

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6441079号
(P6441079)

(45) 発行日 平成30年12月19日(2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/30	(2006.01) C07K 16/30
C07K 16/46	(2006.01) C07K 16/46 Z N A
C12N 15/13	(2006.01) C12N 15/13
C12P 21/08	(2006.01) C12P 21/08
C12N 1/15	(2006.01) C12N 1/15

請求項の数 31 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-547791 (P2014-547791)
(86) (22) 出願日	平成24年11月12日 (2012.11.12)
(65) 公表番号	特表2015-502373 (P2015-502373A)
(43) 公表日	平成27年1月22日 (2015.1.22)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/072364
(87) 國際公開番号	W02013/092001
(87) 國際公開日	平成25年6月27日 (2013.6.27)
審査請求日	平成27年11月10日 (2015.11.10)
(31) 優先権主張番号	61/577,327
(32) 優先日	平成23年12月19日 (2011.12.19)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	514154617 シンイミューン ゲーエムベーハー ドイツ連邦共和国 テュービンゲン アウ フ デア モルゲンシュテレ 15
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重特異性抗体分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含む一本鎖Fv断片、および免疫グロブリンCH2ドメインからなる、組み換え二重特異性抗体分子であって、

該Fab断片が、ヒンジ領域をさらに含み、該Fab断片および該一本鎖Fv断片が、該CH2ドメインを介して連結され、Fc受容体への結合を仲介できる該ヒンジ領域または該CH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基が、欠如または変異されており、該欠如または変異された、Fc受容体への結合を仲介できる該ヒンジ領域または該CH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基が、配列位置228、230、231、232、233、234、235、236、237、238、265、297、327、および330 (EU指標にしたがう配列位置の付番) からなる群より選択され、かつ置換Glu233 Pro、置換Leu234 Val、置換Leu235 Ala、アミノ酸236の欠失、置換Asp265 Gly、置換Asn297 Gln、置換Ala327 Gln、および置換Ala330 Serからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含み、さらに、配列位置226および229のシステイン残基 (EU指標にしたがう配列位置の付番) が欠如または変異している、組み換え二重特異性抗体分子。

【請求項 2】

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが腫瘍関連抗原を結合する、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項 3】

腫瘍関連抗原が腫瘍の脈管構造上に位置する、請求項2に記載の抗体分子。

【請求項4】

腫瘍関連抗原が表面抗原であるかまたは細胞外マトリックスの抗原である、請求項2または3に記載の抗体分子。

【請求項5】

腫瘍関連抗原が、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CDw52、Fms様チロシンキナーゼ3 (FLT-3、CD135)、c-Kit (CD117)、CSF1R、(CD115)、CD133、PDGFR- (CD140a)、PDGFR- (CD140b)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4)、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、EGFR、de2-7-EGFR、EGFRvIII、葉酸結合タンパク質、Her2neu、Her3、PSMA、PSCA、PSA、TAG-72、HLA-DR、IGFR、CD133、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、カルボアンヒドライIX (MN/CA IX)、がん胎児性抗原(CEA)、EpCAM、CDCP1、Derlin1、テネイシン、frizzle d 1~10、血管抗原VEGFR2 (KDR/FLK1)、VEGFR3 (FLT4、CD309)、エンドグリン、CLEC14、Tem1~8、およびTie2からなる群より選択される、請求項2~4のいずれか一項に記載の抗体分子。
10

【請求項6】

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが、T細胞特異的な受容体分子またはNK (ナチュラルキラー)細胞特異的な受容体分子を結合する、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項7】
20

T細胞特異的な受容体分子またはNK細胞特異的な受容体分子が、CD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つである、請求項6に記載の抗体分子。

【請求項8】

TCRがTCR (/)またはTCR (/)である、請求項7に記載の抗体分子。

【請求項9】

Fab断片が、Fab断片の重鎖CH1およびVHドメインを介してまたはFab断片のCLおよびVL軽鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される、請求項1~8のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項10】
30

