - 7】



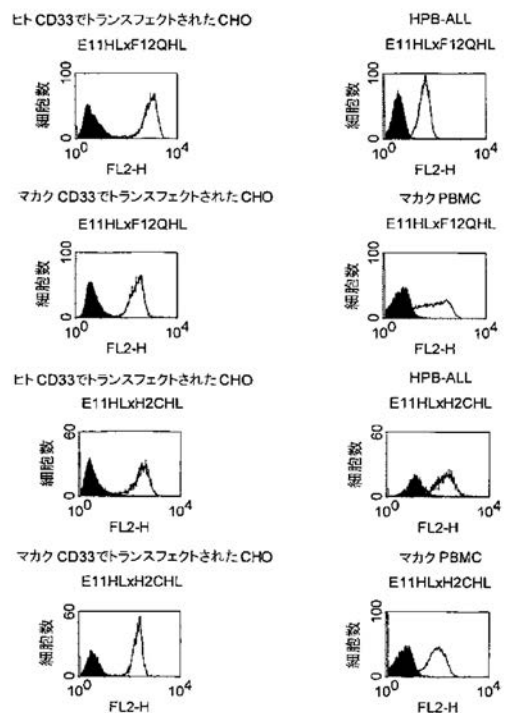
【図 3 3 - 8】



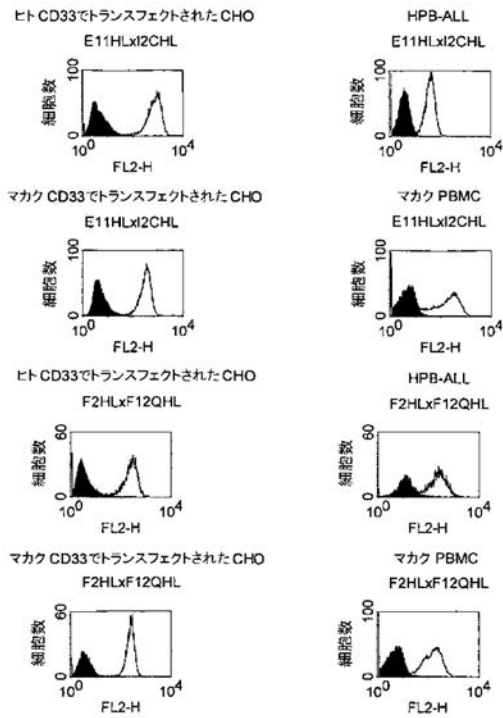
【図 3 3 - 9】



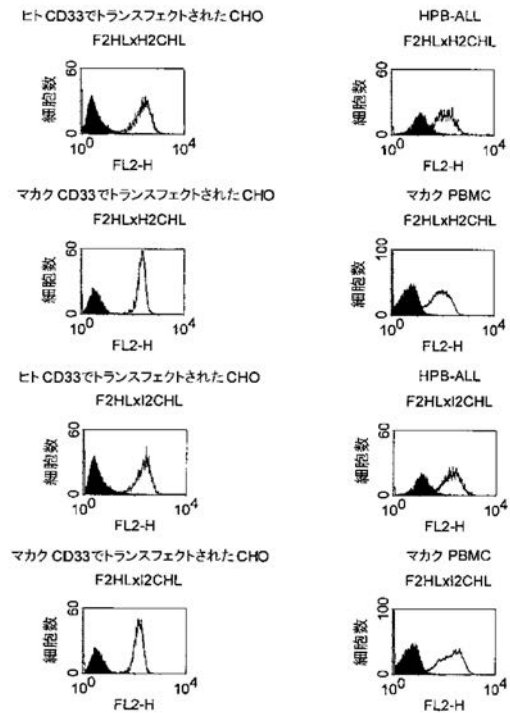
【図 3 3 - 10】



【図 3 3 - 1 1】

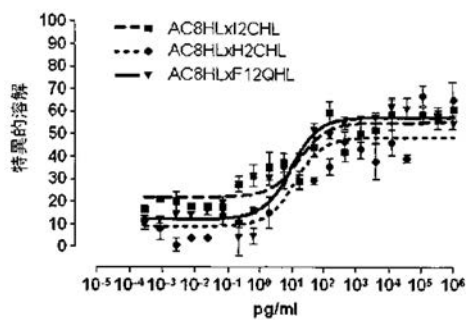


【図 3 3 - 1 2】



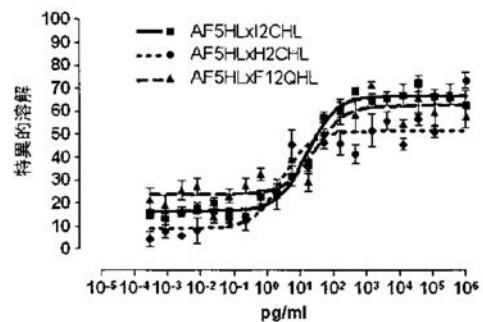
【図 3 4 - 1】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33でトランスフェクトされた CHO

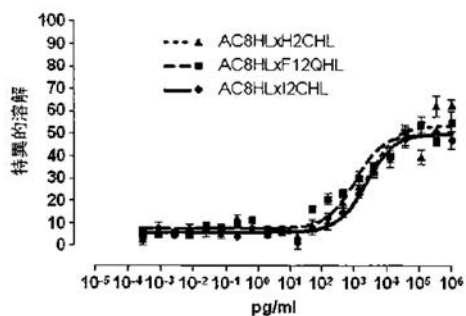


【図 3 4 - 2】

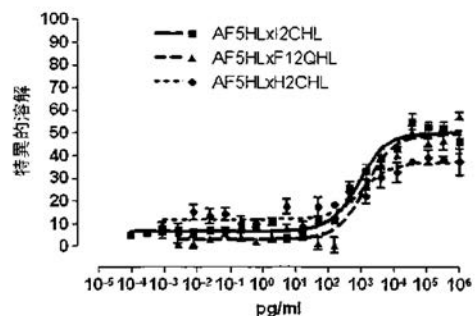
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33でトランスフェクトされた CHO



エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33でトランスフェクトされた CHO

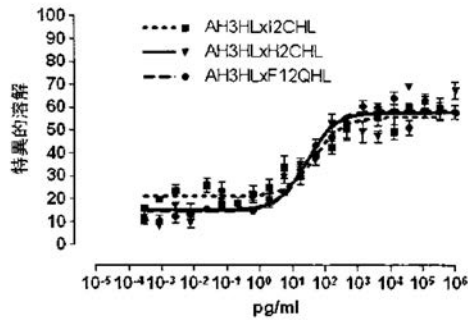


エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33でトランスフェクトされた CHO



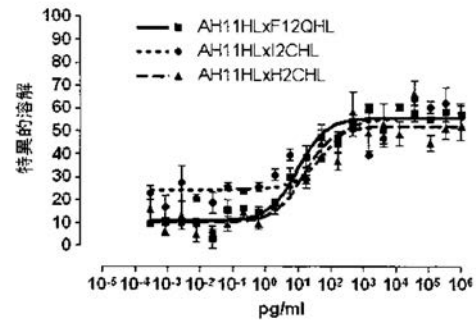
【図 3 4 - 3】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO

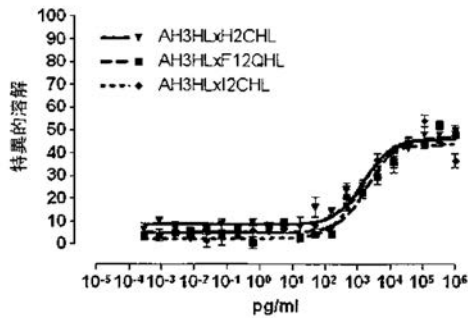


【図 3 4 - 4】

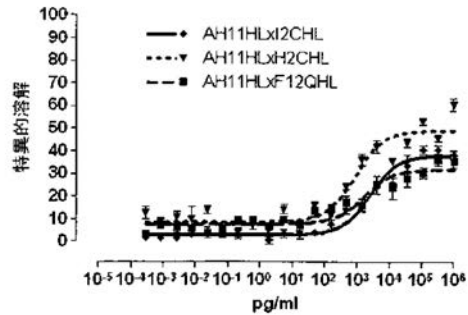
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO



エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO

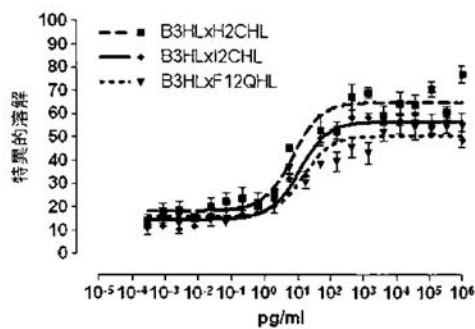


エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO

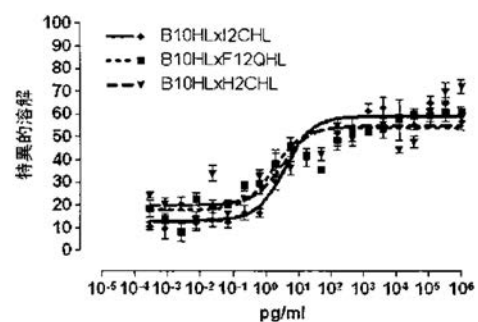


【図 3 4 - 5】

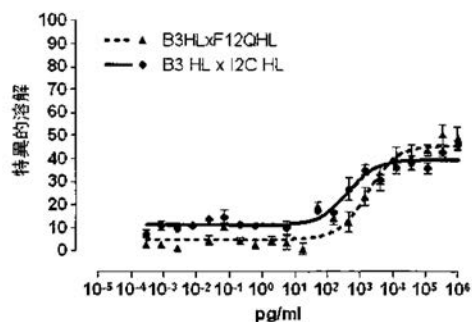
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO



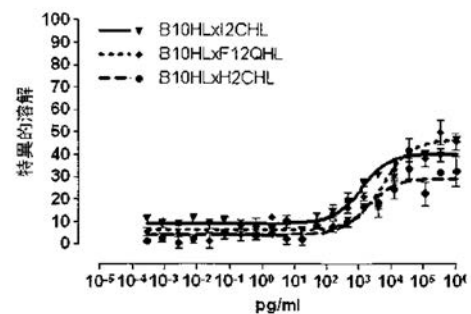
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO



エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO

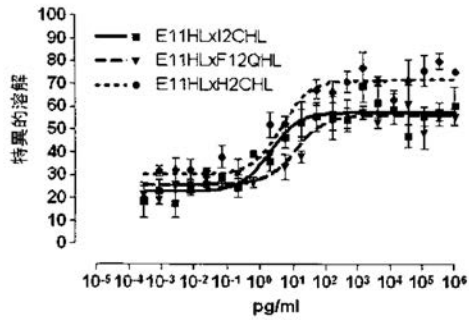


エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO



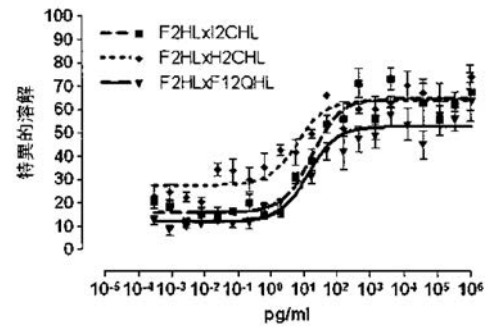
【図 3 4 - 7】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO



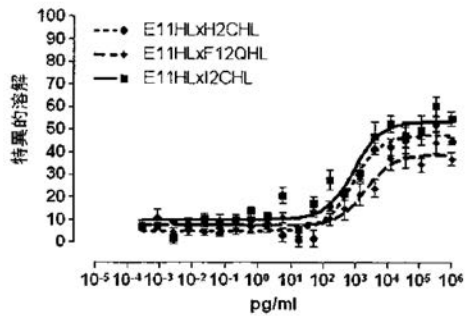
【図 3 4 - 8】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CD33 でトランスフェクトされた CHO



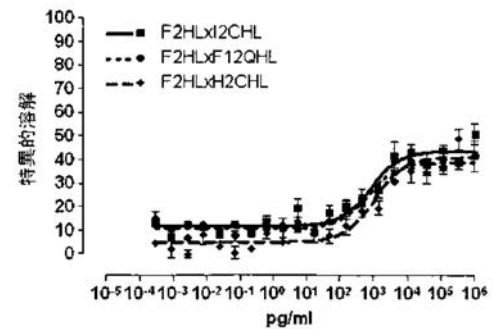
エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx

標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO



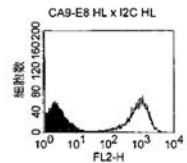
エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx

