

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-503399

(P2018-503399A)

(43) 公表日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 06 4
C 07 K 16/18 (2006.01)	C 07 K 16/18	Z N A 4 C 08 5
C 07 K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46	4 H 04 5
C 07 K 16/30 (2006.01)	C 07 K 16/30	
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-556515 (P2017-556515)	(71) 出願人	517247332 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー
(86) (22) 出願日	平成28年1月13日 (2016.1.13)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月25日 (2017.8.25)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/013291	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02016/115274	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成28年7月21日 (2016.7.21)		
(31) 優先権主張番号	62/103,402		
(32) 優先日	平成27年1月14日 (2015.1.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

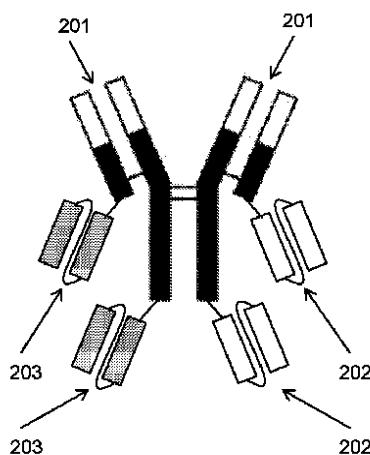
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多特異性免疫調節抗原結合構築物

(57) 【要約】

多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) 及び当該構築物を含む組成物が本明細書で提供される。当該構築物を使用する方法及び該構築物を作製する方法も提供される。癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する多特異性免疫調節抗原結合モジュール I (A B M I) と；エフェクター免疫細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 2 (A B M 2) であって、活性化受容体へのA B M 2の結合が活性化受容体を刺激するA B M 2と；エフェクター免疫細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 3 (A B M 3) であって、阻害性受容体へのA B M 3の結合が阻害性受容体に拮抗するA B M 3とを含む、多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) のポリペプチドが本明細書に記載され、ここで、A B M I、A B M 2 及びA B M 3は互いに作動可能に連結され、随意に、各抗原結合モジュールは、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる。

FIG. 4A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール1(ABM1)；

b. エフェクター免疫細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール2(ABM2)であって、前記活性化受容体へのABM2の結合が前記活性化受容体を刺激する、ABM2；及び

c. 前記エフェクター免疫細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール3(ABM3)であって、前記阻害性受容体へのABM3の前記結合が前記阻害性受容体に拮抗する、ABM3

を含み、

ABM1、ABM2及びABM3が互いに作動可能に連結され、

各抗原結合モジュールが、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる、多特異性免疫調節抗原結合構築物(MIAC)のポリペプチド。

【請求項 2】

前記MIACがFcをさらに含み、ここで、ABM1がscFvフラグメントであり、ABM2がFabフラグメントであり、ABM3がscFvフラグメントであり、ABM2がFcに連結しており、ABM3がABM2に連結しており、ABM1がFcに連結しており、ここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞によるIFN-、TNF-、IL-2及びグランザイムBの分泌のうちの少なくとも1つを誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記MIACと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成り、ここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の前記対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、かつここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の前記対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞のCD25細胞表面発現を誘導する、請求項1に記載のMIAC。

【請求項 3】

前記MIACが、一緒に連結しているABM1、ABM2、ABM3及びFcから成り、ここで、ABM1がscFvフラグメントであり、ABM2がFabフラグメントであり、ABM3がscFvフラグメントであり、ABM2の重鎖のC末端がFcのN末端に連結しており、ABM1がFcのC末端に連結しており、ABM3がABM2の軽鎖のC末端に連結しており、ここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞によるIFN-、TNF-、IL-2及びグランザイムBの分泌のうちの少なくとも1つを誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記MIACと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成り、ここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の前記対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、かつここで、前記MIACが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の前記対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞のCD25細胞表面発現を誘導する、請求項1に記載のMIAC。

【請求項 4】

前記MIACが、一緒に連結しているABM1、ABM2、ABM3及びFcから成り、ここで、ABM1がscFvフラグメントであり、ABM2がFabフラグメントであり、ABM3がscFvフラグメントであり、ABM2の重鎖のC末端がFcのN末端に

10

20

30

40

50

連結しており、ABM1がFcのC末端に連結しており、ABM3がABM2の軽鎖のC末端に連結している、請求項1に記載のM1AC。

【請求項5】

前記M1ACが足場をさらに含み、ここで、随意に、前記足場がFcであり、随意に、前記FcがヒトFcであり、随意に、前記FcがヒトIgGのFcであり、随意に、ABM1、ABM2及びABM3のそれぞれが、リンカーを伴ってまたは伴わずに、直接的または間接的に前記足場に連結しており、随意に、前記リンカーがポリペプチドリンカーである、請求項1に記載のM1AC。

【請求項6】

FcがIgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgEまたはIgMであり、随意に、Fcが改変され、随意に、前記改変がグリコシル化を低減し、随意に、前記改変がADCcを低減する、請求項5に記載のM1AC。

【請求項7】

ABM1、ABM2及びABM3のそれぞれが抗体またはその抗原結合性フラグメントである、上記請求項のいずれか1項に記載のM1AC。

【請求項8】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントがIgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgM、DV D-Ig及び/または重鎖抗体である、請求項7に記載のM1AC。

【請求項9】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントがFvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFvフラグメント、scFv-Fcフラグメント及び/または単一ドメイン抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである、請求項7に記載のM1AC。

【請求項10】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントがモノクローナル、ヒト、ヒト化及び/またはキメラである、請求項7に記載のM1AC。

【請求項11】

ABM1、ABM2及びABM3の少なくとも1つが代替足場をさらに含むか、または前記M1ACが代替足場をさらに含む、先行請求項のいずれか1項に記載のM1AC。

【請求項12】

前記癌細胞によって発現される前記抗原が腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原である、先行請求項のいずれか1項に記載のM1AC。

【請求項13】

前記癌細胞によって発現される前記抗原が、HER2、CD20、9-O-アセチル-GD3、hCG、A33抗原、CA19-9マーカー、CA-125マーカー、カルテイキュリン、カルボアンヒドラーーゼIX(MN/CA IX)、CCR5、CCR8、CD19、CD22、CD25、CD27、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD63、CD70、CC123、CD138、癌胎児性抗原(CEA; CD66e)、デスマグレイン4、E-カドヘリンネオエピトープ、エンドシアリン、エフリンA2(EphA2)、上皮増殖因子受容体(EGFR)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、Erbb2、胎児アセチルコリン受容体、線維芽細胞活性化抗原(FAP)、フコシルGM1、GD2、GD3、GM2、ガングリオシドGD3、グロボH、糖タンパク質100、HER2/neu、HER3、HER4、インスリン様増殖因子受容体1、ルイス-Y、LG、Ly-6、黒色腫特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSCP)、メソテリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5_Ac、MUC5_B、MUC7、MUC16、ミューラー管抑制物質(MIS)II型受容体、形質細胞抗原、ポリSA、PSCA、PSMA、ソニックヘッジホッグ(SHH)、SAS、STEAP、sTn抗原、TNF-アルファ前駆体及びこれらの組み合わせから選択される、先行請求

10

20

30

40

50

項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項14】

前記活性化受容体が、2B4(CD244)、₄₁インテグリン、₂インテグリン、CD2、CD16、CD27、CD38、CD96、CD100、CD160、CD137、CEACAM1(CD66)、CRTAM、CS1(CD319)、DNAM-1(CD226)、GITR(TNFRSF18)、活性化型のKIR、NKG2C、NKG2D、NKG2E、1種または複数種の天然の細胞傷害受容体、NTB-A、PEN-5及びこれらの組み合わせから選択され、随意に、前記₂インテグリンが、CD11a～CD18、CD11b～CD18またはCD11c～CD18を含み、随意に、前記活性化型のKIRがKIR2DS1、KIR2DS4またはKIR-Sを含み、随意に、前記天然の細胞傷害受容体がNKP30、NKP44、NKP46またはNKP80を含む、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

10

【請求項15】

前記阻害性受容体が、KIR、ILT2/LIR-1/CD85j、阻害型のKIR、KLRG1、LAIR-1、NKG2A、NKR-P1A、Singlec-3、Singlec-7、Singlec-9及びこれらの組み合わせから選択され、随意に、前記阻害型のKIRがKIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2またはKIR-Lを含む、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項16】

前記活性化受容体が、CD3、CD2(LFA2、OX34)、CD5、CD27(TNFRSF7)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD40L、CD84(SLAMF5)、CD137(4-1BB)、CD226、CD229(Ly9、SLAMF3)、CD244(2B4、SLAMF4)、CD319(CRACC、BLAME)、CD352(Ly108、NTBA、SLAMF6)、CRTAM(CD355)、DR3(TNFRSF25)、GITR(CD357)、HVEM(CD270)、ICOS、LIGHT、LT-R(TNFRSF3)、OX40(CD134)、NKG2D、SLAM(CD150、SLAMF1)、TCR、TCR、TCR、TIM1(HAVCR、KIM1)及びこれらの組み合わせから選択される、請求項1～13のいずれか1項に記載のM I A C。

20

【請求項17】

前記阻害性受容体が、PD-1(CD279)、2B4(CD244、SLAMF4)、B71(CD80)、B7H1(CD274、PD-L1)、BTLA(CD272)、CD160(BY55、NKG28)、CD352(Ly108、NTBA、SLAMF6)、CD358(DR6)、CTLA-4(CD152)、LAG3、LAIR1、PD-1H(VISTA)、TIGIT(VSIG9、VSTM3)、TIM2(TIMD2)、TIM3(HAVCR2、KIM3)及びこれらの組み合わせから選択される、請求項1～13のいずれか1項に記載のM I A C。

30

【請求項18】

前記エフェクター免疫細胞がT細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞であり、随意に、前記T細胞がCD4+ヘルパーT細胞またはCD8+細胞傷害性T細胞である、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

40

【請求項19】

前記癌細胞が、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓増殖性新生物、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーリング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆囊癌、胃癌(gastric cancer)、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、ヘアリーセル白血病、肝細胞癌、組織球増

50

殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病、唇及び口腔の癌、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、肺癌、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部癌、NUT 遺伝子関与正中管癌腫 (midline tract carcinoma involving NUT gene)、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成 / 骨髄増殖性新生物、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎孟及び尿管の癌、網膜芽細胞腫、ラブドイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、胃癌 (stomach cancer)、T細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腔癌、外陰癌ならびにウィルムス腫瘍に由来する細胞である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

10

【請求項 20】

A B M 2 が 4 つの免疫グロブリン可変ドメインを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

【請求項 21】

A B M 1 が 2 つの免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項 20 に記載の M I A C。

20

【請求項 22】

A B M 3 が 2 つの免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項 21 に記載の M I A C。

【請求項 23】

A B M 2 が F a b フラグメントであり、A B M 1 が s c F v フラグメントであり、A B M 3 が s c F v フラグメントである、請求項 22 に記載の M I A C。

【請求項 24】

前記 M I A C が F c をさらに含み、A B M 2 が F c に連結しており、A B M 3 が A B M 2 に連結しており、A B M 1 が F c に連結している、上記請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

【請求項 25】

A B M 2 の重鎖の C 末端が F c の N 末端に連結しており、A B M 1 が F c の C 末端に連結しており、A B M 3 が A B M 2 の軽鎖の C 末端に連結している、請求項 24 に記載の M I A C。

30

【請求項 26】

各連結が直接的であるかまたはリンカーを介しており、随意に、前記リンカーがポリペプチドリンカーであり、随意に、前記ポリペプチドリンカーが g l y - s e r リンカーまたは免疫グロブリンヒンジ領域もしくはその一部である、上記請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

【請求項 27】

前記 M I A C が二量体であり、随意に、前記二量体がホモ二量体である、上記請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

40

【請求項 28】

前記エフェクター免疫細胞によって発現されるさらなる分子と特異的に結合する抗原結合モジュール 4 (A B M 4) をさらに含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C。

【請求項 29】

前記エフェクター免疫細胞によって発現される前記さらなる分子が、C D 1 6 (C D 1 6 a、C D 1 6 b)、C D 3 2 a、C D 6 4 及び C D 8 9 から選択される、請求項 28 に記載の M I A C。

【請求項 30】

A B M 4 が F c である、請求項 28 に記載の M I A C。

50

【請求項 3 1】

A B M 1 が抗 H E R 2 であり、 A B M 2 が抗 C D 3 であり、 A B M 3 が抗 P D - 1 である、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の M I A C 。

【請求項 3 2】

A B M 1 、 A B M 2 及び A B M 3 のうちの少なくとも 2 つが互いに共有結合的に会合している、先行請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C 。

【請求項 3 3】

前記共有結合的会合が融合タンパク質の形態である、請求項 3 2 に記載の M I A C 。

【請求項 3 4】

A B M 1 、 A B M 2 及び A B M 3 のうちの少なくとも 2 つが互いに非共有結合的に会合している、先行請求項のいずれか 1 項に記載の M I A C 。

10

【請求項 3 5】

a . 癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール 1 (A B M 1) ; 及び

b . エフェクター免疫細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 2 (A B M 2) であって、前記活性化受容体への A B M 2 の結合が前記活性化受容体を刺激する A B M 2

を含み、

A B M 1 及び A B M 2 が互いに作動可能に連結され、

各抗原結合モジュールが、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる、多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) 。

20

【請求項 3 6】

A B M 1 が抗 C D 3 0 であり、 A B M 2 が抗 C D 1 3 7 である、請求項 3 5 に記載の M I A C 。

【請求項 3 7】

前記 M I A C が F c をさらに含み、随意に、 A B M 2 が F a b フラグメントであり、 A B M 1 が s c F v フラグメントであり、随意に、 A B M 2 の重鎖の C 末端が F c の N 末端に連結しており、 A B M 1 が F c の C 末端に連結しており、随意に、前記 M I A C が二量体であり、随意に、前記二量体がホモ二量体である、請求項 3 5 に記載の M I A C 。

30

【請求項 3 8】

a . 癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール 1 (A B M 1) ; 及び

b . エフェクター免疫細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 3 (A B M 3) であって、前記阻害性受容体への A B M 3 の前記結合が前記阻害性受容体に拮抗する、 A B M 3

を含み、

A B M 1 及び A B M 3 が互いに作動可能に連結され、

各抗原結合モジュールが、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる、多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) 。

40

【請求項 3 9】

A B M 1 が抗 C D 3 0 であり、 A B M 2 が抗 P D - 1 である、請求項 3 8 に記載の M I A C 。

【請求項 4 0】

前記 M I A C が F c をさらに含み、随意に、 A B M 3 が F a b フラグメントであり、 A B M 1 が s c F v フラグメントであり、随意に、 A B M 3 の重鎖の C 末端が F c の N 末端に連結しており、 A B M 1 が F c の C 末端に連結しており、随意に、前記 M I A C が二量体であり、随意に、前記二量体がホモ二量体である、請求項 3 8 に記載の M I A C 。

50

【請求項 4 1】

前記M I A Cが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞によるIFN-、TNF-、IL-2及びグランザイムBの分泌のうちの少なくとも1つを誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記M I A Cと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項42】

前記M I A Cによって誘導されるIFN-、TNF-、IL-2及び/またはグランザイムBの分泌の量が、抗体の前記対照セットによって誘導されるものより約2、3、4、5、6、7または8倍多い、請求項41に記載のM I A C。

10

【請求項43】

前記M I A Cが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記M I A Cと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項44】

前記M I A Cによって誘導される増殖のレベルが、抗体の前記対照セットによって誘導されるものより約2、3、4、5、6、7または8倍高い、請求項43に記載のM I A C。

20

【請求項45】

前記M I A Cが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞のCD25細胞表面発現を誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記M I A Cと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項46】

前記M I A Cによって誘導される前記CD25の発現が、抗体の前記対照セットによって誘導されるものより約2、3、4、5、6、7または8倍多い、請求項45に記載のM I A C。

30

【請求項47】

前記M I A Cが、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの癌細胞死を誘導し、ここで、抗体の前記対照セットが、全体としては前記M I A Cと同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

【請求項48】

各ABMが、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合し、随意に、そのそれぞれの抗原または受容体に対する各結合モジュールの親和性が、各ABMがそのそれぞれの抗原または受容体に同時に結合する場合、約0.3nM～約1.7nM、0.37～1.66nM、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6または1.7nMである、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C。

40

【請求項49】

先行請求項のいずれか1項に記載のM I A C及び剤を含む、コンジュゲート。

【請求項50】

前記剤が、治療剤、診断剤、マスキング部分、切断可能部分及びこれらの組み合わせから選択される、請求項49に記載のコンジュゲート。

【請求項51】

50

前記剤がリンカーによってM I A Cに結合している、請求項49または請求項50に記載のコンジュゲート。

【請求項52】

先行請求項のいずれか1項に記載のM I A Cまたはコンジュゲート及び賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項53】

癌を有する対象を治療する方法であって、有効量の、先行請求項のいずれか1項に記載のM I A Cもしくはコンジュゲートまたは請求項52に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項54】

癌の成長を阻害するかまたは低減させる方法であって、前記癌を、有効量の前記対象に対する先行請求項のいずれか1項に記載のM I A Cもしくはコンジュゲートまたは請求項52に記載の医薬組成物に接触させることを含む、前記方法。

【請求項55】

前記M I A Cが癌細胞及びエフェクター細胞と結合する、請求項53または請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記M I A Cが2つ以上のエフェクター細胞と結合する、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記M I A Cが前記エフェクター細胞の活性化受容体を刺激し、前記エフェクター細胞の阻害性受容体に拮抗する、請求項53～56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

前記M I A Cが前記エフェクター細胞を活性化する、請求項53～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

前記活性化されたエフェクター細胞が、癌細胞に対する細胞傷害性、増殖、IL-2の分泌、インターフェロンガンマの分泌、LAMP-1のアップレギュレーション、CD16のダウンレギュレーション、CD69のアップレギュレーション及びKLRG1のアップレギュレーションから選択される表現型を示す、請求項53～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

前記M I A Cによって誘導される前記増殖が、ABM3を含まないM I A Cによって誘導される増殖を上回る、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記癌が、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓増殖性新生物、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーディング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆囊癌、胃癌(gastric cancer)、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、ヘアリーセル白血病、肝細胞癌、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病、唇及び口腔の癌、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、肺癌、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部癌、NUT遺伝子関与正中管癌腫(midline tract carcinoma involving NUT gene)、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髓腫、菌状息肉症、骨髓異形成症候群、骨髓異形成/骨髓増殖性新生物、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺

10

20

30

40

50

腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎孟及び尿管の癌、網膜芽細胞腫、ラブドイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、胃癌 (stomach cancer) 、T細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腔癌、外陰癌ならびにウィルムス腫瘍から選択される、請求項53～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

少なくとも1つのさらなる剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項53～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

請求項1～48のいずれか1項に記載のMIAcをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項64】

請求項63に記載の組成物を含む細胞。

【請求項65】

請求項64に記載の細胞で前記MIAcを発現させることを含む、MIAcを作製する方法。

【請求項66】

請求項1～48のいずれか1項に記載のMIAcの前記ABMを発現させること、および、MIAcを形成するために前記ABMをアセンブルすることを含む、MIAcを作製する方法。

【請求項67】

請求項1～48のいずれか1項に記載のMIAcをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含む、ベクターまたは一連のベクター。

【請求項68】

請求項1～48のいずれか1項に記載のMIAc及び使用のための説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年1月14日に出願された米国特許仮出願第62/103,402号の利益を主張し、当該仮出願は、すべての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、配列表を含む。XYZで作製された前記ASCIIのコピーは、XYZ_PCT_CRF_sequence_listing.txtと名づけられ、XYZバイトのサイズである。

【0003】

分野

多特異性免疫調節抗原結合構築物(MIAc)及びMIAcを含む組成物が本明細書で提供される。該構築物を使用する方法及び該構築物を作製する方法も提供される。

【背景技術】

【0004】

同じエフェクター細胞上の活性化受容体及び阻害性受容体の同時調節

エフェクター細胞ベースの免疫調節抗体療法は抗体を利用して、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞などのエフェクター細胞を腫瘍などの所望の作用部位に動員する。

【0005】

10

20

30

40

50

エフェクター細胞ベースの免疫調節抗体療法の一例は、Amgen IncのBi specific T Cell Engager (BiTE (登録商標))免疫療法プラットフォームである。BiTE (登録商標) プラットフォームは、T細胞と癌細胞の間のブリッジとして機能するように設計されている。BiTE (登録商標) 分子は、2つの抗原結合部位、すなわち、(1)腫瘍細胞の表面上の抗原と結合する結合部位、及び(2)T細胞の表面上のCD3と結合するCD3結合部位を有する。両方の抗原と結合することによって、BiTE (登録商標) 分子は、T細胞の細胞傷害活性を活用して、特定の抗原を発現する癌細胞を破壊する。Nagorsen and Baeuerle, Exp. Cell. Res., 2011, 317:1255-1260 (非特許文献1)；及びBaeuerle et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2009, 11:22-30 (非特許文献2) (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照されたい。10

【0006】

他のエフェクター細胞ベースの免疫調節抗体療法としては、癌細胞で発現される抗原及びT細胞の表面上で発現される共刺激(すなわち、活性化)受容体CD3及びCD28に結合する分子が挙げられる。全体が参照により組み込まれる、Wang et al., J. Biochem., 2004, 135:555-565 (非特許文献3)を参照されたい。

【0007】

しかし、標準的なシグナル1及び2(すなわち、それぞれCD3及びCD28を介する)の供給だけでは、癌療法においてエフェクター細胞の治療的に適切な活性化を誘導するのに十分でない可能性があるという証拠が蓄積している。これについての1つの理由は、癌細胞の中には、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対するリガンドを発現するものがあるということである。例えば、癌細胞によるPD-L1の発現は阻害性受容体PD-1を活性化する。阻害性受容体は、同じエフェクター細胞で共結合した活性化受容体からの刺激性シグナルを抑止する阻害性シグナルを伝達する。20

【0008】

さらに、癌細胞の中には、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対してリガンドを提示できないものもある。例えば、MIC AまたはMIC Bが脱落している癌細胞は、これらのリガンドが活性化受容体NKG2Dを刺激できないことを意味する。30

【0009】

理論に拘束されないが、こうした反対のタイプの受容体(すなわち、活性化及び阻害)によって伝えられるシグナルが個々の細胞のレベルで統合され、次いで、各細胞が、その免疫シナプスにおいて伝達される活性化シグナル及び阻害性シグナルの統合(例えば総和)に従って、活性化される(または活性化されない)ように思われる。例えば、NK細胞の活性化は、数ある中でも、特に、NKG2Dなどの活性化受容体と阻害型のKIR及びPD-1などの阻害性受容体の両方を介するシグナリングの統合に依存している。全体が参照により組み込まれる、Pegram et al., Immunology and Cell Biology, 2011, 89:216-224 (非特許文献4)を参照されたい。40

【0010】

現在のエフェクター細胞ベースの免疫調節抗体療法は、こうした統合的シグナリングメカニズムを考慮していない。したがって、現在の療法は、ある種の治療状況、例えばエフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対するリガンドを発現する悪性腫瘍において、エフェクター細胞を活性化する能力を欠く。

【0011】

したがって、同じエフェクター細胞によって発現される活性化受容体と阻害性受容体の両方を介するシグナリングを同時に調節することによってエフェクター細胞の機能を至適化する、新規な癌細胞標的化療法が必要である。したがって、いくつかの実施形態では、この機能を果たす分子が本明細書で提供される。例えば、エフェクター細胞を利用する治

10

20

30

40

50

療適用における、そのような分子を使用する方法も提供される。これらの分子を作製する方法も提供される。

【0012】

癌細胞への免疫調節構築物の特異的標的化

ある種の癌細胞は、(i)エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対するリガンドを発現することができない；または(ii)エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対するリガンドを発現する。結果として生じる、癌細胞がエフェクター細胞において活性化シグナルを刺激することができないこと、または癌細胞がエフェクター細胞において阻害性シグナルを刺激することに成功することは、それぞれ、癌の進行を促進することもできる。

10

【0013】

例えば、全体が参照により組み込まれる、Hodi et al. (New Engl. J. Med., 2010, 363: 711-723) (非特許文献5)は、阻害性受容体に拮抗する抗CTLA-4抗体イピリムマブが与えられている転移性黒色腫患者の生存の向上を記載している。イピリムマブの投与は生存を延ばしたが、この抗体は癌細胞に特異的に標的化されず、したがって、広範に且つ非特異的に免疫系を活性化する。そのような広範な活性化の結果としては、重度の自己免疫毒性、例えば、大腸炎及び内分泌疾患が挙げられる。前掲誌を参照されたい。

20

【0014】

したがって、現在のエフェクター細胞ベースの免疫調節療法は、しばしば効力があるが非特異的である。これに反して、癌細胞の細胞表面抗原を標的化する従来のモノクローナル抗体ベースの療法は、一般に非常に特異的であるが効力を欠く可能性がある。

30

【0015】

したがって、多くのエフェクター細胞ベースの免疫調節抗体療法につきものの特異性の欠如及び多くの癌細胞標的化モノクローナル抗体療法の効力の欠如に対処する新規な治療法も必要である。有用な分子は、癌細胞標的化モノクローナル抗体の特異性とエフェクター細胞ベースの免疫調節療法の免疫調節能力を兼ね備えるであろう。したがって、いくつかの実施形態では、この機能を果たす分子が本明細書で提供される。例えば、エフェクター細胞を利用する治療適用における、そのような分子を使用する方法も提供される。これらの分子を作製する方法も提供される。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Nagorsen and Baeuerle, Exp. Cell. Res., 2011, 317: 1255-1260

【非特許文献2】Baeuerle et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2009, 11: 22-30

【非特許文献3】Wang et al., J. Biochem., 2004, 135: 555-565

【非特許文献4】Pegram et al., Immunology and Cell Biology, 2011, 89: 216-224

【非特許文献5】Hodi et al., New Engl. J. Med., 2010, 363: 711-723

40

【発明の概要】

【0017】

癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール1(ABM1)；

エフェクター免疫細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール2(ABM2)であって、活性化受容体へのABM2の結合が活性化受容体を刺激するABM2；及び

50

エフェクター免疫細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール3（ABM3）であって、阻害性受容体へのABM3の結合が阻害性受容体に拮抗するABM3

を含む多特異性免疫調節抗原結合構築物（MIAc）のポリペプチドが本明細書に記載され、ここで、ABM1、ABM2及びABM3は互いに作動可能に連結され、随意に、各抗原結合モジュールは、他の抗原結合モジュールのそれぞれが、そのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と、結合することができる。

【0018】

いくつかの態様では、MIAcはさらにFcを含み、ここで、ABM1はscFvフラグメントであり、ABM2はFabフラグメントであり、ABM3はscFvフラグメントであり、ABM2はFcに連結しており、ABM3はABM2に連結しており、ABM1はFcに連結しており、ここで、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞によるIFN- γ 、TNF- α 、IL-2及びグランザイムBの分泌のうちの少なくとも1つを誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体としてはMIAcと同じ標的と特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成り、ここで、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞のCD25細胞表面発現を誘導する。

10

20

30

40

【0019】

いくつかの態様では、MIAcは、一緒に連結しているABM1、ABM2、ABM3及びFcから成り、ここで、ABM1はscFvフラグメントであり、ABM2はFabフラグメントであり、ABM3はscFvフラグメントであり、ABM2の重鎖のC末端はFcのN末端に連結しており、ABM1はFcのC末端に連結しており、ABM3はABM2の軽鎖のC末端に連結しており、ここで、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞によるIFN- γ 、TNF- α 、IL-2及びグランザイムBの分泌のうちの少なくとも1つを誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体としてはMIAcと同じ標的と特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成り、ここで、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、MIAcは、少なくとも1つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも1つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞のCD25細胞表面発現を誘導する。

【0020】

いくつかの態様では、MIAcは、一緒に連結しているABM1、ABM2、ABM3及びFcから成り、ここで、ABM1はscFvフラグメントであり、ABM2はFabフラグメントであり、ABM3はscFvフラグメントであり、ABM2の重鎖のC末端はFcのN末端に連結しており、ABM1はFcのC末端に連結しており、ABM3はABM2の軽鎖のC末端に連結している。

40

【0021】

癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール1（ABM1）及び

エフェクター免疫細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール2（ABM2）であって、活性化受容体へのABM2の結合が活性化受容体を刺激するABM2

を含む多特異性免疫調節抗原結合構築物（MIAc）も本明細書に記載され、ここで、A

50

B M 1 及び A B M 2 は互いに作動可能に連結され、随意に、各抗原結合モジュールは、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる。いくつかの態様では、M I A C はさらに F c を含み、随意に、A B M 2 は F a b フラグメントであり、A B M 1 は s c F v フラグメントであり、随意に、A B M 2 の重鎖の C 末端は F c の N 末端に連結しており、A B M 1 は F c の C 末端に連結しており、随意に、M I A C は二量体であり、随意に、二量体はホモ二量体である。

【 0 0 2 2 】

癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール 1 (A B M 1)
; 及び

エフェクター免疫細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 3 (A B M 3) であって、阻害性受容体への A B M 3 の結合が阻害性受容体に拮抗する A B M 3

を含む多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) も本明細書に記載され、ここで、A B M 1 及び A B M 3 は互いに作動可能に連結され、随意に、各抗原結合モジュールは、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合することができる。いくつかの態様では、M I A C はさらに F c を含み、随意に、A B M 3 は F a b フラグメントであり、A B M 1 は s c F v フラグメントであり、随意に、A B M 3 の重鎖の C 末端は F c の N 末端に連結しており、A B M 1 は F c の C 末端に連結しており、随意に、M I A C は二量体であり、随意に、二量体はホモ二量体である。

【 0 0 2 3 】

いくつかの態様では、M I A C は足場をさらに含み、ここで、随意に、足場は F c であり、随意に、F c はヒト F c であり、随意に、F c はヒト I g G の F c であり、随意に、各 A B M は、直接的または間接的に、リンカーを伴ってまたは伴わずに足場に連結しており、随意に、リンカーはポリペプチドリンカーである。いくつかの態様では、F c は I g G (I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4) 、 I g A (I g A 1 、 I g A 2) 、 I g D 、 I g E または I g M であり、随意に、F c は改変され、随意に、当該改変はグリコシル化を低減させ、随意に、当該改変は A D C C を低減させる。

【 0 0 2 4 】

いくつかの態様では、各 A B M は抗体またはその抗原結合性フラグメントである。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合性フラグメントは I g G (I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4) 、 I g A (I g A 1 、 I g A 2) 、 I g D 、 I g E 、 I g M 、 D V D - I g 及び / または重鎖抗体である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合性フラグメントは F v フラグメント、 F a b フラグメント、 F (a b ') 2 フラグメント、 F a b ' フラグメント、 s c F v フラグメント、 s c F v - F c フラグメント及び / または単一ドメイン抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合性フラグメントはモノクローナル、ヒト、ヒト化及び / またはキメラである。

【 0 0 2 5 】

いくつかの態様では、少なくとも 1 つの A B M は代替足場をさらに含み、または M I A C の別の部分は代替足場をさらに含む。

【 0 0 2 6 】

いくつかの態様では、癌細胞によって発現される抗原は腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原である。いくつかの態様では、癌細胞によって発現される抗原は、 H E R 2 、 C D 2 0 、 9 - O - アセチル - G D 3 、 h C G 、 A 3 3 抗原、 C A 1 9 - 9 マーカー、 C A - 1 2 5 マーカー、カルレティキュリン、カルボアンヒドラーゼ I X (M N / C A I X) 、 C C R 5 、 C C R 8 、 C D 1 9 、 C D 2 2 、 C D 2 5 、 C D 2 7 、 C D 3 0 、 C D 3 3 、 C D 3 8 、 C D 4 4 v 6 、 C D 6 3 、 C D 7 0 、 C C 1 2 3 、 C D 1 3 8 、癌胎児性抗原 (C E A ; C D 6 6 e) 、デスマグレイン 4 、 E - カドヘリンネオエピトープ、エンド

10

20

30

40

50

シアリン、エフリンA2（EphA2）、上皮増殖因子受容体（EGFR）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、Erbb2、胎児アセチルコリン受容体、線維芽細胞活性化抗原（FAP）、フコシルGM1、GD2、GD3、GM2、ガングリオシドGD3、G10bo-H、糖タンパク質100、HER2/neu、HER3、HER4、インスリン様増殖因子受容体1、ルイス-Y、LG、Ly-6、黒色腫特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCSGP）、メソテリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5_{Ac}、MUC5_B、MUC7、MUC16、ミューラー管抑制物質（MIS）I型受容体、形質細胞抗原、ポリSA、PSCA、PSMA、ソニックヘッジホッグ（SHH）、SAS、STEAP、STn抗原、TNF-アルファ前駆体及びこれらの組み合10
わせから選択される。

【0027】

いくつかの態様では、活性化受容体は、2B4（CD244）、₄₁インテグリン、₂インテグリン、CD2、CD16、CD27、CD38、CD96、CD100、CD160、CD137、CEACAM1（CD66）、CRTAM、CS1（CD319）、DNAM-1（CD226）、GITR（TNFRSF18）、活性化型のKIR、NKG2C、NKG2D、NKG2E、1種または複数種の天然の細胞傷害受容体（natural cytotoxicity receptor）、NTB-A、PEN-5及びこれらの組み合わせから選択され、随意に、₂インテグリンは、CD11a-CD18、CD11b-CD18またはCD11c-CD18を含み、随意に、活性化型のKIRはKIR2DS1、KIR2DS4またはKIR-Sを含み、随意に、天然の細胞傷害受容体はNKP30、NKP44、NKP46またはNKP80を含む。
20

【0028】

いくつかの態様では、阻害性受容体は、KIR、ILT2/LIR-1/CD85j、阻害型のKIR、KLRG1、LAIR-1、NKG2A、NKR-P1A、Singlec-3、Singlec-7、Singlec-9及びこれらの組み合わせから選択され、随意に、阻害型のKIRはKIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2またはKIR-Lを含む。

【0029】

いくつかの態様では、活性化受容体は、CD3、CD2（LFA2、OX34）、CD5、CD27（TNFRSF7）、CD28、CD30（TNFRSF8）、CD40L、CD84（SLAMF5）、CD137（4-1BB）、CD226、CD229（Ly9、SLAMF3）、CD244（2B4、SLAMF4）、CD319（CRACC、BLAME）、CD352（Ly108、NTBA、SLAMF6）、CRTAM（CD355）、DR3（TNFRSF25）、GITR（CD357）、HVEM（CD270）、ICOS、LIGHT、LT-R（TNFRSF3）、OX40（CD134）、NKG2D、SLAM（CD150、SLAMF1）、TCR、TCR、TCR、TIM1（HAVCR、KIM1）及びこれらの組み合わせから選択される。
30