Fab断片の重鎖ドメインまたはFab断片の軽鎖ドメインが、ポリペプチド鎖のN末端に配置される、請求項9に記載の抗体分子。

【請求項11】

CH2ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の軽鎖の可変ドメイン(VLドメイン)を介してscFv断片に連結される、請求項10に記載の抗体分子。

【請求項12】

CH2ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の重鎖の可変ドメイン(VHドメイン)を介してscFv断片に連結される、請求項10に記載の抗体分子。

【請求項13】

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片が、CH1ドメインに融合したVLドメインおよびCLドメインに融合したVHドメインからなる、請求項1~8のいずれか一項に記載の抗体分子。
40

【請求項14】

Fab断片のCH1ドメインがCH2ドメインに融合している、請求項13に記載の抗体分子。

【請求項15】

Fab断片のVL-CH1鎖が、ポリペプチド鎖のN末端に配置される、請求項13または請求項14に記載の抗体分子。

【請求項16】

第1の結合部位が腫瘍関連表面抗原を結合し、かつ第2の結合部位がCD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つを結合する、
50

請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項17】

位置226および229の一方または両方のシステインが、異なるアミノ酸によって置き換えられている、請求項1に記載の抗体分子。

【請求項18】

置換Glu233 Pro、置換Leu234 Val、アミノ酸234の欠失、置換Leu235 Ala、アミノ酸235の欠失、アミノ酸236の欠失、置換Asp265 Gly、置換Asn297 Gln、置換Ala327 Gln、および置換Ala330 Serからなる群より選択される少なくとも1つの変異をさらに含む、請求項16または17に記載の抗体分子。

【請求項19】

SEQ ID NO: 6を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体分子。

10

【請求項20】

SEQ ID NO: 1を含む、請求項19に記載の抗体分子。

【請求項21】

SEQ ID NO: 7を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項22】

SEQ ID NO: 2を含む、請求項21に記載の抗体分子。

【請求項23】

請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体分子を含む、薬学的組成物。

【請求項24】

疾患の処置で用いるための、請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体分子。

20

【請求項25】

疾患が増殖性疾患である、請求項24に記載の抗体分子。

【請求項26】

増殖性疾患が、急性および慢性の骨髄球性白血病およびリンパ性白血病、ならびにリンパ腫などの造血性悪性腫瘍、胃腸管腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、間葉腫瘍およびメラノーマなどの固形腫瘍からなる群より選択される、請求項25に記載の抗体分子。

【請求項27】

請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体分子をコードする、核酸分子。

30

【請求項28】

ベクターに含まれる請求項27に記載の核酸分子。

【請求項29】

請求項27に記載の核酸分子または請求項28に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項30】

抗体分子をコードする核酸を、該核酸の発現を可能にする条件の下で発現させる段階を含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体分子を产生する方法。

【請求項31】

抗体分子が宿主細胞または無細胞系において発現される、請求項30に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年12月19日付で米国特許商標庁に出願された米国仮特許出願第61/577,327号の優先権を主張するものであり、その内容全体が全ての目的で本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、二重特異性抗体分子、ならびにそれを產生するための方法、その使用および二重特異性抗体分子をコードする核酸分子に関する。本発明は、詳細には、免疫細胞の標

50

的細胞限定的な活性化を仲介できる抗体分子を提供する。

【背景技術】

【0003】

背景

抗原特異的T細胞受容体(TCR)/CD3-複合体に対するモノクローナル抗体は、T細胞を効率的に活性化することができる。しかしながら、この活性化には、抗体がそのFc部分を介して、Fc受容体発現細胞の表面上で多量体化されることが必要であり、該細胞はしばしば、T細胞活性化の補助シグナルを提供する(Davis, L., Vida, R. and Lipsky, P.E., Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, *J. Immunol.* [1986] 137: 3758-3767 (非特許文献1))。