標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO

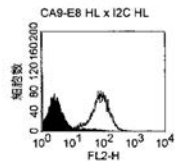


【図 3 5 a】

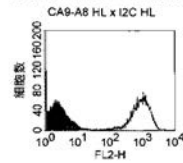
ヒト CAIX でトランスフェクトされた CHO



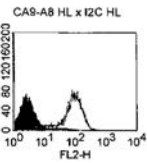
HPB-ALL



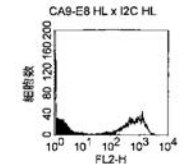
ヒト CAIX でトランスフェクトされた CHO



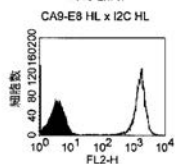
HPB-ALL



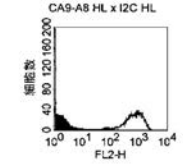
マカク CAIX でトランスフェクトされた CHO



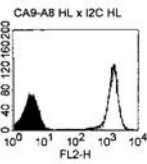
4119 LnPx



マカク CAIX でトランスフェクトされた CHO

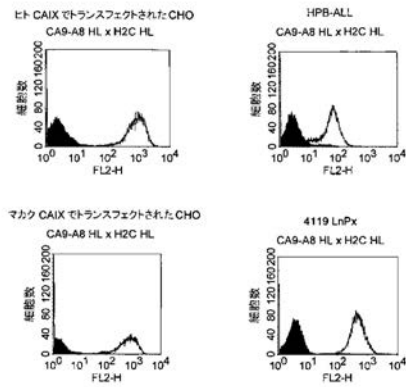


4119 LnPx

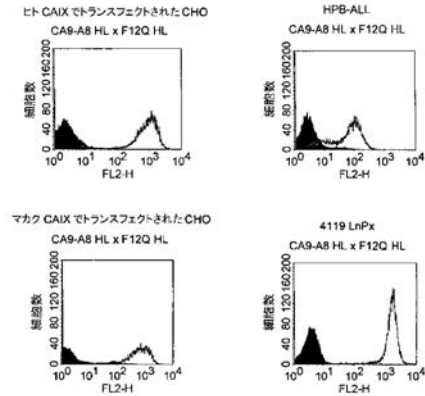


【図 3 5 b】

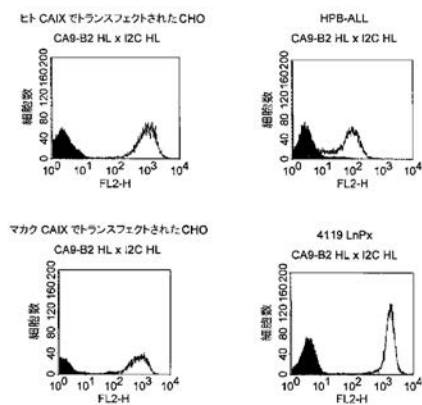
【図 3 5 c】



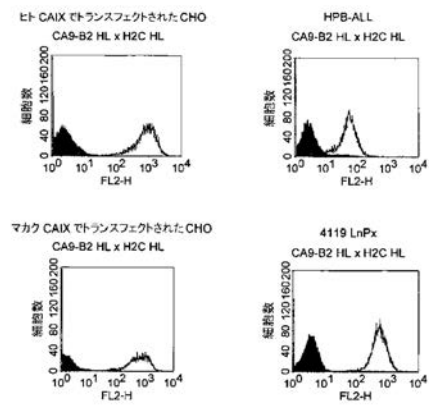
【図 3 5 d】



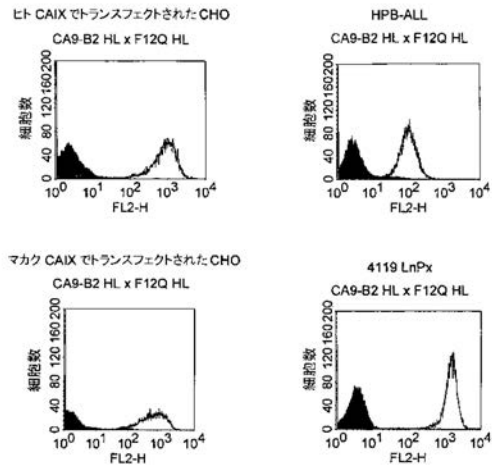
【図 3 5 e】



【図 3 5 f】

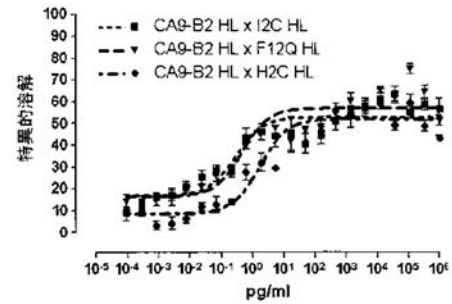


【図 3 5 g】

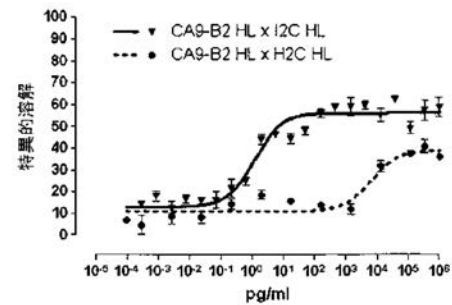


【図 3 6 a】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 10:1

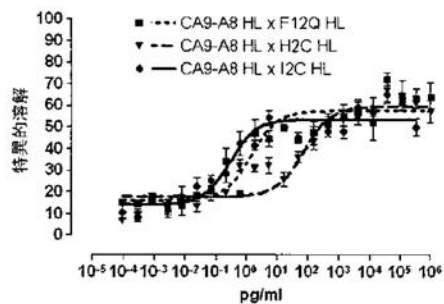


エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 50:1



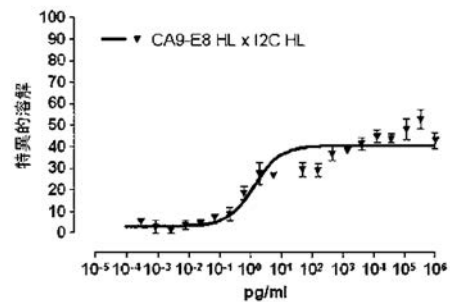
【図 3 6 b】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 10:1

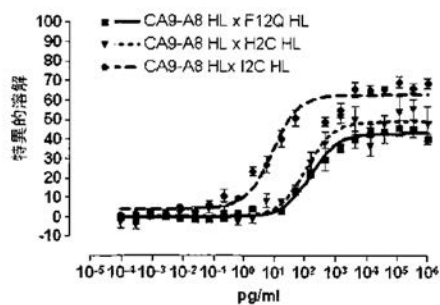


【図 3 6 c】

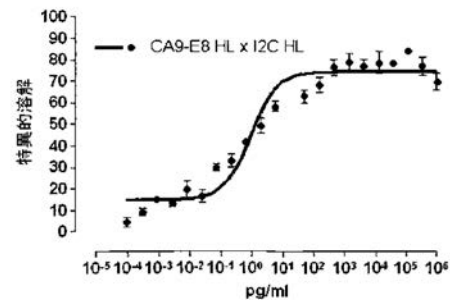
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 10:1



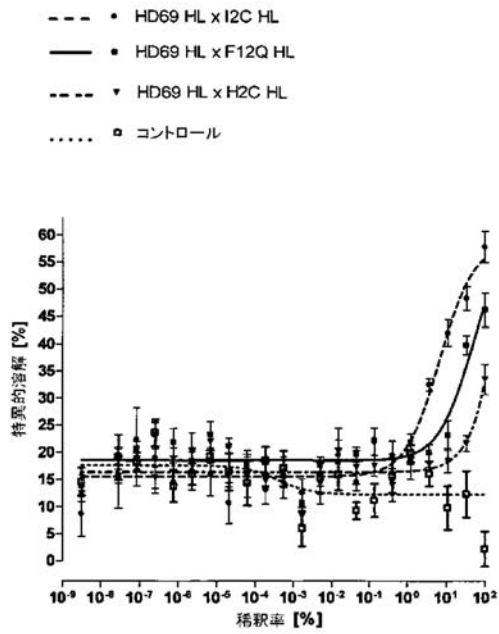
エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 50:1



エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク CAIX でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 50:1



【図 37】



【図 38 a】

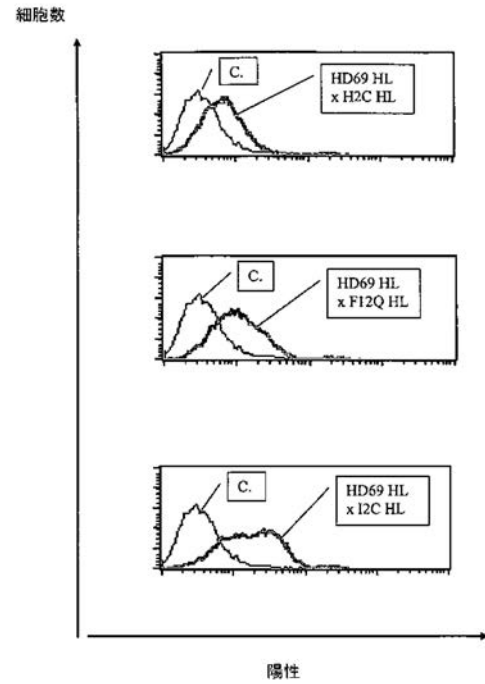


Figure 38a: CHO-EpCAM (ヒト)

【図 38 b】

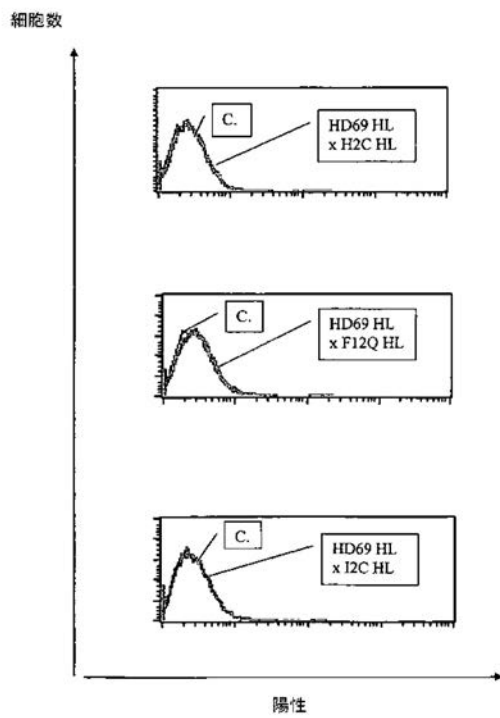


Figure 38b: CHO (トランスフェクトされていない)

【図 38 c】

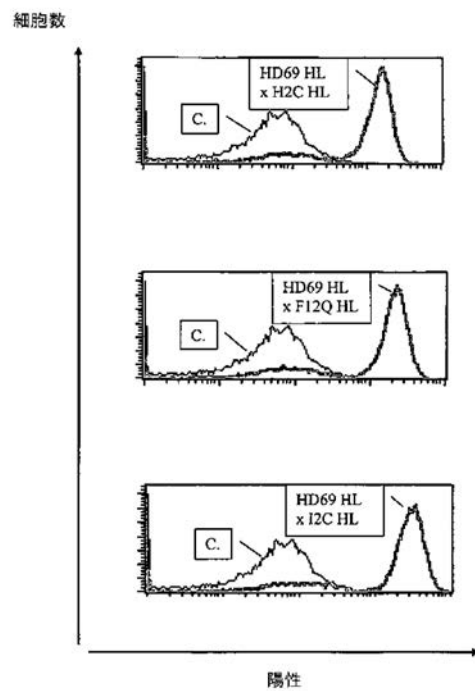


Figure 38c: ヒト PBMCs

【図 38 d】

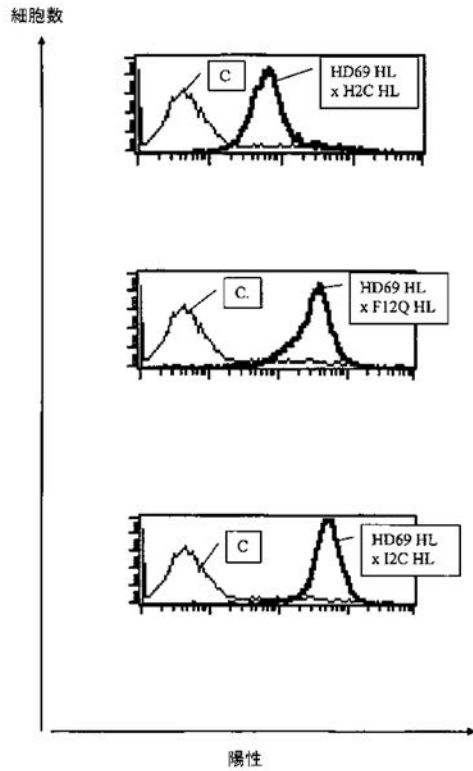
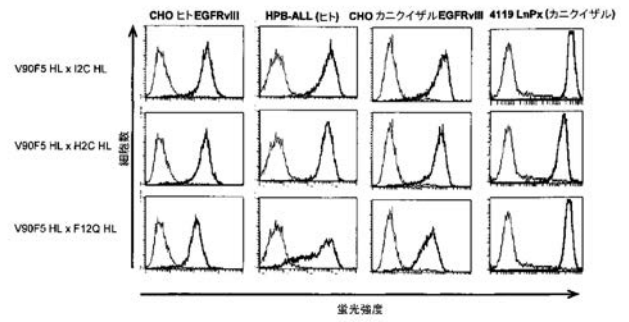
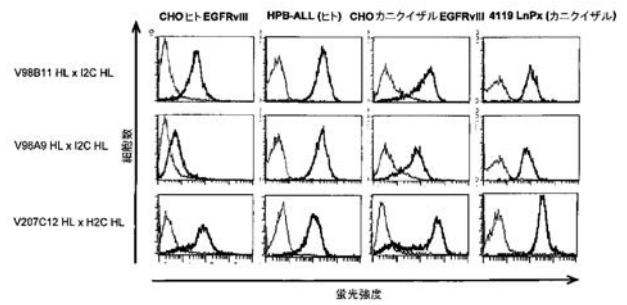