【0030】

いくつかの態様では、阻害性受容体は、PD-1（CD279）、2B4（CD244）、SLAMF4）、B71（CD80）、B7H1（CD274、PD-L1）、BTLA（CD272）、CD160（BY55、NK28）、CD352（Ly108、NTBA、SLAMF6）、CD358（DR6）、CTLA-4（CD152）、LAG3、LAIR1、PD-1H（VISTA）、TIGIT（VSIG9、VSTM3）、TIM2（TIMD2）、TIM3（HAVCR2、KIM3）及びこれらの組み合わせから選択される。
40

【0031】

いくつかの態様では、エフェクター免疫細胞はT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞であり、随意に、T細胞はCD4+ヘルパーT細胞またはCD8+細胞傷害性T細胞である。

【0032】

いくつかの態様では、癌細胞は、急性リンパ性白血病（A L L）、急性骨髓性白血病（A M L）、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病（C L L）、慢性骨髓性白血病（C M L）、慢性骨髓増殖性新生物、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーイング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆嚢癌、胃癌（g a s t r i c c a n c e r）、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、ヘアリーセル白血病、肝細胞癌、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病、唇及び口腔の癌、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、肺癌、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部癌、N U T 遺伝子関与正中管癌腫（m i d l i n e t r a c t c a r c i n o m a i n v o l v i n g N U T g e n e）、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髓腫、菌状息肉症、骨髓異形成症候群、骨髓異形成 / 骨髓増殖性新生物、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎孟及び尿管の癌、網膜芽細胞腫、ラブドトイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、胃癌（s t o m a c h c a n c e r）、T細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腫瘍、外陰癌ならびにウィルムス腫瘍に由来する細胞である。

10

20

30

40

50

【0033】

いくつかの態様では、A B M 2 は、存在する場合、4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、A B M 1 は、存在する場合、2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、A B M 3 は、存在する場合、2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、A B M 2 は、存在する場合、F a b フラグメントであり、A B M 1 は、存在する場合、s c F v フラグメントであり、A B M 3 は、存在する場合、s c F v フラグメントである。

【0034】

いくつかの態様では、M I A C はF c をさらに含み、A B M 2 は、存在する場合、F c に連結しており、A B M 3 は、存在する場合、A B M 2 に連結しており、A B M 1 は、存在する場合、F c に連結している。いくつかの態様では、A B M 2 の重鎖のC末端は、存在する場合、F c のN末端に連結しており、A B M 1 は、存在する場合、F c のC末端に連結しており、A B M 3 は、存在する場合、A B M 2 の軽鎖のC末端に連結している。

【0035】

いくつかの態様では、各連結は直接的であるか、またはリンカーを介しており、随意に、リンカーはポリペプチドリンカーであり、随意に、ポリペプチドリンカーはg l y - s e r リンカーまたは免疫グロブリンヒンジ領域もしくはその一部である。

【0036】

いくつかの態様では、M I A C は二量体であり、随意に、二量体はホモ二量体である。

【0037】

いくつかの態様では、M I A C は、エフェクター免疫細胞によって発現されるさらなる分子に特異的に結合する抗原結合モジュール4（A B M 4）をさらに含む。いくつかの態様では、エフェクター免疫細胞によって発現されるさらなる分子は、C D 1 6（C D 1 6 a、C D 1 6 b）、C D 3 2 a、C D 6 4 及びC D 8 9 から選択される。いくつかの態様では、A B M 4 はF c である。

【0038】

いくつかの態様では、少なくとも2つのA B M は、互いに共有結合的に会合している。いくつかの態様では、共有結合的会合は融合タンパク質の形態である。いくつかの態様で

は、少なくとも 2 つの A B M は、互いに非共有結合的に会合している。

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様では、M I A C は、少なくとも 1 つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも 1 つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より多くの量の、エフェクター免疫細胞による I F N - 、 T N F - 、 I L - 2 及びグランザイム B の分泌のうちの少なくとも 1 つを誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体として、M I A C と同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る。いくつかの態様では、M I A C によって誘導される I F N - 、 T N F - 、 I L - 2 及び / またはグランザイム B の分泌の量は、抗体の対照セットによって誘導されるものより約 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 倍多い。

10

【 0 0 4 0 】

いくつかの態様では、M I A C は、少なくとも 1 つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも 1 つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルのエフェクター免疫細胞増殖を誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体としては M I A C と同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る。いくつかの態様では、M I A C によって誘導される増殖のレベルは、抗体の対照セットによって誘導されるものより約 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 倍高い。

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様では、M I A C は、少なくとも 1 つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも 1 つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの、エフェクター免疫細胞の C D 2 5 細胞表面発現を誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体としては M I A C と同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る。いくつかの態様では、M I A C によって誘導される C D 2 5 の発現は、抗体の対照セットによって誘導されるものより約 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 倍多い。

20

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様では、M I A C は、少なくとも 1 つのエフェクター免疫細胞及び少なくとも 1 つの癌細胞に結合する際に、抗体の対照セットと比較して、より高いレベルの癌細胞死を誘導し、ここで、抗体の対照セットは、全体としては M I A C と同じ標的に特異的に結合する、等モル濃度で存在する別々の单一特異性抗体から成る。

30

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様では、各 A B M は、他の抗原結合モジュールのそれぞれがそのそれぞれの抗原または受容体に結合するのと同時に、そのそれぞれの抗原または受容体と結合し、隨意に、そのそれぞれの抗原または受容体に対する各結合モジュールの親和性は、各 A B M がそのそれぞれの抗原または受容体に同時に結合する場合、約 0 . 3 n M ~ 約 1 . 7 n M 、 0 . 3 7 ~ 1 . 6 6 n M 、 0 . 3 、 0 . 4 、 0 . 5 、 0 . 6 、 0 . 7 、 0 . 8 、 0 . 9 、 1 . 0 、 1 . 1 、 1 . 2 、 1 . 3 . 1 . 4 、 1 . 5 、 1 . 6 または 1 . 7 n M である。

【 0 0 4 4 】

M I A C 及び剤を含むコンジュゲートも本明細書に開示される。いくつかの態様では、剤は、治療剤、診断剤、マスキング部分、切断可能部分及びこれらの組み合わせから選択される。いくつかの態様では、剤はリンカーによって M I A C に結合している。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書に開示される M I A C またはコンジュゲート及び賦形剤を含む医薬組成物も本明細書に開示される。

【 0 0 4 6 】

有効量の、本明細書に開示される M I A C またはコンジュゲートまたは医薬組成物を対象に投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法も本明細書に開示される。

【 0 0 4 7 】

有効量の、対象に対する本明細書に開示される M I A C またはコンジュゲートまたは医

50

薬組成物と癌を接触させることを含む、癌の成長を阻害するかまたは低減させる方法も本明細書に開示される。

【0048】

いくつかの態様では、M I A C は癌細胞及びエフェクター細胞と結合する。いくつかの態様では、M I A C は2つ以上のエフェクター細胞と結合する。いくつかの態様では、M I A C はエフェクター細胞の活性化受容体を刺激し、エフェクター細胞の阻害性受容体に拮抗する。いくつかの態様では、M I A C はエフェクター細胞を活性化する。いくつかの態様では、活性化されたエフェクター細胞は、癌細胞に対する細胞傷害性、増殖、I L - 2 の分泌、インターフェロンガンマの分泌、L A M P - 1 のアップレギュレーション、C D 1 6 のダウンレギュレーション、C D 6 9 のアップレギュレーション及びK L R G 1 のアップレギュレーションから選択される表現型を示す。いくつかの態様では、M I A C によって誘導される増殖は、A B M 3 を含まないM I A C によって誘導される増殖を上回る。

10

【0049】

いくつかの態様では、癌は、急性リンパ性白血病 (A L L)、急性骨髓性白血病 (A M L)、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髓性白血病 (C M L)、慢性骨髓増殖性新生物、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーイング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆囊癌、胃癌 (g a s t r i c c a n c e r)、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、ヘアリーセル白血病、肝細胞癌、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎臓癌、ラングルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病、唇及び口腔の癌、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、肺癌、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部癌、N U T 遺伝子関与正中管癌腫 (m i d l i n e t r a c t c a r c i n o m a i n v o l v i n g N U T g e n e)、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髓腫、菌状息肉症、骨髓異形成症候群、骨髓異形成 / 骨髓増殖性新生物、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎孟及び尿管の癌、網膜芽細胞腫、ラブドイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、胃癌 (s t o m a c h c a n c e r)、T細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腫瘍、外陰癌ならびにウィルムス腫瘍から選択される。

20

【0050】

いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、少なくとも1つのさらなる剤を対象に投与することをさらに含む。

【0051】

本明細書に開示されるM I A C をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含む組成物も本明細書に開示される。

【0052】

本明細書に開示されるM I A C をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含む細胞も本明細書に開示される。

【0053】

本明細書に開示されるM I A C をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含む細胞でM I A C を発現させることを含むM I A C を作製する方法も本明細書に開示される。

30

【0054】

40

本明細書に開示されるM I A CのA B Mを発現させること、および、M I A Cを形成するためにA B Mをアセンブルすることを含む、M I A Cを作製する方法も本明細書に開示される。

【0055】

本明細書に開示されるM I A Cをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドまたは一連のポリヌクレオチドを含むベクターまたは一連のベクターも本明細書に開示される。

【0056】

本明細書に開示されるM I A C及び使用のための説明書を含むキットも本明細書に開示され、随意に、使用のための説明書は、本明細書に開示される方法を実施するための説明書を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】本開示の多特異性免疫調節抗原結合構築物（すなわち、M I A C；101）の概略図である。M I A Cは、3つの抗原結合モジュール（A B M；102、103及び104）を含む。抗原結合モジュール1（A B M1；102）は、癌細胞特異的抗原結合部位を含む。抗原結合モジュール2（A B M2；103）は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対してアゴニスト活性を有する結合部位を含む。抗原結合モジュール3（A B M3；104）は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対してアンタゴニスト活性を有する結合部位を含む。この概略図は、本明細書で提供されるM I A Cの成分を例示することを目的とし、個々のA B Mの配置または数について制限することを目的とするものではない。より詳細に以下に記載するように、A B M（例えば、免疫グロブリン、抗体フラグメント及び代替足場）を形成する分子の性質に応じて、A B Mを様々に配置させることができる。A B Mは、相互作用の結合価を変える及び/またはエフェクター細胞の活性化について改善された制御をもたらすために、異なる量で存在することもできる。

20

【図2A】本明細書で提供されるM I A Cのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのI g G及び2つのs c F vから組み立てられる。2つのs c F vがI g G重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。A B M1は201として指定され、A B M2は202として指定され、A B M3は203として指定される。

30

【図2B】本明細書で提供されるM I A Cのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのI g G及び2つのs c F vから組み立てられる。2つのs c F vがI g G軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。A B M1は201として指定され、A B M2は202として指定され、A B M3は203として指定される。

【図2C】本明細書で提供されるM I A Cのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのI g G及び2つのs c F vから組み立てられる。1つのs c F vがI g G軽鎖のC末端に結合し、もう1つのs c F vがI g G重鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。A B M1は201として指定され、A B M2は202として指定され、A B M3は203として指定される。

40

【図2D】本明細書で提供されるM I A Cのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのI g G及び2つのs c F vから組み立てられる。1つのs c F vがI g G軽鎖のC末端に結合し、もう1つのs c F vがI g G重鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。A B M1は201として指定され、A B M2は202として指定され、A B M3は203として指定される。

【図3A】本明細書で提供されるM I A Cのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体及び阻害性受容体に対する結合部位の数ならびにM I A C内のそれらの位置を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるM I A Cを示す。この例示的実施形態は、1つのI g G及び3つのs c F vから組み立てられる。1つのA B M2（202）が1つのI g G重鎖のC末端に結合し、

50

1つのABM3(203)がもう1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図3B】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体及び阻害性受容体に対する結合部位の数ならびにMIAc内のそれらの位置を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIAcを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)がもう1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)が1つのIgG重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図3C】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体及び阻害性受容体に対する結合部位の数ならびにMIAc内のそれらの位置を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIAcを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)が1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)がもう1つのIgG重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図3D】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体及び阻害性受容体に対する結合部位の数ならびにMIAc内のそれらの位置を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIAcを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)が1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)がもう1つのIgG軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図4】図4A～図4Bは、本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。これらの例示的実施形態は1つのIgG及び4つのscFvから組み立てられる。図4Aは、ABM2(202)が半分のIgG分子の重鎖及び軽鎖のC末端に結合し、ABM3(203)がもう半分のIgG分子の重鎖及び軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。図4Bは、ABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端及び1つのIgG重鎖のC末端に結合し、一方で、ABM3(203)がもう1つのIgG軽鎖のC末端及びもう1つのIgG重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。図4A～4Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図5】図5A～図5Bは、本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。ABM2(図5A)またはABM3(図5B)はIgGであり、残りのABMはIgG重鎖のC末端に結合しているscFvである。図5Aおよび5Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図6】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。ABM1、ABM2及びABM3のそれぞれはscFvである。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図7】図7A～図7Cは、本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。1つのABMは他の2つのABMの両方に結合しているが、他の2つのABMは互いに結合していない。図7A～7Cにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図8】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。各ABMは2つの他のABMに結合している。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図9】本開示の多特異性免疫調節抗原結合構築物(すなわち、MIAc；101)の概略図である。MIAcは、2つの抗原結合モジュール(ABM；102及び103)を含む。抗原結合モジュール1(ABM1；102)は、癌細胞特異的抗原結合部位を含む。

10

20

30

40

50

抗原結合モジュール2(ABM2；103)は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対してアゴニスト活性を有する結合部位を含む。この概略図は、本明細書で提供されるMIAcの成分を例示することを目的とし、個々のABMの配置または数について制限することを目的とするものではない。より詳細に以下に記載するように、ABM(例えば、免疫グロブリン、抗体フラグメント及び代替足場)を形成する分子の性質に応じて、ABMを様々なに配置させることができる。ABMは、相互作用の結合価を変える及び/またはエフェクター細胞の活性化について改善された制御をもたらすために、異なる量で存在することもできる。

【図10】本開示の多特異性免疫調節抗原結合構築物(すなわち、MIAc；101)の概略図である。MIAcは、2つの抗原結合モジュール(ABM；102及び104)を含む。抗原結合モジュール1(ABM1；102)は、癌細胞特異的抗原結合部位を含む。抗原結合モジュール3(ABM2；104)は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対してアンタゴニスト活性を有する結合部位を含む。この概略図は、本明細書で提供されるMIAcの成分を例示することを目的とし、個々のABMの配置または数について制限することを目的とするものではない。より詳細に以下に記載するように、ABM(例えば、免疫グロブリン、抗体フラグメント及び代替足場)を形成する分子の性質に応じて、ABMを様々なに配置させることができる。ABMは、相互作用の結合価を変える及び/またはエフェクター細胞の活性化について改善された制御をもたらすために、異なる量で存在することもできる。

【図11A】本明細書で提供されるMIAcのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのIgG及び2つのscFvから組み立てられる。2つのscFvがIgG重鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図11B】本明細書で提供されるMIAcのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのIgG及び2つのscFvから組み立てられる。2つのscFvがIgG軽鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図11C】本明細書で提供されるMIAcのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのIgG及び2つのscFvから組み立てられる。2つのscFvがIgG重鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図11D】本明細書で提供されるMIAcのある種の例示的実施形態の概略図である。この例示的実施形態は1つのIgG及び2つのscFvから組み立てられる。2つのscFvがIgG軽鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図12】図12A～図12Bは、本明細書で提供されるMIAcのある種の例示的実施形態の概略図である。これらの例示的実施形態は1つのIgG及び2つのscFvから組み立てられる。図12Aおよび図12Bは、1つのscFvがIgG軽鎖のC末端に結合し、もう1つのscFvがIgG重鎖のC末端に結合している実施形態の概略図を提供する。図12A～図12Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図13A】本明細書で提供されるMIAcのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体または阻害性受容体に対する結合部位の数を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIAcを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM2(202)が1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)がも

10

20

30

40

50

う1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図13B】本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体または阻害性受容体に対する結合部位の数を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIACを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM2(202)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)がもう1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM2(202)が1つのIgG重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図13C】本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体または阻害性受容体に対する結合部位の数を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIACを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM3(203)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)が1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)がもう1つのIgG重鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図13D】本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。提供される例示的実施形態は、活性化受容体または阻害性受容体に対する結合部位の数を変えることによってエフェクター細胞の活性化を調節することができるMIACを示す。この例示的実施形態は、1つのIgG及び3つのscFvから組み立てられる。1つのABM3(203)が1つのIgG軽鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)が1つのIgG重鎖のC末端に結合し、1つのABM3(203)がもう1つのIgG軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。

【図14】図14A～図14Bは、本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。これらの例示的実施形態は、1つのIgG及び4つのscFvから組み立てられる。図14Aは、ABM2(202)がIgG分子のすべての重鎖及び軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。図14Bは、ABM3(203)がIgG分子のすべての重鎖及び軽鎖のC末端に結合している一実施形態の概略図を提供する。図14A～図14Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図15】図15A～図15Bは、本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。ABM1はscFvであり、ABM2またはABM3はそれぞれscFv及びIgGである。図15A及び図15Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図16】図16A～図16Bは、本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。ABM1、ABM2、及びABM3のそれぞれはscFvである。図16A～図16Bにおいて、ABM1は201として指定され、ABM2は202として指定され、ABM3は203として指定される。

【図17A】本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。2つのABM1(201)scFvはIgG様分子の重鎖のC末端に結合している。IgG様分子のN末端領域は、2つのABM2結合部位(202)を形成するV_H-V_L領域及び2つのABM3結合部位(203)を形成するV_H-V_L領域を含む。この実施形態では、ABM3結合部位は、IgG様分子によって形成される最もN末端のABMである。

【図17B】本明細書で提供されるMIACのさらなる例示的実施形態の概略図である。2つのABM1(201)scFvはIgG様分子の重鎖のC末端に結合している。IgG様分子のN末端領域は、2つのABM2結合部位(202)を形成するV_H-V_L領域及び2つのABM3結合部位(203)を形成するV_H-V_L領域を含む。この実施形態では、ABM2結合部位は、IgG様分子によって形成される最もN末端のABMである。

10

20

30

40

50

【図18A】本明細書で提供されるM I A Cのさらなる例示的実施形態の概略図である。2つのA B M 1 (2 0 1) s c F v は I g G 様分子の重鎖の C 末端に結合している。I g G 様分子の N 末端領域は、4つのA B M 2 結合部位 (2 0 2) を形成する V H - V L 領域を含む。

【図18B】本明細書で提供されるM I A Cのさらなる例示的実施形態の概略図である。2つのA B M 1 (2 0 1) s c F v は I g G 様分子の重鎖の C 末端に結合している。I g G 様分子の N 末端領域は、4つのA B M 3 結合部位 (2 0 3) を形成する V H - V L 領域を含む。

【図19】A B M 1 が C D 3 0 に対する2つの結合部位を有する I g G である一実施形態を示す図である。A B M 2 は C D 1 3 7 に対する刺激性結合部位を有する s c F v であり、A B M 3 は P D - 1 に対する拮抗性結合部位を有する s c F v である。A B M 2 及び3の s c F v は A B M 1 を形成する I g G の重鎖の C 末端に結合している。しかし、本開示の全体を通して記載されるように、s c F v の1つまたは複数は、重鎖の N 末端及び/または軽鎖の C 末端もしくは N 末端に結合することもできる。

【図20】2つのA B M 1 s c F v が I g G 様分子の重鎖の C 末端に結合している一実施形態を示す図である。I g G 様分子の N 末端領域は、2つのA B M 2 結合部位を形成する V H - V L 領域及び2つのA B M 3 結合部位を形成する V H - V L 領域を含む。このM I A C では、A B M 3 結合部位は、I g G 様分子によって形成される最も N 末端のA B M である。

【図21】図21A～Cは、機能的インビトロアッセイで使用するために操作され、発現され、及び精製された4つの例示的M I A C構築物 (P I D 7 、 P I D 9 2 、 P I D 1 2 8 及び P I D 1 3 0) の概略図である。P I D 7 (図21A) は、P D - 1 を認識する I g G 1 A B M 3 の重鎖 C 末端に融合した、H e r 2 腺癌抗原に特異性を有する2つのA B M 1 s c F v から構成される、二重特異性M I A Cである。P I D 9 2 (図21B) は、C D 1 3 7 に対する I g G 1 A B M 2 の重鎖 C 末端に融合した、H e r 2 に対する2つのA B M 1 s c F v から構成される、二重特異性M I A Cである。P I D 1 2 8 (図21C) は、C D 3 に対する I g G 1 A B M 2 の重鎖 C 末端に融合した、H e r 2 を認識する2つのA B M 1 s c F v から構成される二重特異性M I A Cである。P I D 1 3 0 (図21D) は、C D 3 に対する I g G 1 A B M 2 の重鎖 C 末端に融合した、H e r 2 に対する2つのA B M 1 、及び I g G の軽鎖 C 末端に融合した、P D - 1 を認識する2つのA B M 3 s c F v から構成される、三重特異性M I A Cである。これらの例示的M I A Cの配列情報を、セクション16に提供する。

【図22】例示的M I A Cタンパク質 P I D 3 (単一特異性 - C D 3) 、 P I D 1 2 8 (二重特異性 - H e r 2 / - C D 3) 及び P I D 1 3 0 (三重特異性 - H e r 2 / - C D 3 / - P D - 1) の P O I (目的のピーク) を示す3つのS E Cクロマトグラフである。

【図23】2つの例示的M I A Cタンパク質、P I D 7 (- H e r 2 / - P D - 1) 及び P I D 9 2 (- H e r 2 / - C D 1 3 7) の F o r t e B i o O c t e t (登録商標) 結合センソグラム (s e n s o g r a m s) である。これは、抗原結合活性がM I A C型式で保持されることを実証する。これらの実施例及び他の例示的M I A Cから測定した親和性を表Eに示す。

【図24】フローサイトメトリーを使用して測定した場合の。4つの異なる癌細胞株 (A 4 3 1 、 M D A - M B - 4 5 3 、 J I M T 1 、 N C I - H 4 4 1) の表面における H e r 2 腺癌抗原及び免疫阻害性リガンド P D - L 1 の発現を示す図である。

【図25】例示的な H e r 2 標的化M I A Cタンパク質の濃度依存的腫瘍細胞結合活性を示す図である。M I A Cの結合活性を、単一特異性抗 H e r 2 (ト拉斯ツズマブ、陽性対照として) 及び単一特異性抗 C D 3 (陰性対照) と比較した。

【図26】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 1 3 7 M I A C (P I D 9 2) の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養した C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞における C D 2 5 の発現レベル (フローサイトメトリーによる) を示す2つのグラ

10

20

30

40

50

フである。M I A Cの効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 抗体及び - C D 1 3 7 抗体と比較した。

【図27】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 1 3 7 M I A C (P I D 9 2)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養した (C F S E 希釈法) によって測定した場合の) C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の増殖を示す 2 つのグラフである。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 抗体及び - C D 1 3 7 抗体と比較した。

【図28】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 1 3 7 M I A C (P I D 9 2)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養したヒト一次 T 細胞の (L umine x で測定した場合の) I F N - 及び T N F - サイトカイン誘導を示す 2 つのグラフである。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 抗体及び - C D 1 3 7 抗体と比較した。

【図29】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 3 M I A C (P I D 1 2 8)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養したヒト一次 T 細胞における、フローサイトメトリーで測定した場合の増殖 (図 29 A) および C D 2 5 発現の誘導 (図 29 B) を示す。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 及び - C D 3 と比較した。

【図30】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 3 M I A C (P I D 1 2 8)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養したヒト一次 T 細胞の (L umine x で測定した場合の) I F N - 及び T N F - サイトカイン誘導を示す 2 つのグラフである。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 及び - C D 3 と比較した。

【図31】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 3 M I A C (P I D 1 2 8)に曝露したヒト一次 T 細胞と H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞の共培養における (L umine x で測定した場合の) グランザイム B のレベルを示すグラフである。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 及び - C D 3 と比較した。

【図32】漸増濃度の例示的な三重特異性 - H e r 2 / - C D 3 / - P D - 1 M I A C (P I D 1 3 0)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養したヒト一次 T 細胞におけるフローサイトメトリーで測定した場合の増殖 (図 32 A) および C D 2 5 発現の誘導 (図 32 B) を示す図である。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 、 - C D 3 及び - P D - 1 と比較した。

【図33】漸増濃度の例示的な三重特異性 - H e r 2 / - C D 3 / - P D - 1 M I A C (P I D 1 3 0)の存在下で H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞と共に培養したヒト一次 T 細胞の (L umine x で測定した場合の) I F N - 及び T N F - サイトカイン誘導を示す 2 つのグラフである。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 、 - C D 3 及び - P D - 1 と比較した。

【図34】漸増濃度の例示的な三重特異性 - H e r 2 / - C D 3 / - P D - 1 M I A C (P I D 1 3 0)に曝露したヒト一次 T 細胞と H e r 2 + J I M T 1 腫瘍細胞の共培養における (L umine x で測定した場合の) グランザイム B のレベルを示す図である。M I A C の効果を同等濃度の混合した单一特異性 - H e r 2 、 - C D 3 及び - P D - 1 と比較した。

【図35】インビトロでの細胞の細胞傷害性アッセイの結果を示すグラフである。 C D 3 + T 細胞を、漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 3 M I A C (P I D 1 2 8)の存在下で H e r 2 + B T 4 7 4 ヒト癌細胞と共に培養した。M I A C の効果を同等濃度の混合した - H e r 2 及び - C D 3 単一特異性抗体と比較した。溶解した細胞から放出される乳酸脱水素酵素を測定するための C y t o T o x 9 6 (登録商標) キット (Promega) を使用して、腫瘍細胞の T 細胞による死滅をアッセイした。

【図36】漸増濃度の例示的な二重特異性 - H e r 2 / - C D 3 M I A C (P I D 1 2 8)に曝露した C D 3 + T 細胞 / B T 4 7 4 腫瘍細胞の共培養における (L umine x で測定した場合の) I F N - 及び グランザイム B の誘導を示す 2 つのグラフである

10

20

30

40

50

。M I A C の効果を同等濃度の混合した - H e r 2 及び - C D 3 単一特異性抗体と比較した。

【発明を実施するための形態】

【0058】

1. 定義

別段定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語、表記及び他の科学専門用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解される意味を有することが意図される。ある場合には、通常理解される意味を有する用語は、明確にするために及び／または容易に参照するために本明細書で定義され、本明細書におけるそのような定義の包含は、必ずしも当技術分野で一般に理解されるものと比較して相違を表すと解釈されるべきでない。本明細書で記載されるまたは言及される技法及び手順は、一般に十分理解されており、従来の方法論、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載されている、広範に利用されている分子クローニングの方法論などを使用して、当業者によって通常用いられる。必要に応じて、市販のキット及び試薬の使用を含む手順は、特記しない限り、一般に、製造者が規定したプロトコール及び／またはパラメーターに従って行われる。

10

【0059】

本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈において別段示さない限り、複数の指示物を含む。

20

【0060】

「約」という用語は、示される値及びその値より上または下の範囲を示し且つ包含する。ある種の実施形態では、「約」という用語は、指定された値 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ または $\pm 1\%$ を示す。

30

【0061】

「含む」という用語は、その最も包括的且つオーブンエンドの意味で、本明細書で使用され、請求項に記載されるいかなる追加的な要素または方法ステップも除外しない。例えば、A B M 1、A B M 2 及び A B M 3 を含む M I A C は、任意の他の A B M (例えば A B M 4) または A B M 1、A B M 2 及び／もしくは A B M 3 の複数のコピーまたはバージョンを含むこともできる。M I A C は、A B M ではない任意の他の要素を含むこともできる。同様に、2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む A B M は、3、4、5、6、7、8 個または 8 個より多い免疫グロブリンドメインを含むこともできる。

30

【0062】

「から成る」という用語は、特許請求される主題に通常付随する不純物を除いては、この移行句の直後の条項に記載されない、いかなる要素、ステップまたは成分も除外するように、本明細書で使用される。

40

【0063】

「から本質的に成る」という用語は、請求項の範囲を特定の材料またはステップ及び特許請求される発明の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさないものに限定するように本明細書で使用される。

【0064】

「抗原結合モジュール1」または「A B M 1」という用語は、癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュールを指す。

【0065】

「抗原結合モジュール2」または「A B M 2」という用語は、エフェクター免疫細胞などのエフェクター細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュールであって、エフェクター細胞の活性化受容体への A B M 2 の結合が活性化受容体を刺激する、抗原結合モジュールを指す。

【0066】

50

「抗原結合モジュール3」または「ABM3」という用語は、エフェクター免疫細胞などのエフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュールであって、エフェクター細胞の阻害性受容体へのABM3の結合が阻害性受容体に拮抗する、抗原結合モジュールを指す。

【0067】

「抗原結合モジュール4」または「ABM4」という用語は、エフェクター細胞のFc受容体に結合する抗原結合モジュールを指す。いくつかの実施形態では、ABM4はFc受容体を刺激する。

【0068】

ABM2の生物活性を指すのに使用される場合、「アゴニスト」とび「を刺激する」という用語は、ABM2がエフェクター細胞のその受容体標的に結合し、その受容体を活性化して、受容体を介してエフェクター細胞における生物学的反応を誘導することを示す。

10

【0069】

ABM3の生物活性を指すのに使用される場合、「アンタゴニスト」とび「に拮抗する」という用語は、ABM3がエフェクター細胞のその受容体標的に結合し、(例えば、その内在性リガンドによる)その受容体の活性化を遮断または阻害して、エフェクター細胞における受容体を介する生物学的反応の誘導を防止することを示す。

【0070】

「免疫グロブリン」という用語は、2対のポリペプチド鎖、すなわち1対の軽(L)鎖及び1対の重(H)鎖を一般に含む、構造的に関連したタンパク質のクラスを指す。「インタクトな免疫グロブリン」では、これらの鎖の4つすべてがジスルフィド結合によって相互につながっている。免疫グロブリンの構造は十分に特徴づけられている。例えば、Paul, Fundamental Immunology 7th ed., Ch. 5 (2013) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAを参照されたい。手短に言えば、各重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(V_H)及び重鎖定常領域(C_H)を含む。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、C_H₁、C_H₂及びC_H₃を含む。各軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(V_L)及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、典型的には1つのドメイン、短縮C_Lを含む。

20

【0071】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のタイプを説明し、その最も広い意味において本明細書で使用される。抗体としては、特に、インタクトな抗体(例えば、インタクトな免疫グロブリン)及び抗体フラグメント、例えば抗体の抗原結合性フラグメントが挙げられる。抗体は少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメインの一例は、V_H-V_L二量体によって形成される抗原結合ドメインである。抗体は、抗体が特異的に結合する抗原によって説明することができる。例えば、NKGD2抗体または抗NKGD2抗体は、受容体NKGD2に特異的に結合する抗体である。抗体は、その活性によってさらに説明することができる。例えば、アゴナイズNKGD2抗体は、受容体NKGD2に結合し、それを刺激する抗体である。

30

【0072】

V_H及びV_L領域は、より保存された領域が散在した、超可変性の領域(「超可変領域(HVR)」;「相補性決定領域」(CDR)とも呼ばれる)にさらに細分することができる。より保存された領域はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。V_H及びV_Lのそれぞれは、一般に3つのCDR及び4つのFRを含み、これらは以下の順序(N末端からC末端に向かって)で配置される: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDRは抗原結合に関与し、抗原特異性及び結合親和性を抗体に与える。全体が参照により組み込まれる、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991) Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照されたい。

40

50

【0073】

脊椎動物種由来の軽鎖は、定常ドメインの配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り当てることができる。

【0074】

脊椎動物種由来の重鎖は、5つ異なるクラス（またはアイソタイプ）、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMのうちの1つに割り当てることができる。これらのクラスは、それぞれ α 、 β 、 γ 及び μ とも呼ばれる。IgG及びIgAのクラスは、配列及び機能の違いに基づいて、さらにサブクラスに分けられる。ヒトは、以下のサブクラス、すなわちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。

10

【0075】

CDRのアミノ酸配列境界は、上掲のKabat et al.（「Kabat」付番方式）；Al-Lazikani et al.，1997，J. Mol. Biol.，273：927-948（「Chothia」付番方式）；MacCaillum et al.，1996，J. Mol. Biol. 262：732-745（「Contact」付番方式）；Lefranc et al.，Dev. Comp. Immunol.，2003，27：55-77（「IMGT」付番方式）；及びHonegger and Pluckthun，J. Mol. Biol.，2001，309：657-70（「AHO」付番方式）（これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる）によって記載されているものを含めた、いくつかの既知の付番方式のうちのいずれかを使用して、当業者が決定することができる。

20

【0076】

表1は、Kabat及びChothiaのスキームで特定した場合の、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3の位置を提供する。CDR-H1については、KabatとChothiaの付番方式の両方を使用して残基の付番を提供する。

20

【0077】

別段の指定がない限り、本明細書で特定のCDRの特定に使用される付番方式はKabat/Chothia付番方式である。これら2つの付番方式によってもたらされる残基が異なる場合、付番方式はKabatまたはChothiaのいずれかとして指定される。

30

【0078】

（表1）Kabat及びChothiaの付番方式による、CDR中の残基

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (Kabat付番方式)	H31-H35B	H26-H32またはH34*
H1 (Chothia付番方式)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

40

* Kabat付番規則を使用して付番した場合、CDR-H1のC末端は、CDRの長さに応じて、H32とH34の間で変動する。

【0079】

「EU付番方式」は、一般に、（例えば、Kabat et al.，supraで報告されるように）抗体重鎖定常領域または抗体軽鎖定常領域中の残基を指す場合に使用される。別段の記載がない限り、EU付番方式が本明細書に記載の抗体重鎖定常領域及び軽鎖定常領域中の残基を指すのに使用される。

【0080】

50

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、例えば、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントとしては、例えば、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFv(scFv)フラグメント、scFv-Fcフラグメント及び単ードメイン抗体が挙げられる。

【0081】

「Fv」フラグメントは、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合的に連結した二量体を含む。

【0082】

「Fab」フラグメントは、Fvフラグメントの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1定常ドメイン(C_{H1})を含む。Fabフラグメントは、例えば、組換えで、または全長抗体のパパイン消化によって、生成することができる。

10

【0083】

「F(ab')₂」フラグメントは、ヒンジ領域の近くでジスルフィド結合によって連結した2つのFabフラグメントを含む。F(ab')₂フラグメントは、例えば、組換えで、またはFc領域の大部分を除去するがヒンジ領域部分をインタクトなまま残す、インタクトな抗体のペプシン消化によって、生成することができる。-メルカプトエタノールなどの還元剤で処理することによって、F(ab')₂フラグメントを(2つのF(ab')分子に)分離することができる。

20

【0084】

「単鎖Fv」または「scFv」または「scFv」フラグメントは、単一のポリペプチド鎖中にV_Hドメイン及びV_Lドメインを含む。V_H及びV_Lは、一般に、ペプチドリソナーによって連結される。全体が参照により組み込まれる、Pluckthun A. (1994). Antibodies from Escherichia coli. In Rosenberg M. & Moore G. P. (Eds.), The Pharmacology of Monoclonal Antibodies vol. 1 13 (pp. 269-315). Springer-Verlag, New Yorkを参照されたい。いくつかの実施形態では、リンカーは単一アミノ酸でもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは化学結合でもよい。「scFv-Fc」フラグメントは、Fcドメインに結合したscFvを含む。例えば、FcドメインはscFvのC末端に結合していてもよい。Fcドメインは、scFv中の可変ドメインの配向(すなわち、V_H-V_LまたはV_L-V_H)に応じて、V_Hの次にきてもよいし、V_Lの次にきてもよい。Fcドメインは、当技術分野で既知のまたは本明細書に記載の任意の適切なFcドメインでもよい。ある場合には、FcドメインはIgG1のFcドメインである。

30

【0085】

「単ードメイン抗体」は、単一の単量体免疫グロブリン可変ドメインを含む抗体フラグメントである。全体が参照により組み込まれる、Holte et al., Trends in Biotechnol., 2003, 21: 484-490を参照されたい。単ードメイン抗体は、単一の重鎖または単一の軽鎖のいずれかを含むことができる。単一軽鎖抗体の例は、Masat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 893-896に提供される。.