10

【0004】

標的細胞上の抗原(例えば白血病細胞上のFLT3もしくはCD19、メラノーマ細胞上のCSPG4抗原または膠芽腫細胞上のEGFR)と抗原特異的T細胞受容体(TCR)/CD3-複合体の両方を認識する二重特異性抗体は同様に、T細胞を活性化することができる(Jung,G., Ledbetter,J.A., and Muller-Eberhard,H.J., Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* [1987] 84: 4611-4615 (非特許文献2) ; Jung,G., & Eberhard,H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol.Today* [1988] 9: 257-260 (非特許文献3) ; Jung,G., Brandl,M., Eisner,W., Fraunberger,P., Reifenberger,G., Schlegel,U., Wiestler,O.D., Reulen,H.J., Wilmanns,W. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ T-cell activation and therapeutic efficacy, *Int J Cancer.* [2001] 91 : 225-30 (非特許文献4))、さらに、活性化細胞を標的細胞に集中させることができる(Staerz,U.D., Kanagawa,O., and Bevan,M.J., Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, *Nature* [1985] 314: 628-631 (非特許文献5) ; Perez,P., Hoffman, R.W., Shaw,S., Bluestone,J.A., and Segal, D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, *Nature* [1985] 316: 354-356 (非特許文献6) ; Jung,G., Honsik,C.J., Reisfeld,R.A. and Muller- Eberhard,H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 83: 4479-4483, 1986 (非特許文献7))。結果として、腫瘍細胞のT細胞仲介性の溶解が起こる。CD28のような、T細胞共刺激分子に対するアゴニスト抗体は、抗CD3仲介性のT細胞活性化を増強する。そのような共刺激抗体は、それらも二重特異性の形式で提供されるならば、特に有効である(Grosse-Hovest,L., Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H.G., and Jung,G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur.J. Immunol.* [2003] 33: 1334-1340 (非特許文献8))。いずれにせよ、本発明者らは、Fc受容体への結合を排除できることを、CD3特異性を有する二重特異性抗体の治療的適用のための絶対条件と考える(Jung, G., and Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol.Today* [1988] 9: 257-260 (非特許文献9) ; Jung,G., Freimann,U., Von Marzahl,Z., Reisfeld,R.A., and Wilmanns,W., Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, *Eur.J. Immunol.* [1991] 21: 2431-2435 (非特許文献10))。Fc受容体へのそのような結合はインビボでT細胞活性化を引き起こすものと考えられ、これは、標的抗原への結合にかかわらず、Fc受容体発現細胞が見出されうるいの場所でも、例えば造血系、リンパ系および細網内皮系全体で起きる。経験によれば、そのようなT細胞活性化は、T細胞活性化サイトカインまたは抗体の治療的使用中の重篤な有害反応であるサイトカイン放出症候群を伴う、T細胞の全身的活性化を引き起こす(Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang,J.C., Aebersold,P.M., Linehan,W.M., Seipp,C.A., and White, D.E., Experience with the use of high-dose interleukin-2 in t

20

30

40

50

he treatment of 652 cancer patients, Ann. Surg. [1989] 210: 474-484 (非特許文献11) ; Tibben,J.G., Boerman,O.C, Massuger,L.F., Schijf,C.P., Claessens,R.A., and Corstens,F.H., Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')2 in ovarian carcinoma patients, Int.J. Cancer [1996] 66: 477-483 (非特許文献12) ; Kroesen,B.J., Buter,J., Sleijfer,D.T., Janssen,R.A., van der Graaf,W.T., The,T.H., de, L.L. and Mulder,N.H., Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2, Br.J. Cancer [1994] 70: 652-661 (非特許文献13))。ゆえに、二重特異性CD3抗体の形式化を定めることにおける目的には、Fcを介したT細胞の全身的活性化を回避し、それによって、対応する標的抗原への二重特異性抗体の標的部分の結合に限定的に依存した、標的細胞限定的な活性化を可能にすることが必要である(Jung,G., & Eberhard,H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol. Today [1988] 9: 257-260 (非特許文献14) ; Jung,G., Freimann,U., Von Marshall,Z., Reisfeld,R.A., and Willmanns, W. Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, Eur. J. Immunol. [1991] 21: 2431-2435 (非特許文献15))。上記から、標的抗原を選択する場合に、可能な限り悪性細胞に限定される発現に目配りしなければならないことが明らかになる。このようにして、非悪性細胞による活性化および付随したサイトカイン放出を、可能な限り低く保つことができる。