Figure 38d: マカク 4119LnPx (CD3+)

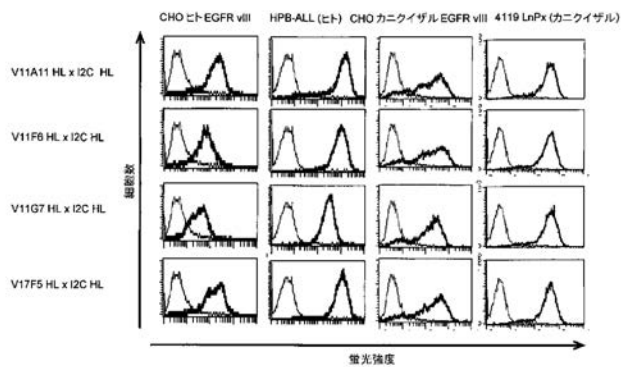
【図 39 a】



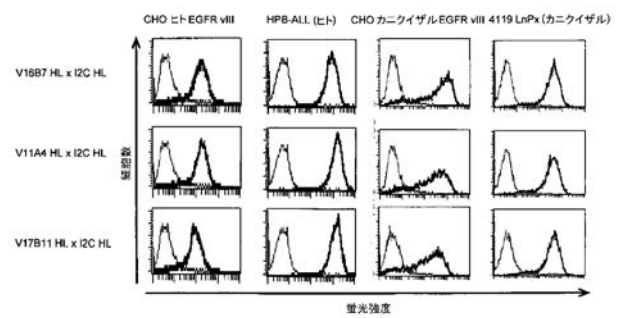
【図 39 b】



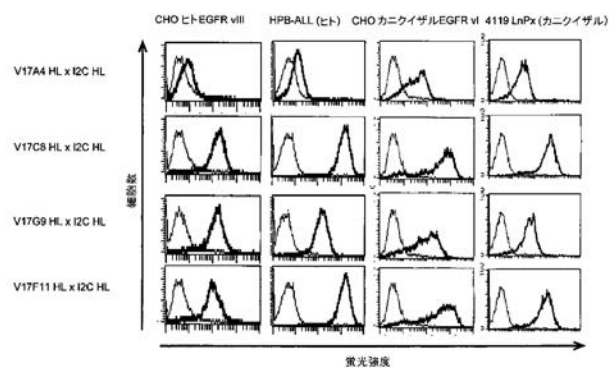
【図 39 c】



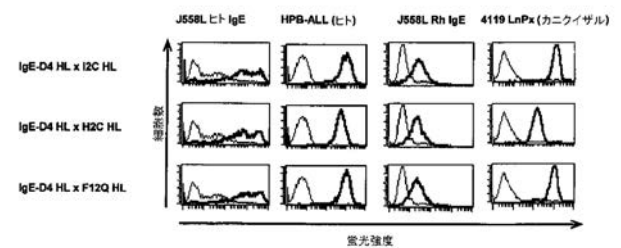
【図 39 e】



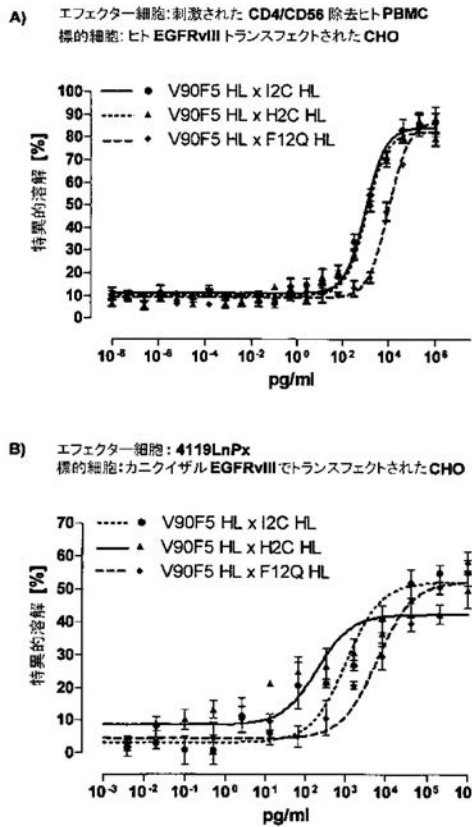
【図 39 d】



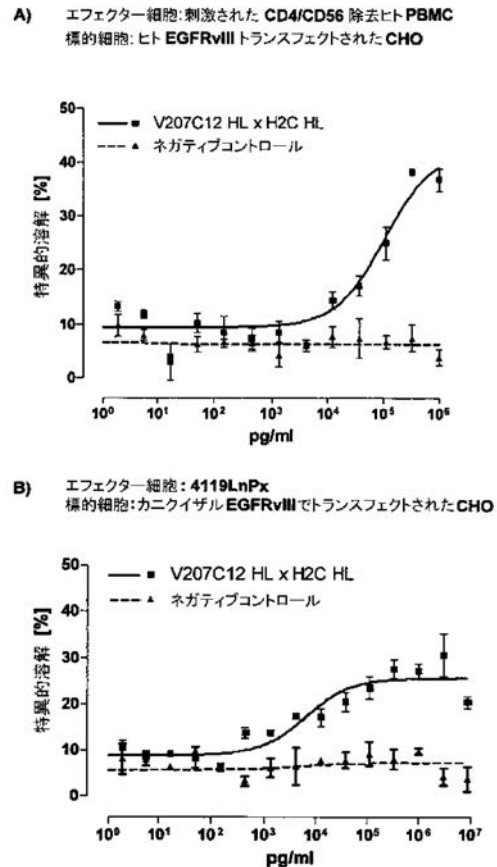
【図 39 f】



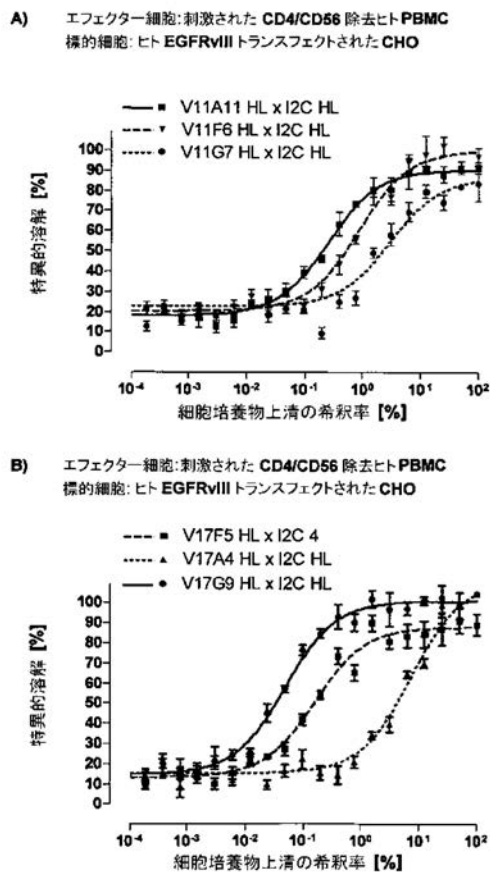
【図 4 0 a】



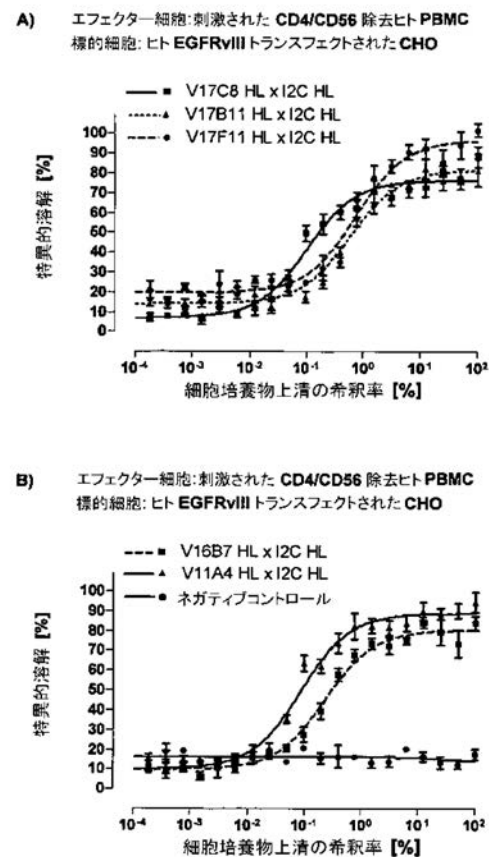
【図 4 0 b】



【図 4 0 c】

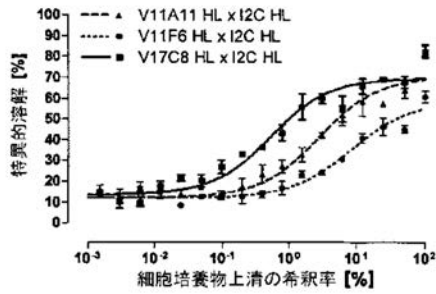


【図 4 0 d】

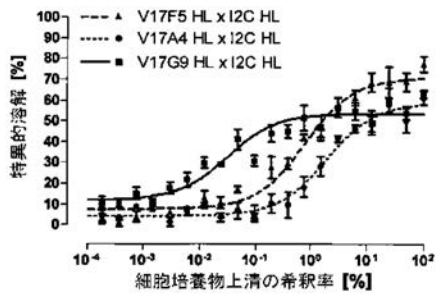


【図 4 0 e】

A) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRvIII でトランスフェクトされた CHO

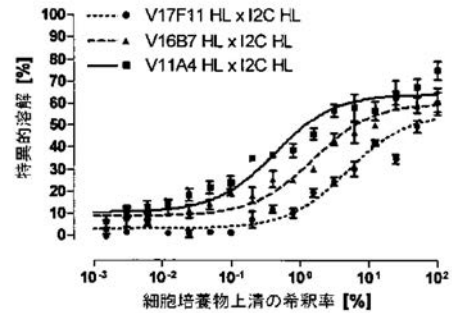


B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRvIII でトランスフェクトされた CHO

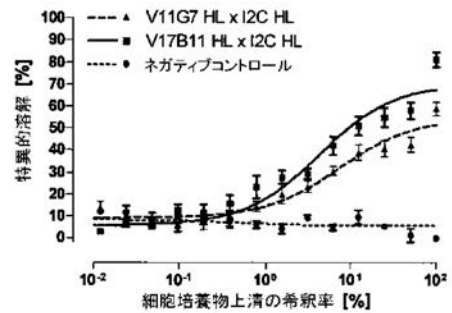


【図 4 0 f】

A) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRvIII でトランスフェクトされた CHO

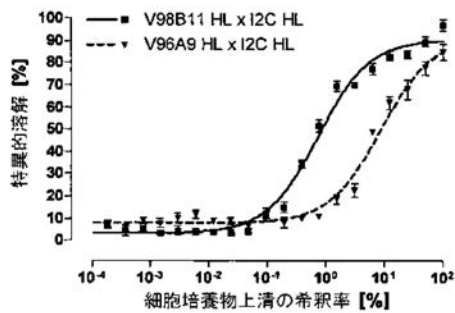


B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRvIII でトランスフェクトされた CHO

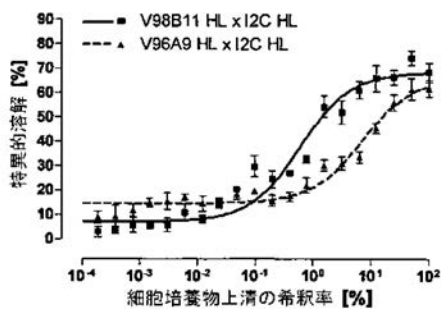


【図 4 0 g】

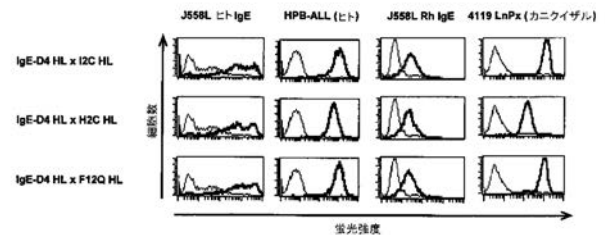
A) エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト EGFRvIII トランスフェクトされた CHO



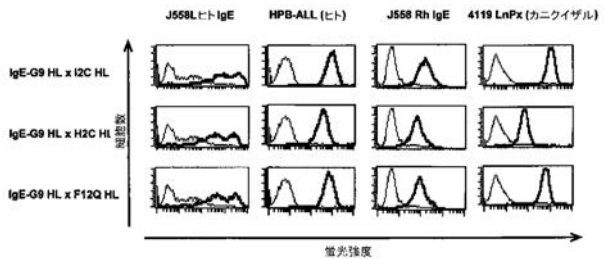
B) エフェクター細胞: 4119LnPx
標的細胞: カニクイザル EGFRvIII でトランスフェクトされた CHO