40

【0086】

「二重可変ドメイン免疫グロブリン」または「DVD-Ig(商標)」という用語は、例えば、Di Giannino et al., Methods Mol. Biol., 2012, 899: 145-156ならびに米国特許第7,612,181号; 第8,258,268号; 第8,586,714号; 第8,716,450号; 第8,722,855号; 第8,735,546号; 及び第8,822,645号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されるような、多価及び多特異性の結合タンパク質を指す。

50

【0087】

「重鎖抗体」という用語は、少なくとも2つの重鎖を含み、軽鎖を欠く抗体を指す。Harmesen et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 13-22, 2007; 及び Hamers-Casterman et al., *Nature*, 1993, 363: 446-448 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる) を参照されたい。

【0088】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団由来の抗体を指す。実質的に均一な抗体の集団は、モノクローナル抗体の產生の間に通常生じる変異体を除いて、実質的に同様であり且つ同じエピトープ(複数可)と結合する抗体を含む。そのような変異体は、一般にほんの少量でしか存在しない。モノクローナル抗体は、典型的には、複数の抗体からの単一の抗体の選択を含む方法によって得られる。例えば、選択方法は、複数のクローン、例えば、酵母クローン、ファージクローン、細菌クローン、哺乳動物細胞クローン、ハイブリドーマクローンまたは他の組換えDNAクローンのプールからのユニークなクローンの選択でもよい。例えば、標的への親和性を向上させる(「親和性成熟」)ため、抗体をヒト化するため、細胞培養でその產生を向上させるため、及び/または対象におけるその免疫原性を低減させるために、選択した抗体をさらに変化させることができる。

10

【0089】

「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来するが、重鎖及び/または軽鎖の残部が異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

20

【0090】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、一般に、1つまたは複数のCDR由来の残基が非ヒト抗体(ドナー抗体)の1つまたは複数のCDR由来の残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性または生物学的效果を有する、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリまたは非ヒト靈長類抗体などの任意の適切な非ヒト抗体でもよい。場合によっては、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体由来の対応するフレームワーク領域残基に置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むこともできる。このような改変は、抗体機能をさらに改良するために行うことができる。さらなる詳細については、Jones et al., *Nature*, 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332: 323-329; 及び Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2: 593-596 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる) を参照されたい。

30

【0091】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって產生された、またはヒト抗体レパートリーもしくはヒト抗体をコードする配列(例えば、ヒト供給源から得られるもしくは新規に設計される)を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のものと一致するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体は、ヒト化抗体を特に除外する。

40

【0092】

「代替足場」は、抗体のものと類似している特異性及び親和性を有する分子を生成するために1つまたは複数の領域が多様化され得る分子を指す。例示的代替足場としては、フィブロネクチン(例えば、*Adnectin*(商標))、-サンドイッチ(例えば、iMab)、リポカリン(例えば、*Anticalin*(登録商標))、EETI-II/AGRIP、BPTI/LACI-D1/ITI-D2(例えば、クニッツドメイン)、チオレドキシンペプチドアプタマー、プロテインA(例えば、アフィボディ)、アンキリンリピート(例えば、DARPin)、ガンマ-B-クリスタリン/ユビキチン(例えば、アフィリン)、CTL₃(例えば、テトラネクチン)及び(LDLR-Aモジュール)

50

(例えば、アビマー) に由来するものが挙げられる。代替足場に関するさらなる情報は、B i n z e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . , 2 0 0 5 2 3 : 1 2 5 7 - 1 2 6 8 ; 及び S k e r r a , C u r r e n t O p i n . i n B i o t e c h . , 2 0 0 7 1 8 : 2 9 5 - 3 0 4 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる) に提供されている。

【 0 0 9 3 】

「作動可能に連結される」という用語は、M I A C 部分 (例えば、1 つもしくは複数の A B M 及び / または F c) が、その意図された目的のために協力して機能するように配置されることを示す。

【 0 0 9 4 】

「単離されたM I A C 」は、その生成環境の成分から分離及び / または回収された M I A C である。環境の成分としては、細胞、培地及び他のタンパク質性または非タンパク質性の物質、例えば核酸を挙げることができる。いくつかの実施形態では、単離された M I A C は、例えばスピニングカップシーケネーター (s p i n n i n g c u p s e q u e n a t o r) の使用によって N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 1 5 残基を得るのに十分な程度まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された M I A C は、クマシーブルーまたは銀染色によって検出する、還元または非還元条件下でのゲル電気泳動 (例えば、S D S - P A G E) で分析した場合に、均一まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された M I A C は、M I A C を生成する組換え細胞内においてインサイチュで M I A C を含む。いくつかの実施形態では、単離された M I A C は少なくとも 1 つの精製ステップによって調製される。

10

20

30

40

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態では、単離された M I A C は、少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % または 9 9 重量 % まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された M I A C は、少なくとも 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % から 1 0 0 重量 % の M I A C を含む溶液として提供され、残りの重量は溶媒に溶解している他の溶質の重量を含む。

【 0 0 9 6 】

「親和性」は、分子 (例えば、M I A C の抗原結合モジュール) の単一結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) の間の非共有結合的相互作用の総計の強度を指す。別段指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー (例えば、抗原結合モジュールと抗原) の間の 1 : 1 相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般に、解離定数 (K D) によって表すことができる。親和性は、当技術分野で既知の方法によって、例えば、表面プラスモン共鳴 (S P R) 技術 (例えば、B i a c o r e (登録商標) 装置) またはバイオレイヤー干渉法 (例えば、F o r t e B i o (登録商標) 装置) を使用することによって、測定することができる。

30

【 0 0 9 7 】

標的分子への A B M の結合に関して、特定の抗原 (例えば、ポリペプチド標的) または特定の抗原上のエピトープに「特異的結合すること」、「特異的に結合する」、「特異的である」、「選択的に結合する」及び「選択的である」という用語は非特異的または非選択的な相互作用と測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、対照分子の結合と比較して分子の結合を決定することによって、測定することができる。特異的結合は、標的と類似している対照分子、例えば、過剰量の非標識標的との競合によっても決定することができる。この場合、プローブに対する標識された標的の結合が過剰な非標識標的によって競合的に阻害される場合に、特異的結合が示される。

【 0 0 9 8 】

本明細書で使用する場合、「 k d 」 (秒 ⁻¹) という用語は、特定の A B M - 抗原相互作用の解離速度定数を指す。この値は k _{o f f} 値ともいわれる。

【 0 0 9 9 】

本明細書で使用する場合、「 k a 」 (M ⁻¹ × 秒 ⁻¹) という用語は、特定の A B M -

50

抗原相互作用の会合速度定数を指す。この値は k_{on} 値ともいわれる。

【0100】

本明細書で使用する場合、「 K_D 」(M)という用語は、特定のABM-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。 $K_D = k_d / k_a$ 。

【0101】

本明細書で使用する場合、「 K_A 」(M⁻¹)という用語は、特定のABM-抗原相互作用の会合平衡定数を指す。 $K_A = k_a / k_d$ 。

【0102】

「親和性成熟」ABMは、変化(複数可)を有さない親ABMと比較してABMのその抗原に対する親和性の向上をもたらす、(例えば、1つまたは複数のCDRまたはFRにおける)1つまたは複数の変化を有するABMである。一実施形態では、親和性成熟ABMは、標的抗原に対してナノモルまたはピコモルの親和性を有する。親和性成熟ABMは、当技術分野で既知の様々な方法を使用して生成することができる。例えば、Marks et al. (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783(その全体が参照により組み込まれる))は、V_H及びV_Lドメインのシャフリングによる親和性成熟を記載している。CDR及び/またはフレームワーク残基のランダム変異誘発は、例えば、Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1994, 91: 3809-3813); Schier et al., Gene, 1995, 169: 147-155; Yelton et al., J. Immunol., 1995, 155: 1994-2004; Jackson et al., J. Immunol., 1995, 154: 3310-3319; 及びHawkins et al., J. Mol. Biol., 1992, 226: 889-896(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)によって記載されている。

10

20

30

40

50

【0103】

2つ以上のABMに関して本明細書で使用する場合、「と競合する」または「と交差競合する」は、2つ以上のABMが抗原への結合について競合することを示す。1つの例示的アッセイでは、抗原をプレートにコーティングし、第1のABMと結合させ、その後、標識された第2のABMを加える。第1のABMの存在が第2のABMの結合を低減させるならば、これらのABMは競合する。「と競合する」という用語は、1つのABMが別のABMの結合を低減させるが、これらのABMが逆の順序で加えられたときに競合が観察されない場合のABMの組み合わせも含む。しかし、いくつかの実施形態では、第1及び第2のABMは、それらが加えられる順序にかかわらず互いの結合を阻害する。いくつかの実施形態では、1つのABMは別のABMのその抗原への結合を、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%低減させる。

【0104】

「エピトープ」という用語は、ABMに特異的結合ができる、抗原の一部を意味する。エピトープは、しばしば、表面接触可能なアミノ酸残基及び/または糖側鎖から成り、特定の三次元構造特性及び特定の荷電特性を有し得る。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、前者への結合が変性溶媒の存在下で失われるが後者では失われないという点において区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基及び結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基を含むことができる。ABMが結合するエピトープは、エピトープの決定に関する既知の技法、例えば、様々な点変異を有する抗原変異体へのABMの結合を試験することを使用して決定することができる。

【0105】

ABMを説明するのに使用される場合、「結合価」という用語は、ABM中の抗原認識(結合)部位の数を指す。各抗原認識部位は、1つの抗原または抗原のエピトープを特異的に認識し、したがってそれと結合することができる。ABMが1つを超える抗原認識部位を含む場合(例えば、ABMがその可変領域に2つの抗原認識部位を有するIgGである場合)、各抗原認識部位は同じまたは異なる抗原を特異的に認識することができる。し

かし、いくつかの実施形態では、ABMの各抗原認識部位は同じ抗原を特異的に認識する。

【0106】

ポリペプチド配列と参照配列の間の「同一性」パーセントは、配列を整列させ、必要ならば、最大パーセントの配列同一性を得るためにギャップを導入した後の、ポリペプチド配列中の、参照配列中のアミノ酸残基と同一であるアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列化は、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN (DNASTAR)、CLUSTALWまたはCLUSTAL OMEGAソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当技術分野の範囲内の様々な方法で達成することができる。いくつかの実施形態では、CLUSTAL OMEGAソフトウェアを使用して整列化を行う。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大限の整列化を達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含めた、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。

10

【0107】

「保存的置換」または「保存的アミノ酸置換」は、1つまたは複数の化学的または機能的に類似したアミノ酸との1つまたは複数のアミノ酸の置換を指す。類似したアミノ酸を示す保存的置換表は当技術分野で周知である。そのような置換を有するポリペプチド配列は、「保存的に改変された変異体」として知られている。そのような保存的に改変された変異体は、多形変異体、種間相同体及びアレルに追加されるものであり、これらを除外するものではない。例として、表2～4に示されるアミノ酸の群は、互いに保存的置換であるとみなされる。

20

【0108】

(表2)ある種の実施形態における、互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸の選択群。

酸性残基	D及びE
塩基性残基	K, R及びH
親水性非荷電残基	S, T, N, 及びQ
脂肪族非荷電残基	G, A, V, L, 及びI
非極性非荷電残基	C, M, 及びP
芳香族残基	F, Y, 及びW

30

【0109】

(表3)ある種の実施形態における、互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸のさらなる選択群。

群1	A, S, 及びT
群2	D及びE
群3	N及びQ
群4	R及びK
群5	I, L, 及びM
群6	F, Y, 及びW

40

【0110】

(表4)ある種の実施形態における、互いに保存的置換であるとみなされるアミノ酸のさらなる選択群。

群 A	A 及び G
群 B	D 及び E
群 C	N 及び Q
群 D	R, K, 及び H
群 E	I, L, M, V
群 F	F, Y, 及び W
群 G	S 及び T
群 H	C 及び M

【0111】

さらなる保存的置換は、例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties 2nd ed. (1993) W. H. Freeman & Co., New York, NYに見出すことができる。親ABM中のアミノ酸残基の1つまたは複数の保存的置換を行うことによって作製されるABMは、「保存的に改変された変異体」といわれる。

10

【0112】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在する20種の通常のアミノ酸を指す。天然に存在するアミノ酸としては、アラニン(Ala; A)、アルギニン(Arg; R)、アスパラギン(Asn; N)、アスパラギン酸(Asp; D)、システイン(Cys; C)；グルタミン酸(Glu; E)、グルタミン(Gln; Q)、グリシン(Gly; G)；ヒスチジン(His; H)、イソロイシン(Ile; I)、ロイシン(Leu; L)、リジン(Lys; K)、メチオニン(Met; M)、フェニルアラニン(Phe; F)、プロリジン(Pro; P)、セリン(Ser; S)、スレオニン(Thr; T)、トリプトファン(Trp; W)、チロシン(Tyr; Y)及びバリン(Val; V)が挙げられる。いくつかの実施形態では、「アミノ酸」という用語は、非天然アミノ酸も含む。任意の適切な非天然アミノ酸を使用することができる。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、M I A Cへの剤のコンジュゲーションについての反応性部分を含む。

20

【0113】

ある種の実施形態では、任意の疾患または障害を「治療すること」または任意の疾患または障害の「治療」は、対象に存在する疾患または障害を好転させることを指す。別の実施形態では、「治療すること」または「治療」は、対象が識別することができない可能性がある少なくとも1つの身体的なパラメーターを好転させることを含む。さらに別の実施形態では、「治療すること」または「治療」は、身体的に(例えば、識別可能な症状の安定化)または生理的に(例えば、身体的なパラメーターの安定化)または両方で疾患または障害を調節することを含む。さらに別の実施形態では、「治療すること」または「治療」は、疾患または障害の発症を遅延させるまたは予防することを含む。

30

【0114】

本明細書で使用する場合、「治療有効量」または「有効量」という用語は、対象に投与される場合に、疾患または障害を治療するのに有効なM I A Cの量を指す。

【0115】

本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、哺乳類対象を意味する。例示的対象としては、限定されないが、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ラクダ、ヤギ及びヒツジが挙げられる。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、本明細書で提供されるM I A Cで治療することができる疾患または状態を有するか、有することが疑われる。いくつかの態様では、疾患または状態は癌である。いくつかの実施形態では、対象は本明細書で提供されるM I A Cで治療することができる癌を有するヒトである。いくつかの実施形態では、対象は本明細書で提供されるM I A Cで治療することができる癌を有することが疑われるヒトである。

40

【0116】

2. 多特異性免疫調節抗原結合構築物(M I A C)

2. 1. 癌細胞を標的にし、同時に同じエフェクター細胞の活性化受容体及び阻害性受

50

容体を調節する、多特異性免疫調節抗原結合構築物（M I A C）

M I A C のコンセプトの一態様を図 1 に図示する。これは、3 つの A B M を含む、3 つの A B M から本質的に成る、または 3 つの A B M から成る M I A C を示す。A B M 1 は癌細胞特異的抗原結合部位を含む。A B M 2 はエフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対してアゴニスト活性を有する結合部位を含む。A B M 3 はエフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対してアンタゴニスト活性を有する結合部位を含む。

【 0 1 1 7 】

図 1 に提供する例示的実施形態は、M I A C が癌細胞を標的にし、同時に同じエフェクター細胞の活性化受容体及び阻害性受容体を調節する、M I A C のコンセプトを提供する。本開示の他の個所でより詳細に記載されているように A B M を形成する分子のタイプを選択することによって、または M I A C に含まれる各 A B M の数を変えることによって、M I A C の各成分に対する結合部位の数を変えることができる。例えば、A B M として単一の I g G を選択することは、標的化抗原に対する 2 つの結合部位をもたらす。その一方で、A B M として単一の s c F v を選択することは標的化抗原に対する単一の結合部位をもたらす。

10

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される M I A C は、以下を含む、以下から本質的に成る、または以下から成る：(a) 癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール 1 (A B M 1) ；(b) エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 2 (A B M 2) ；及び(c) エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール 3 (A B M 3) 。

20

【 0 1 1 9 】

エフェクター細胞の活性化受容体への A B M 2 の結合は活性化受容体を刺激し、それによって、活性化受容体を介する活性化シグナルの伝達を促進することによって、エフェクター細胞の活性化を促進する。いくつかの実施形態では、活性化受容体を介する活性化シグナルの伝達は、増殖、癌細胞に対する細胞傷害活性、サイトカイン（例えば、I L - 2 及びインターフェロンガンマ）の分泌、L A M P - 1 のアップレギュレーション、C D 1 6 のダウンレギュレーション、C D 6 9 のアップレギュレーション及びK L R G 1 のアップレギュレーションから選択されるエフェクター細胞からの応答を誘導する。

30

【 0 1 2 0 】

エフェクター細胞の阻害性受容体への A B M 3 の結合は阻害性受容体に拮抗し、それによって、阻害性受容体を介する阻害性シグナリングの伝達を遮断することによって、エフェクター細胞の活性化を促進する。いくつかの実施形態では、阻害性受容体を介する阻害性シグナリングの伝達を遮断することは、増殖、癌細胞に対する細胞傷害活性、サイトカイン（例えば、I L - 2 及びインターフェロンガンマ）の分泌、L A M P - 1 のアップレギュレーション、C D 1 6 のダウンレギュレーション、C D 6 9 のアップレギュレーション及びK L R G 1 のアップレギュレーションから選択されるエフェクター細胞からの応答を誘導する。

40

【 0 1 2 1 】

2 . 2 . 癌細胞を標的にし、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体を刺激する、多特異性免疫調節抗原結合構築物（M I A C）

M I A C のコンセプトの別の態様を図 9 に図示する。これは、2 つの A B M を含む、2 つの A B M から本質的に成る、または 2 つの A B M から成る M I A C を示す。A B M 1 は癌細胞特異的抗原結合部位を含む。A B M 2 はエフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対してアゴニスト活性を有する結合部位を含む。

【 0 1 2 2 】

図 9 に提供する例示的実施形態は、M I A C が癌細胞を標的にし、エフェクター細胞の活性化受容体を調節する、M I A C のコンセプトを提供する。本開示の他の個所でより詳細に記載されているように、A B M を形成する分子のタイプを選択することによって、ま

50

たはM I A Cに含まれる各A B Mの数を変えることによって、M I A Cの各成分に対する結合部位の数を変えることができる。例えば、A B Mとして単一のI g Gを選択することは、標的化抗原に対する2つの結合部位をもたらす。その一方で、A B Mとして単一のs c F vを選択することは標的化抗原に対する単一の結合部位をもたらす。

【0123】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるM I A Cは、以下を含む、以下から本質的に成る、または以下から成る：(a)癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール1(A B M 1)；及び(b)エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール2(A B M 2)。本態様では、M I A CはA B M 3を含まない。

10

【0124】

エフェクター細胞の活性化受容体へのA B M 2の結合は活性化受容体を刺激し、それによって、活性化受容体を介する活性化シグナルの伝達を促進することによって、エフェクター細胞の活性化を促進する。いくつかの実施形態では、活性化受容体を介する活性化シグナルの伝達は、増殖、癌細胞に対する細胞傷害活性、サイトカイン(例えば、I L - 2及びインターフェロンガンマ)の分泌、L A M P - 1のアップレギュレーション、C D 1 6のダウンレギュレーション、C D 6 9のアップレギュレーション及びK L R G 1のアップレギュレーションから選択されるエフェクター細胞からの応答を誘導する。

【0125】

いくつかの実施形態では、M I A Cが、A B M 1及びA B M 2を含むがA B M 3を含まない場合は、A B M 2は、特に、エフェクター細胞の活性化に関与するある種の標準的な受容体に結合しない。いくつかの実施形態では、A B M 2はC D 3と結合せず、且つC D 2 8と結合しない。いくつかの実施形態では、A B M 2はC D 3と結合しない。いくつかの実施形態では、A B M 2はC D 2 8と結合しない。

20

【0126】

2.3.癌細胞を標的にし、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に拮抗する、多特異性免疫調節抗原結合構築物(M I A C)

M I A Cのコンセプトの別の態様を図10に図示する。これは、2つのA B Mを含む、2つのA B Mから本質的に成る、または2つのA B Mから成るM I A Cを示す。A B M 1は癌細胞特異的抗原結合部位を含む。A B M 3はエフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対してアンタゴニスト活性を有する結合部位を含む。

30

【0127】

図10に提供する例示的実施形態は、M I A Cが癌細胞を標的にし、エフェクター細胞の阻害性受容体を調節する、M I A Cのコンセプトを提供する。本開示の他の個所でより詳細に記載されているように、A B Mを形成する分子のタイプを選択することによって、またはM I A Cに含まれる各A B Mの数を変えることによって、M I A Cの各成分に対する結合部位の数を変えることができる。例えば、A B Mとして単一のI g Gを選択することは、標的化抗原に対する2つの結合部位をもたらす。その一方で、A B Mとして単一のs c F vを選択することは、標的化抗原に対する単一の結合部位をもたらす。

【0128】

いくつかの態様では、本明細書で提供されるM I A Cは、以下を含む、以下から本質的に成る、または以下から成る：(a)癌細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗原結合モジュール1(A B M 1)；及び(b)エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する抗原結合モジュール3(A B M 3)。本態様では、M I A CはA B M 2を含まない。

40

【0129】

エフェクター細胞の阻害性受容体へのA B M 3の結合は阻害性受容体に拮抗し、それによって、阻害性受容体を介する阻害性シグナリングの伝達を遮断することによって、エフェクター細胞の活性化を促進する。いくつかの実施形態では、阻害性受容体を介する阻害性シグナリングの伝達を遮断することは、増殖、癌細胞に対する細胞傷害活性、サイトカ

50

イン（例えば、IL-2 及びインターフェロンガンマ）の分泌、LAMP-1 のアップレギュレーション、CD16 のダウンレギュレーション、CD69 のアップレギュレーション及び KLRG1 のアップレギュレーションから選択されるエフェクター細胞からの応答を誘導する。

【0130】

2.4. 多特異性免疫調節抗原結合構築物 (MIAc) は、Fcなどの1つまたは複数の足場を含むことができる。

MIAc は、Fcなどの足場を含むことができる。そのような足場は、各ABMを互いに作動可能に連結するのに使用することができる。ある種の態様では、1つまたは複数のABMが、Fcなどの足場を含むことができる。

10

【0131】

「Fc」または「Fcドメイン」または「Fc領域」という用語は、本明細書で、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するのに使用される。この用語は、天然配列のFc領域及び変異型Fc領域を含む。別段の指定がない限り、本明細書では、Fc領域または定常領域のアミノ酸残基の付番は、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EUインデックスとも呼ばれるEU付番システムに従う。本明細書で使用する場合、二量体Fcの「Fcポリペプチド」は、二量体Fcドメインを形成する2つのポリペプチドのうちの1つ、すなわち、安定な自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチドを指す。例えば、二量体IgG FcのFcポリペプチドは、IgG CH2 及び IgG CH3 定常ドメイン配列を含む。

20

【0132】

Fcドメインは、CH3ドメインまたはCH3ドメイン及びCH2ドメインのいずれかを含む。CH3ドメインは2つのCH3配列を含み、二量体Fcの2つのFcポリペプチドのそれぞれからのものである。CH2ドメインは2つのCH2配列を含み、二量体Fc 2つのFcポリペプチドのそれぞれからのものである。

30

【0133】

いくつかの態様では、Fcは、少なくとも1つのまたは2つのCH3配列を含む。いくつかの態様では、Fcは、1つまたは複数のリンカーを伴ってまたは伴わずに、第1の抗原結合モジュール及び/または第2の抗原結合モジュールに結合している。いくつかの態様では、FcはヒトFcである。いくつかの態様では、FcはヒトIgGまたはIgG1 Fcである。いくつかの態様では、Fcはヘテロ二量体Fcである。いくつかの態様では、Fcは、少なくとも1つのまたは2つのCH2配列を含む。

【0134】

いくつかの態様では、Fcは、CH3配列の少なくとも1つに1つまたは複数の改変を含む。いくつかの態様では、Fcは、CH2配列の少なくとも1つに1つまたは複数の改変を含む。いくつかの態様では、Fcは単一のポリペプチドである。いくつかの態様では、Fcは複数のペプチド、例えば、2つのポリペプチドである。例えばCH2ドメイン及び/またはCH3ドメイン中に1つまたは複数の改変を含むように、Fcを改変することができる。そのような改変は、Fcの機能及び結合特性、例えばFc受容体(FcR)結合に影響を与える。FcRへの結合を遮断するようにFcを改変することができ、例えば、FcR結合を遮断するための変異、例えばアミノ酸N297での変異を含むようにFcを改変することができる。N結合型グリコシル化を防止する及び/またはADCを低減するようにFcを改変することができる。以下の実施例セクションに例を示す。

40

【0135】

3. 抗原結合モジュール(ABM)

MIAcのABMは、任意の適切な抗原結合分子を含むことができる。いくつかの実施

50

形態では、ABMは、免疫グロブリン、抗体、抗体フラグメント及び／または代替足場から選択される分子を含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、ABM1は抗体またはその抗原結合性フラグメントである。いくつかの実施形態では、ABM1は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE及びIgMまたはこれらのフラグメントから選択される免疫グロブリン分子を含む。いくつかの実施形態では、ABM1は、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFvフラグメント、scFv-Fcフラグメント及び単一ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、ABM1はDVD-Ig(商標)である。いくつかの実施形態では、ABM1は重鎖抗体である。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、ABM1は、Adnectin(商標)、iMab、Anticalin(登録商標)、EETI-II/AGRP、クニッツドメイン、チオレドキシンペプチドアプタマー、アフィボディ、DARPin、アフィリン、テトラネクチン及びアビマーから選択される分子を含む代替足場を含む。

【0138】

いくつかの実施形態では、ABM2は抗体である。いくつかの実施形態では、ABM2は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE及びIgMまたはこれらのフラグメントから選択される免疫グロブリン分子を含む。いくつかの実施形態では、ABM2は、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFvフラグメント、scFv-Fcフラグメント及び単一ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、ABM2はDVD-Ig(商標)である。いくつかの実施形態では、ABM2は重鎖抗体である。

20

【0139】

いくつかの実施形態では、ABM2は、Adnectin(商標)、iMab、Anticalin(登録商標)、EETI-II/AGRP、クニッツドメイン、チオレドキシンペプチドアプタマー、アフィボディ、DARPin、アフィリン、テトラネクチン及びアビマーから選択される分子を含む代替足場を含む。

30

【0140】

いくつかの実施形態では、ABM3は抗体である。いくつかの実施形態では、ABM3は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE及びIgMまたはこれらのフラグメントから選択される免疫グロブリン分子を含む。いくつかの実施形態では、ABM3は、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFvフラグメント、scFv-Fcフラグメント及び単一ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、ABM3はDVD-Ig(商標)である。いくつかの実施形態では、ABM3は重鎖抗体である。

40

【0141】

いくつかの実施形態では、ABM3は、Adnectin(商標)、iMab、Anticalin(登録商標)、EETI-II/AGRP、クニッツドメイン、チオレドキシンペプチドアプタマー、アフィボディ、DARPin、アフィリン、テトラネクチン及びアビマーから選択される分子を含む代替足場を含む。

【0142】

いくつかの実施形態では、ABM4は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE及びIgMまたはこれらのフラグメントから選択される免疫グロブリン分子を含む。いくつかの実施形態では、ABM4は、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、scFvフラグメント、scFv-Fcフラグメント及び単一ドメイン抗体

50

を含む。いくつかの実施形態では、ABM4はDVD-Ig(商標)である。いくつかの実施形態では、ABM4は重鎖抗体である。

【0143】

いくつかの実施形態では、ABM4は、Adnectin(商標)、iMab、Anticalin(登録商標)、EETI-II/AGRPs、クニッソドメイン、チオレドキシンペプチドアプタマー、アフィボディ、DARPin、アフィリン、テトラネクチン及びアビマーから選択される分子を含む代替足場を含む。

【0144】

本明細書で提供されるABMの組成物は例示であり、ABMとして機能することができる任意の適切な分子を本明細書で提供されるM1ACで使用することができる。ABMとして機能することができる分子としては、本明細書に記載のABMの結合特性及び機能的特性を有する、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質、アプタマー(ペプチド及びオリゴヌクレオチド)などが挙げられる。

10

【0145】

3.1. 結合価及び免疫グロブリン可変ドメイン

本明細書で提供されるABMを、抗原に対するその結合価の点から特徴づけることができる。ABMは任意の適切な結合価を有し得る。いくつかの実施形態では、ABMは、一価でも、二価でも、三価でも、四価でも、四価を超えてよい。ABMを形成する分子の選択を介して結合価を制御することができることを当業者は認識するであろう。例えば、scFv ABMは一般に一価であるであろうし、IgG ABMは一般に二価であるであろう。

20

【0146】

いくつかの実施形態では、ABM1は一価である。いくつかの実施形態では、ABM1は二価である。いくつかの実施形態では、ABM1は三価である。いくつかの実施形態では、ABM1は四価である。いくつかの実施形態では、ABM1は四価より大きい結合価を有する。

20

【0147】

いくつかの実施形態では、ABM2は一価である。いくつかの実施形態では、ABM2は二価である。いくつかの実施形態では、ABM2は三価である。いくつかの実施形態では、ABM2は四価である。いくつかの実施形態では、ABM2は四価より大きい結合価を有する。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、ABM3は一価である。いくつかの実施形態では、ABM3は二価である。いくつかの実施形態では、ABM3は三価である。いくつかの実施形態では、ABM3は四価である。いくつかの実施形態では、ABM3は四価より大きい結合価を有する。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、ABM4は一価である。いくつかの実施形態では、ABM4は二価である。いくつかの実施形態では、ABM4は三価である。いくつかの実施形態では、ABM4は四価である。いくつかの実施形態では、ABM4は四価より大きい結合価を有する。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、すべてのABMは一価である。例えば、いくつかの態様では、ABM1は一価であり、ABM2は一価であり、ABM3は一価である。

【0151】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのABMは二価である。例えば、いくつかの態様では、ABM1は二価であり、ABM2は二価であり、ABM3は二価である。いくつかの態様では、ABM1は二価であり、ABM2は一価であり、ABM3は一価である。いくつかの態様では、ABM1は一価であり、ABM2は二価であり、ABM3は一価である。いくつかの態様では、ABM1は一価であり、ABM2は一価であり、ABM3は一価である。

50

は二価である。

【0152】

いくつかの実施形態では、特定の数の免疫グロブリン可変ドメインの存在によって、結合価を特徴づけることができる。いくつかの実施形態では、可変ドメインは V_H ドメイン及び V_L ドメインから選択される。

【0153】

いくつかの実施形態では、ABM1は1つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM1は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM1は3つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM1は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM1は4つより多い免疫グロブリン可変ドメインを含む。

10

【0154】

いくつかの実施形態では、ABM2は1つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM2は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM2は3つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM2は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM2は4つより多い免疫グロブリン可変ドメインを含む。

20

【0155】

いくつかの実施形態では、ABM3は1つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM3は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM3は3つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM3は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ABM3は4つより多い免疫グロブリン可変ドメインを含む。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、各ABMは2つの免疫グロブリン可変ドメイン（例えば、2つの V_H ドメイン及び V_L ドメイン；2つの V_H ドメイン；または2つの V_L ドメイン）を含む。例えば、いくつかの態様では、ABM1は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM2は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM3は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのABMは4つの免疫グロブリン可変ドメイン（例えば、2つの V_H ドメイン及び2つの V_L ドメイン）を含む。例えば、いくつかの態様では、ABM1、ABM2及びABM3はそれぞれ4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、ABM1は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM2は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM3は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、ABM1は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM2は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM3は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。いくつかの態様では、ABM1は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM2は2つの免疫グロブリン可変ドメインを含み、ABM3は4つの免疫グロブリン可変ドメインを含む。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、結合価は、あるABMの結合部位と別のABMの結合部位の数の比として表すことができる。この比を変えることは、例えばエフェクター細胞の活性化度の調整において、有利であり得る。

【0159】

いくつかの実施形態では、ABM1、ABM2及びABM3の結合部位は2:1:1の比で存在する。図2A~2Dは、この比で存在する結合部位を有するM1ACの例を示す。

【0160】

いくつかの実施形態では、ABM1、ABM2及びABM3の結合部位は2:1:2の

50

比で存在する。図3A～3Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0161】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：2：1の比で存在する。図3C～3Dは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0162】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：2：2の比で存在する。図4A～4Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