【0005】

NK細胞上に発現されるCD16のような、T細胞以外の免疫細胞上の誘発性受容体に結合する作動性エフェクタ抗体を含む二重特異性抗体が構築される場合に、考慮すべき類似の事柄があてはまる。いずれにせよ、T細胞について上記で概説した論拠により、Fc受容体への抗体のFc仲介性結合は回避されるべきである。

【0006】

現在、臨床開発において最も進んでいる二重特異性抗体は、CD19×CD3特異性、ならびにリンパ腫および白血病細胞に対する並外れた治療活性を有する二重特異性の一本鎖抗体ブリナツモマブ(Micromet, Inc., Rockville, MD)である(Bargou, R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, Science [2008] 321: 974-977 (非特許文献16) ; Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, J. Clin. Oncol. [2011] 29: 2493-2498 (非特許文献17))。

【0007】

一本鎖の形式はFc部分のいずれのドメインも含まないので、この抗体は、上記で説明された意味の範囲内で標的細胞限定的であり、すなわちこれは、CD19発現標的細胞の存在下でT細胞を活性化させるのみである(Brischwein,K., et al., Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class, J. Immunother. [2007] 30: 798-807 (非特許文献18))。

【0008】

しかしながら、CD19は、正常B細胞にも発現され、その結果、標的細胞に限定したにもかかわらず、治療的適用の後にサイトカインの全身放出が起こり、これにより以前100 μg前後の日用量でかなりの細胞毒性を引き起こしている(Bargou,R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, Science [2008] 321: 974-977 (非特許文献19) ; Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, J.Clin.Oncol. [2011] 29: 2493-2498 (非特許文献20))。

10

20

30

40

50

【0009】

さらに、一本鎖の形式は以下の欠点を有する：(i) 約50 kDaの分子量は比較的小さく、短い血清中半減期を伴い、(ii) この形式の抗体は容易に凝集し、かつ(iii) 従来の発酵プロセスで產生することが困難である(Grosse-Hovest,L., Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H.G., and Jung,G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, Eur.J. Immunol. [2003] 33: 1334-1340 (非特許文献21)；Grosse-Hovest,L., et al., Clone d transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A [2004] 101: 6858-6863 (非特許文献22))。

10

【0010】

それゆえ、上記の困難の少なくともいくつかを克服し、かつ治療において、とりわけ上記のような厳密な標的細胞限定的な免疫細胞活性化のために一般に使用できる二重特異性抗体分子を提供することが本発明の目的である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Davis, L., Vida, R. and Lipsky, P.E., Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, J. Immunol. [1986] 137: 3758-3767

20

【非特許文献2】Jung,G., Ledbetter,J.A., and Muller-Eberhard,H.J., Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A [1987] 84: 4611-4615

【非特許文献3】Jung,G., & Eberhard,H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol.Today [1988] 9: 257-260

【非特許文献4】Jung,G., Brandl,M., Eisner,W., Fraunberger,P., Reifenberger,G., Schlegel,U., Wiestler,O.D., Reulen,H.J., Wilmanns,W. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ T-cell activation and therapeutic efficacy, Int J Cancer. [2001] 91 : 225-30

【非特許文献5】Staerz,U.D., Kanagawa,O., and Bevan,M.J., Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, Nature [1985] 314: 628-631

30

【非特許文献6】Perez,P., Hoffman, R.W., Shaw,S., Bluestone,J.A., and Segal, D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, Nature [1985] 316: 354-356

【非特許文献7】Jung,G., Honsik,C.J., Reisfeld,R.A. and Muller-Eberhard,H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 83: 4479-4483, 1986