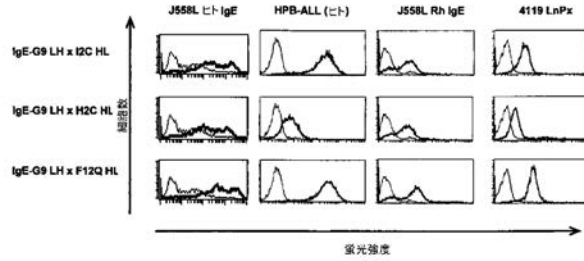
【図 4 1 a】



【図 4 1 b】



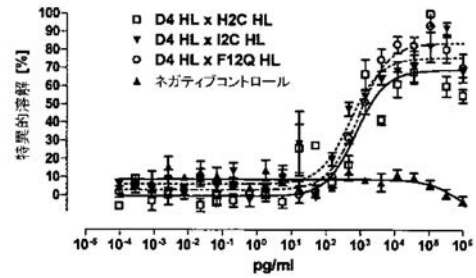
【図 4 1 c】



【図 4 2 a】

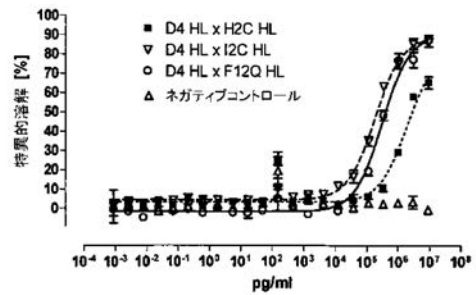
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞



B)

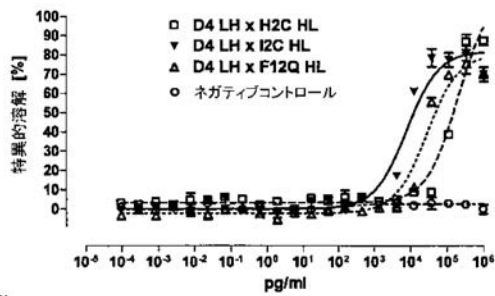
エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞



【図 4 2 b】

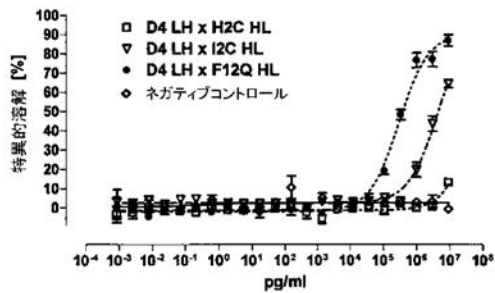
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞



B)

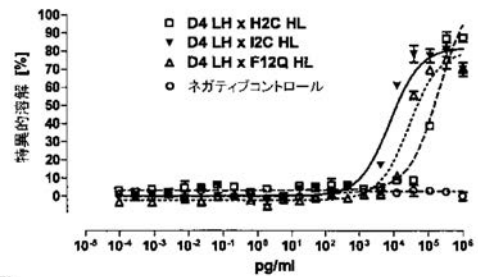
エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞



【図 4 2 c】

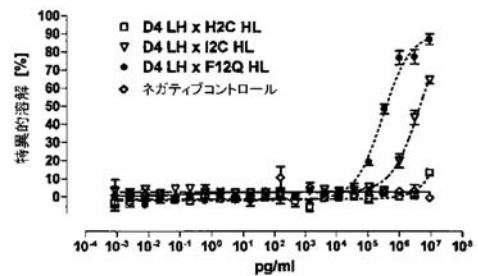
A)

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒト IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞

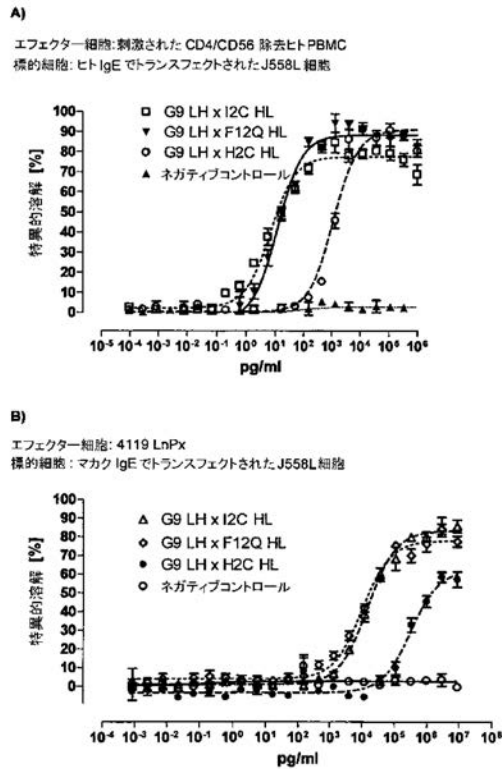


B)

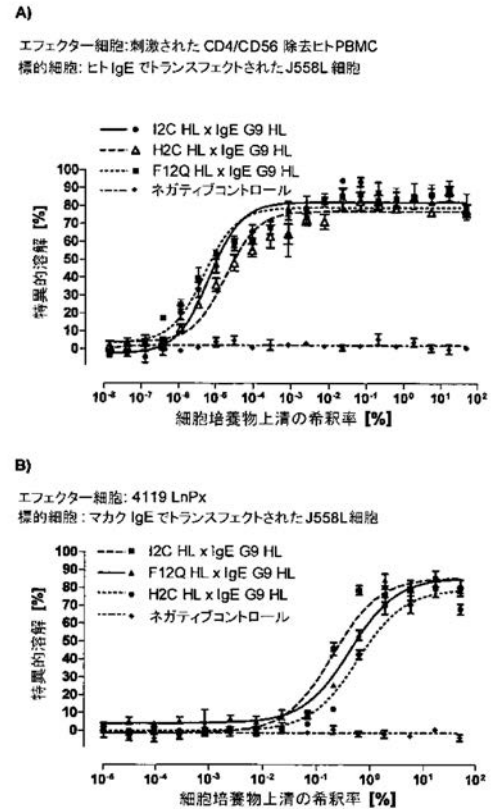
エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク IgE でトランスフェクトされた J558L 細胞



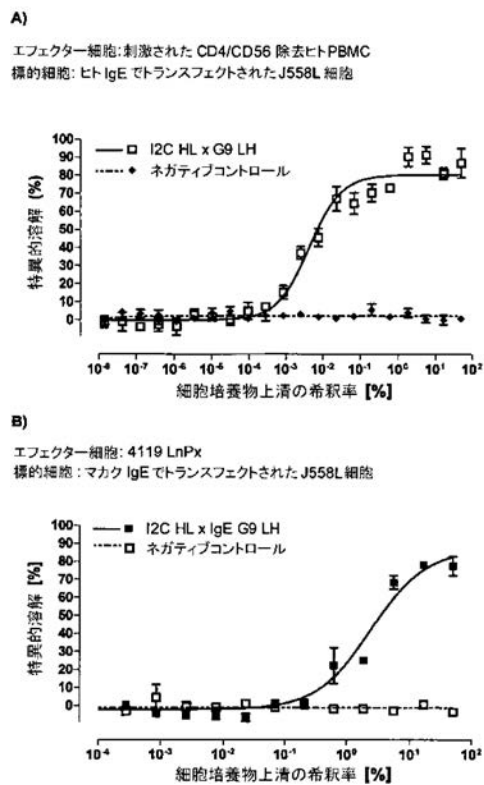
【図 4 2 d】



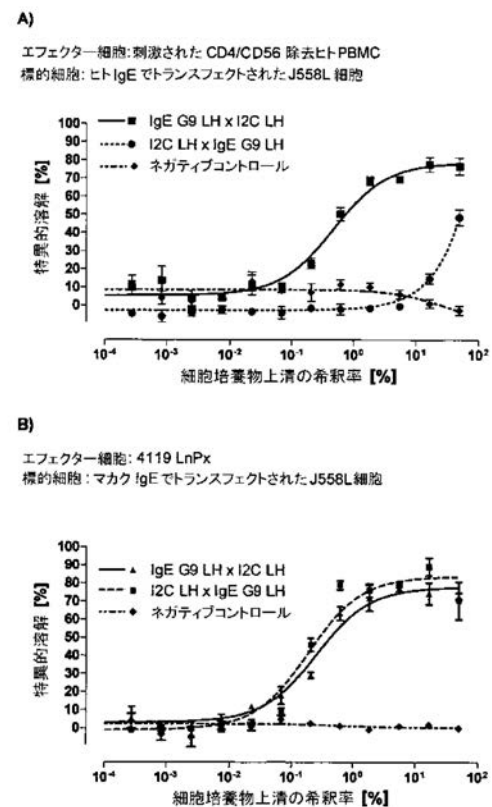
【図 4 2 e】



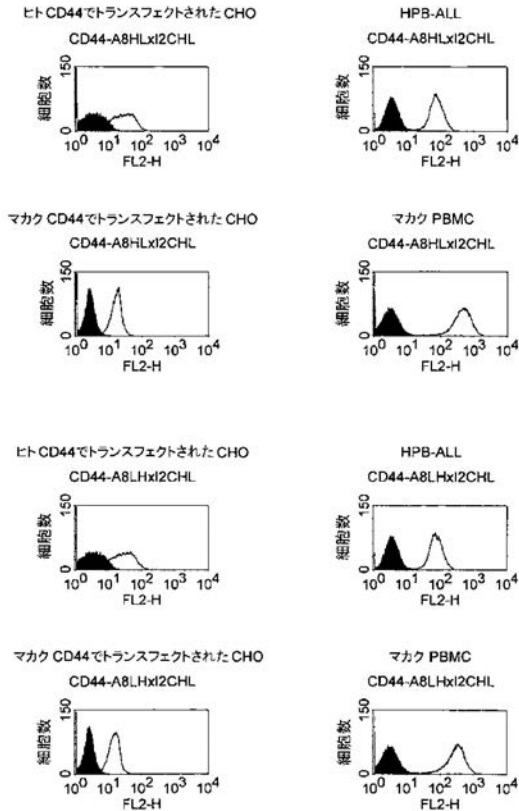
【図 4 2 f】



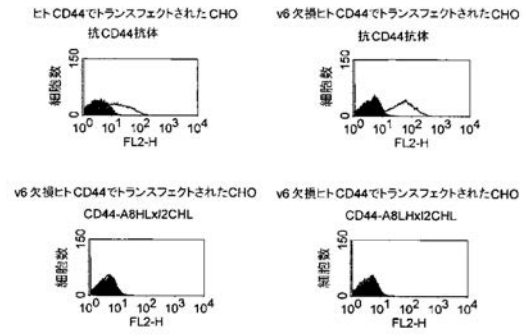
【図 4 2 g】



【図 4 3】

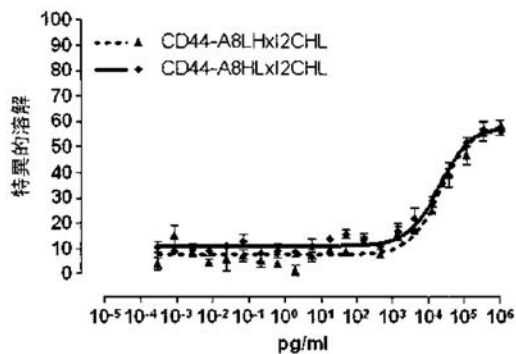


【図 4 4】

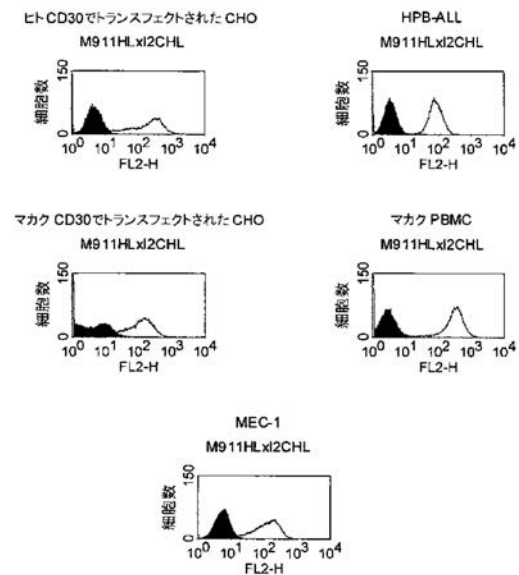


【図 4 5】

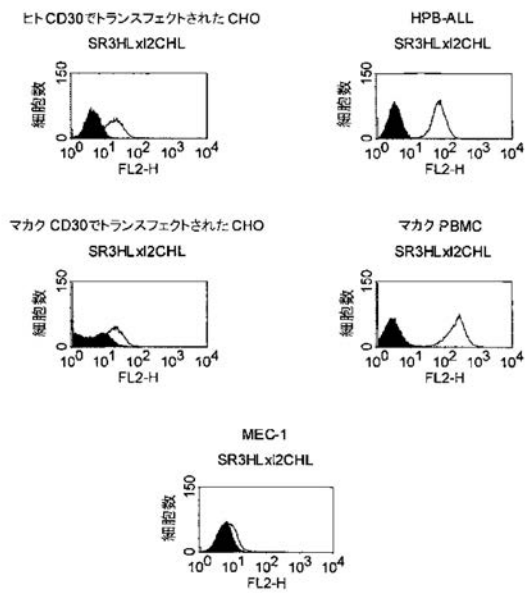
エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒト PBMC
標的細胞: ヒト CD44 でトランスフェクトされた CHO