10

【0163】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：2：0の比で存在する。図11A～B及び12Aは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0164】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：0：2の比で存在する。図11C～D及び12Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：3：0の比で存在する。図13A～Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

20

【0166】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：0：3の比で存在する。図13C～Dは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

30

【0167】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：4：0の比で存在する。図14Aは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0168】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は2：0：4の比で存在する。図14Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

30

【0169】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は1：3：0の比で存在する。図15Aは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0170】

いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位は1：0：3の比で存在する。図15Bは、この比で存在する結合部位を有するM I A Cの例を示す。

【0171】

A B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位に対する他の適切な比としては、1：1：1（例えば、図6）、1：2：1（例えば、図5A）、1：1：2（例えば、図5B）、2：1：2、2：2：1などが挙げられる。異なるモジュールが寄与する結合部位の比は限定的でないこと、及びM I A Cの意図された生物活性に基づいて適切な比を選択することができることを当業者は容易に認識するであろう。

40

【0172】

いくつかの実施形態では、1～10：0～10：0～10の比でそれぞれ存在するA B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位を有するM I A Cが、本明細書で提供される。特に、1～5：0～5：0～5の比でそれぞれ存在するA B M 1、A B M 2及びA B M 3の結合部位を有するM I A Cが、本明細書で提供される。例えば、いくつかの実施形態では、A B M 1、A B M 2及びA B M 3は、1：0：1、1：0：2、1：0：3、1：0：

50

4、1：0：5、1：1：0、1：1：1、1：1：2、1：1：3、1：1：4、1：
 1：5、1：2：0、1：2：1、1：2：2、1：2：3、1：2：4、1：2：5、
 1：3：0、1：3：1、1：3：2、1：3：3、1：3：4、1：3：5、1：4：
 0、1：4：1、1：4：2、1：4：3、1：4：4、1：4：5、1：5：0、1：
 5：1、1：5：2、1：5：3、1：5：4、1：5：5、2：0：1、2：0：2、
 2：0：3、2：0：4、2：0：5、2：1：0、2：1：1、2：1：2、2：1：
 3、2：1：4、2：1：5、2：2：0、2：2：1、2：2：2、2：2：3、2：
 2：4、2：2：5、2：3：0、2：3：1、2：3：2、2：3：3、2：3：4、
 2：3：5、2：4：0、2：4：1、2：4：2、2：4：3、2：4：4、2：4：
 5、2：5：0、2：5：1、2：5：2、2：5：3、2：5：4、2：5：5、3：
 0：1、3：0：2、3：0：3、3：0：4、3：0：5、3：1：0、3：1：1、
 3：1：2、3：1：3、3：1：4、3：1：5、3：2：0、3：2：1、3：2：
 2、3：2：3、3：2：4、3：2：5、3：3：0、3：3：1、3：3：2、3：
 3：3、3：3：4、3：3：5、3：4：0、3：4：1、3：4：2、3：4：3、
 3：4：4、3：4：5、3：5：0、3：5：1、3：5：2、3：5：3、3：5：
 4、3：5：5、4：0：1、4：0：2、4：0：3、4：0：4、4：0：5、4：
 1：0、4：1：1、4：1：2、4：1：3、4：1：4、4：1：5、4：2：0、
 4：2：1、4：2：2、4：2：3、4：2：4、4：2：5、4：3：0、4：3：
 1、4：3：2、4：3：3、4：3：4、4：3：5、4：4：0、4：4：1、4：
 4：2、4：4：3、4：4：4、4：4：5、4：5：0、4：5：1、4：5：2、
 4：5：3、4：5：4、4：5：5、4：0：1、5：0：2、5：0：3、5：0：
 4、5：0：5、5：1：0、5：1：1、5：1：2、5：1：3、5：1：4、5：
 1：5、5：2：0、5：2：1、5：2：2、5：2：3、5：2：4、5：2：5、
 5：3：0、5：3：1、5：3：2、5：3：3、5：3：4、5：3：5、5：4：
 0、5：4：1、5：4：2、5：4：3、5：4：4、5：4：5、5：5：0、5：
 5：1、5：5：2、5：5：3、5：5：4 または 5：5：5 の比で存在する。
 【0173】

同様に、M I A C の標的 (A B M 1)、刺激性 (A B M 2) 及びアンタゴニスト (A B M 3) 効果に合うようにするために、各モジュールの親和性を調整することもできる。

【0174】

特に、A B M 2 と A B M 3 の間の親和性の比は、エフェクター細胞の活性化度に影響を及ぼす。適切な A B M 2 : A B M 3 の親和性の比は、例えば、1 : 1 0 0 ~ 1 0 0 : 1 の範囲に及び得る。いくつかの実施形態では、A B M 2 : A B M 3 の親和性の比は、約 1 : 1 0 0、1 : 9 0、1 : 8 0、1 : 7 0、1 : 6 0、1 : 5 0、1 : 4 0、1 : 3 0、1 : 2 0、1 : 1 0、1 : 1、1 0 : 1、2 0 : 1、3 0 : 1、4 0 : 1、5 0 : 1、6 0 : 1、7 0 : 1、8 0 : 1、9 0 : 1 または 1 0 0 : 1 である。いくつかの実施形態では、A B M 2 : A B M 3 の親和性の比は、少なくとも 1 : 1 0 0、1 : 9 0、1 : 8 0、1 : 7 0、1 : 6 0、1 : 5 0、1 : 4 0、1 : 3 0 : 1、3 0 : 1、4 0 : 1、5 0 : 1、6 0 : 1、7 0 : 1、8 0 : 1、9 0 : 1 または 1 0 0 : 1 である。いくつかの実施形態では、A B M 2 : A B M 3 の親和性の比は、最大で 1 : 1 0 0、1 : 9 0、1 : 8 0、1 : 7 0、1 : 6 0、1 : 5 0、1 : 4 0、1 : 3 0、1 : 2 0、1 : 1 0、1 : 1、1 0 : 1、2 0 : 1、3 0 : 1、4 0 : 1、5 0 : 1、6 0 : 1、7 0 : 1、8 0 : 1、9 0 : 1 または 1 0 0 : 1 である。

【0175】

本明細書で提供される M I A C は、任意の適切な数の、本明細書で提供される A B M のいずれをも含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される M I A C は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個の A B M 1 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される M I A C は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個の A B M 2 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される M I A C は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個の A B M 3 を含む。いく

つかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のA B M 4を含む。

【0176】

本明細書で提供されるM I A Cは、A B Mごとに任意の適切な数の結合部位を有するA B Mを含むこともできる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cで使用されるA B M 1は、癌細胞抗原に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の結合部位を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cで使用されるA B M 2は、エフェクター細胞の活性化受容体に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の結合部位を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cで使用されるA B M 3は、エフェクター細胞の阻害性受容体に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の結合部位を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cで使用されるA B M 4は、エフェクター細胞のF c受容体に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の結合部位を含む。

10

【0177】

さらに、本明細書で提供されるM I A Cは、異なる癌細胞抗原、異なる活性化受容体及び/または異なる阻害性受容体を標的にするA B Mを含むこともできる。

【0178】

例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1種より多い癌細胞抗原を標的にするA B M 1を含む。いくつかの実施形態では、A B M 1は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる癌細胞抗原を標的にする。

20

【0179】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1つより多いA B M 1を含み、各A B M 1は異なる癌細胞抗原を標的にする。いくつかの実施形態では、異なるA B M 1が、全体として2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる癌細胞抗原を標的にする。いくつかの実施形態では、いくつかのA B M 1は同じ癌細胞抗原(複数可)を標的にし、いくつかのA B M 1は異なる癌細胞抗原を標的にするが、A B M 1は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる癌細胞抗原を全体として標的にする。

【0180】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1種より多い活性化受容体を標的にするA B M 2を含む。いくつかの実施形態では、A B M 2は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる活性化受容体を標的にする。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1つより多いA B M 2を含み、各A B M 2は異なる活性化受容体を標的にする。いくつかの実施形態では、異なるA B M 2は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる活性化受容体を全体として標的にする。いくつかの実施形態では、いくつかのA B M 2は同じ活性化受容体(複数可)を標的にし、いくつかのA B M 2は異なる活性化受容体を標的にするが、A B M 2は2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる活性化受容体を全体として標的にする。

40

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1種より多い阻害性受容体を標的にするA B M 3を含む。いくつかの実施形態では、A B M 3は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる阻害性受容体を標的にする。

【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、1つより多いA B M 3を含み、各A B M 3は異なる阻害性受容体を標的にする。いくつかの実施形態では、異なるA B M 3は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる阻害性受容体を全体として標的にする。いくつかの実施形態では、いくつかのA B M 3は同じ阻害性受容体(複数可)を標的にし、いくつかのA B M 3は異なる阻害性受容体を標的にする

50

が、ABM3は、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上の異なる阻害性受容体を全体として標的にする。

【0184】

3.2.抗原結合モジュール1(ABM1)：癌細胞抗原結合因子

本明細書で提供されるMIAcでは、ABM1は癌細胞によって発現される抗原(「癌細胞抗原」)に特異的に結合する。ABM1が結合する好ましい抗原としては、癌細胞によって発現されるが正常細胞によって発現されないもの、または正常細胞と比べると癌細胞でアップレギュレートされるものが挙げられる。抗原が細胞の表面で発現され、ここで抗原がABM1に接触可能であることが好ましい。任意の適切な癌細胞抗原がABM1によって標的にされ得、当業者は、ABM1による結合に適切な抗原を選択することができるであろう。

10

【0185】

いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくともある程度の量、癌細胞でアップレギュレートされる。対照細胞は、同じ組織由来の細胞でもよい。同じ組織由来の細胞は、標的にされる癌細胞に発達することができる細胞のタイプの正常型でもよい。例えば、癌細胞がヒト結腸癌上皮細胞であるならば、対照細胞は、正常なヒト結腸上皮細胞でもよい。この例は例示目的で提供され、当業者は、癌細胞と比較するための適切な対照細胞を容易に選択することができる。

【0186】

いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも2倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも5倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも10倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも100倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも1,000倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも10,000倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも100,000倍アップレギュレートされる。いくつかの実施形態では、ABM1が結合する抗原は、対照細胞と比べて少なくとも1,000,000倍アップレギュレートされる。

20

【0187】

ABM1の役割は、悪性病変の部位に、例えば癌細胞にMIAcを標的化することである。したがって、ABM1がその抗原に結合した後に任意の特定の生物活性(すなわち、刺激または拮抗活性)を発揮することは必要とされない。しかし、ABM1がその抗原への結合によって生物活性を発揮するMIAcも本開示の範囲内にある。いくつかの実施形態では、ABM1は受容体抗原を刺激する。いくつかの実施形態では、ABM1は受容体抗原に拮抗する。いくつかの実施形態では、ABM1は、刺激性作用または拮抗性作用なしで、(受容体抗原を含めた)抗原と結合する。

30

【0188】

ABM1による結合についての例示的癌細胞抗原としては、例えば、9-O-アセチル-GD3、hCG、A33抗原、CA19-9マーカー、CA-125マーカー、カルテイキュリン、カルボアンヒドラーーゼIX(MN/CA IX)、CCR5、CCR8、CD19、CD20、CD22(SINGLEC-2)、CD25、CD27(TNFRSF7)、CD30(TNFRSF8)、CD33(SINGLEC-3)、CD38(サイクリックADPリボースヒドロラーゼ)、CD44v6、CD63(LAMP-3)、CD66e(CEACAM5)、CD70、CD123(IL3RA)、CD138(シンデカン1)、CD248(エンドシアリン)癌胎児性抗原(CEA)、デスマグレイン4、E-カドヘリンネオエピトープ、エフリンA2(EphA2)、上皮増殖因子受容体(EGFR)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、Erbb2、胎児アセチルコリン受容

40

50

体、線維芽細胞活性化抗原（FAP）、フコシルGM1、GD2、GD3、GM2、ガングリオシドGD3、グロボH、糖タンパク質100（gp100）、HER2/neu、HER3、HER4、インスリン様増殖因子受容体1、ルイス-Y、LG、Ly-6、黒色腫特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MUCSCP）、メソテリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5_{AC}、MUC5_B、MUC7、MUC16、ミューラー管抑制物質（MIS）II型受容体、形質細胞抗原、ポリSA、PSCA、PSMA、ソニックヘッジホッグ（SHH）、SAS、STEAP、sTN抗原及びTNF-アルファ前駆体が挙げられる。ABM1によって標的にされ得る癌抗原の例は、参照によりその全体が組み込まれる、米国特許第7,235,641号に提供される。

【0189】

いくつかの実施形態では、ABM1は多特異性抗原結合モジュールである。多特異性抗原結合モジュールは、当技術分野で既知のまたは本明細書に記載の任意の方法、例えば、ノブ及びホール（knobs and holes）アプローチまたは異なる抗原に結合することが知られている単一ドメイン抗体を組みわせることによって調製することができる。いくつかの実施形態では、多特異性ABM1は、2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上の異なる抗原と結合する。いくつかの実施形態では、異なる抗原のそれぞれは、ABM1結合部位によって認識される異なる抗原である。

【0190】

いくつかの実施形態では、1種類より多くのABM結合部位を含むハイブリッド多特異性ABMを形成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ハイブリッド多特異性ABMは、ABM1及びABM2に対する結合部位を含む。そのようなハイブリッドABMの一例は、1つの結合部位がABM1に対する結合部位を形成し、もう1つの結合部位がABM2に対する結合部位を形成する、二重特異性IgGである。ABM1及び3；ABM1及び4；ABM1、2及び3；ABM1、2及び4；ABM1、3及び4；ならびにABM1、2、3及び4に結合する多特異性ハイブリッドABMも本明細書で提供される。

【0191】

3.3.抗原結合モジュール2（ABM2）：活性化受容体のアゴニスト

本明細書で提供されるM1ACでは、ABM2はエフェクター細胞によって発現される活性化受容体に特異的に結合する。活性化受容体へのABM2の結合が活性化受容体を刺激し、エフェクター細胞への活性化シグナルの伝達をもたらす。例えば、活性化受容体に対するABM2の親和性、ABM2の結合価またはABM2の数を変え、それによって、活性化シグナルの強度を変えることによって、エフェクター細胞の活性を調整することができる。

【0192】

ABM2に標的とされる活性化受容体は、例えば癌細胞に動員したいエフェクター細胞のタイプに基づいて、選択される。例えば、例示的一実施形態では、刺激活性を有するCD137結合分子をABM2として利用することによって、ナチュラルキラー（NK）細胞を動員及び活性化することができる。

【0193】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞はNK細胞である。ABM2による刺激に対する適切な例示的NK細胞受容体としては、例えば、2B4（CD244）、₄¹インテグリン、₂インテグリン（例えば、CD11a-CD18、CD11b-CD18、CD11c-CD18）、CD2（LFA2、OX34）、CD16、CD27（TNFRSF7）、CD38、CD96、CD100、CD160、CD137、CEACAM1（CD66）、CRTAM、CS1（CD319）、DNAM-1（CD226）、GITR（TNFRSF18）、活性化型のKIR（例えば、KIR2DS1、KIR2DS4、KIR-S）、NKG2C、NKG2D、NKG2E、天然の細胞傷害受容体（例えば、NKP30、NKP44、NKP46、NKP80）、NTB-A及びPEN-5が挙げられる。ABM2による刺激に対する適切なNK細胞受容体についてのさらに

10

20

30

40

50

多くの情報が、Miller, *Hematology*, 2013, 2013(1): 247-253; Mentlik et al., *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 481(1-12); Stein et al., *Antibodies*, 2012, 1: 88-123; Pegram et al., *Immunology and Cell Biology*, 2011, 89: 216-224; 及び Vivier et al., *Nature Immunology*, 2008, 9: 503-510(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

【0194】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞はTリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球は細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球はT細胞である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球はNKT細胞である。いくつかの実施形態では、NKT細胞はiNKT細胞である。ABM2による刺激に対する適切な例示的Tリンパ球受容体としては、例えば、CD2(LFA2、OX34)、CD3、CD5、CD27(TNFRSF7)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD40L、CD84(SLAMF5)、CD137(4-1BB)、CD226、CD229(Ly9、SLAMF3)、CD244(2B4、SLAMF4)、CD319(CRACC、BLAME)、CD352(Ly108、NTBA、SLAMF6)、CRTAM(CD355)、DR3(TNFRSF25)、GITR(CD357)、HVEM(CD270)、ICOS、LIGHT、LT-R(TNFRSF3)、OX40(CD134)、NKG2D、SLAM(CD150、SLAMF1)、TCR、TCR、TCR及びTIM1(HAVCR、KIM1)が挙げられる。ABM2による刺激に対する適切なT細胞受容体についてのさらに多くの情報が、Stein et al., *Antibodies*, 2012, 1: 88-123; Chen and Flies, *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13: 227-242; 及びPardoll, *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12: 252-264(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

【0195】

いくつかの実施形態では、ABM2は、特に、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対する天然リガンドまたはその一部ではない。いくつかの実施形態では、ABM2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体に対する天然リガンドまたはその一部である。

【0196】

いくつかの実施形態では、ABM2は多特異性抗原結合モジュールである。当技術分野で既知のまたは本明細書に記載の任意の方法、例えば、ノブ及びホールアプローチまたは異なる抗原に結合することが知られている単一ドメイン抗体を組みわせることによって、多特異性抗原結合モジュールを調製することができる。いくつかの実施形態では、多特異性ABM2は、2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上の異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態では、異なる抗原のそれぞれは、ABM2結合部位によって認識される異なる抗原である。

【0197】

いくつかの実施形態では、1種類より多くのABM結合部位を含むハイブリッド多特異性ABMを形成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ハイブリッド多特異性ABMは、ABM2及びABM1に対する結合部位を含む。そのようなハイブリッドABMの一例は、1つの結合部位がABM2に対する結合部位を形成し、もう1つの結合部位がABM1に対する結合部位を形成する、二重特異性IgGである。ABM2及び3；ABM2及び4；ABM2、1及び3；ABM2、1及び4；ABM2、3及び4；ならびにABM2、1、3及び4に結合する多特異性ハイブリッドABMも本明細書で提供される。

10

20

30

40

50

【0198】

3.4. 抗原結合モジュール3 (ABM3)：阻害性受容体のアンタゴニスト

本明細書で提供されるM1ACでは、ABM3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に特異的に結合する。阻害性受容体へのABM3の結合が阻害性受容体に拮抗し、エフェクター細胞に伝達される阻害性シグナルの遮断をもたらす。例えば、阻害性受容体に対するABM3の親和性、ABM3の結合価またはABM3の数を変えて、それによって、阻害性シグナルの拮抗の程度をえることによって、エフェクター細胞の活性をさらに調整することができる。

【0199】

ABM3によって標的とされる阻害性受容体は、例えば癌細胞に動員したいエフェクター細胞のタイプに基づいて、選択される。例えば、エフェクター細胞がNK細胞である場合の例示的実施形態では、ABM3は、拮抗活性を有するKIR2DL1結合分子でもよい。

【0200】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞はNK細胞である。ABM3による拮抗に対する適切な例示的NK細胞受容体としては、例えば、ILT2/LIR-1/CD85j、阻害型のKIR(例えば、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2、KIR-L)、KLRG1、LAIR-1、NKG2A、NKR-P1A、Singlec-3、Singlec-7及びSinglec-9が挙げられる。ABM3によるアンタゴニズムに対するNK細胞受容体についてのさらに多くの情報は、Miller, Hematology, 2013, 2013(1): 247-253; Mentlik et al., Frontiers in Immunology, 2013, 4: 481(1-12); Stein et al., Antibodies, 2012, 1: 88-123; Pegram et al., Immunology and Cell Biology, 2011, 89: 216-224; 及びVivier et al., Nature Immunology, 2008, 9: 503-510(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

【0201】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞はTリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球は細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球はT細胞である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球はNKT細胞である。いくつかの実施形態では、NKT細胞はiNKT細胞である。ABM3による拮抗に適する例示的Tリンパ球受容体としては、例えば、2B4(CD244、SLAMF4)、B71(CD80)、B7H1(CD274、PD-L1)、BTLA(CD272)、CD160(BY55、NK28)、CD352(Ly108、NTBA、SLAMF6)、CD358(DR6)、CTLA-4(CD152)、LAG3、LAIR1、PD-1(CD279)、PD-1H(VISTA)、TIGIT(VSIG9、VSTM3)、TIM2(TIMD2)及びTIM3(HAVCR2、KIM3)が挙げられる。ABM3によるアンタゴニズムに対するT細胞受容体についてのさらに多くの情報は、Stein et al., Antibodies, 2012, 1: 88-123; Chen and Flies, Nature Reviews Immunology, 2013, 13: 227-242; 及びPardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12: 252-264(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

【0202】

いくつかの実施形態では、ABM3は、特に、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対する天然リガンドまたはその一部ではない。いくつかの実施形態では、ABM3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体に対する天然リガンドまたはその一部である。

【0203】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、ABM3は多特異性抗原結合モジュールである。当技術分野で既知のまたは本明細書に記載の任意の方法、例えば、ノブ及びホールアプローチまたは異なる抗原に結合することが知られている単一ドメイン抗体を組みわせることによって、多特異性抗原結合モジュールを調製することができる。いくつかの実施形態では、多特異性ABM3は、2、3、4、5、6、7、8種またはそれ以上の異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態では、異なる抗原のそれぞれは、ABM3の結合部位によって認識される異なる抗原である。

【0204】

いくつかの実施形態では、1種類より多くのABM結合部位を含むハイブリッド多特異性ABMを形成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ハイブリッド多特異性ABMは、ABM3及びABM1に対する結合部位を含む。そのようなハイブリッドABMの一例は、1つの結合部位がABM3に対する結合部位を形成し、もう1つの結合部位がABM1に対する結合部位を形成する、二重特異性IgGである。ABM3及び2；ABM3及び4；ABM3、1及び2；ABM3、1及び4；ABM3、2及び4；ならびにABM3、1、2及び4に結合する多特異性ハイブリッドABMも本明細書で提供される。

10

【0205】

3.5. ABM1、ABM2及びABM3の組み合わせの実例

任意の適切なABM1、ABM2及び/またはABM3を組み合わせて、本明細書のM1ACを作製することができる。以下の組み合わせは、単に例示目的で提供され、ABM1、ABM2及びABM3のいかなる特定の組み合わせにも本発明を限定することを意図するものではない。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、M1ACはABM1、ABM2及びABM3を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はCD137を刺激し、ABM3はPD-1に拮抗する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM2を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はCD137を刺激する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM3を含み、ABM1はCD30と結合し、ABM3はPD-1に拮抗する。いくつかの実施形態では、本段落に記載されている構築物のうちのいずれも、CD64と結合するABM4を含む。

30

【0207】

いくつかの実施形態では、M1ACはABM1、ABM2及びABM3を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はNKG2Dを刺激し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM2を含み、ここで、ABM1とCD30に結合し、ABM2はNKG2Dを刺激する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM3を含み、ABM1はCD30と結合し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、本段落に記載されている構築物のうちのいずれも、CD64に結合するABM4を含む。

【0208】

いくつかの実施形態では、M1ACはABM1、ABM2及びABM3を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はCD137を刺激し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM2を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はCD137を刺激する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM3を含み、ABM1はCD30と結合し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、本段落に記載されている構築物のうちのいずれも、CD64に結合するABM4を含む。

40

【0209】

いくつかの実施形態では、M1ACはABM1、ABM2及びABM3を含み、ここで、ABM1はCD20と結合し、ABM2はNKG2Dを刺激し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、M1ACはABM1及びABM2を含み、こ

50

ここで、ABM1はCD20と結合し、ABM2はNKG2Dを刺激する。いくつかの実施形態では、MIAcはABM1及びABM3を含み、ABM1はCD20と結合し、ABM3は阻害型のKIRに拮抗する。いくつかの実施形態では、本段落に記載されている構築物のうちのいずれも、CD64に結合するABM4を含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、MIAcはABM1、ABM2及びABM3を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はNKG2Dを刺激し、ABM3はNKG2Aに拮抗する。いくつかの実施形態では、MIAcはABM1及びABM2を含み、ここで、ABM1はCD30と結合し、ABM2はNKG2Dを刺激する。いくつかの実施形態では、MIAcはABM1及びABM3を含み、ABM1はCD30と結合し、ABM3はNKG2Aに拮抗する。いくつかの実施形態では、本段落に記載されている構築物のうちのいずれも、CD64に結合するABM4を含む。

10

【0211】

3.6. 抗原結合モジュール4(ABM4)：Fc受容体-結合モジュール

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるMIAcは、エフェクター細胞のFc受容体に結合する結合モジュールを含む。Fc受容体としては、例えば、CD16(CD16a、CD16b)、CD32a、CD64及びCD89が挙げられる。

【0212】

いくつかの実施形態では、ABM4は、Fc受容体と特異的に結合する、免疫グロブリン、抗体、抗体フラグメントまたは代替足場である。いくつかの実施形態では、ABM4は免疫グロブリンのFcドメインである。

20

【0213】

免疫グロブリンのFcドメインは、「抗原結合」として本分野で一般に説明されていないが、本開示のMIAcのABM4に対する目的では、Fcドメインに対する受容体はFcドメインが結合する「抗原」とみなされる。言い換えれば、免疫グロブリンのFcドメインは、先行段落及び本開示の全体を通して記載されている他のタイプのABM4に混ざって、ABM4の1種類である。

【0214】

例えば、ABM1、ABM2及び/またはABM3がFcドメインを有する免疫グロブリンタンパク質を含む場合は、Fcドメインが存在し得る。より詳細に、且つ例示として、ABM1、ABM2またはABM3のうちのいずれかがIgGを含む場合は、ABM4はIgGのFcドメインであり得る。これらの実施形態では、当業者が容易に認識するように、単一のIgGは、ABM4ならびにABM1、ABM2及びABM3の少なくとも1つを形成することができる。エフェクター細胞でのFcRの発現は、その全体が参照により組み込まれるRavetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol., 1991, 9: 457-492に概説されている。

30

【0215】

ある種の実施形態では、Fc領域変異体を生成するために、Fc領域中に変更を導入ことができる。ある種の実施形態では、Fc領域変異体は増強したまたは変化したエフェクター機能を有する。変化したエフェクター機能をともなう多数の置換または置換もしくは欠失が当技術分野で既知である。Fc領域変異体の例としては、米国特許第8,815,237号; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 4005-4010; 及び strohl, Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20: 685-691(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されているものが挙げられる。

40

【0216】

補体依存性細胞傷害(CDC)及び/または抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)活性の変化を、インビトロ及び/またはインビボアッセイを使用して確認することができる。例えば、Fc受容体結合アッセイを行って、FcR結合を測定することができる

50

。目的の分子のADC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定例は、米国特許第5,500,362号及び第5,821,337号；Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1986, 83:7059-7063；Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, 82:1499-1502；及びBruggemann et al., J. Exp. Med., 1987, 166:1351-1361（これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる）に提供される。あるいは、またはさらに、全体が参照により組み込まれる、Clynes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998, 95:652-656に開示されているものなどの動物モデルを使用して、目的の分子のADC活性をインビトロで評価することができる。10

【0217】

いくつかの実施形態では、MIAcはABM4を含まない。

【0218】

ABM4に関して、例えばCH2ドメイン及び/またはCH3ドメイン中に1つまたは複数の改変を含むように、Fcを改変することができる。そのような改変は、Fcの機能及び結合特性、例えばFc受容体(FcR)結合に影響を与える。FcRへの結合を遮断するようにFcを改変することができ、例えば、FcR結合を遮断するための変異、例えばアミノ酸N297での変異を含むようにFcを改変することができる。N結合型グリコシル化を防止する及び/またはADCを低減するようにFcを改変することができる。20

【0219】

3.7.抗原結合モジュールのアセンブリ

本明細書で提供されるMIAcは、MIAcを含むABMが、MIAcを形成するために、共有結合的または非共有結合的に互いに会合（または「結合」）することを特徴とする。当業者は、ABMの性質及び用途に基づいて、会合の種類を選択することができる。30

【0220】

いくつかの実施形態では、1つのABMは他の2つのABMの両方に結合しているが、他の2つのABMは互いに直接的に結合していない。例えば、図7Aに示すように、いくつかの態様では、ABM1はABM2とABM3の両方に結合しているが、ABM2とABM3は互いに結合していない。いくつかの態様では、図7Bに示すように、ABM2はABM1とABM3の両方に結合しているが、ABM1とABM3は互いに直接的に結合していない。いくつかの態様では、図7Cに示すように、ABM3はABM1とABM2の両方に結合しているが、ABM1とABM2は互いに直接的に結合していない。30

【0221】

いくつかの実施形態では、各ABMは2つの他のABMに結合している。例えば、いくつかの態様では、図8に示すように、ABM1はABM2とABM3に結合しており、ABM2はABM1とABM3に結合しており、ABM3はABM1とABM2に結合している。40

【0222】

MIAcが2つのABMしか含まない実施形態では、ABMは、一般に、共有結合的または非共有結合的に互いに会合する。しかし、いくつかの実施形態では、各ABMは、ABMではない第3の分子と会合することができる。

【0223】

3.7.1.共有結合的に会合したABM

いくつかの実施形態では、ABMは、互いに共有結合的に会合している。共有結合的会合は、任意の適切な共有結合的連結でもよい。

【0224】

いくつかの実施形態では、共有結合的会合は2つ以上のABMまたはそれらの一部を含

む融合タンパク質の形態である。そのような融合タンパク質の例示的実施形態としては、図2A～5B及び11A～15Bに例示するように、scFv及びIgGの重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質のさらなる例示的実施形態は、図6及び16A～18Bに示されるMIACである。

【0225】

本明細書で提供されるMIACは任意の適切な融合タンパク質構造を含むことができ、適切な融合タンパク質の選択は、例えばMIACの各ABMの所望の結合価及び分子量に応じて、当業者が行うことができる。適切な融合タンパク質構造の例は、本開示の全体を通して提供される。融合タンパク質を生成する方法は、本開示の他の個所で記載されている。

10

【0226】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質はポリペプチドリンカーを含む。ポリペプチドリンカーは、融合タンパク質の少なくとも2つのタンパク質（例えば、ABM）を互いに結合させる任意の適切なポリペプチドリンカーでもよい。当業者は、融合タンパク質の成分（例えば、ABM）及びその用途に基づいて、適切なポリペプチドリンカーを選択することができる。適切なリンカーの例としては、(GGGGS)_n（配列番号20）、ヒトIgG1 C_H2の残基297～322由来のFcインターリンカー：NSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCK（配列番号21）及びヒト血清アルブミンのD3ドメイン由来のHASインターリンカー：FQNALLVRYTKKVPPQVSTPT LVEV（配列番号22）が挙げられる。全体が参照により組み込まれる、Fang et al., Chinese Sci. Bull., 2003, 48: 1912-1918を参照されたい。いくつかの実施形態では、リンカーは(GGGGS)₃（配列番号23）である。他のリンカーは、例えば、米国特許第5,525,491号；Alftahan et al., Protein Eng., 1995, 8: 725-731；Shan et al., J. Immunol., 1999, 162: 6589-6595；Newton et al., Biochemistry, 1996, 35: 545-553；Megeed et al.；Biomacromolecules, 2006, 7: 999-1004；及びPerisic et al., Structure, 1994, 12: 1217-1226（これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる）に提供される。

20

【0227】

いくつかの実施形態では、ABMは化学的カップリングによって共有結合的に会合している。任意の適切な化学的リンカーを、本明細書で提供されるABMを共有結合的に会合させるのに使用することができる。抗体同士の化学的カップリングは、例えば、Wong et al., Scand. J. Rheumatol., 2000, 29: 282-287；Jung et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21: 2431-2435；Tutt et al., J. Immunol., 1991, 147: 60-69；French, Methods Mol. Biol., 1998, 80: 121-134；及びGavril yuk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19: 3716-3720（これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる）に記載されている。

30

【0228】

いくつかの実施形態では、化学的カップリングはスペーサーを介する。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ポリマー、ポリペプチド、炭水化物（例えば、デキストラン）などから選択される分子である。特定の実施形態では、スペーサーはポリ(エチレン)グリコール(PEG)ポリマーである。いくつかの実施形態では、PEGは、約2.5kDa～約50kDaの範囲の分子量を有する。化学的カップリングのためのPEG試薬及びその使用方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Hermansson, Bioconjugate Techniques, 2013, 3d ed., chapter 18, Academic Press, London, UK, Waltham MA,

40

50

and San Diego, CAに記載されている。

【0229】

3.7.2. 非共有結合的に会合しているABM

いくつかの実施形態では、ABMは互いに非共有結合的に会合している。非共有会合的会合は、任意の適切な共有結合的連結でもよい。

【0230】

いくつかの実施形態では、非共有結合的会合は、2分子間の特異的相互作用の形態である。例えば、いくつかの実施形態では、非共有会合的会合はアビジンとビオチンの間の相互作用である。いくつかの実施形態では、アビジンはストレプトアビジン及びニュートラアビジンから選択される。これらの実施形態では、アビジン分子は1つのABMに結合しており、ビオチン分子は別のABMに結合している。次いで、アビジンとビオチンの間の特異的な高親和性相互作用の結果として、ABMが会合する。アビジン-ビオチン系及びその使用方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Hermansson, Bioconjugate Techniques, 2013, 3d ed., chapter 11, Academic Press, London, UK, Waltham MA, and San Diego, CAに記載されている。

10

【0231】

3.8. 多特異性免疫調節構築物(MIAC)の例示的実施形態

図2A～6及び11A～18Bは、本明細書で提供されるMIACの例示的非限定例を提供する。

20

【0232】

図2Aでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)及びABM3(203)がIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方をIgGの重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0233】

図2Bでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)及びABM3(203)がIgGの軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方をIgGの軽鎖のN末端に結合させることも可能である。

30

【0234】

図2Cでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの軽鎖のC末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGの1つの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方をそれぞれ軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

40

【0235】

図2Dでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの重鎖のC末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGの1つの軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方をそれぞれ重鎖のN末端または軽鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0236】

図3Aでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの重鎖のC末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用

50

して、ABM3(203)がIgGのもう1つの重鎖のC末端及びIgGの1つの軽鎖に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方を重鎖のN末端または軽鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0237】

図3Bでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの軽鎖のC末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGのもう1つの軽鎖のC末端及びIgGの1つの重鎖に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

10

【0238】

図3Cでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの重鎖のC末端及びIgGの1つの軽鎖に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGのもう1つの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方を重鎖のN末端または軽鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0239】