【非特許文献8】Grosse-Hovest,L., Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H.G., and Jung,G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, Eur.J. Immunol. [2003] 33: 1334-1340

40

【非特許文献9】Jung, G., and Eberhard, H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol.Today [1988] 9: 257-260

【非特許文献10】Jung,G., Freimann,U., Von Marshall,Z., Reisfeld,R.A., and Wilmanns,W., Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, Eur.J. Immunol. [1991] 21: 2431-2435

【非特許文献11】Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang,J.C., Aebersold,P.M., Linehan,W.M., Seipp,C.A., and White, D.E., Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients, Ann. Surg. [1989] 210: 474-484

50

【非特許文献 12】 Tibben,J.G., Boerman,O.C, Massuger,L.F., Schijf,C.P., Claessen s,R.A., and Corstens,F.H., Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')2 in ovarian carcinoma patients, Int.J. Cancer [1996] 66: 477-483

【非特許文献 13】 Kroesen,B.J., Buter,J., Sleijfer,D.T., Janssen,R.A., van der G raaf,W.T., The,T.H., de, L.L. and Mulder,N.H., Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2, Br.J. Cancer [1994] 70: 652-661

【非特許文献 14】 Jung,G., & Eberhard,H.J., An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, Immunol. Today [1988] 9: 257-260

【非特許文献 15】 Jung,G., Freimann,U., Von Marshall,Z., Reisfeld,R.A., and Wilm anns, W. Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, Eur. J. Immunol. [1991] 21: 2431-2435

【非特許文献 16】 Bargou, R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, Science [2008] 321: 974-977

【非特許文献 17】 Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-1 lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, J. Clin. Oncol. [2011] 29: 2493-2498

【非特許文献 18】 Brischwein,K., et al., Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class, J. Immunother. [2007] 30: 798-807

【非特許文献 19】 Bargou,R., et al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, Science [2008] 321: 974-977

【非特許文献 20】 Topp, M.S., et al., Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-1 lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, J.Clin.Oncol. [2011] 29: 2493-2498

【非特許文献 21】 Grosse-Hovest,L, Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H. G., and Jung,G., A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted , supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, Eur.J. Immunol. [2003] 33: 1334-1340

【非特許文献 22】 Grosse-Hovest,L, et al., Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A [2004] 101: 6858-6863

【発明の概要】

【0012】

第1の局面において、本発明は、組み換え二重特異性抗体分子を提供する。組み換え二重特異性抗体分子はFab断片、一本鎖Fv断片および免疫グロブリンCH2ドメインからなる。Fab断片は第1の抗原に対する第1の結合部位を含む。一本鎖Fv断片は第2の抗原に対する第2の結合部位を含む。Fab断片および一本鎖Fv断片は、CH2ドメインを介して互いにカップリングされる。典型的な態様において、重鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基(ヒトIgG-免疫グロブリンにおけるC226およびC229)が交換されている。

【0013】

第2の局面において、本発明は、四量体抗体分子を提供する。四量体抗体分子は、第1の局面による抗体分子の二量体を含む。二量体は概して、第1の局面の2つの抗体分子のシステイン残基間の、つまりヒンジ領域中のシステイン間の結合によって規定される。そのようなシステイン残基は、典型的には、保存されたアミノ酸(ヒトIgG-免疫グロブリンにおけるC226およびC229)である。

【0014】

10

20

30

40

50

第3の局面において、本発明は、組み換え二重特異性抗体分子を提供する。組み換え二重特異性抗体分子は、第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含む一本鎖Fv断片、免疫グロブリンCH2ドメイン、および免疫グロブリンCH3ドメインを含む。Fab断片および一本鎖Fv断片は、CH2ドメイン/CH3ドメインを介して連結される。Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基は、欠如しているかまたは変異している。この局面の典型的な態様において、鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)の少なくとも1個が交換される。いくつかの態様において、そのような分子は、同型CH3ドメインとの二量体化を妨害するCH3領域中のさらなる改変を含んでもよい。