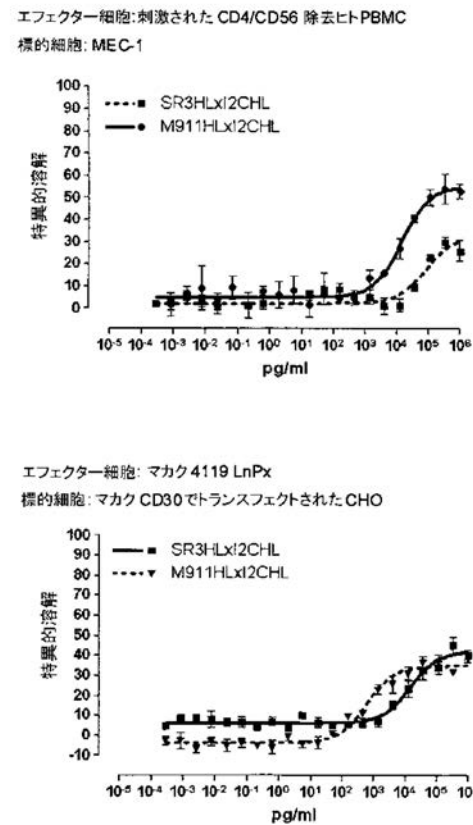
【図 4 6 - 1】



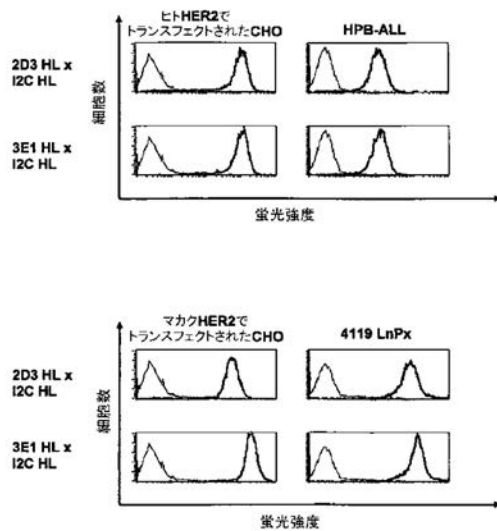
【図 46-2】



【図 47】



【図 48】



【図 49】

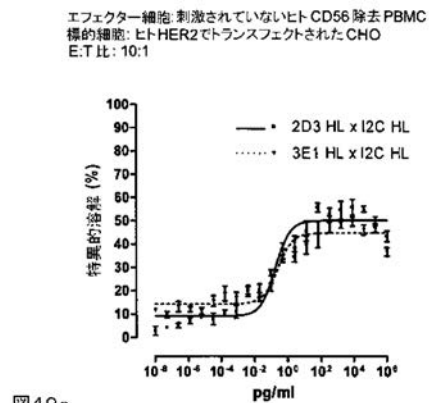


図 49a

エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx
標的細胞: マカク HER2 でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 10:1

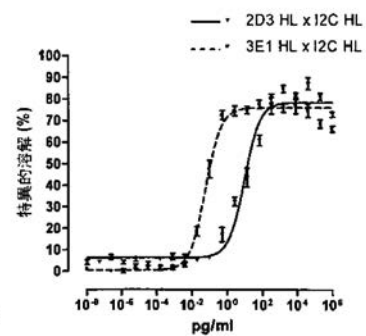
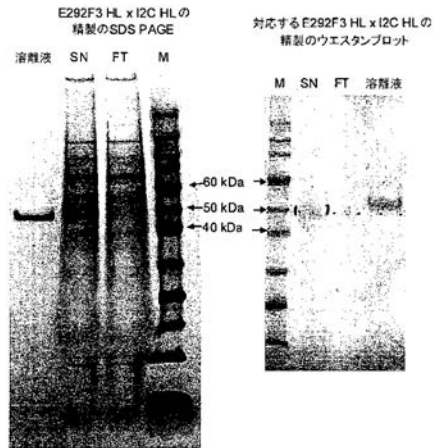
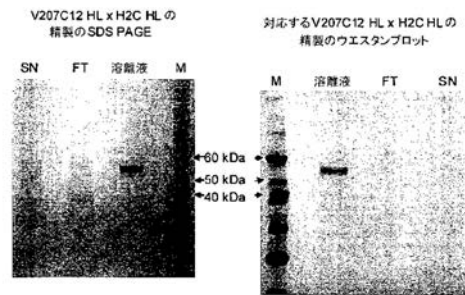