図3Dでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの1つの重鎖のC末端及びIgGの1つの軽鎖に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGのもう1つの軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の一方または両方を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

20

【0240】

図4Aでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ABM2(202)が、半分のIgGの軽鎖のC末端及び同じ半分のIgGの重鎖のC末端に結合している。ABM3(203)が、もう半分のIgGの軽鎖のC末端及びもう半分のIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の1つまたは複数を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

30

【0241】

図4Bでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はscFvである。ABM2(202)が、半分のIgGの軽鎖のC末端及びもう半分のIgGの重鎖のC末端に結合している。ABM3(203)が、半分のIgGの軽鎖のC末端及びもう半分のIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)及びABM3(203)の1つまたは複数を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0242】

図5Aでは、ABM1(201)はscFvであり、ABM2(202)はIgGであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM1(201)及びABM3(203)がIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM1(201)及びABM3(203)の一方または両方をIgGの重鎖のN末端に結合させることが可能である。ABM1(201)及びABM3(203)を、軽鎖のC末端またはN末端を含めた、IgGの任意の他の適切な部位に結合させることも可能である。

40

【0243】

図5Bでは、ABM1(201)はscFvであり、ABM2(202)はscFvであり、ABM3(203)はIgGである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM1(201)及びABM2(202)がIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、A

50

B M 1 (2 0 1) 及び A B M 2 (2 0 3) の一方または両方を I g G の重鎖の N 末端に、結合させることが可能である。A B M 1 (2 0 1) 及び A B M 2 (2 0 3) を、軽鎖の C 末端または N 末端を含めた、 I g G の任意の他の適切な部位に結合させることも可能である。

【 0 2 4 4 】

図 6 では、 A B M 1 (2 0 1) は s c F v であり、 A B M 2 (2 0 2) は s c F v であり、 A B M 3 (2 0 3) は s c F v である。本例示的実施形態では、ポリペプチドリンカーを使用して、 N 末端から C 末端に向かって A B M 1 - A B M 2 - A B M 3 の順序で、 s c F v をアセンブルする。しかし、 N 末端から C 末端に向かって例えば、 A B M 1 - A B M 3 - A B M 2 、 A B M 2 - A B M 1 - A B M 3 、 A B M 2 - A B M 3 - A B M 1 、 A B M 3 - A B M 1 - A B M 2 及び A B M 3 - A B M 2 - A B M 1 を含めた任意の適切な順序で、 s c F v をアセンブルすることが可能である。
10

【 0 2 4 5 】

図 1 1 A では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 2 (2 0 2) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 2 (2 0 2) が I g G の重鎖の C 末端のそれぞれに結合している。しかし、一方または両方の A B M 2 (2 0 2) を I g G の重鎖の N 末端に結合させることも可能である。

【 0 2 4 6 】

図 1 1 B では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 2 (2 0 2) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 2 (2 0 2) が I g G の軽鎖の C 末端のそれぞれに結合している。しかし、一方または両方の A B M 2 (2 0 2) を I g G の軽鎖の N 末端に結合させることも可能である。
20

【 0 2 4 7 】

図 1 1 C では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 3 (2 0 3) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 3 (2 0 3) が I g G の重鎖の C 末端のそれぞれに結合している。しかし、一方または両方の A B M 3 (2 0 3) を I g G の重鎖の N 末端に結合させることも可能である。

【 0 2 4 8 】

図 1 1 D では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 3 (2 0 3) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 3 (2 0 3) が I g G の軽鎖の C 末端のそれぞれに結合している。しかし、一方または両方の A B M 3 (2 0 3) を I g G の軽鎖の N 末端に結合させることも可能である。
30

【 0 2 4 9 】

図 1 2 A では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 2 (2 0 2) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 2 (2 0 2) が I g G の 1 つの軽鎖の C 末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、別の A B M 2 (2 0 2) が I g G の 1 つの重鎖の C 末端に結合している。しかし、一方または両方の A B M 2 (2 0 2) を、それぞれ軽鎖の N 末端または重鎖の N 末端に結合させることも可能である。

【 0 2 5 0 】

図 1 2 B では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 3 (2 0 3) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 1 つの A B M 3 (2 0 3) が I g G の 1 つの軽鎖の C 末端に結合している。ポリペプチドリンカーを使用して、別の A B M 3 (2 0 3) が I g G の 1 つの重鎖の C 末端に結合している。しかし、一方または両方の A B M 3 (2 0 3) を、それぞれ軽鎖の N 末端または重鎖の N 末端に結合させることも可能である。
40

【 0 2 5 1 】

図 1 3 A では、 A B M 1 (2 0 1) は I g G であり、 A B M 2 (2 0 2) は s c F v である。ポリペプチドリンカーを使用して、 A B M 2 (2 0 2) が I g G の両方の重鎖及び 1 つの軽鎖の C 末端に結合している。しかし、 A B M 2 (2 0 2) のいずれかを重鎖の N 末端または軽鎖の N 末端に結合させることも可能である。

【 0 2 5 2 】

10

20

30

40

50

図13Bでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM2(202)がIgGの両方の軽鎖及び1つの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)のいずれかを軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0253】

図13Cでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGの両方の重鎖及び1つの軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM3(203)のいずれかを重鎖のN末端または軽鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0254】

図13Dでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM3(203)はscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM3(203)がIgGの両方の軽鎖及び1つの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM3(203)のいずれかを軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0255】

図14Aでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM2(202)はscFvである。ABM2(202)は、両方の重鎖及び両方の軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM2(202)の1つまたは複数を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0256】

図14Bでは、ABM1(201)はIgGであり、ABM3(203)はscFvである。ABM3(203)は、両方の重鎖及び両方の軽鎖のC末端に結合している。しかし、ABM3(203)の1つまたは複数を軽鎖のN末端または重鎖のN末端に結合させることも可能である。

【0257】

図15Aでは、ABM1(201)はscFvであり、ABM2(202)はIgG及びscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM1(201)及びscFv ABM2(202)がIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM1(201)及びscFv ABM2(202)の一方または両方をIgGの重鎖のN末端に結合させることが可能である。ABM1(201)及びscFv ABM2(202)を、軽鎖のC末端またはN末端を含めた、IgGの任意の他の適切な部位に結合させることも可能である。

【0258】

図15Bでは、ABM1(201)はscFvであり、ABM3(203)はIgG及びscFvである。ポリペプチドリンカーを使用して、ABM1(201)及びscFv ABM3(203)がIgGの重鎖のC末端に結合している。しかし、ABM1(201)及びscFv ABM3(203)の一方または両方をIgGの重鎖のN末端に結合させることが可能である。ABM1(201)及びscFv ABM3(203)を、軽鎖のC末端またはN末端を含めた、IgGの任意の他の適切な部位に結合させることも可能である。

【0259】

図16Aでは、ABM1(201)はscFvであり、両方のABM2(202)はscFvである。本例示的実施形態では、ポリペプチドリンカーを使用して、N末端からC末端に向かってABM1 - ABM2 - ABM2の順序で、scFvをアセンブルする。しかし、N末端からC末端に向かって例えば、ABM2 - ABM1 - ABM2及びABM2 - ABM2 - ABM1を含めた任意の適切な順序で、scFvをアセンブルすることが可能である。

【0260】

図16Bでは、ABM1(201)はscFvであり、両方のABM3(203)はscFvである。本例示的実施形態では、ポリペプチドリンカーを使用して、N末端からC

10

20

30

40

50

末端に向かって A B M 1 - A B M 3 - A B M 3 の順序で、 s c F v をアセンブルする。しかし、 N 末端から C 末端に向かって、例えば、 A B M 3 - A B M 1 - A B M 3 及び A B M 3 - A B M 3 - A B M 1 を含めた任意の適切な順序で、 s c F v をアセンブルすることが可能である。

【 0 2 6 1 】

図 1 7 A ~ 1 7 B では、 2 つの A B M 1 (2 0 1) s c F v が I g G 様分子の重鎖の C 末端に結合している。 I g G 様分子の N 末端領域は、 2 つの A B M 2 結合部位 (2 0 2) を形成する V H - V L 領域及び 2 つの A B M 3 結合部位 (2 0 3) を形成する V H - V L 領域を含む。図 1 7 A で示される実施形態では、 A B M 3 結合部位は、 I g G 様分子によって形成される最も N 末端の A B M 結合部位である。図 1 7 B で示される実施形態では、 A B M 2 結合部位は、 I g G 様分子によって形成される最も N 末端の A B M 結合部位である。 1 つまたは複数の s c F v A B M 1 (2 0 1) を、 I g G 様分子の軽鎖の C 末端もしくは N 末端に、または重鎖の N 末端に結合させることも可能である。

10

【 0 2 6 2 】

図 1 8 A ~ 1 8 B では、 2 つの A B M 1 (2 0 1) s c F v が I g G 様分子の重鎖の C 末端に結合している。 I g G 様分子の N 末端領域は、 4 つの A B M 2 結合部位 (2 0 2 ; 図 1 8 A) または 4 つの A B M 3 結合部位 (2 0 3 ; 図 1 8 B) を形成する V H - V L 領域を含む。 1 つまたは複数の s c F v A B M 1 (2 0 1) を、 I g G 様分子の軽鎖の C 末端もしくは N 末端に、または重鎖の N 末端に結合させることも可能である。

20

【 0 2 6 3 】

4 . 多特異性免疫調節抗原結合構築物 (M I A C) の調製

M I A C は、当技術分野で既知であり且つ以下により詳細に記載されている、核酸クローニング、タンパク質発現及びタンパク質アセンブリの技法を使用して調製することができる。本開示の他の個所で記載するように、 M I A C を形成する A B M は、複数のサブユニットを有するタンパク質（及び融合タンパク質）からアセンブルすることができる。 M I A C が複数のサブユニットから形成される場合は、 M I A C の最終的なアセンブリは、組換え細胞の内部で行ってもよいし、組換え細胞の外部で行ってもよい。

20

【 0 2 6 4 】

4 . 1 . 抗原の調製

A B M の生成に使用される抗原は、細胞によって発現されるインタクトな分子（例えば、癌細胞特異的抗原、活性化受容体及び／もしくは阻害性受容体）またはこれらの分子のフラグメントでもよい。抗原は、単離タンパク質の形態でもよし、当該タンパク質を発現する細胞の形態でもよい。 A B M を生成するのに有用な抗原の他の形態は当業者に明らかである。

30

【 0 2 6 5 】

4 . 2 . 抗体

抗体は、例えば、全体が参照により組み込まれる、 K o h l e r e t a l . , N a t u r e , 1 9 7 5 , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 によって最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して、及び／または組換え D N A 法（例えば、全体が参照により組み込まれる、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 を参照されたい）によって、得ることができる。例えば、ファージまたは酵母ベースのライブラリーを使用して、モノクローナル抗体を得ることもできる。例えば、米国特許第 8 , 2 5 8 , 0 8 2 号及び第 8 , 6 9 1 , 7 3 0 号（これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる）を参照されたい。

40

【 0 2 6 6 】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物を免疫化して、免疫化に使用されたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、インピトロでリンパ球を免疫化することができる。次いで、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレンギリコールなどの適切な融合剤を使用してリンパ球を骨髄腫細胞と融合する。全体が参照により組み込まれる、 G o d i n g J . W . , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a

50

nd Practice, 3rd ed. (1986) Academic Press, San Diego, CAを参照されたい。

【0267】

未融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する1種または複数種の物質を含む適切な培養培地にハイブリドーマ細胞を播種し、成長させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPR TまたはH P R T)を欠く場合は、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、HGPR T欠損細胞の成長を防止する、ヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む(HAT培地)。

【0268】

有用な骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定的な高レベル産生を支持し、且つHAT培地の有無などの培地条件に感受性があるものである。これらの中で、好ましい骨髄腫細胞株は、マウス骨髄腫系統、例えば、MOP-21及びMC-11マウス腫瘍に由来するもの(Salk研究所細胞分配センター(Salk Institute Cell Distribution Center)、San Diego, CAから入手可能)及びSP-2またはX63-Ag8-653細胞(アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)、Rockville, MDから入手可能)である。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞の細胞株もヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている。例えば、全体が参照により組み込まれる、Kozbor, J. Immunol., 1984, 133:3001を参照されたい。

10

20

【0269】

所望の特異性、親和性及び/または生物活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、選択したクローニングを限界希釈法によってサブクローニングすることができ、標準的な方法によって成長させることができる。上掲のGoodingを参照されたい。この目的に適した培養培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、動物中の腹水腫瘍として、ハイブリドーマ細胞をインビボで成長させることができる。

【0270】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離及び配列決定することができる。したがって、ハイブリドーマ細胞は、所望の特性を有する抗体をコードするDNAの有用な供給源として働き得る。一旦単離すれば、DNAを発現ベクター中に配置することができ、次いで、これを、そうでなければ抗体を産生しない、細菌(例えば、大腸菌(E. coli))、酵母(例えば、サッカロミセス属(Saccharomyces)もしくはコマタガエラ(Komagataella)(ピキア(Pichia)属)、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または骨髄腫細胞宿主細胞にトランスフェクトして、モノクローナル抗体を産生する。

30

【0271】

4.2.1. ヒト化抗体

ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の構造部分の大部分またはすべてを対応するヒト抗体配列と置き換えることによって生成することができる。したがって、抗原特異的な可変領域またはCDRのみが非ヒト配列から構成されるハイブリッド分子が生成される。ヒト化抗体を得るための方法としては、例えば、Winter and Milstein, Nature, 1991, 349:293-299; Rader et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1998, 95:8910-8915; Steinberger et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:36073-36078; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1989, 86:10029-10033; ならびに米国特許第5,585,089号; 第5,693,761号; 第5,693,762号; 及び第6

40

50

, 180, 370号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されているものが挙げられる。

【0272】

4.2.2.ヒト抗体

ヒト抗体は、当技術分野で既知の様々な技法によって、例えば、トランスジェニック動物(例えば、ヒト化マウス)を使用することによって、生成することができる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993, 90: 2551; Jakobovits et al., Nature, 1993, 362: 255-258; Bruggermann et al., Year in Immuno., 1993, 7: 33; ならびに米国特許第5,591,669号、第5,589,369号及び第5,545,807号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照されたい。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーに由来してもよい(例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 1991, 227: 381-388; Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222: 581-597; ならびに米国特許第5,565,332号及び第5,573,905号)(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照されたい)。ヒト抗体は、インビトロ活性化B細胞によつても生成することができる(例えば、米国特許第5,567,610号及び第5,229,275号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照されたい)。ヒト抗体はまた、酵母ベースのライブラリーに由来してもよい(例えば、全体が参照により組み込まれる、米国特許第8,691,730号を参照されたい)。

【0273】

4.3.代替足場

代替足場は、当技術分野で既知の任意の方法によって調製することができる。

【0274】

例えば、Adnectin(商標)を調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Emanuel et al., mAbs, 2011, 3: 38-48に記載されている。iMabを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、米国特許公開第2003/0215914号に記載されている。Anticalin(登録商標)を調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Vogt and Skerra, Chem. Biochem., 2004, 5: 191-199に記載されている。クニツツドメインを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Wagner et al., Biochem. & Biophys. Res. Comm., 1992, 186: 118-1145に記載されている。チオレドキシンペプチドアブタマーを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Geyer and Brent, Meth. Enzymol., 2000, 328: 171-208に提供される。アフィボディを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Fernandez, Curr. Opinion in Biotech., 2004, 15: 364-373に提供される。DARPinを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Zahnd et al., J. Mol. Biol., 2007, 369: 1015-1028に提供される。アフィリンを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Ebersbach et al., J. Mol. Biol., 2007, 372: 172-185に提供される。テトラネクチンを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Graversen et al., J. Biol. Chem., 2000, 275: 37390-37396に提供される。アビマーを調製する方法は、全体が参照により組み込まれる、Silverman et al., Nature Biotech., 2005, 23: 1556-1561に提供される。

【0275】

代替足場に関するさらなる情報は、Binz et al., Nat. Biotech nol., 2005 23: 1257-1268; 及びSkerra, Current

10

20

30

40

50

Opin. in Biotech., 2007 18: 295 - 304 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

【0276】

4.4. 融合タンパク質

融合タンパク質は、当技術分野で既知の標準的な分子生物学的方法を使用して生成することができる。一般に、融合される2種以上のタンパク質、例えば2種以上のABMをコードするポリヌクレオチド配列を合成する。ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列の転写及び翻訳が2種以上のタンパク質（例えば、ABM）を含むポリペプチド鎖の発現をもたらすように設計する。このポリペプチド鎖は「融合タンパク質」といわれる。融合タンパク質の1つの実例はscFvに融合したIgG重鎖である。

10

【0277】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、融合されるタンパク質が直接的に互いに結合するように、またはアミノ酸もしくはポリペプチドリンカーを介して互いに結合するように設計することができる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質中の1つのタンパク質のN末端が、融合タンパク質中の別のタンパク質のC末端に直接続く。いくつかの実施形態では、融合タンパク質に含まれる少なくとも2つのタンパク質の間に单一アミノ酸が存在する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質に含まれる少なくとも2つのタンパク質の間にポリペプチドリンカーが存在する。

【0278】

重鎖に融合したscFvを有する免疫グロブリンを調製する方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Coloma and Morrison, Nature Biotechnol., 1997, 15: 159 - 163に提供される。軽鎖に融合したscFvを有する免疫グロブリンを調製する方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Orcutt et al., Protein Eng., 2010, 23: 221 - 228に提供される。

20

【0279】

酵母及び糸状菌で抗体融合タンパク質を生成する方法は、例えば、Joosten et al., Microbial Cell Factories, 2003, 2: 1; 及びPowers et al., J. Immunol. Meth., 2001, 251: 123 - 136 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。scFv - Fc融合タンパク質を生成する方法は、例えば、Ono et al., J. Biosci. & Bioeng., 2003, 95: 231 - 238; 及びKamihara et al., J. Virology, 2005, 79: 10864 - 10874 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。scFv融合タンパク質の生成のための無細胞方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Kanter et al., Blood, 2007, 109: 3393 - 3399に記載されている。

30

【0280】

4.5. ポリペプチドリンカー

任意の適切なポリペプチドリンカーを使用して、MIAcのABMを互いに結合させることができ、当業者は、ABMの性質及びMIAcの用途に基づいて、適切なポリペプチドリンカーを選択することができる。適切なリンカー組成物は当技術分野で既知であり、本開示の他の個所で記載される。ABMの親和性及びMIAcの生物活性に対する様々なリンカー長の効果を評価することによって、適切なリンカー長を選択することができる。適切なリンカー長の決定は、十分、当業者の能力内である。

40

【0281】

1つの実例として、いくつかの実施形態では、次の組成物及び長さを有する5種のリンカーを試験することによって適切なリンカー長を決定することができる：(2)(GGGGS)（配列番号25）；(2)(GGGGGS)₂（配列番号26）；(3)(GGGGS)₃（配列番号23）；(4)(GGGGGS)₄（配列番号24）；及び(5)(GG

50

GG S)₅ (配列番号27)。5種のリンカーのそれぞれをMICの各ABM間の連結として評価することができ、MICに含めるために、最も良いABMの親和性、MICの生物活性、収率などをもたらす連結を選択することができる。前述のリンカーは例示のためだけに提供され、当業者なら認識するように、評価されるリンカーの組成物及び長さは任意の適切な様式で変動し得る。

【0282】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーは、ポリペプチドリンカーによって連結される2つ以上のABMもコードするポリヌクレオチドにコードされる(例えば、融合タンパク質)。そのようなポリヌクレオチドは、第1のABM、第1のポリペプチドリンカー及び第2のABMをコードするポリヌクレオチドをアセンブルするまたは合成することによって生成することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、第2のポリペプチドリンカー及び第3のABMをさらにコードすることができる。次いで、本明細書に提供され且つ当技術分野で既知の方法に従ってポリヌクレオチドを発現させて、リンカーによって結合した2つ以上のABMを含む融合タンパク質を生成することができる。

10

【0283】

いくつかの実施形態では、ABMを別々に発現させ、ポリペプチドリンカーを使用して、発現後に2つ以上のABMを互いに結合させる。そのような実施形態では、第1のABMと第1のポリペプチドリンカーの間の化学結合の形成に適した条件下で、第1のABMが第1のポリペプチドリンカーと接触する。次いで、第1のポリペプチドリンカーと第2のABMの間の化学結合の形成に適した条件下で、第2のABMが第1のABMと第1のポリペプチドリンカーによって形成されるコンジュゲートと接触する。同様の技法を利用することによって、さらなるABMを第1及び/もしくは第2のABMに、または第1のリンカーにコンジュゲートすることができる。ポリペプチドリンカーとABMの間の化学結合の形成に適した条件は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Hermannson, *Bioconjugate Techniques*, 2013, 3d ed., Academic Press, London, UK, Waltham MA, and San Diego, CAに提供される。

20

【0284】

4.6. 化学的カップリング

30

いくつかの実施形態では、ABMを別々に発現させ、ポリペプチドリンカー以外の化学的カップリング試薬を使用して、発現後に、2つ以上のABMを互いに結合させる。そのような実施形態では、第1のABMと第1の化学的カップリング試薬の間の化学結合の形成に適した条件下で、第1のABMが第1の化学的カップリング試薬と接触する。次いで、第1の化学的カップリング試薬と第2のABMの間の化学結合の形成に適した条件下で、第2のABMが第1のABM及び第1の化学的カップリング試薬によって形成されるコンジュゲートと接触する。同様の技法を利用することによって、さらなるABMを第1及び/もしくは第2のABMに、または第1の化学的カップリング試薬にコンジュゲートすることができる。化学的カップリング試薬とABMの間の化学結合の形成に適した条件は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Hermannson, *Bioconjugate Techniques*, 2013, 3d ed., Academic Press, London, UK, Waltham MA, and San Diego, CAに提供される。

40

【0285】

MICを化学的にカップリングする場合、任意の適切なカップリング試薬を使用することができる。カップリング試薬としては、ゼロレンジスクロスリンカー、ホモ二官能性クロスリンカー、ヘテロ二官能性クロスリンカー、三官能性クロスリンカー、デンドリマー及びデンドロン、化学選択的及びバイオ直交型試薬などが挙げられる。例示的な適切なカップリング試薬としては、例えば、m-マレイミド安息香酸、N-ヒドロキシスクシニミドエステル、グルタルアルデヒド及びカルボジイミドが挙げられる。化学的カップリ

50

ングの他の適切な試薬及びそれらの使用方法は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2013, 3d ed., Academic Press, London, UK, Waltham MA, and San Diego, CAに記載されている。抗体同士の化学的カップリングは、例えば、Wong et al., Scand. J. Rheumatol., 2000, 29: 282-287; Jung et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21: 2431-2435; Tutt et al., J. Immunol., 1991, 147: 60-69; French, Methods Mol. Biol., 1998, 80: 121-134; 及びGavrillyuk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19: 3716-3720(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。
10

【0286】

5. M I A Cを生成するためのベクター、宿主細胞及び方法

5. 1 ベクター

本発明は、M I A Cをコードする単離核酸、その核酸を含むベクター及び宿主細胞ならびにM I A Cを生成するための組換え技法も提供する。

【0287】

本明細書で提供されるM I A Cの組換え体生成については、M I A Cをコードする核酸(複数可)を単離し、さらなるクローニング(すなわち、DNAの増幅)または発現のための複製可能なベクターに挿入することができる。いくつかの態様では、核酸は、例えば、全体が参照により組み込まれる、米国特許第5,204,244号に記載されているように、相同組換えによって生成することができる。
20

【0288】

多くの異なるベクターが当技術分野で既知である。ベクター成分としては、例えば、全体が参照により組み込まれる、米国特許第5,534,615号に記載されているように、一般に、限定されないが、以下の1つまたは複数が挙げられる:シグナル配列、複製開始点、1種または複数種のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター及び転写終結配列。

【0289】

5. 2. 宿主細胞

任意の適切な宿主細胞を使用して、本明細書で提供されるM I A Cを生成することができる。適切な宿主細胞の実例を以下に提供する。これらの宿主細胞は、限定することを意図するものではない。
30

【0290】

適切な宿主細胞としては、任意の原核生物(例えば、細菌)、下等真核生物(例えば、酵母)または高等真核生物(例えば、哺乳類)の細胞が挙げられる。適切な原核生物としては、グラム陰性生物またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば、エシェリキア属(*Escherichia*)(*E. coli*)、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、プロテウス属(*Proteus*)、サルモネラ属(*Salmonella*) (ネズミチフス菌(*S. typhimurium*))、セラチア属(*Serratia*) (靈菌(*S. marcescans*))、シゲラ属(*Shigella*)、桿菌(*Bacillus*) (枯草菌(*B. subtilis*))及びバチルス・リケニフォルミス(*B. licheniformis*))、シュードモナス属(*Pseudomonas*) (綠膿菌(*P. aeruginosa*))ならびに、ストレプトミセス属(*Streptomyces*)などの腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)が挙げられる。1つの有用な*E. coli*クローニング宿主は*E. coli* 294であるが、*E. coli* B、*E. coli* X1776及び*E. coli* W3110などの他の系統も適切である。
40

【0291】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物も、M I A Cをコードするベクタ

10

20

30

40

50

ーに適したクローニング用または発現用宿主である。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) または一般的なパン酵母は、一般に使用される下等真核生物の宿主微生物である。しかし、いくつかの他の属、種及び系統が利用可能且つ有用であり、例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロミセス属 (*Kluyveromyces*) (*K. lactis*)、*K. fragilis*、*K. bulgaricus*、*K. wickeramii*、*K. waltii*、*K. drosophilae*、*K. marxi*、*K. Yarrowia*、*K. pastoris*、*Candida* (*C. albicans*)、*Trichoderma reesiae*、*Neurospora crassa*、*Schwanniomyces* (*S. occidentalis*) ならびに、例えば、*Penicillium* (*P. chrysogenum*)、*Tolypocladium* 及び *Aspergillus* (*A. nidulans*) 及び *A. niger* などの糸状菌である。
10

【0292】

有用な哺乳類宿主細胞としては、COS-7細胞、HEK293細胞；ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞；チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)；マウスセルトリ細胞；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76) などが挙げられる。
20

【0293】

本明細書で提供されるM1ACを生成するのに使用する宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。例えば、ハムF10、最少必須培地 (MEM)、RPMI-1640 及びダルベッコ改変イーグル培地 (D MEM) などの市販培地は、宿主細胞を培養するのに適する。さらに、Ham et al., Meth. Enz., 1979, 58: 44; Barnes et al., Anal. Biochem., 1980, 102: 255; ならびに米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号及び第5,122,469号またはWO90/03430 及びWO87/00195に記載されている培地のうちのいずれかを使用することができる。本段落で引用する参考文献のそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる。
30

【0294】

これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモン及び/または他の増殖因子 (例えば、インスリン、トランスフェリンまたは上皮増殖因子)、塩 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、緩衝剤 (例えば、HEPES)、ヌクレオチド (例えば、アデノシン及びチミジン)、抗生物質、微量元素 (マイクロモル濃度範囲の終濃度で通常存在する無機化合物と定義される) 及びグルコースまたは同等のエネルギー源を補充することができる。任意の他の必要な補充物も当業者に知られるであろう適切な濃度で含めることができる。
40

【0295】

培養条件、例えば温度、pHなどは、発現用に選択された宿主細胞とともに以前に使用されたものであり、当業者に明らかであろう。

【0296】

5.3. M1ACの生成

組換えタンパク質生成の一般的な方法、特に、抗体の生成方法を、本明細書で提供されるM1ACの生成に適用することができる。抗体の生成方法のさらなる詳細は、A1-Rubeai, ed., *Antibody Expression and Production*, 2011, Springer, Heidelberg, London, New
50

Y o r k に提供される。

【 0 2 9 7 】

例えば、いくつかの実施形態では、M I A C は、ペリプラズム空間において細胞内に生成されるか、培地に直接分泌される。M I A C が細胞内に生成される場合は、第1ステップとして、粒子状の残屑、すなわち宿主細胞または溶解された断片のいずれかを、例えば遠心分離または限外濾過によって除去する。例えば、C a r t e r e t a l . (B i o / T e c h n o l o g y , 1 9 9 2 , 1 0 : 1 6 3 - 1 6 7 ; その全体が参照により組み込まれる) は、E . c o l i のペリプラズム空間に分泌されたA B M を単離する手順を記載している。手短に言えば、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(p H 3 . 5)、E D T A 及びフッ化フェニルメチルスルホニル(P M S F) の存在下で、約30分にわたって解かす。遠心分離によって、細胞残屑を除去することができる。

10

【 0 2 9 8 】

いくつかの実施形態では、M I A C は無細胞系で生成される。いくつかの態様では、その全体が参照により組み込まれるY i n e t a l . , m A b s , 2 0 1 2 , 4 : 2 1 7 - 2 2 5 に記載されているように、無細胞系はインビトロ転写及び翻訳系である。いくつかの態様では、無細胞系は真核細胞または原核細胞からの無細胞抽出物を利用する。いくつかの態様では、原核細胞はE . c o l i である。M I A C の無細胞発現は、例えば、M I A C が不溶性凝集物として細胞中に蓄積する場合、またはペリプラズム発現からの收率が低い場合に、有用であり得る。

20

【 0 2 9 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A C は、細胞によって発現され、アセンブルする。いくつかの実施形態では、細胞は、完全に形成され、適切にアセンブルされたM I A C を分泌することができる、酵母細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A C は、アセンブリを完了するために、さらなる処理(例えば、重鎖及び/または軽鎖の間のジスルフィド結合の形成)を必要とする。組換えで発現され、精製された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖からの機能的A B M のアセンブリは、例えば、全体が参照により組み込まれる、B o s s e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 9 8 4 , 1 2 : 3 7 9 1 - 3 8 0 6 に記載されている。そのような技法は、本開示で記載されるものの中でも、免疫グロブリン重鎖を含む融合タンパク質及び/または免疫グロブリン軽鎖を含む融合タンパク質をアセンブルするために容易に適合させることができることを当業者は認識するであろう。

30

【 0 3 0 0 】

M I A C が培地中に分泌される場合は、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、A m i c o n (登録商標) またはM i l l i p o r e (登録商標) P e l l c o n (登録商標) 限外濾過ユニットを使用して、そのような発現系由来の上清を最初に濃縮する。タンパク質分解を阻害するために、P M S F などのプロテアーゼ阻害剤を前述のステップのいずれかに含めることができ、外来性汚染物の増殖を防止するために、抗生物質を含めることができる。

【 0 3 0 1 】

細胞から調製したM I A C 組成物を、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが特に有用な精製技法である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、M I A C 中に存在する任意の免疫グロブリンF c ドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト1、2または4重鎖に基づくM I A C を精製することができる(全体が参照により組み込まれる、L i n d m a r k e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h . , 1 9 8 3 , 6 2 : 1 - 1 3)。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプ及びヒト3に有用である(全体が参照により組み込まれる、G u s s e t a l . , E M B O J . , 1 9 8 6 , 5 : 1 5 6 7 - 1 5 7 5)。

40

【 0 3 0 2 】

50

親和性リガンドが結合するマトリックスは大抵の場合アガロースであるが、他のマトリックスが利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースによって達成されるよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。M I A C が C H 3 ドメインを含む場合は、B a k e r B o n d A B X (登録商標)樹脂が精製に有用である。

【0303】

タンパク質精製に関する他の技法、例えば、イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相H P L C、シリカによるクロマトグラフィー、heparin Sepharose (登録商標)によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E 及び硫酸アンモニウム沈殿も利用可能であり、当業者によって適用され得る。

10

【0304】

任意の予備的な精製ステップ(複数可)に続いて、目的のM I A C 及び夾雑物を含む混合物を、約2.5～約4.5の間のp Hの溶出緩衝液を使用して、一般に低塩濃度(例えば、約0～約0.25Mの塩)で行われる、低p H疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することができる。

【0305】

ある場合には、複数の分子種を形成するために、本明細書に記載のM I A C の個々の成分をアセンブルすることができる。この場合は、クロマトグラフィーなどの標準的な技法を使用して、所望の分子種を複数種から精製することができる。

【0306】

さらに、「ノブ及びホール」アプローチなどの技法を使用して、適切にアセンブルされたM I A C の生成を支持することができ、これによって、望まれない分子種を除去する必要性が低減また排除される。米国特許第5,731,168号；第7,695936号；第8,642,745号；及び第8,679,785号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照されたい。

20

【0307】

いくつかの実施形態では、1つより多い抗原を認識するA B Mを生成することが有用であり得る。そのようなA B Mを生成するために、上記のノブ及びホールアプローチを含めた任意の適切な技法を使用することができる。いくつかの実施形態では、1つより多い抗原を認識するA B Mは、異なる抗原を認識する単一ドメイン抗体を単離し、次いでそれらを、単一ドメイン抗体によって認識される異なる抗原のそれぞれを認識する分子中に組み合わせることによって開発される。例えば、いくつかの実施形態では、1つの抗原と結合する単一軽鎖抗体と、別の抗原と結合する単一の重鎖抗体を組み合わせて、両方の抗原に結合するインタクトな免疫グロブリンまたはそのフラグメントを形成する。

30

【0308】

多特異性A B Mは、Z y m e w o r k s I n c の A z y m e t r i c (商標) プラットフォームを使用して生成することもできる。そのような多特異性A B M及びその作製方法は、例えば、米国特許公開第2012/0149876号；第2012/0244577号；第2013/0195849号；第2013/0336973号；第2014/0051835号；第2014/0066378号；第2014/0072581号；及び第2014/0200331号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

40

【0309】

6. コンジュゲート

いくつかの実施形態では、M I A C を剤にコンジュゲートすることができる。有用な剤としては、例えば、治療剤及び診断剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、剤は、リンカーを用いてM I A C にコンジュゲートされる。いくつかの態様では、リンカーは生分解性リンカーである。

【0310】

適切な剤及びリンカーを当業者は選択することができる。リンカー及び剤についてのさ

50

らに多くの情報は、例えば、Gerber et al., Nat. Prod. Rep., 2013, 30: 625-639; Alley et al., Current Opinion in Chemical Biology, 2010, 14: 529-537; 及び米国特許第5,010,176号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に見出すことができる。さらなる治療剤は以下に記載され、これらを、本明細書で提供されるM I A Cにコンジュゲートすることもできる。