【0015】

10

第4の局面において、本発明は、四量体抗体分子を提供する。四量体抗体分子は、第3の局面による組み換え二重特異性抗体分子の二量体からなる。二量体は概して、ヒンジ領域中の保存されたシステイン(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)間の結合によって規定される。

【0016】

20

第5の局面において、本発明は、さらなる組み換え二重特異性抗体分子を提供する。この抗体分子は、第1の抗原に対する第1の結合部位を含んだFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含んだ一本鎖Fv断片、免疫グロブリンCH2ドメイン、および免疫グロブリンCH3ドメインを含む。Fab断片および一本鎖Fv断片は、CH2ドメインおよびCH3ドメインを介して互いに連結される。二量体化のためのジスルフィド架橋を形成できるこの抗体分子の少なくとも1個のシステイン残基は、欠如しているかまたは変異している。

【0017】

第6の局面において、本発明は、核酸分子を提供する。核酸分子は、第1、第2、第3、第4または第5の局面のいずれか1つによる抗体分子をコードする。

【0018】

第7の局面において、本発明は、薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、第1、第2、第3、第4および第5の局面の1つによる抗体分子を含む。

【0019】

第8の局面において、本発明は、疾患を処置する方法を提供する。本方法は、第1、第2、第3、第4および第5の局面の1つによる抗体分子を用いる段階を含む。一般的には、抗体分子はそれを必要としている患者に投与される。

30

【0020】

第9の局面において、本発明は、第6の局面による核酸分子を含む宿主細胞を提供する。

【0021】

第10の局面において、本発明は、第1、第2、第3、第4および第5の局面の1つによる抗体分子を産生する方法を提供する。本方法は、抗体分子をコードする核酸を、核酸分子の発現を可能にする条件の下で発現させる段階を含む。

【0022】

[本発明1001]

40

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含む一本鎖Fv断片、および免疫グロブリンCH2ドメインからなり、該Fab断片および該一本鎖Fv断片が該CH2ドメインを介して連結される、組み換え二重特異性抗体分子。

[本発明1002]

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが腫瘍関連抗原を結合する、本発明1001の抗体分子。

[本発明1003]

腫瘍関連抗原が腫瘍の脈管構造上に位置する、本発明1002の抗体分子。

[本発明1004]

腫瘍関連抗原が表面抗原であるかまたは細胞外マトリックスの抗原である、本発明1002または1003の抗体分子。

50

[本発明1005]

腫瘍関連抗原が、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CDw52、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3、CD135)、c-Kit(CD117)、CSF1R、(CD115)、CD133、PDGFR-(CD140a)、PDGFR-(CD140b)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、EGFR、de2-7-EGFR、EGFRvIII、葉酸結合タンパク質、Her2neu、Her3、PSMA、PSCA、PSA、TAG-72、HLA-DR、IGFR、CD133、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、カルボアンヒドライゼIX(MN/CA IX)、がん胎児性抗原(CEA)、EpCAM、CDCP1、Derlin1、テネイシン、frizzle d 1~10、血管抗原VEGFR2(KDR/FLK1)、VEGFR3(FLT4、CD309)、エンドグリン、CLEC14、Tem1~8、およびTie2からなる群より選択される、本発明1002~1004のいずれかの抗体分子。

10

[本発明1006]

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが、T細胞特異的な受容体分子またはNK(ナチュラルキラー)細胞特異的な受容体分子を結合する、本発明1001~1005のいずれかの抗体分子。

[本発明1007]

T細胞特異的な受容体分子またはNK細胞特異的な受容体分子が、CD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つである、本発明1006の抗体分子。

20

[本発明1008]

TCRがTCR(/)またはTCR(/)である、本発明1007の抗体分子。

[本発明1009]

Fab断片が、Fab断片の重鎖CH1およびVHドメインを介してまたはFab断片のCLおよびVL軽鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1010]