図 49b

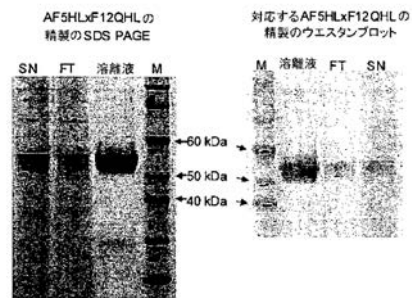
【図 50】



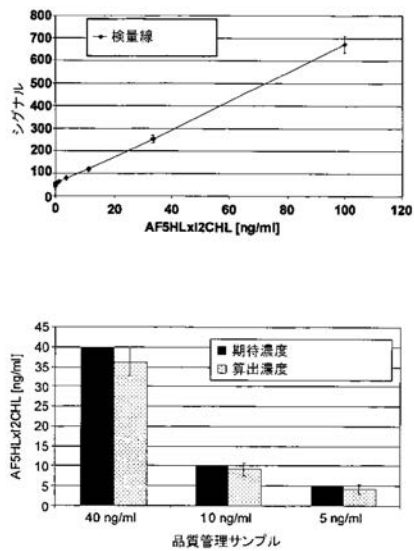
【図 51】



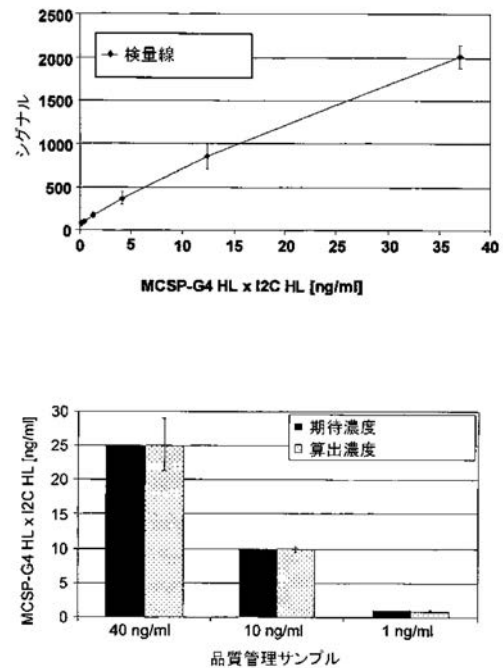
【図 52】



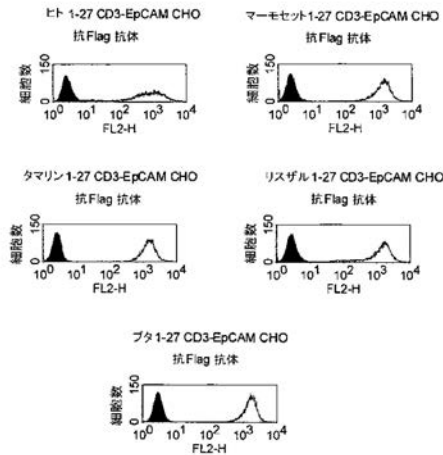
【図 53】



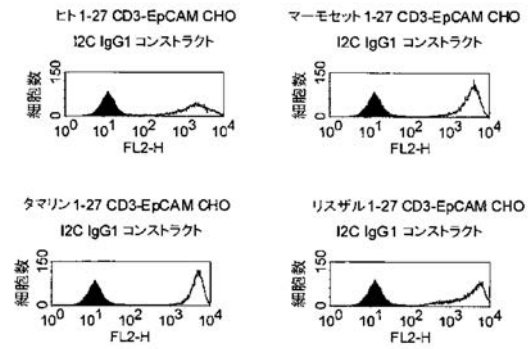
【図 54】



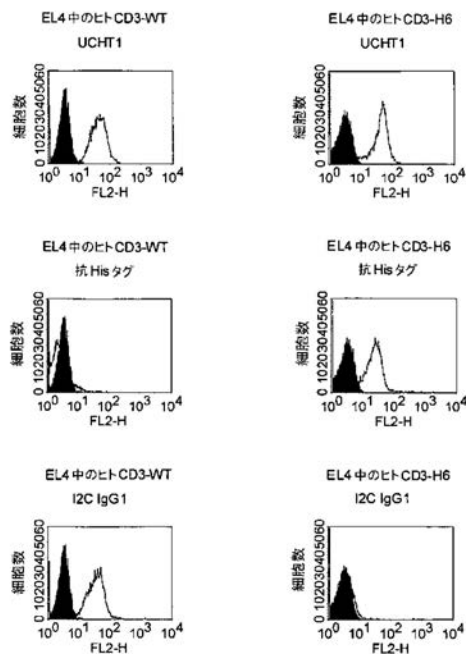
【図 5 5】



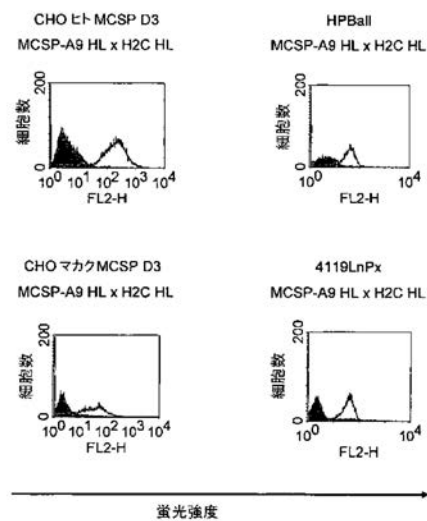
【図 5 6】



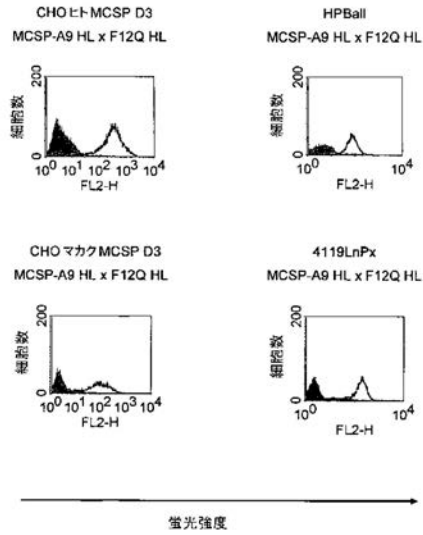
【図 5 7】



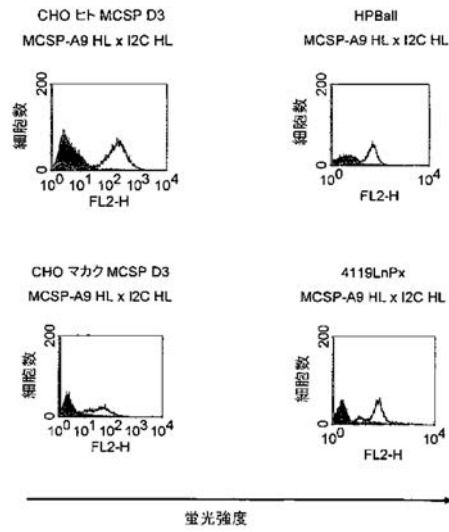
【図 5 8 a】



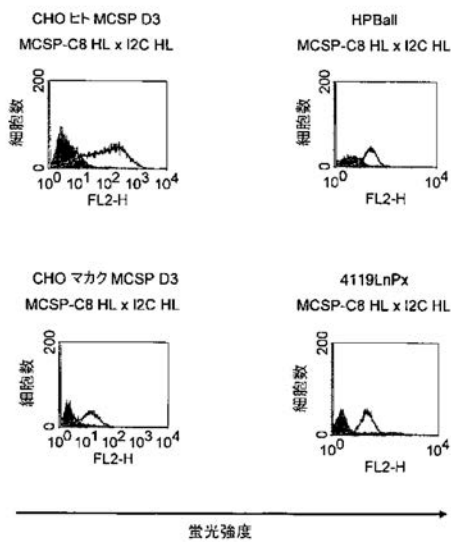
【図 5 8 b】



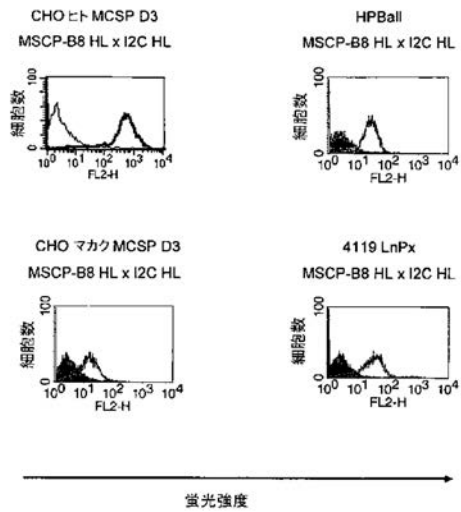
【図 5 8 c】



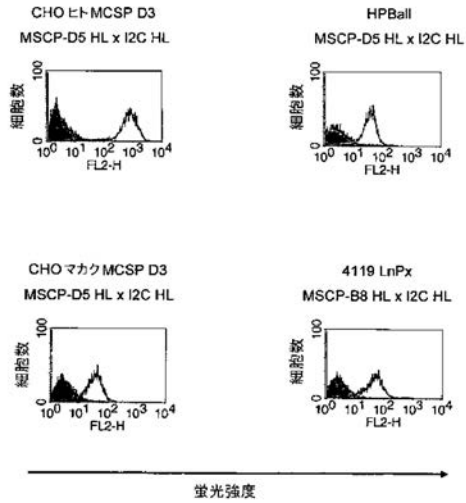
【図 5 8 d】



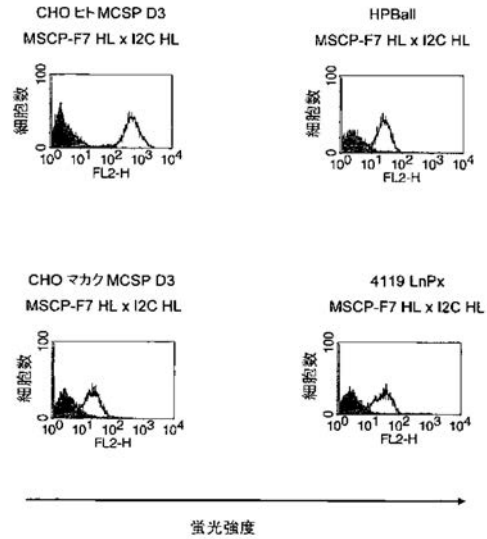
【図 5 8 e】



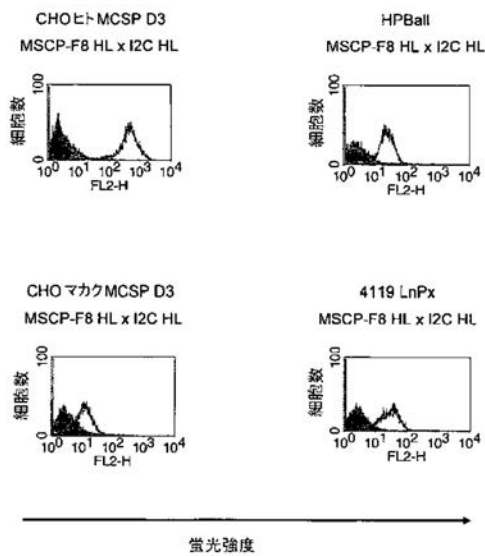
【図 5 8 f】



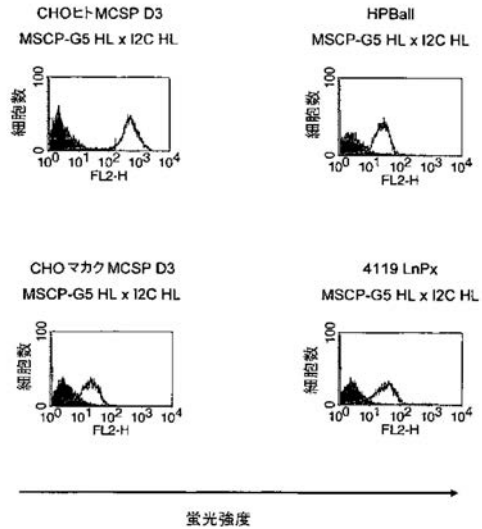
【図 5 8 g】



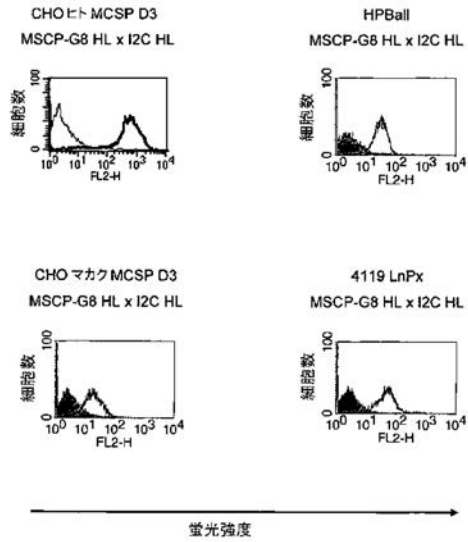
【図 5 8 h】



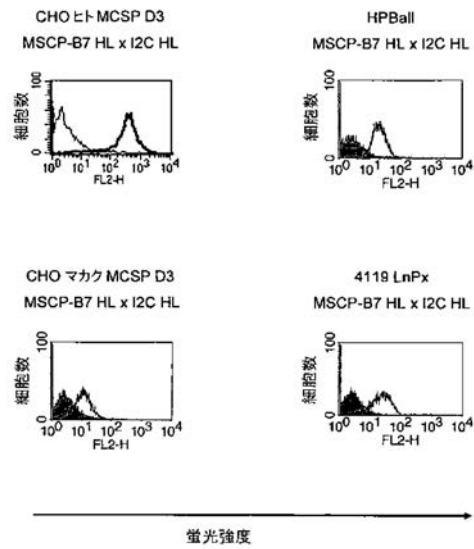
【図 5 8 i】



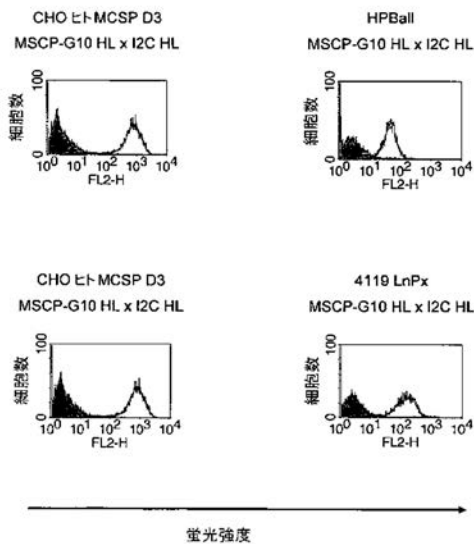
【図 5 8 j】



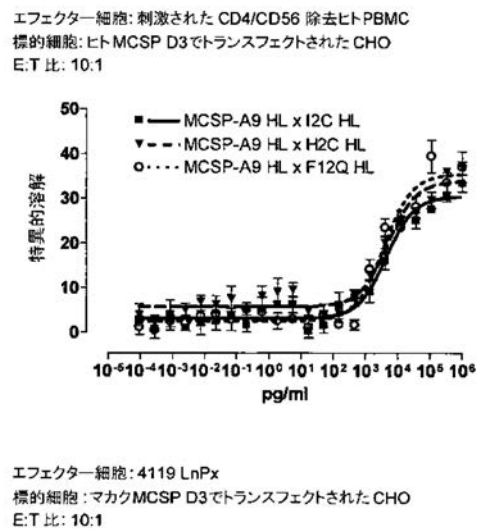
【図 5 8 k】



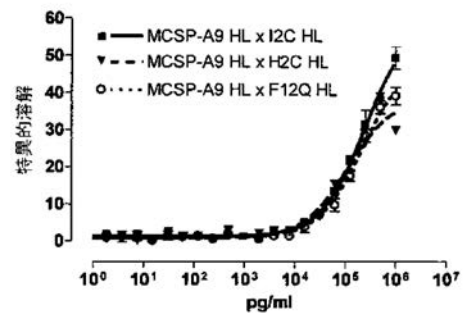
【図 5 8 l】



【図 5 9 a】

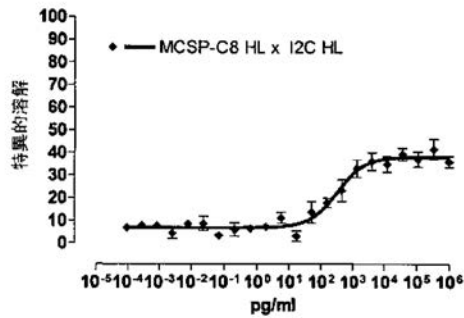


エフェクター細胞: 4119 LnPx
標的細胞: マカク MCSP D3 でトランスフェクトされた CHO
E:T 比: 10:1

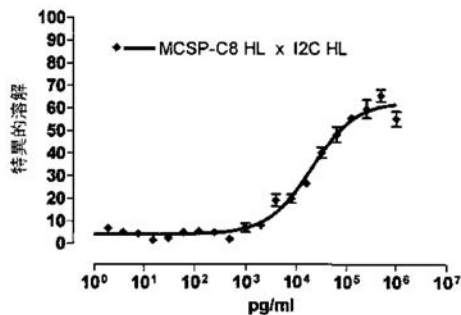


【図 5 9 b】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMc
 標的細胞: ヒトMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

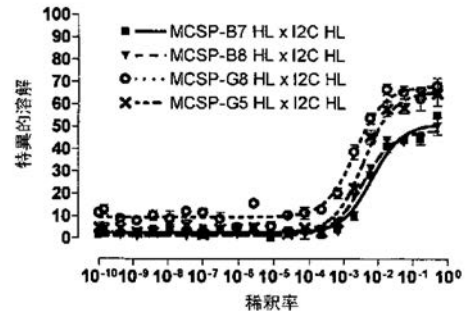


エフェクター細胞: 4119 LnPx
 標的細胞: マカクMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

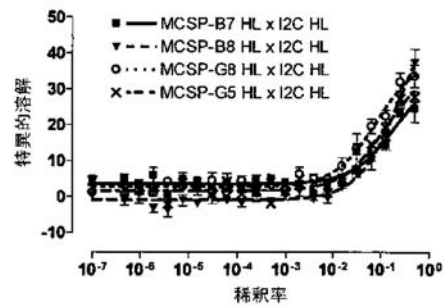


【図 5 9 c】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMc
 標的細胞: ヒトMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

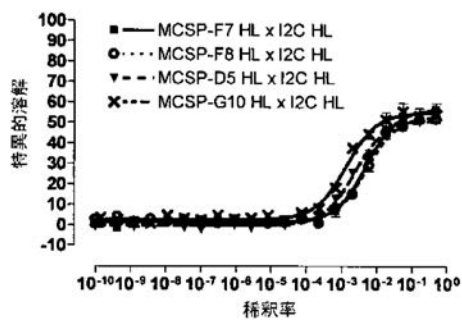


エフェクター細胞: 4119 LnPx
 標的細胞: マカクMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

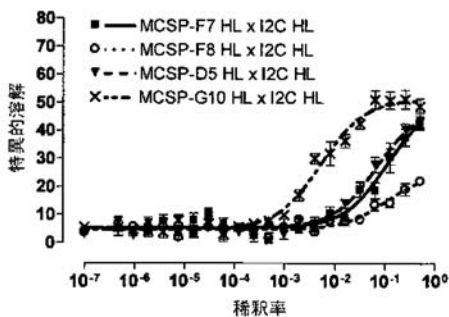


【図 5 9 d】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMc
 標的細胞: ヒトMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