【0311】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A CのA B Mは、マスキング部分及び切斷可能部分を含む。マスキング部分は、A B Mのその標的への結合を阻害する。マスキング部分の阻害活性は、切斷可能部分の切斷後に低減または排除される。そのようなA B Mは、切斷可能部分が未切斷である場合A B Mが標的に接近しにくく、且つ切斷剤の存在下で切斷可能部分が切斷された後に標的により接触しやすくなるように、「活性化可能な」コンフォメーションを示す。マスキング部分及び切斷可能部分を利用する活性化可能な結合ポリペプチドの例及びそれを得る方法は、米国特許公開第2010/0189651; 第2010/0221212号; 第2013/0101555号; 第2013/0309230号; 第2013/0315906号; 第2014/0023664号; 第2014/0045195号; 第2014/0024810号; 第2014/0235467号; 第2014/0255313号; 及び米国特許第8,399,219号; 第8,513,390号; 第8,518,404号; 第8,541,203号; 第8,529,898号; 第8,563,269号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に提供される。

10

20

20

【0312】

7. 医薬組成物及び投与方法

本明細書で提供されるM I A Cは、任意の適切な医薬組成物中に提供することができ、任意の適切な投与経路で投与することができる。適切な投与経路としては、限定されないが非経口、吸入、動脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、経鼻、肺及び皮下経路が挙げられる。

30

【0313】

医薬組成物は、1種または複数種の医薬品賦形剤を含むことができる。任意の適切な医薬品賦形剤を使用することができ、当業者は適切な医薬品賦形剤を選択することができる。したがって、以下に提供される医薬品賦形剤は例示を意図し、限定することを意図するものではない。さらなる医薬品賦形剤としては、例えば、全体が参照により組み込まれる、Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rouse et al. (Eds.), 6th Ed. (2009)に記載されているものが挙げられる。

【0314】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は溶媒を含む。いくつかの態様では、溶媒は、生理食塩水、例えば無菌の等張生理食塩水、またはデキストロース溶液である。いくつかの態様では、溶媒は注射用水である。

40

【0315】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は消泡剤を含む。任意の適切な消泡剤を使用することができる。いくつかの態様では、消泡剤はアルコール、エーテル、油、ワックス、シリコーン、界面活性剤及びこれらの組み合わせから選択される。いくつかの態様では、消泡剤は、鉱物油、植物油、エチレンビスステアロアミド、パラフィンワックス、エステルワックス、脂肪アルコールワックス、長鎖脂肪アルコール、脂肪酸石鹼、脂肪酸エステル、シリコングリコール、フルオロシリコーン、ポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコールコポリマー、ポリジメチルシロキサン-二酸化ケイ素、エーテル、オクチルアルコール、カプリルアルコール、ソルビタントリオレート、エチルアルコール、2-エチル-ヘキサノール、ジメチコン、オレイルアルコール、シメチコン及びこれらの組み合わせから選択される。

50

【0316】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は共溶媒を含む。共溶媒の実例としては、エタノール、ポリ(エチレン)グリコール、ブチレングリコール、ジメチルアセトアミド、グリセリン及びプロピレングリコールが挙げられる。

【0317】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は緩衝剤を含む。緩衝剤の実例としては、酢酸塩、ホウ酸塩、炭酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、水酸化物、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、グリシン、メチオニン、グーガム及びグルタミン酸モノナトリウムが挙げられる。

【0318】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は担体または充填剤を含む。担体または充填剤の実例としては、ラクトース、マルトデキストリン、マンニトール、ソルビトール、キトサン、ステアリン酸、キサンタンガム及びグーガムが挙げられる。

【0319】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は界面活性剤を含む。界面活性剤の実例としては、d-アルファトコフェロール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、ドクサートナトリウム、ベヘン酸グリセリル、モノオレイン酸グリセリル、ラウリン酸、マクロゴール15ヒドロキシステアレート、ミリスチルアルコール、リン脂質、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシエチレン、ポリオキシルグリセリド、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステル及びビタミンEポリエチレン(グリコール)スクシネートが挙げられる。

【0320】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は固化防止剤を含む。固化防止剤の実例としては、リン酸カルシウム(三塩基性)、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース及び酸化マグネシウムが挙げられる。

【0321】

医薬組成物とともに使用することができる他の賦形剤としては、例えば、アルブミン、抗酸化剤、抗菌剤、抗真菌剤、生体吸収性ポリマー、キレート剤、制御放出剤、希釈剤、分散剤、溶解増強剤、乳化剤、ゲル化剤、軟膏基剤、浸透促進剤、防腐剤、可溶化剤、溶媒、安定化剤及び糖が挙げられる。これらの剤のそれぞれの具体例は、例えば、全体が参照により組み込まれる、Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (Eds.) 6th Ed. (2009), The Pharmaceutical Pressに記載されている。

【0322】

いくつかの実施形態では、医薬組成物はマイクロ粒子またはナノ粒子などの粒子形態である。マイクロ粒子及びナノ粒子は、任意の適切な材料、例えば、ポリマーまたは脂質から形成することができる。いくつかの態様では、マイクロ粒子またはナノ粒子はミセル、リポソームまたはポリマーソームである。ある種の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、医薬組成物または単一単位剤形である。本明細書で提供される医薬組成物及び単一単位剤形は、予防的または治療的有効量の1種または複数種の予防的または治療的MICを含む。

【0323】

水がいくつかのMICの分解を促進する可能性があるので、MICを含む無水の医薬組成物及び剤形が本明細書にさらに包含される。

【0324】

本明細書で提供される無水の医薬組成物及び剤形は、無水成分または低水分含有成分及び低水分または低湿度条件を使用して調製することができる。製造、包装及び/または貯蔵中に水分及び/または湿度との実質的な接触が予想される場合、ラクトース及び一級または二級アミンを含む少なくとも1つの活性成分を含む医薬組成物及び剤形は無水であり

10

20

30

40

50

得る。

【0325】

無水の医薬組成物は、その無水性が維持されるように調製及び貯蔵されるべきである。したがって、無水組成物を適切な製剤用キット中に含めることができるように、水への暴露を防止することができている材料を使用して無水組成物を包装することができる。適切な包装の例としては、限定されないが、密封されたホイル、プラスチック、単位用量容器（例えば、バイアル）、プリスター・パック及びストリップ・パックが挙げられる。

【0326】

7.1. 非経口剤形

ある種の実施形態では、M I A C を含む非経口剤形が提供される。非経口剤形は、限定されないが、皮下、静脈内（ボーラス注射を含める）、筋肉内及び動脈内を含めた、様々な経路で対象に投与することができる。それらの投与は、典型的には汚染物に対する対象の自然防御を迂回するので、非経口剤形は、典型的には、無菌であるか、対象への投与に先立って無菌化することができる。非経口剤形の例としては、限定されないが、注射用液剤、注射用の医薬的に許容可能なビヒクルに容易に溶解または懸濁される乾燥製品、注射用懸濁剤及び乳剤が挙げられる。

10

【0327】

非経口剤形を提供するのに使用することができる適切なビヒクルは当業者に周知である。例としては、限定されないが、以下が挙げられる：注射用水 U S P；水性ビヒクル、例えば、限定されないが、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースと塩化ナトリウムの注射液及び乳酸化リンガー注射液；水混和性ビヒクル、例えば限定されないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコール；ならびに非水性ビヒクル、例えば限定されないが、トウモロコシ油、綿実油、ピーナッツ油、ゴマ油、オレイン酸エチル、イソプロピルミリストート及びベンジル安息香酸。

20

【0328】

本明細書に開示されるM I A C の1つまたは複数の溶解度を増大させる賦形剤を非経口剤形に組み入れることもできる。

【0329】

8. アッセイ

30

活性用の任意の適切なインビトロまたはインビボアッセイを使用して、本明細書で提供されるM I A C の活性を評価することができる。いくつかの実施形態では、多数のM I A C 構築物を効率的に調べることを可能にするために、これらのアッセイをハイスループットアプローチに適合させることができる。

【0330】

いくつかの実施形態では、アッセイはエフェクター細胞の増殖を測定する。任意の適切なアッセイを使用して、エフェクター細胞の増殖を測定することができる。エフェクター細胞の増殖を測定するのに適したアッセイとしては、例えば、³H - チミジンの取り込み、C F S E (カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル) 希釀アッセイ及びK i 6 7 抗原発現の抗体検出が挙げられる。Gong and Klingemann, , Leukemia, 1994, 8: 652 - 658; Parish, Immunol. Cell Biol., 1999, 77: 499 - 508; ならびに Lyons, J. Immunol. Methods, 2000, 243: 147 - 154、及び Soares, J. Immunol. Methods, 2010, 362 (1 - 2): 43 - 50 (これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる) を参照されたい。

40

【0331】

いくつかの実施形態では、アッセイは、エフェクター細胞の刺激及び/または抑制を測定する。いくつかの実施形態では、サイトカイン及び/またはケモカインの生成を測定することによって、エフェクター細胞の活性化及び/または抑制を評価することができる。任意の適切なサイトカイン及び/またはケモカインの生成を測定することができる。いく

50

つかの実施形態では、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-12p70、IL-15、MIP-アルファ/ベータ、RANTESから選択される1種または複数種のサイトカイン及び/またはケモカインの生成を測定する。任意の適切なアッセイを使用して、サイトカイン及び/またはケモカインの生成を測定することができる。適切なアッセイとしては、例えば、BD(商標)サイトメトリックビーズアレイ(CBA)アッセイ(BD Biosciences)、Luminex(登録商標)×MAP(登録商標)技術(Luminex Corporation)及びELISpotアッセイ(例えば、Mabtech、ProImmune)が挙げられる。

【0332】

10

いくつかの実施形態では、アッセイは、エフェクター細胞の細胞傷害活性を測定する。任意の適切なアッセイを使用して、エフェクター細胞の細胞傷害活性を測定することができる。エフェクター細胞の細胞傷害活性の測定に適したアッセイとしては、例えば、クロム51放出アッセイ、グランザイムB ELISpotまたはLuminexアースのアッセイ、CD107aの細胞表面動員の測定、カスパーゼ-3アッセイ、フルオロフォアPKH-26及びTO-PRO-3ヨウ化物を用いるフローサイトメトリーアッセイならびにADCCアッセイ、例えば、ADCCレポーターバイオアッセイ(Promega)が挙げられる。Shafer-Weaver et al., J. Transl. Med., 2003, 1:14; Rininsland et al., J. Immunol. Methods, 2000, 240:143-155; Betts et al., J. Immunol. Methods, 2003, 28:65-78; Jerome et al., Apoptosis, 2003, 8:563-571; He et al., J. Immunol. Methods, 2005, 304:43-59; Lee-Macary et al., J. Immunol. Methods, 2001, 252:83-92; and Aktas et al., Cell. Immunol., 2009, 254:149-154を参照されたい。

20

【0333】

30

いくつかの実施形態では、アッセイはエフェクター細胞の健全性を測定する。任意の適切なアッセイを使用して、エフェクター細胞の健全性を測定することができる。エフェクター細胞の健全性を測定するのに適したアッセイとしては、例えば、アポトーシスについてのアッセイが挙げられる。アネキシンVアッセイ及びアネキシンV FITCアッセイ(例えば、BD Biosciences)を含めた任意の適切なアッセイを使用して、アポトーシスを測定することができる。Vermes et al., J. Immunol. Methods, 1995, 84:39-51; 及びPoggio et al., J. Immunol., 2005, 17:2653-2660を参照されたい。

【0334】

40

9. 投薬量及び単位剤形

ヒトの治療法では、医師は、予防的または治癒的治療に従って、ならびに年齢、体重、状態及び治療される対象に特異的な他の要因に従って、最も適切だと考える薬量を決定する。

【0335】

障害またはその1つもしくは複数の症状の予防または治療に有効であろうMIAcの量は、疾患または状態の性質及び重症度ならびにMIAcが投与される経路によって変化する。頻度及び投薬量も、施される特定の療法(例えば、治療剤または予防剤)、障害、疾患または状態の重症度、投与経路ならびに対象の年齢、身体、体重、応答及び既往歴に応じて、各対象に特異的な要因によって変動する。インビトロまたは動物モデルの試験系に由来する用量応答曲線から、有効量を外挿することができる。

【0336】

ある種の実施形態では、組成物の例示的用量としては、対象または試料の重量のキログラムあたりでミリグラムまたはマイクログラム量のMIAc(例えば、キログラムあたり

50

約 10 マイクログラム～キログラムあたり約 50 ミリグラム、キログラムあたり約 100 マイクログラム～キログラムあたり約 25 ミリグラム、またはキログラムあたり約 100 マイクログラム～キログラムあたり約 10 ミリグラム) が挙げられる。ある種の実施形態では、対象の障害またはその 1 つもしくは複数の症状を予防する、治療する、管理する、または好転させるために投与される M I A C の重量に基づく、本明細書で提供される M I A C の投薬量は、対象の体重について 0.1 mg / kg、1 mg / kg、2 mg / kg、3 mg / kg、4 mg / kg、5 mg / kg、6 mg / kg、10 mg / kg または 15 mg / kg またはそれ以上である。別の実施形態では、対象の障害またはその 1 つもしくは複数の症状を予防する、治療する、管理する、または好転させるために投与される、本明細書で提供される M I A C の投薬量は、0.1 mg ~ 200 mg、0.1 mg ~ 100 mg、0.1 mg ~ 50 mg、0.1 mg ~ 25 mg、0.1 mg ~ 20 mg、0.1 mg ~ 15 mg、0.1 mg ~ 10 mg、0.1 mg ~ 7.5 mg、0.1 mg ~ 5 mg、0.1 ~ 2.5 mg、0.25 mg ~ 20 mg、0.25 ~ 15 mg、0.25 ~ 12 mg、0.25 ~ 10 mg、0.25 mg ~ 7.5 mg、0.25 mg ~ 5 mg、0.25 mg ~ 2.5 mg、0.5 mg ~ 20 mg、0.5 ~ 15 mg、0.5 ~ 12 mg、0.5 ~ 10 mg、0.5 mg ~ 7.5 mg、0.5 mg ~ 5 mg、0.5 mg ~ 2.5 mg、1 mg ~ 20 mg、1 mg ~ 15 mg、1 mg ~ 12 mg、1 mg ~ 10 mg、1 mg ~ 7.5 mg、1 mg ~ 5 mg または 1 mg ~ 2.5 mg である。

10

【0337】

用量は、適切なスケジュールに従って、例えば、毎週 1 回、2 回、3 回もしくは 4 回；毎月 1 回、2 回、3 回もしくは 4 回；または毎年 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回、11 回もしくは 12 回投与することができる。当業者に明らかのように、ある場合には、本明細書に開示される範囲を外れた M I A C の投薬量を使用することが必要であり得る。さらに、臨床医または治療担当医師が、対象の応答に関連して、療法を中断する、調整するまたは終了する方法及び時期を知ることに留意されたい。

20

【0338】

当業者なら容易に分かるように、異なる疾患及び状態に対して異なる治療有効量が適用可能である。同様に、そのような障害を予防する、管理する、治療する、または好転させるのに十分であるが、本明細書で提供される M I A C に付随する有害作用を引き起こすのには不十分であるか、そうした有害作用を低減させるのに十分である量も、本明細書に記載される投薬量及び投与頻度スケジュールに包含される。さらに、対象が本明細書で提供される組成物の複数の投薬量を投与される場合は、投薬量のすべてが同じである必要はない。例えば、対象に投与される投薬量は、組成物の予防的または治療的効果を向上させるために増大させることができ、または特定の対象が経験する 1 種または複数種の副作用を低減させるために低下させることができる。

30

【0339】

ある種の実施形態では、治療または予防は、本明細書で提供される M I A C または組成物の 1 種または複数種の負荷量で開始し、その後に 1 種または複数種の維持量を続けることができる。

40

【0340】

ある種の実施形態では、対象の血液または血清において M I A C の定常状態濃度を達成するように、本明細書で提供される M I A C または組成物の用量を投与することができる。定常状態濃度は、当業者が利用可能な技法に従って測定することによって決定することができ、または対象の身体的特徴、例えば、身長、体重及び年齢に基づき得る。

【0341】

ある種の実施形態では、同じ組成物の投与を繰り返すことができ、少なくとも 1 日、2 日、3 日、5 日、10 日、15 日、30 日、45 日、2 か月、75 日、3 か月または 6 か月、投与を離すことができる。他の実施形態では、同じ予防剤または治療剤の投与を繰り返すことができ、少なくとも 1 日、2 日、3 日、5 日、10 日、15 日、30 日、45 日、2 か月、75 日、3 か月または 6 か月、投与を離すことができる。

50

【0342】

ある種の実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cをさらなる治療剤と一緒に投与することができる。さらなる治療剤の例示としては、例えば、アルキル化剤（例えば、ベンダムスチン、ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、ダカルバジン、イホスファミド、メルファラン、プロカルバジン、ストレプトゾシン、テモゾロミド）；代謝拮抗薬（例えば、アスパラギナーゼ、カペシタбин、シタラビン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、ゲムシタбин、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド）；抗腫瘍抗生物質（例えば、アクチノマイシンD、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシン、ミトキサンtron）；微小管阻害剤（例えば、エトポシド、ドセタキセル、イリノテカン、パクリタキセル、トポテカン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン）；DNA結合剤（例えば、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン）；生物学的剤（例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ブレンツキシマブ、セツキシマブ、デノスマブ、イブリツモマブ、インターフェロン、イピリムマブ、オビヌツズマブ、オファツムマブ、パニツムマブ、ラムシルマブ、リツキシマブ、ルクソリチニブ、シルツキシマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ）；キナーゼ阻害剤（例えば、アファチニブ、アキシチニブ、ボスチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イブルチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、パゾパニブ、ポナチニブ、レゴラフェニブ、ルクソリチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラメチニブ、パンデタニブ、ベムラフェニブ）；ラパマイシン誘導体（例えば、ラパマイシン、シロリムス、テムシロリムス、エベロリムス、デフォロリムス）；ビスホスホネート（例えば、クロドロネート、イバンドロン酸、パミドロネート、ゾレドロン酸）；ならびにホルモン及び他の薬物（例えば、アナストロゾール、アビラテロン、アミホスチン、ベキサロテン、ビカルタミド、ブセレリン、シプロテロン、デガレリクス、エキセメスタン、フルタミド、フォリン酸、フルベストラント、ゴセレリン、ランレオチド、レナリドマイド、レトロゾール、リュープロレリン、メドロキシログステロン、メゲストロール、メスナ、オクトレオチド、スチルベストロール、タモキシフェン、サリドマイド、トリプトレリン）が挙げられる。

【0343】

本明細書で提供されるM I A Cとともに有用なさらなる治療剤の追加例としては、アビラテロン、アルデスロイキン、アミノレブリン酸、アプレピタント、アナストロゾール、ベンダムスチン、ベキサロテン、ビカルタミド、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カバジタキセル、カボザンチニブ-S-リンゴ酸塩、カペシタбин、カルボプラチニン、カルフィルゾミブ、クロラムブシル、クロファラビン、シスプラチニン、シタラビン、ダクチノマイシン、ダブラフェニブ、ダカルバジン、ダサチニブ、デシタбин、デガレリクス、デニロイキンジフチトクス、デキスラゾキサン、ドセタキセル、エルトロンボバグ、エンザルタミド、エピルビシン、エリプリン、エルロチニブ、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲムシタбин、グルカルピダーゼ、ゴセレリン、イホスファミド、イミキモド、インターフェロンアルファ-2b、イリノテカン、イキサベピロン、レナリドマイド、レトロゾール、ロイコボリン、リュープロリド、ロムスチン、メクロレタミン、メゲストロール、メルカブトブリン、メシレート、マイトマイシンC、ナベルビン、ネララビン、オマセタキシン、オキサリプラチニン、パクリタキセル、パリフェルミン、パロノセトロン、パミドロネート、ペメトレキセド、ブレリキサホル、ポマリドミド、ポナチニブ、プララトレキサート、プロカルバジン、ラロキシフェン、ラスブリカーゼ、ロミデプシン、ロミプロスチム、テモゾロミド、トポテカン、トレミフェン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ボリノスタット、ビスモデギブ及びゾレドロン酸が挙げられる。

【0344】

これらの剤は、本明細書で提供されるM I A Cと同時に投与することができ、または任意の適切なスケジュールに従って投与することができる。いくつかの実施形態では、剤は本明細書で提供されるM I A Cとともに単位剤形中に製剤化される。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、剤は本明細書で提供されるM I A Cにコンジュゲートされる。

【0345】

10. 治療適用

治療適用については、本発明のM I A Cは、当技術分野で既知のもの及び上述のものなどの医薬的に許容可能な剤形で、哺乳動物、一般にヒトに投与される。例えば、本発明のM I A Cは、ヒトに対して、ボーラスとしてまたはある期間にわたる持続注入によって静脈内に、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内または腫瘍内の経路によって、投与することができる。M I A Cはまた、局部的及び全身的な治療効果を発揮するために、腫瘍周囲、病巣内または病変周囲経路によって適切に投与される。腹腔内経路は、例えば卵巣腫瘍の治療において、特に有用であり得る。

10

【0346】

本明細書で提供されるM I A Cは、標的にするエフェクター細胞の活性化が治療上有効である任意の疾患または状態、例えば癌の治療に有用であり得る。

【0347】

任意の適切な癌を本明細書で提供されるM I A Cで治療することができる。例示的な適切な癌としては、例えば、急性リンパ性白血病 (A L L)、急性骨髓性白血病 (A M L)、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、脳腫瘍、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳癌、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、原発不明癌、心臓腫瘍、子宮頸癌、脊索腫、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髓性白血病 (C M L)、慢性骨髓増殖性新生物、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、腺管癌、胚芽腫、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、線維性組織球腫、ユーリング肉腫、眼癌、胚細胞腫瘍、胆嚢癌、胃癌 (g a s t r i c c a n c e r)、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、頭頸部癌、ヘアリーセル白血病、肝細胞癌、組織球増殖症、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内黒色腫、膵島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓癌、ラングルハンス細胞組織球症、喉頭癌、白血病、唇及び口腔の癌、肝臓癌、非浸潤性小葉癌、肺癌、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明の転移性扁平上皮頸部癌、N U T 遺伝子関与正中管癌腫 (m i d l i n e t r a c t c a r c i n o m a i n v o l v i n g N U T g e n e)、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髓腫、菌状息肉症、骨髓異形成症候群、骨髓異形成 / 骨髓増殖性新生物、鼻腔及び副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、乳頭腫症、傍神経節腫、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎孟及び尿管の癌、網膜芽細胞腫、ラブドトイド腫瘍、唾液腺癌、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟部組織肉腫、脊髄腫瘍、胃癌 (s t o m a c h c a n c e r)、T細胞リンパ腫、奇形腫、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宮癌、腔癌、外陰癌ならびにウィルムス腫瘍が挙げられる。

20

【0348】

いくつかの実施形態では、有効量のM I A Cを対象に投与することを含む、疾患有する対象を治療する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、有効量のM I A C含有医薬組成物を対象に投与することを含む、疾患有する対象を治療する方法が本明細書で提供される。いくつかの態様では、疾患は癌である。

30

【0349】

いくつかの実施形態では、癌細胞をM I A Cと接触させることを含む癌細胞を死滅させる方法であって、M I A Cが癌細胞を死滅させるエフェクター細胞を活性化する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、方法はインビトロ法である。いくつかの実施形態では、方法はインビボ法である。

40

【0350】

エフェクター細胞をM I A Cと接触させることを含むエフェクター細胞を活性化する方法であって、M I A Cがエフェクター細胞を活性化する方法も提供される。いくつかの実

50

施形態では、方法はインピトロ法である。いくつかの実施形態では、方法はインピボ法である。いくつかの態様では、方法は癌細胞に近接して行われる。いくつかの態様では、近接は、エフェクター細胞が癌細胞に対して細胞傷害活性を発揮するほど十分に近いものである。

【0351】

11. 診断適用

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは診断適用で使用される。例えば、検出可能な部分でM I A Cを標識することができる。適切な検出可能な部分としては、限定されないが、放射性同位体、蛍光標識及び酵素・基盤標識が挙げられる。

【0352】

12. キット

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるM I A Cは、キットの形態で提供される。いくつかの実施形態では、キットは、手順を実施ための説明書とともに、所定量の試薬のパッケージ化された組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、手順は治療手順である。他の実施形態では、手順は診断アッセイである。さらに他の実施形態では、手順は研究アッセイである。

【0353】

いくつかの実施形態では、キットはM I A Cを再構成するための溶媒をさらに含む。いくつかの実施形態では、M I A Cは医薬組成物の形態で提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は凍結乾燥した医薬組成物である。

10

20

30

40

【実施例】

【0354】

実施例1：M I A C 1 : C D 3 0 、 C D 1 3 7 及び阻害性K I Rを標的とするI g G - s c F v - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は古典的ホジキンリンパ腫及び全身性未分化大細胞型リンパ腫で発現されるタンパク質であるC D 3 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるC D 1 3 7と結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性K I R受容体と結合し、これに拮抗する。

【0355】

本実施例では、A B M 1はブレンツキシマブ(Adcetris(登録商標))由来のI g Gである。A B M 2は、ウレルマブ(Bristol-Myers Squibb)から生成したs c F vである。A B M 3はリリルマブ(Innate Pharma)から生成したs c F vである。重鎖と軽鎖の間に(G G G G S)₄(配列番号24)リンカーを使用して、標準的な技法によって、s c F vをアセンブルする。両方の順序(すなわち、V_H-リンカー-V_L及びV_L-リンカー-V_H)でs c F vをアセンブルする。Pluckthun A. (1994). Antibodies from Escherichia coli. In Rosenberg M. & Moore G. P. (Eds.), The Pharmacology of Monoclonal Antibodies vol. 113 (pp. 269-315)を参照されたい。

【0356】

標準的な分子生物学的技法を使用して、3つのA B M及び適切な融合タンパク質をコードする核酸をアセンブルする。本実施例で使用する融合タンパク質は、(1)V_H-A B M 2融合、(2)V_H-A B M 3融合、(3)V_L-A B M 2融合及び(4)V_L-A B M 3融合を含む。

【0357】

本実施例では、2つのA B M 1部位が存在し、これらは、I g Gの4つの可変ドメイン(2つのV_H及び2つのV_L)によって形成される。以下に記載のように、A B M 2及びA B M 3部位の数は変動する。本実施例のM I A Cは、I g GのF c領域によって形成されるA B M 4も含む。本開示の他の個所で記載するように、このドメインは、F c受容体

50

を発現するエフェクター細胞、例えばNK細胞に結合することができる。

【0358】

10の異なるタイプのMIAc(1.1~1.10として指定される)をコードする核酸を合成し、CHO細胞にトランスフェクトする。MIAcを発現させ、プロテインAカラムを使用して精製する。MIAc1.1を図2Aに示す。MIAc1.2を図2Bに示す。MIAc1.3を図2Cに示す。MIAc1.4を図2Dに示す。MIAc1.5を図3Aに示す。MIAc1.6を図3Bに示す。MIAc1.7を図3Cに示す。MIAc1.8を図3Dに示す。MIAc1.9を図4Aに示す。MIAc1.10を図4Bに示す。

【0359】

NK細胞を活性化する能力ならびに癌細胞及び腫瘍を破壊する能力について、インビトロ及びインビボでMIAcを試験する。インビトロアッセイは、MIAcに暴露した後のCD16のダウンレギュレーション、CD69のアップレギュレーション、LAMP1+細胞のパーセンテージ、インターフェロンガンマ放出、7-AAD陽性細胞のパーセンテージ及び増殖ならびにMIAcの存在下でエフェクター細胞に曝露したラージ細胞の死滅を測定することによってNK細胞の活性化をモニタリングすることを含む。インビボアッセイは、誘導した腫瘍または腫瘍異種移植片を有する動物を本明細書で提供されるMIAcで処置することによって実施する。

【0360】

エフェクター細胞の増殖は、3H-チミジンによって評価する。エフェクター細胞の刺激は、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-12p70、IL-15、MIP-アルファ/ベータ及びRANTESの濃度を測定するためのBD(商標)サイトメトリックビーズアレイ(CBA)アッセイを使用してサイトカイン及びケモカイン分泌を測定することによって測定する。細胞傷害活性は、クロム51放出アッセイ、グランザイムB ELISPOTアッセイ、CD107aの細胞表面動員の測定、カスパーゼ-3アッセイならびにフルオロフォアPKH-26及びTO-PRO-3ヨウ化物を用いるフローサイトメトリーアッセイによって測定する。エフェクター細胞の健全性は、アネキシンV FITCアッセイによって測定する。

【0361】

実施例2:MIAc2:CD20、NKG2D及び阻害性KIRを標的とするIgG-scFv-scFv MIAc

本明細書に記載のMIAcを以下の抗原結合モジュールで作製する。ABM1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、CD20と結合する。CD20に対するABMの例はリツキシマブである。ABM2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるNKG2Dと結合し、これを刺激する。ABM3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性KIR受容体と結合し、これに拮抗する。

【0362】

MIAc2.1~2.10(図2A~4Bに提供されるMIAcに対応する)を、実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0363】

実施例3:MIAc3:CD20、NKG2D及び阻害性KIRを標的とするscFv-IgG-scFv及びscFv-scFv-IgG MIAc

本明細書に記載のMIAcを以下の抗原結合モジュールで作製する。ABM1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、CD20と結合する。ABM2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるNKG2Dと結合し、これを刺激する。ABM3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性KIR受容体と結合し、これに拮抗する。

【0364】

10

20

30

40

50

このM I A Cの2つの構成を生成する。第1の構成では、A B M 1はs c F vであり、A B M 2はI g Gであり、A B M 3はs c F vである(M I A C 3 . 1)。このM I A Cの例を図5 Aに示す。第2の構成では、A B M 1はs c F vであり、A B M 2はs c F vであり、A B M 3はI g Gである(M I A C 3 . 2)。このM I A Cの例を図5 Bに示す。

【0365】

実施例4：M I A C 4 : C D 2 0、N K G 2 D 及び阻害性K I Rを標的とするs c F v - s c F v - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性K I R受容体と結合し、これに拮抗する。

【0366】

このM I A Cでは、A B M 1、A B M 2及びA B M 3のそれぞれはs c F vである。M I A Cは、N末端のA B M 1、中央のA B M 2及びC末端のA B M 3との融合タンパク質として発現される。このM I A Cの例を図6に示す。

【0367】

実施例5：M I A C 5 : C D 2 0 及びN K G 2 Dを標的とするI g G - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。

【0368】

M I A C 5 . 1 ~ 5 . 6 (図11A ~ B、12A、13A ~ B及び14Aに提供されるM I A Cに対応する)を、実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0369】

実施例6：M I A C 6 : C D 2 0 及び阻害性K I Rを標的とするI g G - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I Rと結合し、これに拮抗する。

【0370】

M I A C 6 . 1 ~ 6 . 6 (図11C ~ D、12B、13C ~ D及び14Bに提供されるM I A Cに対応する)を実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0371】

実施例7：M I A C 7 : C D 2 0 及びN K G 2 Dを標的とするs c F v - I g G M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。

【0372】

A B M 1はs c F vであり、1つのA B M 2はI g Gであり、第2のA B M 2はs c F vである(M I A C 7 . 1)。このM I A Cの例を図15 Aに示す。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0373】

実施例8：M I A C 8 : C D 2 0 及び阻害性K I Rを標的とするs c F v - I g G M

10

20

30

40

50

I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I Rと結合し、これに拮抗する。

【0 3 7 4】

A B M 1はs c F vであり、1つのA B M 3はI g Gであり、第2のA B M 3はs c F vである(M I A C 7 . 1)。このM I A Cの例を図15Bに示す。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0 3 7 5】

実施例9：M I A C 9 : C D 2 0 及びN K G 2 Dを標的とするs c F v - s c F v - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。

【0 3 7 6】

このM I A Cでは、A B M 1及びA B M 2のそれぞれはs c F vである。M I A Cは、N末端のA B M 1、中央のA B M 2及びC末端のA B M 2との融合タンパク質として発現される。このM I A Cの例(M I A C 9 . 1)を図16Aに示す。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0 3 7 7】

実施例10：M I A C 1 0 : C D 2 0 及び阻害性K I Rを標的とするs c F v - s c F v - s c F v M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I Rと結合し、これに拮抗する。

【0 3 7 8】

このM I A Cでは、A B M 1及びA B M 3のそれぞれはs c F vである。M I A Cは、N末端のA B M 1、中央のA B M 3及びC末端のA B M 3との融合タンパク質として発現される。このM I A Cの例(M I A C 1 0 . 1)を図16Bに示す。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0 3 7 9】

実施例11：M I A C 1 1 : C D 2 0 、N K G 2 D 及び阻害性K I Rを標的とするs c F v - I g GベースのM I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I Rと結合し、これに拮抗する。

【0 3 8 0】

このM I A Cでは、A B M 1はs c F vである。A B M 2及び3はI g Gベースの分子の可変ドメインである。一実施形態(図17A；M I A C 1 1 . 1)では、A B M 3結合部位はI g Gベースの分子の最もN末端の結合部位である。別の実施形態(図17B；M I A C 1 1 . 2)では、A B M 2結合部位はI g Gベースの分子の最もN末端の結合部位である。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0 3 8 1】

実施例12：M I A C 1 2 : C D 2 0 及びN K G 2 D または阻害性K I Rを標的とするs c F v - I g GベースのM I A C

10

20

30

40

50

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、B細胞の表面で発現され、B細胞リンパ腫及び白血病の治療に関連するタンパク質である、C D 2 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるN K G 2 Dと結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I Rと結合し、これに拮抗する。このM I A Cは、A B M 2またはA B M 3のいずれかを含むが、両方は含まない。

【0382】

このM I A Cでは、A B M 1はs c F vである。A B M 2及び3はI g Gベースの分子の可変ドメインである。一実施形態(図18A; M I A C 1 2 . 1)では、A B M 2結合部位はI g Gベースの分子によって形成される。別の実施形態(図18B; M I A C 1 2 . 2)では、A B M 3結合部位はI g Gベースの分子によって形成される。このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

10

【0383】

実施例13: C D 3 0、C D 1 3 7及びP D - 1を標的とするM I A C 1 3 : s c F v - I g G M I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は、古典的ホジキンリンパ腫及び全身性未分化大細胞型リンパ腫で発現されるタンパク質である、C D 3 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるC D 1 3 7と結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I RであるP D - 1と結合し、これに拮抗する。

20

【0384】

このM I A Cでは、A B M 1はI g Gである。A B M 2及び3はs c F vである。図19に例示するように、A B M 2及び3s c F vはA B M 1を形成するI g Gの重鎖のC末端に結合している。2つの重鎖及び軽鎖の配列を配列番号1～3に提供する。

【0385】

このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0386】

実施例14: M I A C 1 4 : C D 3 0、C D 1 3 7及びP D - 1を標的とするs c F v - I g GベースのM I A C

本明細書に記載のM I A Cを以下の抗原結合モジュールで作製する。A B M 1は古典的ホジキンリンパ腫及び全身性未分化大細胞型リンパ腫で発現されるタンパク質である、C D 3 0と結合する。A B M 2は、エフェクター細胞によって発現される活性化受容体であるC D 1 3 7と結合し、これを刺激する。A B M 3は、エフェクター細胞によって発現される阻害性受容体である阻害性K I RであるP D - 1と結合し、これに拮抗する。

30

【0387】

図20に示すように、このM I A Cでは、2つのA B M 1 s c F vはI g G様分子の重鎖のC末端に結合している。I g G様分子のN末端領域は、2つのA B M 2結合部位を形成するV_H - V_L領域及び2つのA B M 3結合部位を形成するV_H - V_L領域を含む。このM I A Cでは、A B M 3結合部位は、I g G様分子によって形成される最もN末端のA B Mである。重鎖及び軽鎖の配列を配列番号4～5に提供する。

40

【0388】

このM I A Cを実施例1に記載されているように合成し、特徴づけする。

【0389】

実施例15: 例示的な単一特異性、二重特異性及び三重特異性M I A C構築物の調製
以下に記載のように、個別の腫瘍関連抗原、チェックポイント受容体及び活性化受容体、またはこれらの組み合わせを標的とするいくつかの例示的な単一特異性、二重特異性及び三重特異性M I A C構築物を調製した。例示的抗体型式の代表を図21に示す。二重特異性構築物については、標的1に対するs c F vを、標的2に対する全長I g G 1抗体の重鎖のC末端に(G₄S)₃リンカーを介して遺伝学的に融合した。三重特異性構築物については、標的1及び2に対するs c F vを、それぞれ、標的3に対する全長I g G 1抗

50

体の重鎖及び軽鎖のC末端に(G₄S)₃リンカーを介して遺伝学的に融合した。抗CD3結合ドメインを含む構築物については、N結合型グリコシル化を防止する及びADCを低減するために、Fcドメインのアミノ酸N297をアラニンに変異させた。

【0390】

例示的な单一特異性、二重特異性及び三重特異性構築物

表A～Cに示すように、例示的な单一特異性、二重特異性及び三重特異性抗体構築物を調製した。

【0391】

(表A) 例示的单一特異性タンパク質

タンパク質	特異性	HCプラスミド	LCプラスミド	Fabドメイン	定常ドメイン
PID-2	PD-1	DID-15 (配列番号13)	DID-16 (配列番号14)	ペンプロリズマブ	ヒト IgG1
PID-3	Her2	DID-1 (配列番号7)	DID-2 (配列番号8)	トラスツズマブ	ヒト IgG1
PID-90	CD137	DID-9 (配列番号11)	DID-309 (配列番号12)	ウレルマブ	ヒト IgG1
PID-127	CD3	DID-365 (配列番号9)	DID-8 (配列番号10)	ブリナツモマブ _CD3	非グリコシル化 ヒト IgG1 (N297A変異)

10

【0392】

(表B) 例示的二重特異性タンパク質

タンパク質	特異性	HCプラスミド	LCプラスミド	N末端 Fabドメイン	定常ドメイン	C末端 scFv
PID-7	Her2/PD-1	DID-27 (配列番号17)	DID-16 (配列番号14)	ペンプロリズマブ	ヒト IgG1	トラスツズマブ
PID-92	Her2/CD137	DID-26 (配列番号16)	DID-309 (配列番号12)	ウレルマブ	ヒト IgG1	トラスツズマブ
PID-128	Her2/CD3	DID-366 (配列番号15)	DID-8 (配列番号10)	ブリナツモマブ _CD3	非グリコシル化 ヒト IgG1 (N297A変異)	トラスツズマブ

20

30

【0393】

(表C) 例示的三重特異性タンパク質

タンパク質	特異性	HC プラスミド	LC プラスミド	N末端 Fabドメイン	定常ドメイン	HC C末端 scFv	LC C末端 scFv
PID-98	Her2/CD137/PD-1	DID-26 (配列番号16)	DID-310 (配列番号19)	ウレルマブ	ヒト IgG1	トラスツズマブ	ペンプロリズマブ
PID-130	Her2/CD3/PD-1	DID-366 (配列番号15)	DID-50 (配列番号18)	ブリナツモマブ _CD3	非グリコシル化ヒト IgG1	トラスツズマブ	ペンプロリズマブ

40

【0394】

各单一特異性、二重特異性及び三重特異性構築物の軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子をDNA2.0(Menlo Park, CA)によって合成し、それらのpD2610.v10発現ベクターにクローニングした。製造者の指示書に従ってQiagen Maxi prep Plusキットを使用して、プラスミドをスケールアップし、精製した。

【0395】

実施例16：例示的な单一特異性、二重特異性及び三重特異性MIAc構築物のベンチスケールの発現及び精製

DNA2.0(Menlo Park, CA)によって、最終的な遺伝子産物を市販の哺乳類発現ベクターpD2610-v10またはpD2610-v10(DNA2.0, M

50

en 1 o Park、CA) のいずれかにサブクローニングし、ヒト胎児由来腎臓 293 (HEK-293) 細胞株において、一過的トランスフェクションによって発現させた。

【0396】

タンパク質の発現に使用したHEK-293細胞は、Thermo-Fisher Scientificから市販されている「Expi 293 Expression System」に提供されるものであった。トランスフェクション及び発現は製造者の推奨のように行なった。手短に言えば、指数増殖期に2~3百万細胞/mlで、脂質-DNA複合混合物をExpi 293細胞にトランスフェクトした。使用した脂質トランスフェクション試薬は、「Expi 293 Expression System Kit」中に提供され、「ExpiFectamine 293 Reagent」という商品名で知られている。トランスフェクションに使用したDNAは、Qiagen Endo-free Maxi KitなどのエンドトキシンフリーDNA調製キットを使用して調製した。トランスフェクションに使用するDNAの最終的な量は、トランスフェクション培養容積1mlあたり1ug DNA、すなわち30mlの発現容積に対して30ugの全DNAを使用した。最終的なタンパク質は、別々のプラスミドから個々に発現される少なくとも2つのタンパク質配列(すなわち、最小限で重鎖及び軽鎖)から構成されたので、プラスミドの組み合わせの最適な比を決定した。例えば、ヘテロ二量体の形成にとって最適な濃度範囲を決定するために、ヘテロ二量体形成を可能にする重鎖A(HC-A)、軽鎖(LC)及び重鎖B(HC-B)の最適なDNA比(例えば、HC-A/HC-B/LC比=40:40:20(PID94の場合と同様)でDNAをトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を4~5日後に回収し、培養培地を4000rpmで遠心分離してから収集し、0.45μmフィルターを使用して清澄化した。

【0397】

清澄化した培養培地をPierceプロテインAアガロース充填カラム(Thermo-Fisher)にロードし、10カラム体積のpH7.2のPBS緩衝液で洗浄した。10カラム体積のpH3.6のクエン酸緩衝液で抗体を溶出し、抗体を含むプールした画分をpH8.0のTRISで中和した。

【0398】

プロテインA溶出抗体試薬の品質を特徴づけるために、分析スケールのゲルfiltration (SEC) によって試料を分析した。このために、移動相として20mMリン酸ナトリウム、400mM塩化ナトリウム、pH7.0を使用するAgilent Technologiesシリーズ1200HPLCによって、YMC-Pack Diol-200カラム(YMC Ltd, Kyoto, Japan)に5~20μgのタンパク質を流した。得られたクロマトグラムを使用して、アセンブルされた単一、二重及び三重特異性抗体試薬の目的のピーク(POI)のパーセンテージを計算した。

【0399】

必要に応じて、ゲルfiltration (SEC) によってプロテインA抗体溶出液をさらに精製した。ゲルfiltrationについては、およそ1mgの抗体混合液を1mLに濃縮し、1mL/分の流速のAKTA Pure FPLCによって、Superose 6 Increase 10/300 GLカラム(GE Healthcare)に充填した。pH7.4のPBS緩衝液を1mL/分の流速で使用した。精製された抗体に対応する画分を収集し、約1mg/mLに濃縮し、0.2μmフィルターを通してfiltration滅菌した。前の段落に記載されているように、得られた物質を分析的ゲルfiltrationによって特徴づけした。以下の表Dは、いくつかの生成された最終的抗体試薬についてのPOIのパーセンテージを例証する。図22は、単一(PID3)、二重(PID128)及び三重(PID130)特異性抗体試薬についての分析的ゲルfiltrationクロマトグラフを示す。

【0400】

(表D) 分析的ゲルfiltrationによる特徴づけ

試薬	% POI
PID2 (PD-1)	99.1
PID3 (Her2)	94.6
PID90 ¹ (CD137)	97.0
PID127 ¹⁶ (CD3 ^{非グリコシル化})	100.0
PID92 ⁶ (Her2 / CD137)	95.0
PID128 ²³ (Her2 / CD3 ^{非グリコシル化})	94.2
PID130 ⁷⁵ (Her2 / CD3 ^{非グリコシル化} / PD-1)	92.2

10

20

30

【0401】

実施例17：For te Bio Oct et (登録商標)による、例示的な単一特異性

、二重特異性及び三重特異性M I A C構築物の抗原結合解析

個々の抗原結合

For te Bio Oct etを使用してM I A C構築物の抗原結合を解析した。組換えのヒトPD-1Fc、Her2Fc、CD137Fc融合タンパク質をSino Biolog 20 calから購入し、組換えのHisタグ付きヒトCD3イプシロンをAcroBiosystemsから購入した。すべての抗原を0.25ug/ulの終濃度でPBS中に再構成した。PD-1、Her2及びCD137結合の解析については、抗原(For te bioキネティクス緩衝液中に100nM)をプロテインAセンサーに3分間固定化し、続いて、センサーを300nMリツキシマブに10分間浸漬することによって、センサーの電位フリー結合部位を遮断した。100nM M I A C構築物に5分間センサーを浸漬することによって会合が進み、プランクのキネティクス緩衝液中に5分間で解離が生じた。CD3イプシロン結合については、抗原をNi-NTAセンサーに固定化し、50nM M I A C構築物中で会合を行った。For te Bioデータ解析9.0ソフトウェアを使用して、結合データを解析した。代表的な結合センソグラム(sensograms)を図23に示す。測定した親和性を表Eにまとめる。このデータは、1つより多い標的に結合する試験した4つのM I A Cのそれぞれが、各標的に同時に結合することができるることを示す。このデータは、M I A Cの結合親和性が同時結合条件下で0.12~1.66nMの範囲にわたることも示す。

【0402】

(表E) 結合親和性

PID	標的抗原	親和性 (nM)		
		PD1	Her2	CD137
PID2	PD1	0.52	NB	NB
PID3	Her2	NB	0.88	NB
PID90	CD137	NB	NB	0.7
PID7	Her2/PD1	0.12	1.34	NB
PID92	A-Her2/α-CD137	NB	1.12	0.23
PID128	Her2/CD3	NB	4.2	5.5
PID130	Her2/CD3/PD1	0.37	1.66	9.6

NB: 結合不検出

【0403】

実施例18：フローサイトメトリーによる、ヒト乳癌細胞株におけるHer2及びPD-L1の発現解析 20

例示的なHer2標的化MIAcの生物活性を評価するための適切な細胞株を同定するために、Her2及びPD-L1（プログラム死リガンド-1）の表面発現についてフローサイトメトリーによって癌細胞株パネルをスクリーニングした。図24の結果は、JIMT1細胞株が高いHer2発現を有し、免疫阻害分子、すなわちプログラム死リガンド-1（PD-L1；CD274）をその表面で発現したことを示す。これらの発見に基づいて、例示的なHer2標的化MIAcのインビトロでの機能性評価のために、JIMT1細胞を選択した。

【0404】

実施例19：フローサイトメトリーによる腫瘍細胞に対する例示的なHer2を標的とするMIAcの結合解析 30

Her2+JIMT1細胞の表面への例示的MIAc構築物の結合をフローサイトメトリーによって解析した。以下のように実験を行った。

【0405】

漸増濃度（0、0.01、0.1、1.0nM）の二重特異性及び三重特異性Her2標的化MIAc（PID92[Her2/CD137]、PID128[Her2/CD3]、PID130[Her2/CD3/PD-1]）またはHer2（陽性対照）またはCD3（陰性対照）に対する対照抗体の存在下で30分間、懸濁液中のJIMT1細胞をインキュベートした。細胞を洗浄し、次いで、第2のフルオロフォア標識検出抗体（抗ヒトIgG1-AF488）とともに20分間インキュベートした。最終的な洗浄後、BD Fortessaフローサイトメーターを使用して、平均蛍光強度（MFI）によってタンパク質の結合を解析した。 40

【0406】

図25に示すように、例示的MIAcの3つすべてが、検出可能な、JIMT1細胞に対する濃度依存的結合を示した。MIAcの結合のレベルは抗Her2陽性対照抗体で観察されるものより低く、これは、抗体重鎖のC末端へのHer2結合scFvの連結がHer2抗原結合親和性/結合活性の低減をもたらした可能性があることを示唆するものである。MIAcによって示された細胞結合活性のレベルは、インビトロで生物活性を評価するのに十分であると考えられる。

【0407】

実施例20：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、増殖及びCD25活性化マーカーの発現に対する例示的な二重特異性抗Her2/抗CD137MIAc(PID92)の効果

本実験を、Her2及びCD137を標的とする例示的な二重特異性MIAc1の、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞の増殖及び活性化を増強する能力を判定するために行った。-Her2/-CD137MIAc(PID92)の応答を、等モル濃度の、MIAcと同一のFab配列を有する混合した单一特異性-*Her2*抗体及び-CD137抗体と比較した。以下のように実験を行った。

【0408】

フィコール勾配遠心分離、それに続く磁気ビーズ分離(Miltenyi Biotech)によって、CD3+T細胞を単離した。T細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)色素で標識してから、10:1の比でJIMT1乳癌細胞との共培養に供した。共培養物を1 μ g/mlの抗CD3抗体(クローンOKT3)で予めコーティングした96ウェルマイクロプレートに播種し、続いて、漸増濃度(0.02~20.0nM)の二重特異性-*Her2*/-CD137MIAc(PID92)または等モル濃度の混合した-*Her2*及び-CD137モノクローナル抗体の存在下で、72時間インキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、CD4、CD8及びCD25に対するフルオロフォア標識抗体で染色後に、フローサイトメトリーによって増殖及びCD25の発現についてCD4+及びCD8+T細胞を解析した。増殖パーセントは、CFSEシグナル希釈法によって決定した場合の、少なくとも1ラウンドの細胞分裂を経験する細胞の割合と定義した。

【0409】

CD25の発現解析の結果を図26に示す。单一特異性の-*Her2*及び-CD137抗体の組み合わせと比較して、二重特異性MIAcは、CD4+T細胞とCD8+T細胞のサブセットの両方でCD25のより高い表面発現を刺激した。CD25の発現に対する-*Her2*/-CD137MIAc(PID92)の増強効果は、MIAcと組み合わせ処理の両方について同様の発現レベルを示した最低試験濃度及び最高試験濃度を除いては、試験した濃度範囲の全体にわたって明らかであった。

【0410】

増殖解析の結果を図27に示す。増殖の濃度依存的増大は、CD4+T細胞と比較してCD8+T細胞においてより顕著であった。-*Her2*/-CD137MIAc(PID92)によって誘導される増殖の全体的な規模は抗体の組み合わせと類似していたが、2nMで応答曲線の明白な分離があり、これは、MIAcの効力の増強を示唆するものである。

【0411】

実施例21：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、サイトカイン産生に対する例示的な二重特異性抗Her2/抗CD137MIAc(PID92)の効果

本実験を、Her2及びCD137を標的とする例示的な二重特異性MIAcの、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞からのサイトカイン産生を増強する能力を判定するために行った。対照として、-*Her2*/-CD137MIAc(PID92)MIAcの効果を、等モル濃度の、MIAcと同じFab配列を有する混合した单一特異性-*Her2*及び-CD137抗体と比較した。

【0412】

実施例6に記載されている同じ共培養実験から収集した細胞培養上清において、サイトカイン産生を測定した。72時間のインキュベーション期間の終わりに、上清を収集し、Luminexキット(EMD Millipore)を使用して、IFN- γ 及びTNF- α のレベルを測定した。

【0413】

図28に結果を示す。IFN- γ とTNF- α の両方で確固たる濃度依存的増大が観察され、二重特異性-*Her2*/-CD137MIAc(PID92)は、单一特異性

10

20

50

30

40

50

抗体の組み合わせと比較して劇的な活性増強を示した。

【0414】

実施例22：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、増殖及びCD25活性化マーカーの発現に対する例示的な二重特異性抗Her2/抗CD3MIAc(PID128)の効果

本実験を、Her2及びCD3を標的とする例示的な二重特異性MIAcの、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞の増殖及び活性化を増強する能力を判定するために行つた。対照として、-Her2/-CD3MIAc(PID128)MIAcの効果を、等モル濃度の、MIAc中に含まれる同じFab配列を有するCD3標的の抗体と比較した。以下のように実験を行つた。

10

【0415】

フィコール勾配遠心分離、それに続く磁気ビーズ分離(Miltenyi Biotech)によってCD3+T細胞を単離し、10:1の比でJIMT1乳癌細胞との共培養に供した。共培養物を96ウェルマイクロプレートに播種し、続いて、漸増濃度(0.02~20.0nM)の二重特異性-*Her2/-CD3MIAc(PID128)*MIAcまたは等モル濃度の抗CD3モノクローナル抗体の存在下で、72時間インキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、Ki67(細胞内増殖マーカー)、CD8及びCD25に対するフルオロフォア標識抗体で染色後に、増殖及びCD25の表面発現について、フローサイトメトリーによってT細胞を解析した。

20

【0416】

増殖及びCD25の発現解析の結果を図29に示す。二重特異性-*Her2/-CD3MIAc(PID128)*MIAcは、T細胞増殖及びCD25の表面発現の両方を劇的にアップレギュレートし、最大の誘導がすべての試験濃度で観察された。比較すると、抗CD3抗体の効果ははるかに弱く、濃度依存的であった。

20

【0417】

実施例23：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、サイトカイン及びグランザイムBの産生に対する例示的な二重特異性抗Her2/抗CD3MIAc(PID128)の効果

30

本実験を、Her2及びCD3を標的とする例示的な二重特異性MIAcの、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞からのサイトカイン産生を増強する能力を判定するために行つた。対照として、-Her2/-CD3MIAc(PID128)MIAcを等モル濃度の、MIAcと同じFab配列を有する単一特異性抗CD3抗体と比較した。

【0418】

実施例8に記載されている同じ共培養実験から収集した細胞培養上清において、サイトカイン産生を測定した。72時間のインキュベーション期間の終わりに、上清を収集し、Luminexキット(EMD Millipore)を使用して、IFN- γ 、TNF- α 及びグランザイムBのレベルを測定した。

【0419】

IFN- γ 及びTNF- α の両方で確固たる濃度依存的増大が観察され(図30)、二重特異性-*Her2/-CD3MIAc(PID128)*MIAcは、単一特異性CD3抗体と比較して劇的に増強された効力を示した。

40

【0420】

標的細胞の死滅を媒介するCD8+T細胞の細胞傷害性顆粒に見られるプロテアーゼであるグランザイムBも、-*Her2/-CD3MIAc(PID128)*MIAcでの処理によって強く誘導され(図31)、単一特異性抗CD3と比較して劇的に増大した効力を示した。MIAcは、最低濃度の0.02nMを含めて、試験した全濃度範囲にわたって、グランザイムBの最大の産生を達成した。

【0421】

実施例24：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、増殖及びCD25活

50

性化マーカーの発現に対する例示的な三重特異性抗Her2/抗CD3/抗PD-1 MIAc (PID130) の効果

本実験を、Her2、CD3及びPD-1（プログラム死受容体-1）を標的とする例示的な三重特異性MIAcの、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞の増殖及び活性化を増強する能力を判定するために行なった。対照として、MIAcの効果を、等モル濃度の、三重特異性 - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) と同一のFab配列を有する混合した単一特異性抗Her2、抗CD3及び抗PD-1抗体と比較した。以下のように実験を行なった。

【0422】

フィコール勾配遠心分離、それに続く磁気ビーズ分離 (Miltenyi Biote 10 c) によってCD3+T細胞を単離し、10:1の比でJIMT1乳癌細胞との共培養に供した。共培養物を96ウェルマイクロプレートに播種し、続いて、漸増濃度 (0.02 ~ 20.0 nM) の - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) または等モル濃度の、混合した単一特異性抗Her2、抗CD3及び抗PD-1モノクローナル抗体の存在下で、72時間インキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、Ki67（細胞内増殖マーカー）、CD8及びCD25に対するフルオロフォア標識抗体で染色後に、増殖及びCD25の表面発現について、フローサイトメトリーによってT細胞を解析した。

【0423】

増殖及びCD25の発現解析の結果を図32に示す。三重特異性 - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) はT細胞増殖及びCD25の表面発現の両方を劇的にアップレギュレートし、ほぼ最大の誘導がすべての試験濃度にわたって観察された。比較すると、単一特異性抗体の3重組み合わせは、MIAcよりずっと弱い濃度依存的応答を示した。

【0424】

実施例25：ヒトT細胞/JIMT1腫瘍細胞の共培養における、サイトカイン及びグランザイムBの産生に対する例示的な三重特異性抗Her2/抗CD3/抗PD-1 MIAc (PID130) の効果

本実験を、Her2、CD3及びPD-1を標的とする例示的な三重特異性MIAcの、JIMT1腫瘍細胞と共に培養されるヒト一次T細胞からのサイトカイン産生を増強する能力を判定するために行なった。対照として、 - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) を、等モル濃度の、MIAcと同一のFab配列を有するHer2、CD3及びPD-1に対する混合した単一特異性抗体と比較した。

【0425】

実施例10に記載されている同じ共培養実験から収集した細胞培養上清において、サイトカイン産生を測定した。72時間のインキュベーション期間の終わりに、上清を収集し、Luminexキット (EMD Millipore) を使用して、IFN-、TNF- 及びグランザイムBのレベルを測定した。

【0426】

図33に示すように、三重特異性 - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) は、IFN- 及びTNF- の両方の産生を劇的に増大させ、ほぼ最大の効果が試験した全濃度範囲にわたって観察された。これに対して、単一特異性抗体の組み合わせ効果は、ほとんど弱く、濃度依存的であり、サイトカイン産生の増大は、濃度反応曲線の上端で観察されただけであった。

【0427】

標的細胞の死滅を媒介するCD8+T細胞の細胞傷害性顆粒に見られるプロテアーゼであるグランザイムBも、 - Her2 / - CD3 / - PD-1 MIAc (PID130) での処理によって、高レベルで誘導され（図34）、サイトカイン産生と同様に、最低試験濃度においてさえも最大効果が見られた。比較すると、単一特異性抗体の組み合わせは、グランザイムBを実際に濃度依存的様式で増大させたが、三重特異性MIAc

10

20

30

40

50

よりもはるかに低い効力を示した。

【0428】

実施例26：ヒトT細胞/BT474腫瘍細胞の共培養における、T細胞媒介性腫瘍死滅、グランザイムB誘導及びIFN- γ 産生に対する例示的な二重特異性抗Her2/抗CD3MIAc(PID128)の効果

本実験を、Her2及びCD3を標的化する例示的な二重特異性MIAcの、ガンマインターフェロンの産生を増強し、ヒトBT474乳房細胞株の死滅を促進する能力を判定するために行った。-Her2/-CD3MIAc(PID128)の応答を、等モル濃度の、MIAcと同一のFab配列を有する混合した単一特異性- γ -Her2及び- γ -CD3抗体と比較した。以下のように実験を行った。

10

【0429】

フィコール勾配遠心分離、それに続く磁気ビーズ分離(Miltenyi Biotech)によってCD3+T細胞を単離し、96ウェル培養プレート中でBT474乳癌細胞と15:1の比で共培養した。細胞をプレーティングする前に、漸増濃度(0.01nM~1.0nM)の二重特異性- γ -Her2/- γ -CD3MIAc(PID128)または混合した- γ -Her2及び- γ -CD3モノクローナル抗体をプレートの適切なウェルに加えた。このプレートを24時間インキュベートし、上清を収集し、製造者のプロトコールに従って、Cytotox96(登録商標)非放射性細胞傷害アッセイ及びLuminexサイトカインアッセイに使用した。

【0430】

腫瘍細胞死滅解析の結果を図35に示す。単一特異性- γ -Her2及び- γ -CD3抗体の組み合わせと比較して、二重特異性MIAcは、2つのモノクローナル抗体の組み合わせよりも多くの細胞死滅を媒介した。

20

【0431】

IFN- γ 及びグランザイムBの産生解析の結果を図36に示す。IFN- γ 及びグランザイムBの産生の濃度依存的増大は、モノクローナル抗体の組み合わせと比較して、- γ -Her2/- γ -CD3MIAc(PID128)の存在下で有意に顕著であった。合わせると、これらの結果は、- γ -Her2/- γ -CD3MIAc(PID218)が、サイトカイン産生誘導及び腫瘍細胞死滅促進で、モノクローナル抗体の組み合わせより効力があることを示す。

30

【0432】

他の実施形態、参照による組み込み

本明細書に記載される開示は、独立した有用性を有する複数の別個の発明を包含することができる。これらの発明のそれぞれをその好ましい形態(複数可)で開示してきたが、本明細書で開示及び例示するこれらの特定の実施形態は、多数の変形形態が可能であるので、限定的な意味で考えられるべきでない。本発明の主題は、本明細書に開示される様々な要素、特色、機能及び/または特性の新規且つ自明でない組み合わせ及び部分組み合わせを含む。以下の特許請求の範囲は、新規且つ自明でないと見なされるある特定の組み合わせ及び部分組み合わせを特に示す。特長、機能、要素及び/または特性の他の組み合わせ及び部分組み合わせにおいて具体化される発明を、本出願、本出願から優先権を主張する出願または関連出願において請求することができる。そのような特許請求の範囲も、異なる発明に向けられてものであろうと、同じ発明に向けられたものであろうと、及び元の特許請求の範囲と比べて範囲が広い、狭い、等しいまたは異なるものであろうとなからうと、本開示の本発明の主題内に含まれる。

40

【0433】

本開示で引用されるすべての参考文献、刊行物及び特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0434】

配列

配列番号1-実施例13由来の重鎖#1

50

ブレンツキシマブ V H _ ヒト I g G 1 H C 定常 _ (G G G G S) 3 _ ウレルマブ V H _
(G G G G S) 7 _ ウレルマブ _ V K

QIQLQQSGPEVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTVDTSSTAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQ
VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG
GGGGGGGSQVQLQQWGAGLLKPSLTLCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLE
WIGEINHGGYVTYNPSPLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPVN
YDWYFDLWGRGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEI
VLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAZYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPA
RFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFCGGTKVEIK

10

配列番号 2 - 実施例 1 3 由来の重鎖 # 2

ブレンツキシマブ V H _ ヒト I g G 1 定常 _ (G G G G S) 3 _ ペンプロリズマブ V H _
(G G G G S) 7 _ ペンプロリズマブ _ V K

QIQLQQSGPEVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGN
TKYNEKFKGKATLTVDTSSTAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQ
VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG
GGGGGGGSQVQLVQSGVEKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGL
EWMGGINPSNGGTFNEKFKNRVTLTTDSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY
RFDMGFDYWGQGTTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYL
ESGVPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK

20

配列番号 3 - 実施例 1 3 由来の軽鎖

30

ブレンツキシマブ V L _ ヒト I g G 1 L C 定常

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIAASN
LESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 5 - 実施例 1 4 由来の重鎖

ペンプロリズマブ V H _ (G G G G S) 2 _ ウレルマブ V H _ ヒト I g G 1 H C 定常 _
(G G G G S) 3 _ ブレンツキシマブ V H _ (G G G G S) 7 _ ブレンツキシマブ _ V K

QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS
 NGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY
 WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSQVQLQQWAGALLKPSLTCAVYGGSFSGYYW
 SWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA
 YYCARDYGPONYDWYFDLWGRGLTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKIS
 CKASGYTFTDYYITWKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEFKKGKATLTVDTSS
 TAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAGGGGGSGGGGGGGGG
 SGGG
 MNWYQQKPGQPPKVLIYAAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ
 QSNEDPWTFGGGTKLEIK

10

配列番号 6 - 実施例 1 4 由来の軽鎖

ベンブロリズマブ V L (G G G G S) 2 ウレルマブ V L ヒト I g G 1 L C 定常
 EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYL
 ESGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKGGG
 GSGGGGSEIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
 DASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFCGGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C

20

配列番号 7 - 重鎖 (D I D - 1)

トラスツズマブ V H ヒト I g G 1 H C 定常
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY
 TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
 GTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKA
 KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号 8 - 軽鎖 (D I D - 2)

トラスツズマブ V L ヒトカッパ L C 定常
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGV
 PSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 SSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

トラスツズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G F N I K D T (配列番号 2 8)
 C D R - H 2 : Y P T N G Y (配列番号 2 9)
 C D R - H 3 : W G G D G F Y A M D Y (配列番号 3 0)

トラスツズマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q D V N T A V A (配列番号 3 1)
 C D R - L 2 : S A S F L Y S (配列番号 3 2)
 C D R - L 3 : Q Q H Y T T P P T (配列番号 3 3)

配列番号 9 - 重鎖 (D I D - 3 6 5)

ブリナツモマブ C D 3 V H ヒト非グリコシル化 I g G 1 定常

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
 YTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQQ
 TTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 10 - 軽鎖 (D I D - 8)

ブリナツモマブ_ C D 3 V L _ ヒトカッパ L C 定常
 DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV
 PYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

ブリナツモマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T R Y T M H (配列番号 3 4)

C D R - H 2 : Y I N P S R G Y T (配列番号 3 5)

C D R - H 3 : Y Y D D H Y C L D Y (配列番号 3 6)

ブリナツモマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S S S V S Y M N (配列番号 3 7)

C D R - L 2 : D T S K V A S (配列番号 3 8)

C D R - L 3 : Q Q W S S N P L T (配列番号 3 9)

20

配列番号 11 - 重鎖 (D I D - 9)

ウレルマブ V H _ ヒト I g G 1 定常

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGY
 VTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPONYDWYFDLWG
 RGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号 12 - 軽鎖 (D I D - 3 0 9)

ウレルマブ V L _ ヒトカッパ L C 定常

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP PALT FGGGT KVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

ウレルマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G G S F S G Y Y (配列番号 4 0)

C D R - H 2 : N H G G Y (配列番号 4 1)

C D R - H 3 : D Y G P G N Y D W Y F D L (配列番号 4 2)

40

ウレルマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q S V S S Y L A (配列番号 4 3)

C D R - L 2 : D A S N R A T (配列番号 4 4)

C D R - L 3 : Q Q R S N W P P A L T (配列番号 4 5)

配列番号 13 - 重鎖 (D I D - 1 5)

ペンブロリズマブ V H _ ヒト I g G 1 定常

QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS
 NGGTNFNEFKKNRVTLLTDSSTTAYMELKSLQFDVTAVYYCARRDYRFDMGFDY
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 14 - 軽鎖 (D I D - 16)

ペンブロリズマブ V L _ ヒトカッパ L C 定常

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLE
 SGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

ペンブロリズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T N Y Y M Y (配列番号 4 6)

C D R - H 2 : N P S N G G (配列番号 4 7)

C D R - H 3 : R D Y R F D M G F D Y (配列番号 4 8)

ペンブロリズマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S K G V S T S G Y S Y L H (配列番号 4 9)

C D R - L 2 : L A S Y L E S (配列番号 5 0)

C D R - L 3 : Q H S R D L P L T (配列番号 5 1)

20

配列番号 15 - 重鎖 (D I D - 3 6 6)

ブリナツモマブ _ C D 3 V H _ ヒト非グリコシル化 I g G 1 H C 定常 _ (G G G G S) 3 _ ト拉斯ツズマブ V H _ (G G G G S) 4 _ ト拉斯ツズマブ V L

DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
 YTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQQ
 TTLTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PVLDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
 GGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGK
 GLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
 CSRWGGDGFYA MDYWQGQTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIQMT
 CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASASFLYSGVPSRSGSRSGTDFTL
 TISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK

30

ブリナツモマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T R Y T M H (配列番号 5 2)

C D R - H 2 : Y I N P S R G Y T (配列番号 5 3)

C D R - H 3 : Y Y D D H Y C L D Y (配列番号 5 4)

40

ト拉斯ツズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G F N I K D T (配列番号 5 5)

C D R - H 2 : Y P T N G Y (配列番号 5 6)

C D R - H 3 : W G G D G F Y A M D Y (配列番号 5 7)

ト拉斯ツズマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q D V N T A V A (配列番号 5 8)

C D R - L 2 : S A S F L Y S (配列番号 5 9)

C D R - L 3 : Q Q H Y T T P P T (配列番号 6 0)

配列番号 16 - 重鎖 (D I D - 2 6)

ウレルマブ V H _ ヒト I g G 1 H C 定常 _ (G G G G S) 3 _ ト拉斯ツズマブ V H _ (

50

G G G G S) 4 _ ト拉斯ツズマブ V L
 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGY
 VTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPONYDWYFDLWG
 RGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG
 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGF
 YAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDRVT
 ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQ
 PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK

10

ウレルマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G G S F S G Y Y (配列番号 6 1)

C D R - H 2 : N H G G Y (配列番号 6 2)

C D R - H 3 : D Y G P G N Y D W Y F D L (配列番号 6 3)

ト拉斯ツズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G F N I K D T (配列番号 6 4)

C D R - H 2 : Y P T N G Y (配列番号 6 5)

C D R - H 3 : W G G D G F Y A M D Y (配列番号 6 6)

20

ト拉斯ツズマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q D V N T A V A (配列番号 6 7)

C D R - L 2 : S A S F L Y S (配列番号 6 8)

C D R - L 3 : Q Q H Y T T P P T (配列番号 6 9)

配列番号 1 7 - 重鎖 (D I D - 2 7)

ペンプロリズマブ V H _ ヒト I g G 1 H C 定常 _ (G G G G S) 3 _ ト拉斯ツズマブ V
 H _ (G G G G S) 4 _ ト拉斯ツズマブ V L

QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPS
 NGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG
 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLE
 WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD
 GFYAMDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASAVGDR
 VTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQ
 LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK

30

ペンプロリズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T N Y Y M Y (配列番号 7 0)

C D R - H 2 : N P S N G G (配列番号 7 1)

C D R - H 3 : R D Y R F D M G F D Y (配列番号 7 2)

40

ト拉斯ツズマブ重鎖 C D R

C D R - H 1 : G F N I K D T (配列番号 7 3)

C D R - H 2 : Y P T N G Y (配列番号 7 4)

C D R - H 3 : W G G D G F Y A M D Y (配列番号 7 5)

ト拉斯ツズマブ軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q D V N T A V A (配列番号 7 6)

50

C D R - L 2 : S A S F L Y S (配列番号 77)

C D R - L 3 : Q Q H Y T T P P T (配列番号 78)

配列番号 18 - 軽鎖 (D I D - 50)

ブリナツモマブ C D 3 V L ヒトカッパ L C 定常 (G G G G S) 3 ペンプロリズ
マブ V H (G G G G S) 4 ペンプロリズマブ V L

DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV
PYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFAGTKLELKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGGGSQ
VQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSN
GGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGV
STSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGSTDFTLTISLEPEDFA
VYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIK

ブリナツモマブ 軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S S S V S Y M N (配列番号 79)

C D R - L 2 : D T S K V A S (配列番号 80)

C D R - L 3 : Q Q W S S N P L T (配列番号 81)

ペンプロリズマブ 重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T N Y Y M Y (配列番号 82)

C D R - H 2 : N P S N G G (配列番号 83)

C D R - H 3 : R D Y R F D M G F D Y (配列番号 84)

ペンプロリズマブ 軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S K G V S T S G Y S Y L H (配列番号 85)

C D R - L 2 : L A S Y L E S (配列番号 86)

C D R - L 3 : Q H S R D L P L T (配列番号 87)

配列番号 19 - 軽鎖 (D I D - 310)

ウレルマブ V L ヒトカッパ L C 定常 (G G G G S) 3 ペンプロリズマブ V H (G
G G G S) 4 ペンプロリズマブ V L

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQVSSYLAZYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFFGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGGGSQ
VQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSN
GGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWG
QGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGV
STSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGSTDFTLTISLEPEDFA
VYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIK

ウレルマブ 軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S Q S V S S Y L A (配列番号 88)

C D R - L 2 : D A S N R A T (配列番号 89)

C D R - L 3 : Q Q R S N W P P A L T (配列番号 90)

ペンプロリズマブ 重鎖 C D R

C D R - H 1 : G Y T F T N Y Y M Y (配列番号 91)

C D R - H 2 : N P S N G G (配列番号 92)

C D R - H 3 : R D Y R F D M G F D Y (配列番号 93)

ペンプロリズマブ 軽鎖 C D R

C D R - L 1 : R A S K G V S T S G Y S Y L H (配列番号 94)

C D R - L 2 : L A S Y L E S (配列番号 95)

C D R - L 3 : Q H S R D L P L T (配列番号 96)

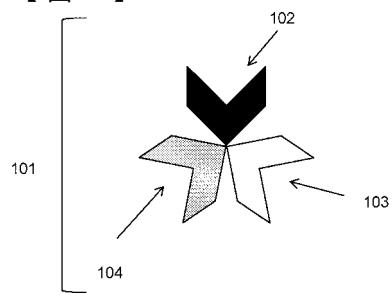
10

20

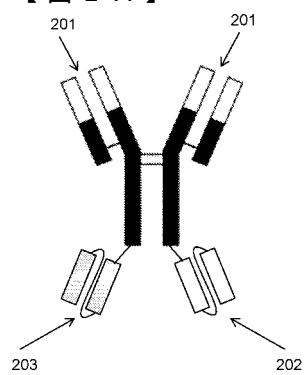
30

40

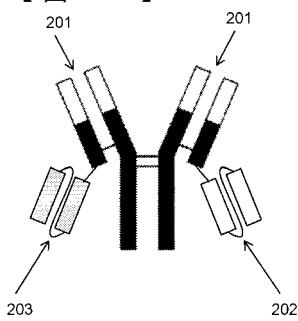
【図1】



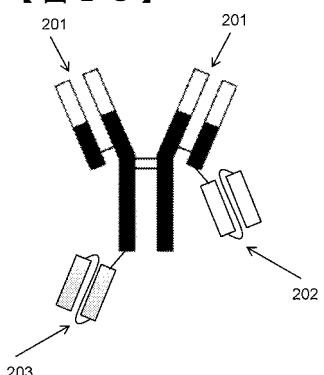
【図2 A】



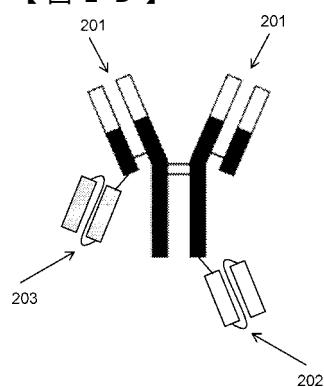
【図2 B】



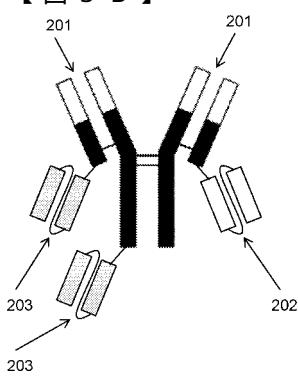
【図2 C】



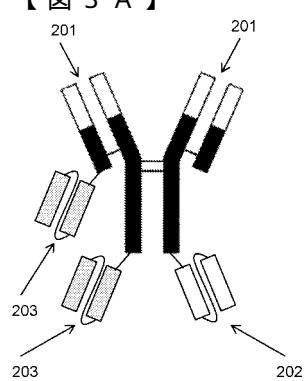
【図2 D】



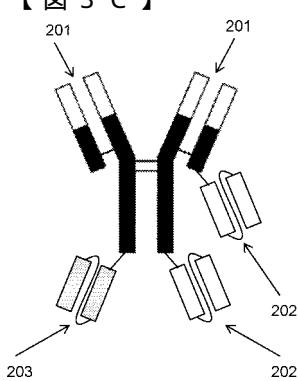
【図3 B】



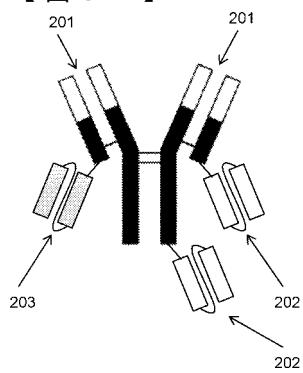
【図3 A】



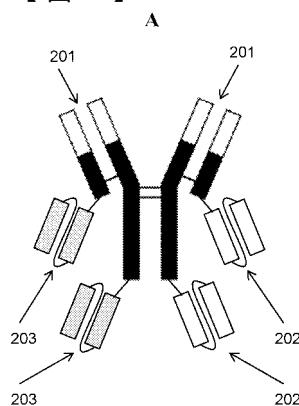
【図3 C】



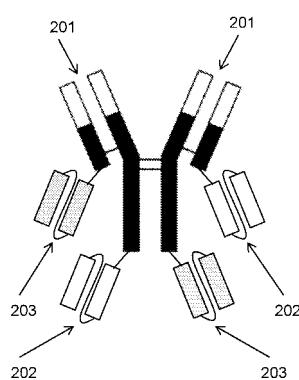
【図3D】



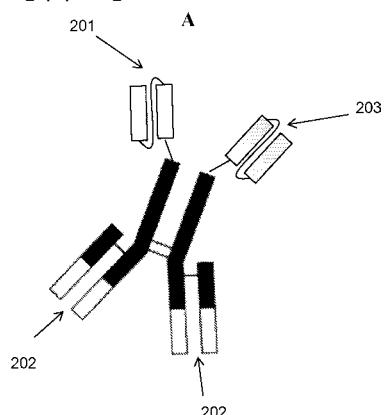
【図4】



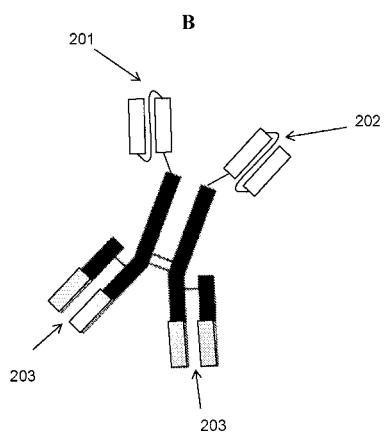
B



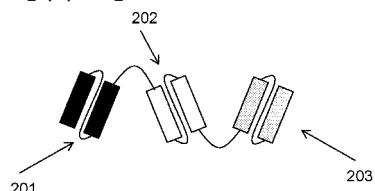
【図5】

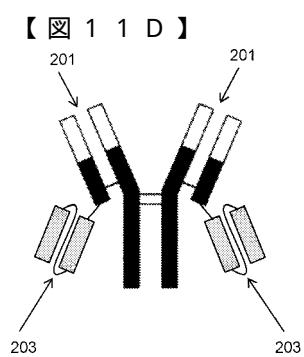
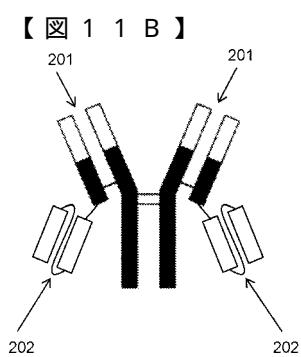
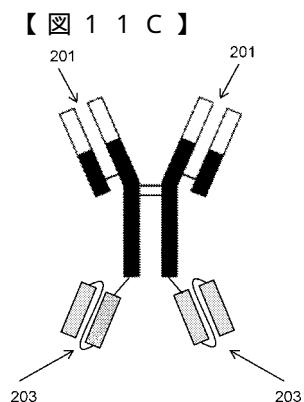
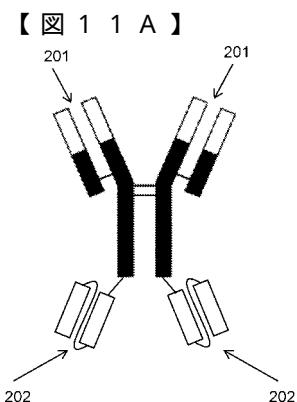
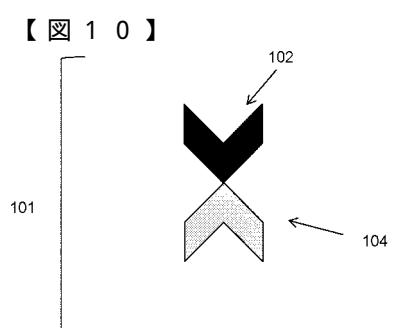
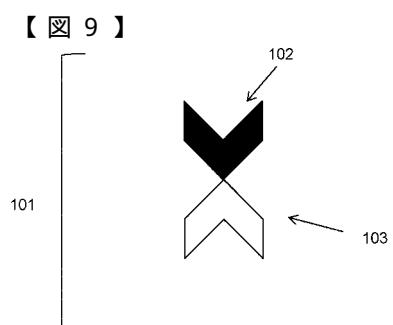
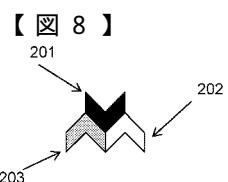
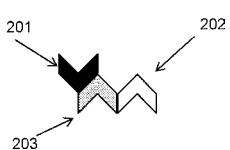
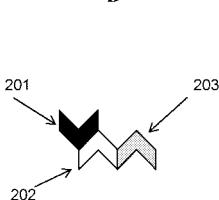
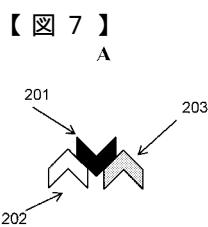


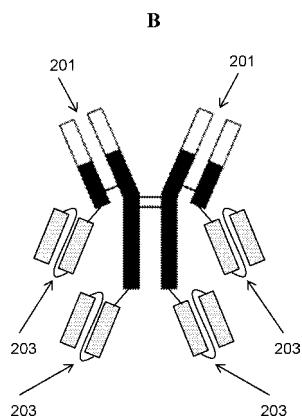
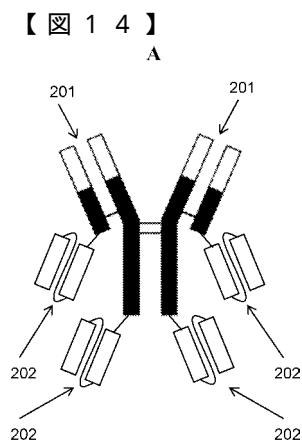
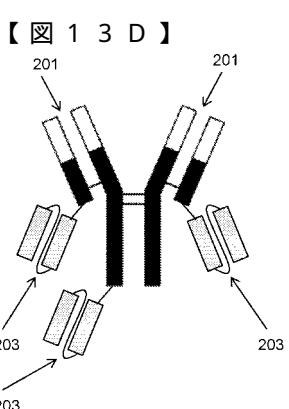
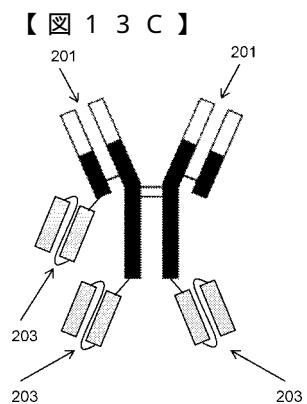
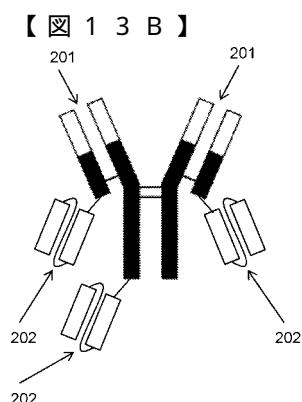
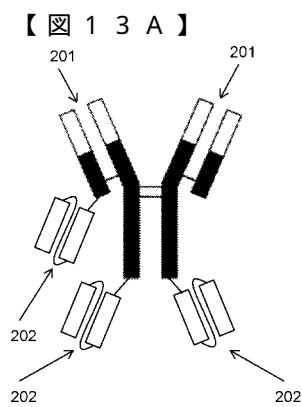
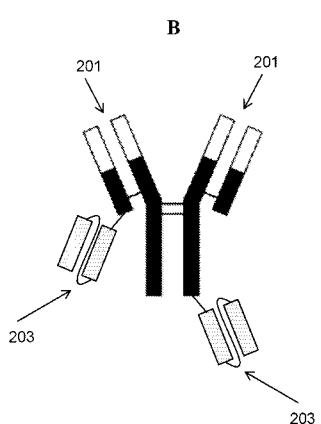
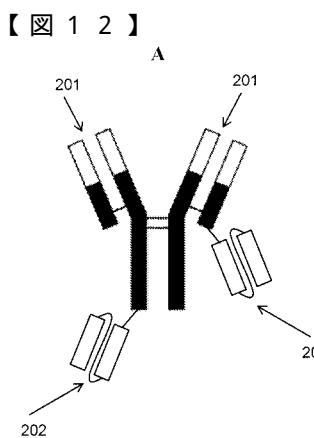
B

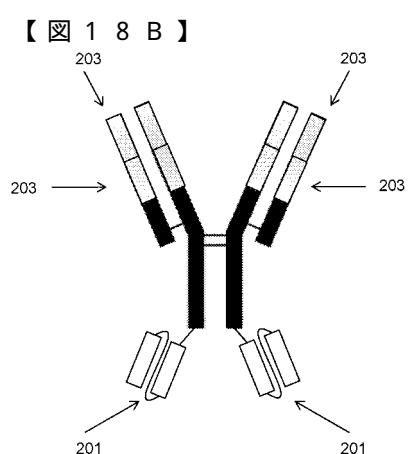
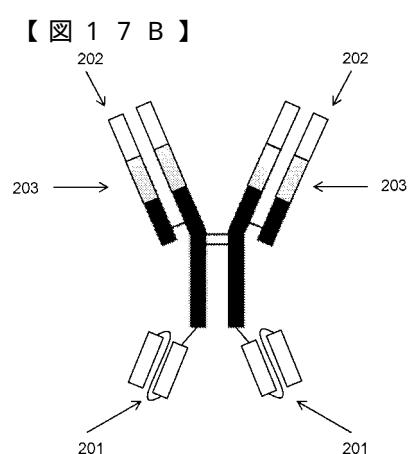
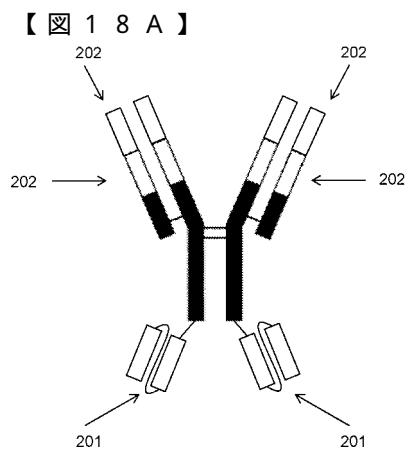
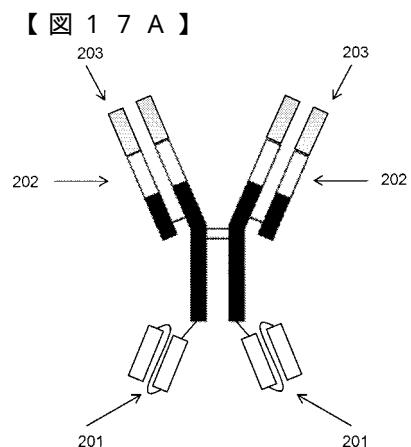
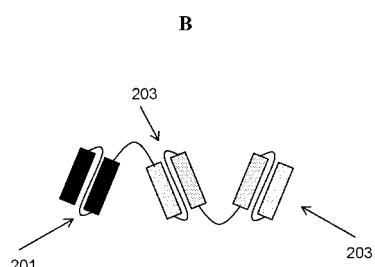
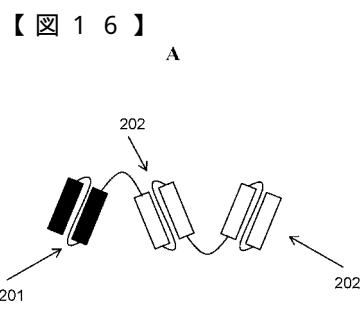
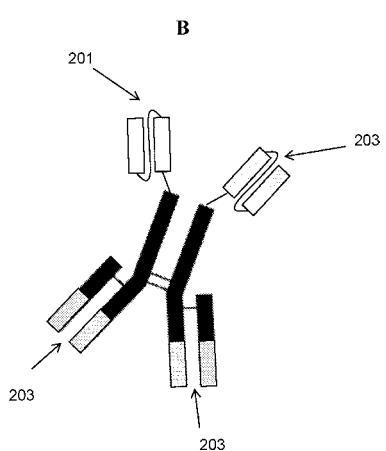
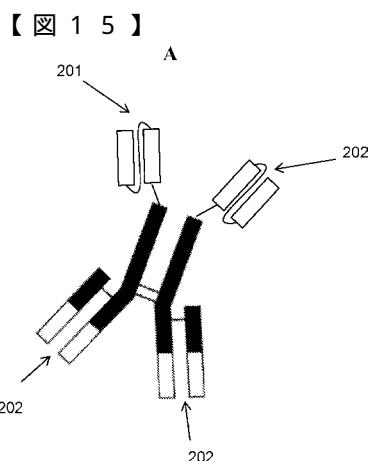


【図6】

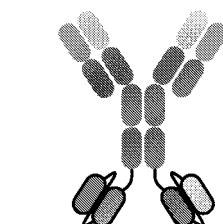








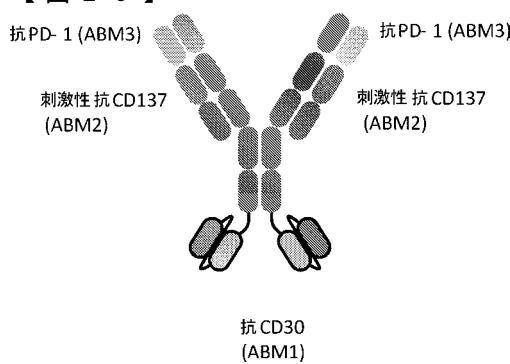
【図 19】
抗 CD30 VH & VL
(ABM1)



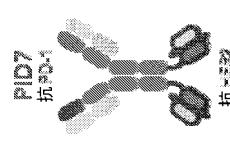
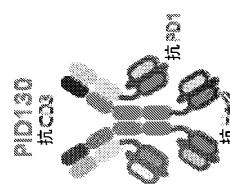
刺激性
抗 CD137 scFv
(ABM2)

拮抗性
抗 PD-1 scFv
(ABM3)

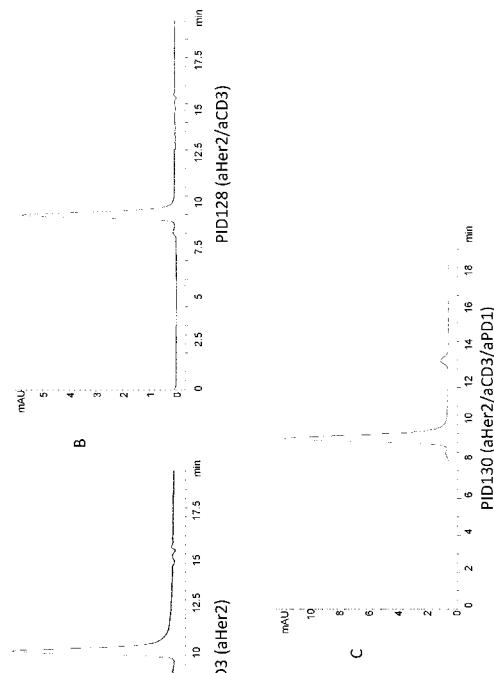
【図 20】



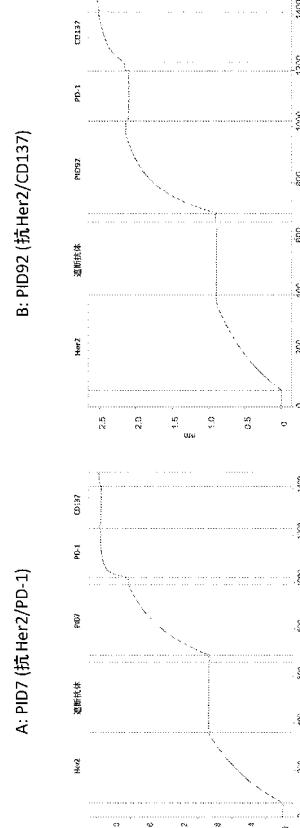
【図 21】



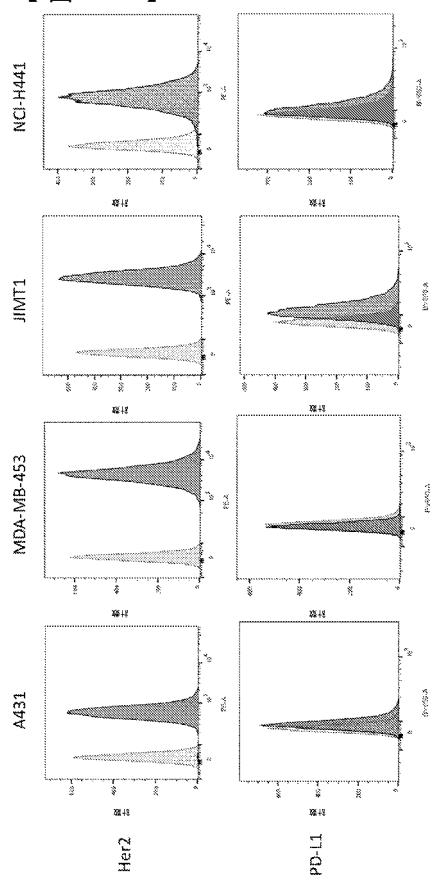
【図 22】



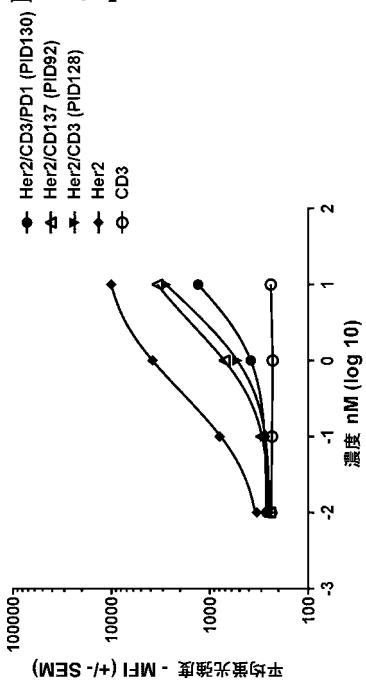
【図 23】



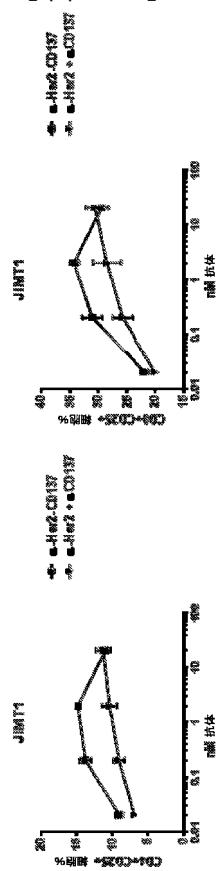
【図 2 4】



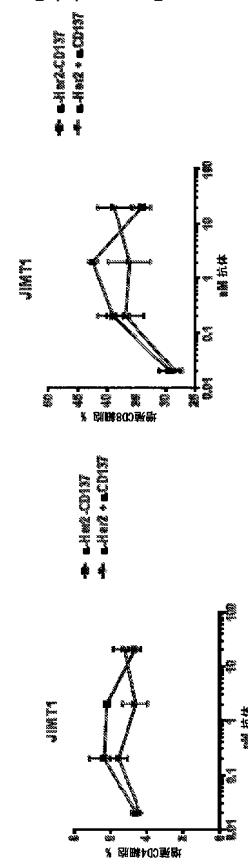
【図 2 5】



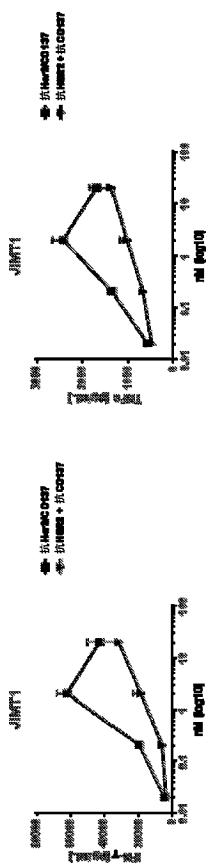
【図 2 6】



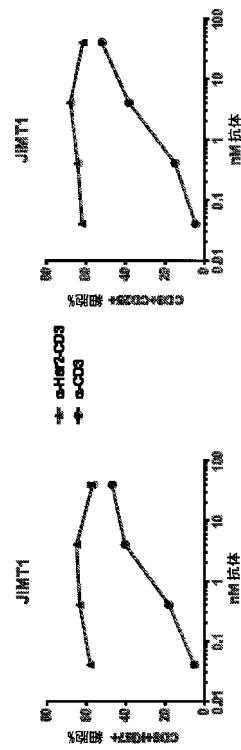
【図 2 7】



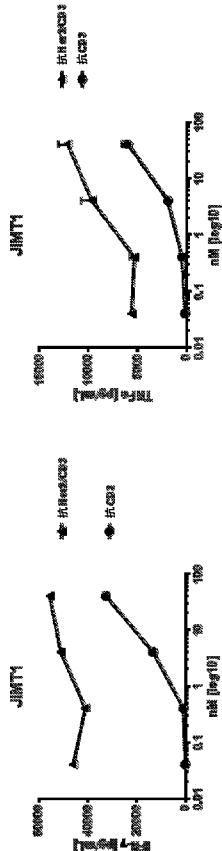
【図28】



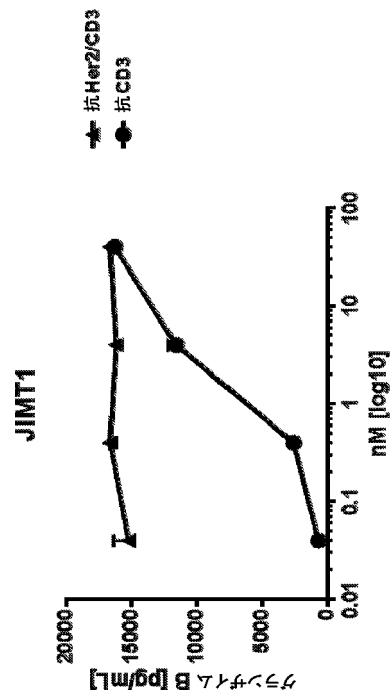
【図29】



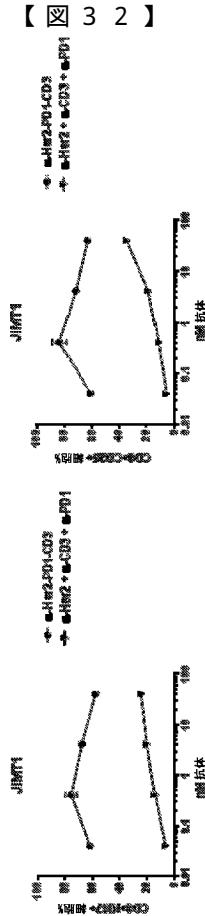
【図30】



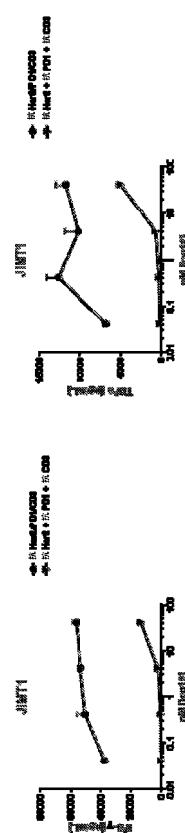
【図31】



【図3-2】



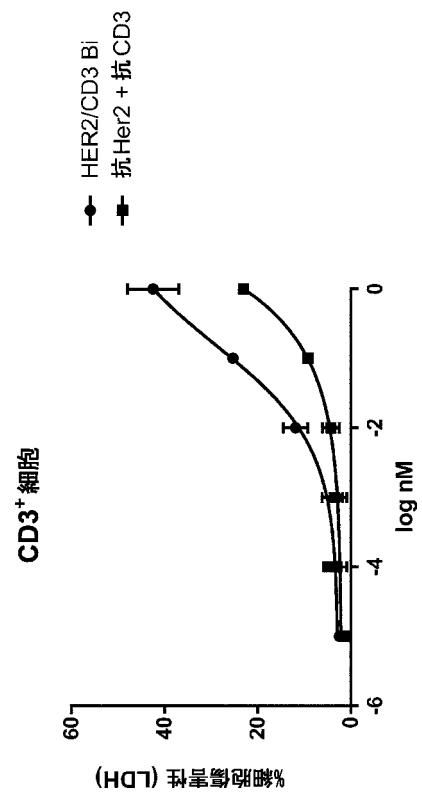
【図3-3】



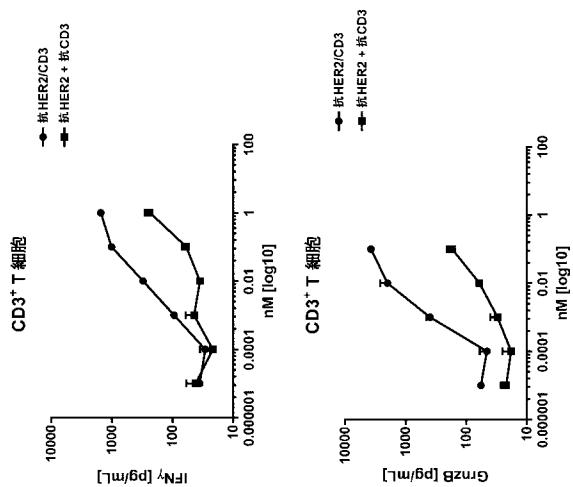
【図3-4】



【図3-5】



【図 3 6】



【手続補正書】

【提出日】平成29年9月15日(2017.9.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018503399000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/013291
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/00 (2016.01) CPC - C07K 2317/31 (2016.02) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00, 16/28, 16/32; C12N 15/13 (2016.01) CPC - A61K 39/395; C07K 16/28, 16/2863, 16/32, 16/468, 2317/31, 2317/55, 2317/622, 2317/72 (2016.02)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/136.1, 138.1; 435/328; 530/387.3 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar. Search terms used: multispecific, multivalent, bispecific, antibody, antigen, epitope, monoclonal, inhibition, activation, proliferation, cancer, tumor, cell, receptor, Fc, scFv, Fab, CD25, CD30, CD137, IFN, PD-1, PDCD1, CD279, SLEB2, TNFRSF8, TNFRSF9		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0155275 A1 (WU et al) 18 June 2009 (18.06.2009) entire document	1, 4-10, 35-40
Y		2, 3
Y	US 2002/004587 A1 (MILLER et al) 10 January 2002 (10.01.2002) entire document	2, 3
A	US 2008/0069820 A1 (FUH et al) 20 March 2008 (20.03.2008) entire document	1-10, 35-40
A	WO 2012/006490 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 12 January 2012 (12.01.2012) entire document	1-10, 35-40
A	WO 2014/100490 A1 (ADIMAB, LLC) 26 June 2014 (26.06.2014) entire document	1-10, 35-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 March 2016	Date of mailing of the international search report 21 APR 2016	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT DSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/013291

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

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

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

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 11-34, 41-68 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F	I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929	弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699	弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048	弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506	弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707	弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340	弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889	弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072	弁理士 川本 和弥
(72)発明者 シュット トーマス ジョセフ	アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2 4 5 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
(72)発明者 ボブロウイック ピオトロ	アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2 4 5 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
(72)発明者 サブゼバリ ヘレン	アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2 4 5 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
(72)発明者 シュミット マイケル マーチ	アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2 4 5 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内
(72)発明者 タイ ロバート ブイ ザ サード	アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2 4 5 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内

(72)発明者 メテノウ サイモン

アメリカ合衆国 02142 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト ストリート 2

45 コンパス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー内

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA05

4C085 AA14 BB01 CC02 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28

FA74 GA26

【要約の続き】