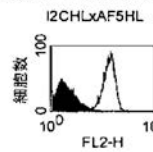


エフェクター細胞: 4119 LnPx
 標的細胞: マカクMCSP D3でトランスフェクトされた CHO
 E:T 比: 10:1

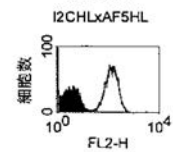


【図 6 0 a】

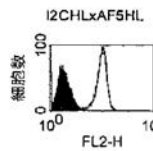
ヒトCD33でトランスフェクトされた CHO



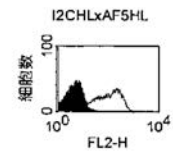
HPB-ALL



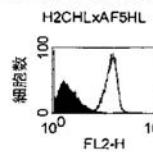
マカク CD33でトランスフェクトされた CHO



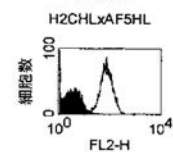
マカク PBMc



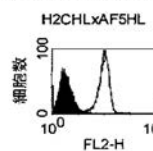
ヒト CD33でトランスフェクトされた CHO



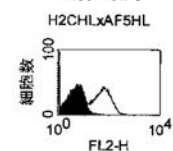
HPB-ALL



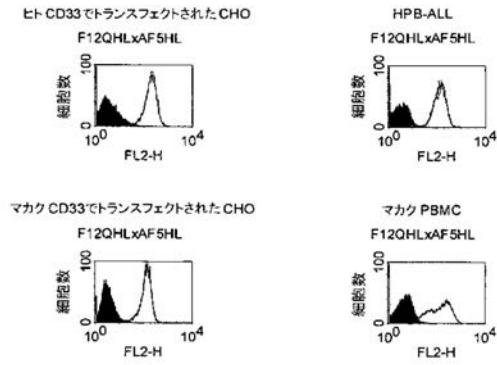
マカク CD33でトランスフェクトされた CHO



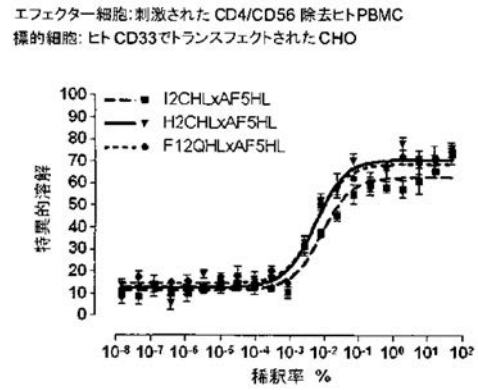
マカク PBMc



【図 6 0 b】

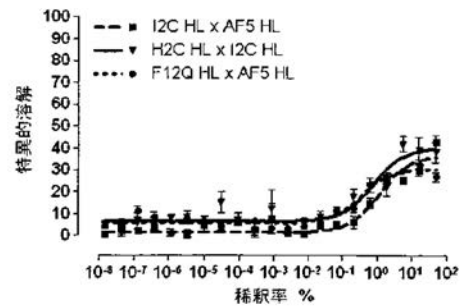


【図 6 1】

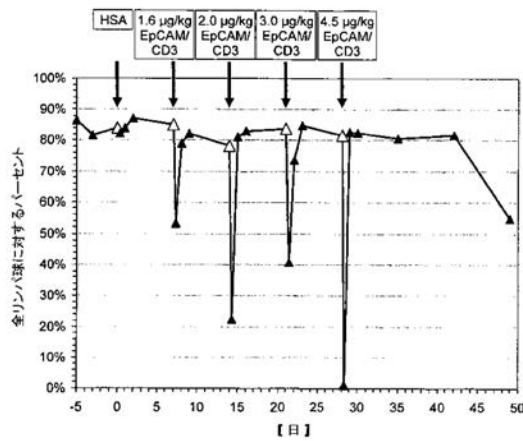


エフェクター細胞: マカク 4119 LnPx

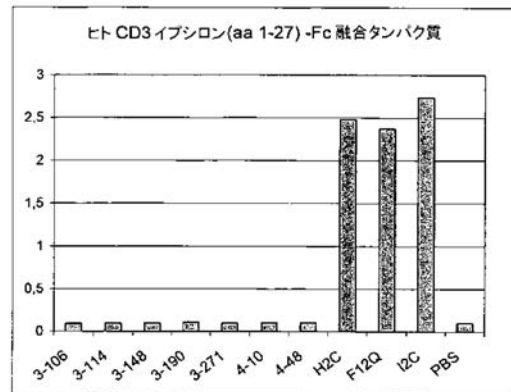
標的細胞: マカク CD33 でトランスフェクトされた CHO



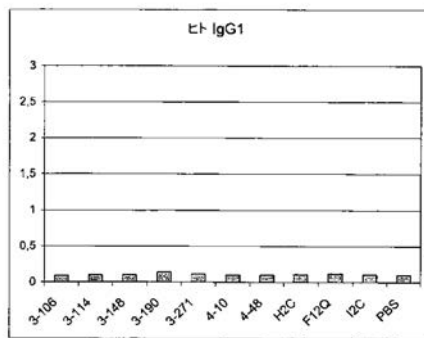
【図 6 2】



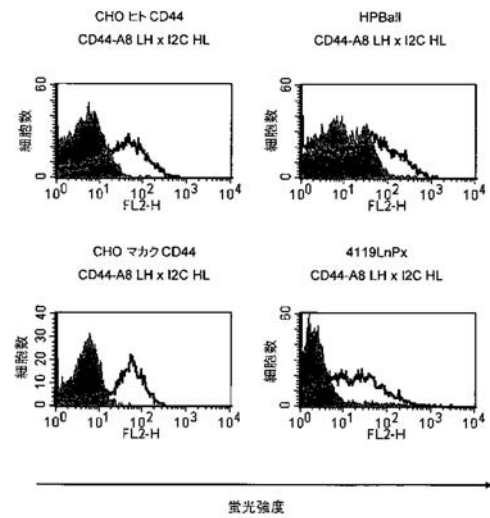
【図 6 3】



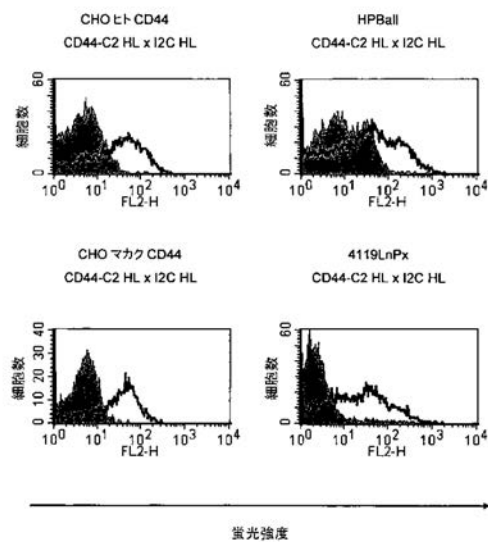
【図 6 4】



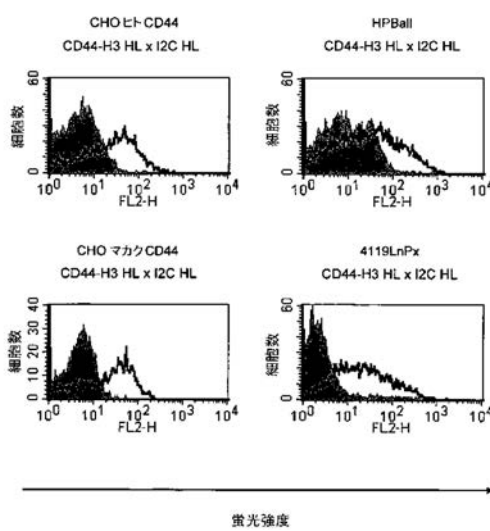
【図 6 5 a】



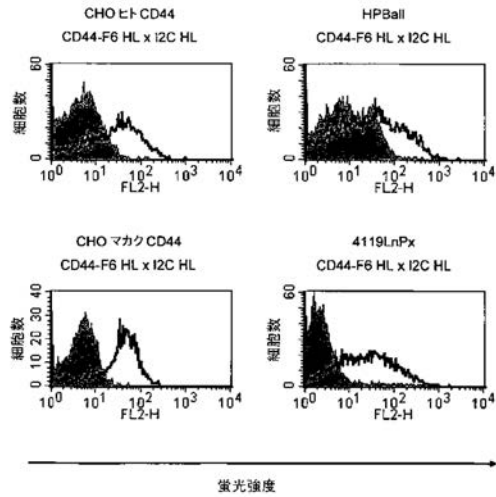
【図 6 5 b】



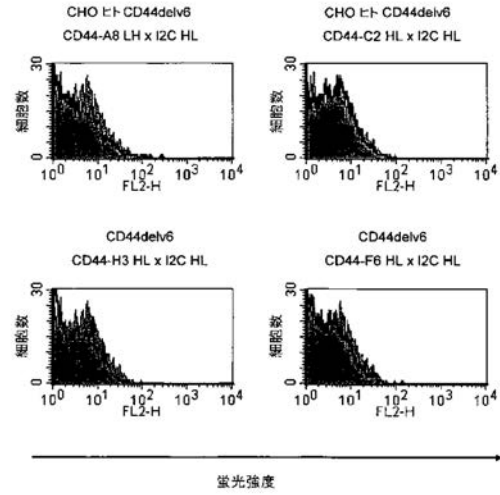
【図 6 5 c】



【図 6 5 d】

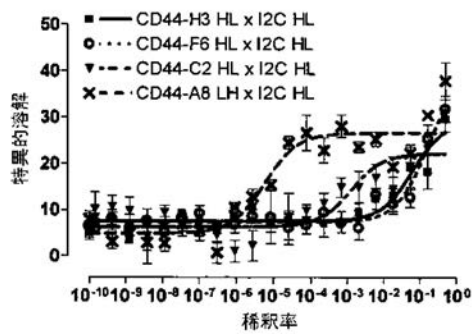


【図 6 5 e】

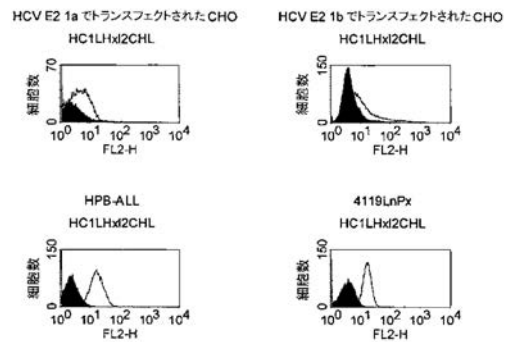


【図 6 6】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
標的細胞: ヒトCD44でトランスフェクトされたCHO
E:T 比: 10:1

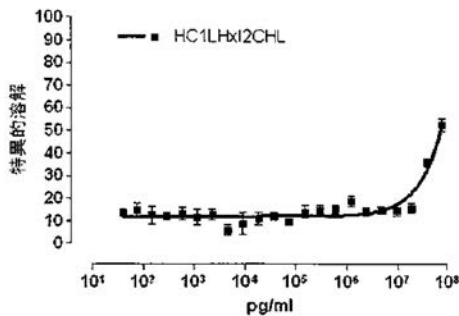


【図 6 7】

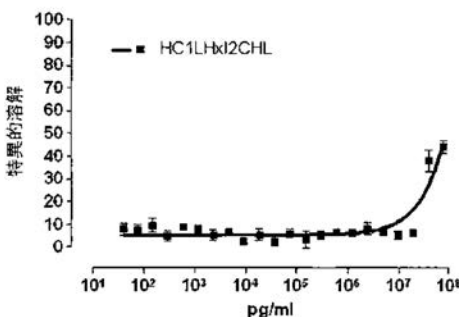


【図 6 8】

エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
 標的細胞: HCV E2 1b でトランスフェクトされた CHO



エフェクター細胞: 刺激された CD4/CD56 除去ヒトPBMC
 標的細胞: HCV E2 1b でトランスフェクトされた CHO



【配列表】

2017012201000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月10日(2016.11.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト及び非チンパンジー霊長類のCD3ε（イプシロン）鎖のエピトープに結合する第1の結合ドメインと、

細胞表面抗原と結合する能力を有する第2の結合ドメインとを含み、

前記エピトープは、配列番号2、4、6、又は8からなる群に含まれるアミノ酸配列の一部である、結合分子。

【請求項2】

前記ヒト及び非チンパンジー霊長類のCD3ε（イプシロン）鎖のエピトープに結合する第1の結合ドメインは、ヒト由来である、請求項1に記載の結合分子。

【請求項3】

前記第2の結合ドメインは、ヒト及び非チンパンジー霊長類の細胞表面抗原と結合する、請求項2に記載の結合分子。

【請求項4】

前記第1の結合ドメインは、

(a) 配列番号27に記載のCDR-L1、配列番号28に記載のCDR-L2、及び

配列番号 29 に記載の CDR - L 3 ;

(b) 配列番号 117 に記載の CDR - L 1、配列番号 118 に記載の CDR - L 2、及び配列番号 119 に記載の CDR - L 3 ; 並びに、

(c) 配列番号 153 に記載の CDR - L 1、配列番号 154 に記載の CDR - L 2、及び配列番号 155 に記載の CDR - L 3、

より選択される CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 を有する VL 領域を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 5】

前記第 1 の結合ドメインは、

(a) 配列番号 12 に記載の CDR - H 1、配列番号 13 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 14 に記載の CDR - H 3 ;

(b) 配列番号 30 に記載の CDR - H 1、配列番号 31 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 32 に記載の CDR - H 3 ;

(c) 配列番号 48 に記載の CDR - H 1、配列番号 49 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 50 に記載の CDR - H 3 ;

(d) 配列番号 66 に記載の CDR - H 1、配列番号 67 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 68 に記載の CDR - H 3 ;

(e) 配列番号 84 に記載の CDR - H 1、配列番号 85 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 86 に記載の CDR - H 3 ;

(f) 配列番号 102 に記載の CDR - H 1、配列番号 103 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 104 に記載の CDR - H 3 ;

(g) 配列番号 120 に記載の CDR - H 1、配列番号 121 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 122 に記載の CDR - H 3 ;

(h) 配列番号 138 に記載の CDR - H 1、配列番号 139 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 140 に記載の CDR - H 3 ;

(i) 配列番号 156 に記載の CDR - H 1、配列番号 157 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 158 に記載の CDR - H 3 ;

(j) 配列番号 174 に記載の CDR - H 1、配列番号 175 に記載の CDR - H 2、及び配列番号 176 に記載の CDR - H 3、

より選択される CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 を有する VH 領域を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 6】

前記第 1 の結合ドメインは、配列番号 35、39、125、129、161、又は 165 に記載の VL 領域からなる群より選択される VL 領域を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 7】

第 1 の結合ドメインは、配列番号 15、19、33、37、51、55、69、73、87、91、105、109、123、127、141、145、159、163、177、又は 181 に記載の VH 領域からなる群より選択される VH 領域を含む、請求項 1～3 及び 5 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 8】

前記第 1 の結合ドメインは、

(a) 配列番号 17 又は 21 に記載の VL 領域、及び配列番号 15 又は 19 に記載の VH 領域 ;

(b) 配列番号 35 又は 39 に記載の VL 領域、及び配列番号 33 又は 37 に記載の VH 領域 ;

(c) 配列番号 53 又は 57 に記載の VL 領域、及び配列番号 51 又は 55 に記載の VH 領域 ;

(d) 配列番号 71 又は 75 に記載の VL 領域、及び配列番号 69 又は 73 に記載の VH 領域 ;

(e) 配列番号 89 又は 93 に記載の V L 領域、及び配列番号 87 又は 91 に記載の V H 領域；

(f) 配列番号 107 又は 111 に記載の V L 領域、及び配列番号 105 又は 109 に記載の V H 領域；

(g) 配列番号 125 又は 129 に記載の V L 領域、及び配列番号 123 又は 127 に記載の V H 領域；

(h) 配列番号 143 又は 147 に記載の V L 領域、及び配列番号 141 又は 145 に記載の V H 領域；

(i) 配列番号 161 又は 165 に記載の V L 領域、及び配列番号 159 又は 163 に記載の V H 領域；

(j) 配列番号 179 又は 183 に記載の V L 領域、及び配列番号 177 又は 181 に記載の V H 領域、

からなる群より選択される V L 領域及び V H 領域を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 9】

前記第 1 の結合ドメインは、配列番号 23、25、41、43、59、61、77、79、95、97、113、115、131、133、149、151、167、169、185、又は 187 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の結合分子。

【請求項 10】

前記細胞表面抗原は、腫瘍抗原である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 11】

前記細胞表面抗原は、EGFR、EGFRvIII、MCS P、カルボニックアンヒドラーゼ IX、CD30、CD33、CD44v6、EpCAM、Her2/neu、MUC1、IgE、HBV、及び HCV より選択される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 12】

前記結合分子は、二重特異性単鎖抗体分子である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 13】

前記二重特異性単鎖抗体分子は、第 2 の結合ドメイン中の CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及び CDR L3 として、以下に記載の配列の一群：

配列番号：189 - 194、配列番号：201 - 206、配列番号：219 - 224、配列番号：237 - 242、配列番号：255 - 260、配列番号：273 - 279、配列番号：382 - 384 及び 387 - 389、配列番号：400 - 402 及び 405 - 407、配列番号：418 - 420 及び 423 - 425、配列番号：436 - 438 及び 441 - 443、配列番号：454 - 456 及び 459 - 461、配列番号：472 - 474 及び 477 - 479、配列番号：490 - 492 及び 495 - 497、配列番号：及び 508 - 510 及び 513 - 515、配列番号：530 - 532 及び 1568 - 1570、配列番号：545 - 547 及び 550 - 552、配列番号：559 - 561 及び 564 - 566、配列番号：577 - 579 及び 582 - 584、配列番号：615 - 617 及び 620 - 622、配列番号：633 - 635、638、639、及び 1571、配列番号：650 - 652 及び 655 - 657、配列番号：668 - 670 及び 673 - 675、配列番号：682 - 684 及び 687 - 689、配列番号：696 - 698 及び 701 - 703、配列番号：710 - 712 及び 715 - 717、配列番号：724 - 726 及び 729 - 731、配列番号：738 - 740 及び 743 - 745、配列番号：752 - 754 及び 757 - 759、配列番号：766 - 768 及び 771 - 773、配列番号：780 - 782 及び 785 - 787、配列番号：794 - 796 及び 799 - 801、配列

番号：808 - 810 及び 813 - 815、配列番号：822 - 824 及び 827 - 829、配列番号：836 - 838 及び 841 - 843、配列番号：850 - 852 及び 855 - 857、配列番号：866 - 868 及び 871 - 873、配列番号：884 - 886 及び 889 - 891、配列番号：902 - 904 及び 907 - 909、配列番号：920 - 922 及び 925 - 927、配列番号：938 - 940 及び 943 - 945、配列番号：956 - 958 及び 961 - 963、配列番号：974 - 976 及び 979 - 981、配列番号：992 - 994 及び 997 - 999、配列番号：1006 - 1008 及び 1011 - 1013、配列番号：1020 - 1022 及び 1025 - 1027、配列番号：1034 - 1036 及び 1039 - 1041、配列番号：1048 - 1050 及び 1053 - 1055、配列番号：1062 - 1064 及び 1067 - 1069、配列番号：1076 - 1078 及び 1081 - 1083、配列番号：1090 - 1092 及び 1095 - 1097、配列番号：1114 - 1116 及び 1119 - 1121、配列番号：1128 - 1130 及び 1133 - 1135、配列番号：1141 - 1143 及び 1146 - 1148、配列番号：1155 - 1157 及び 1160 - 1162、配列番号：1169 - 1171 及び 1174 - 1176、配列番号：1183 - 1185 及び 1188 - 1190、配列番号：1197 - 1199 及び 1202 - 1204、配列番号：1211 - 1213 及び 1216 - 1218、配列番号：1225 - 1227 及び 1230 - 1232、配列番号：1239 - 1241 及び 1244 - 1246、配列番号：1253 - 1255 及び 1258 - 1260、配列番号：1267 - 1269 及び 1272 - 1274、配列番号：1281 - 1283 及び 1286 - 1288、配列番号：1295 - 1297 及び 1300 - 1302、配列番号：1309 - 1311 及び 1314 - 1316、配列番号：1323 - 1325 及び 1328 - 1330、配列番号：1343 - 1345 及び 1348 - 1350、配列番号：1361 - 1363 及び 1366 - 1368、配列番号：1375 - 1377 及び 1380 - 1382、配列番号：1389 - 1391 及び 1394 - 1396、配列番号：1403 - 1405 及び 1408 - 1410、配列番号：1417 - 1419 及び 1422 - 1424、配列番号：1431 - 1433 及び 1436 - 1438、配列番号：1445 - 1447 及び 1450 - 1452、配列番号：1459 - 1461 及び 1464 - 1466、配列番号：1473 - 1475 及び 1478 - 1480、配列番号：1486 - 1491、配列番号：1492 - 1497、配列番号：1505 - 1507 及び 1510 - 1512、配列番号：1531 - 1533 及び 1536 - 1538、配列番号：1573 - 1575 及び 1578 - 1580、配列番号：1591 - 1593 及び 1596 - 1598、配列番号：1605 - 1607 及び 1610 - 1612、配列番号：1619 - 1621 及び 1624 - 1626、配列番号：1634 - 1636 及び 1639 - 1641、配列番号：1652 - 1654、配列番号：1657 - 1659、並びに配列番号：1669 - 1674、

からなる群より選択される一群を含む、請求項 12 に記載の結合分子。

【請求項 14】

前記二重特異性単鎖抗体分子は、

(a) 配列番号 291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311、313、315、317、319、321、323、325、327、329、331、333、335、337、339、341、343、345、347、393、395、397、411、413、415、429、431、433、447、449、451、465、467、469、483、485、487、501、503、505、519、521、523、1336、1338、1340、538、540、542、556、570、572、574、588、590、592、626、628、630、643、645、647、661、663、665、679、693、707、721、735、749、763、777、791、805、819、833、847、861、863、877、879、881、895、897、899、913、915、917、931、933、935、949、951、953、967、969、971、985、987、989、1003、1017、1031、1045、1059、

1 0 7 3、1 0 8 7、1 1 0 1、1 1 2 5、1 1 3 8、1 1 5 2、1 1 6 6、1 1 8 0、
1 1 9 4、1 2 0 8、1 2 2 2、1 2 3 6、1 2 5 0、1 2 6 4、1 2 7 8、1 2 9 2、
1 3 0 6、1 3 2 0、1 3 3 4、1 3 5 4、1 3 5 6、1 3 5 8、1 3 7 2、1 3 8 6、
1 4 0 0、1 4 1 4、1 4 2 8、1 4 4 2、1 4 5 6、1 4 7 0、1 4 8 4、1 5 0 0、
1 5 0 2、1 5 1 8、1 5 2 0、1 5 2 2、1 5 2 4、1 5 2 6、1 5 2 8、1 5 4 4、
1 5 4 6、1 5 4 8、1 5 5 0、1 5 5 2、1 5 5 4、1 5 5 6、1 5 5 8、1 5 6 0、
1 5 6 2、1 5 6 4、1 5 6 6、1 5 8 6、1 5 8 8、1 6 0 2、1 6 1 6、1 6 3 0、
1 6 4 7、1 6 4 9、又は1 6 6 3のいずれかに記載のアミノ酸配列；及び、

(b) 配列番号 2 9 2、2 9 4、2 9 6、2 9 8、3 0 0、3 0 2、3 0 4、3 0 6、
3 0 8、3 1 0、3 1 2、3 1 4、3 1 6、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、
3 2 8、3 3 0、3 3 2、3 3 4、3 3 6、3 3 8、3 4 0、3 4 2、3 4 4、3 4 6、
3 4 8、3 9 4、3 9 6、3 9 8、4 1 2、4 1 4、4 1 6、4 3 0、4 3 2、4 3 4、
4 4 8、4 5 0、4 5 2、4 6 6、4 6 8、4 7 0、4 8 4、4 8 6、4 8 8、5 0 2、
5 0 4、5 0 6、5 2 0、5 2 2、5 2 4、1 3 3 7、1 3 3 9、1 3 4 1、5 3 9、5
4 1、5 4 3、5 5 7、5 7 1、5 7 3、5 7 5、5 8 9、5 9 1、5 9 3、6 2 7、6
2 9、6 3 1、6 4 4、6 4 6、6 4 8、6 6 2、6 6 4、6 6 6、6 8 0、6 9 4、7
0 8、7 2 2、7 3 6、7 5 0、7 6 4、7 7 8、7 9 2、8 0 6、8 2 0、8 3 4、8
4 8、8 6 2、8 6 4、8 7 8、8 8 0、8 8 2、8 9 6、8 9 8、9 0 0、9 1 4、9
1 6、9 1 8、9 3 2、9 3 4、9 3 6、9 5 0、9 5 2、9 5 4、9 6 8、9 7 0、9
7 2、9 8 6、9 8 8、9 9 0、1 0 0 4、1 0 1 8、1 0 3 2、1 0 4 6、1 0 6 0、
1 0 7 4、1 0 8 8、1 1 0 2、1 1 2 6、1 1 3 9、1 1 5 3、1 1 6 7、1 1 8 1、
1 1 9 5、1 2 0 9、1 2 2 3、1 2 3 7、1 2 5 1、1 2 6 5、1 2 7 9、1 2 9 3、
1 3 0 7、1 3 2 1、1 3 3 5、1 3 5 5、1 3 5 7、1 3 5 9、1 3 7 3、1 3 8 7、
1 4 0 1、1 4 1 5、1 4 2 9、1 4 4 3、1 4 5 7、1 4 7 1、1 4 8 5、1 5 0 1、
1 5 0 3、1 5 1 9、1 5 2 1、1 5 2 3、1 5 2 5、1 5 2 7、1 5 2 9、1 5 4 5、
1 5 4 7、1 5 4 9、1 5 5 1、1 5 5 3、1 5 5 5、1 5 5 7、1 5 5 9、1 5 6 1、
1 5 6 3、1 5 6 5、1 5 6 7、1 5 8 7、1 5 8 9、1 6 0 3、1 6 1 7、1 6 3 1、
1 6 4 8、1 6 5 0、又は1 6 6 4のいずれかに記載の核酸配列によってコードされるア
ミノ酸配列、

から選択される配列を含む、請求項 1 2 に記載の結合分子。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子をコードする核酸分子。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子の製造のための、請求項 1 6 に記載の
ベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子の製造方法であって、該方法が、請求
項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子の発現を可能にする条件下にて請求項 1 7 に
記載の宿主細胞を培養すること、及び製造された結合分子を該培養物から回収すること
を含む、方法。

【請求項 1 9】

増殖性疾患、腫瘍性疾患、又は免疫障害から選択される疾患の予防、治療又は寛解のた
めの、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子を含む、医薬組成物。

【請求項 2 0】

担体、安定化剤及び賦形剤の適切な製剤のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項
1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

増殖性疾患、腫瘍性疾患、又は免疫障害から選択される疾患の予防、治療又は寛解のた

めの医薬組成物の製造のための、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の結合分子の使用

。

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 08004741.8

(32)優先日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(72)発明者 キシエル, ロマン

ドイツ連邦共和国 カールスフェルド 8 5 7 5 7, ドクターヨーハンハイツァーシュートラ
ーセ 3 6

(72)発明者 ルッタビューゼ, ラルフ

ドイツ連邦共和国 ノイリート 8 2 0 6 1, フリーダーシュートラーセ 1 1

(72)発明者 ホフマン, パトリック

ドイツ連邦共和国 バートハイルブルン 8 3 6 7 0, ホーエンビルケン 2 6 ベー

(72)発明者 クリンガー, マティアス

ドイツ連邦共和国 ギルヒング 8 2 2 0 5, アムブッヘンシュトック 2 4 アー

(72)発明者 ラウ, ドリス

ドイツ連邦共和国 ウンターハッヒング 8 2 0 0 8, テルメーラーシュートラーセ 5 1

(72)発明者 マンゴルツ, スザンネ

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4 7 6, フォルシュテンリーダーアレイ 1 4 0 アー

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 BA41 CA40 DA50 DA76

EA50 FA74