Fab断片の重鎖ドメインまたはFab断片の軽鎖ドメインが、ポリペプチド鎖のN末端に配置される、本発明1009の抗体分子。

[本発明1011]

CH2ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の軽鎖の可変ドメイン(VLドメイン)を介してscFv断片に連結される、本発明1010の抗体分子。

30

[本発明1012]

CH2ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の重鎖の可変ドメイン(VHドメイン)を介してscFv断片に連結される、本発明1010の抗体分子。

[本発明1013]

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片が、CH1ドメインに融合したVLドメインおよびCLドメインに融合したVHドメインからなる、本発明1001~1008のいずれかの抗体分子。

[本発明1014]

Fab断片のCH1ドメインがCH2ドメインに融合している、本発明1013の抗体分子。

[本発明1015]

Fab断片のVL-CH1鎖が、ポリペプチド鎖のN末端に配置される、本発明1013または本発明1014の抗体分子。

40

[本発明1016]

Fab断片がヒンジ領域を含む、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1017]

第1の結合部位が腫瘍関連表面抗原を結合し、かつ第2の結合部位がCD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つを結合する、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1018]

Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基が欠如して

50

いるかまたは変異している、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1019]

アミノ酸残基が、配列位置230、231、232、233、234、235、236、237、238、265、297、327、および330 (EU指標にしたがう配列位置の付番)からなる群より選択される、本発明1018の抗体分子。

[本発明1020]

配列位置226、228および229のうちさらに1個または複数個のアミノ酸残基が欠如しているかまたは変異している、本発明1019の抗体分子。

[本発明1021]

位置226および229の一方または両方のシステインが、異なるアミノ酸によって置き換えられている、本発明1020の抗体分子。

10

[本発明1022]

アミノ酸228の欠失、アミノ酸229の欠失、アミノ酸230の欠失、アミノ酸231の欠失、アミノ酸232の欠失、アミノ酸233の欠失、置換Glu233 Pro、置換Leu234 Val、アミノ酸234の欠失、置換Leu235 Ala、アミノ酸235の欠失、アミノ酸236の欠失、アミノ酸237の欠失、アミノ酸238の欠失、置換Asp265 Gly、置換Asn297 Gln、置換Ala327 Gln、および置換Ala330 Serからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む、本発明1019～1021のいずれかの抗体分子。

[本発明1023]

二重特異性抗体分子のヒンジ領域間にジスルフィド架橋を含む、本発明1001～1019のいずれかの抗体分子の二量体を含む四量体抗体分子。

20

[本発明1024]

ジスルフィド架橋が、配列位置226または229 (EU指標にしたがう配列位置の付番)のシステイン残基の少なくとも1つによって形成される、本発明1023の四量体抗体分子。

[本発明1025]

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含む一本鎖Fv断片、免疫グロブリンCH2ドメイン、および免疫グロブリンCH3ドメインを含み、該Fab断片および該一本鎖Fv断片が該CH2ドメインおよび該CH3ドメインを介して互いに連結され、かつ二量体化のためのジスルフィド架橋を形成できる少なくとも1個のシステイン残基が欠如しているかまたは変異している、組み換え二重特異性抗体分子。

30

[本発明1026]

位置226および229 (EU指標にしたがう配列位置の付番)の一方または両方のシステインが欠如しているかまたは異なるアミノ酸によって置き換えられている、本発明1025の抗体分子。

[本発明1027]

CH3ドメインの二量体化を妨害する、該CH3ドメインにおける少なくとも1つの改変を含む、本発明1025または1026の抗体分子。

[本発明1028]

Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメインのアミノ酸残基が欠如しているかまたは変異している、本発明1025～1027のいずれかの抗体分子。

40

[本発明1029]

第1の抗原に対する第1の結合部位を含むFab断片、第2の抗原に対する第2の結合部位を含む一本鎖Fv断片、免疫グロブリンCH2ドメイン、および免疫グロブリンCH3ドメインを含み、該Fab断片および該一本鎖Fv断片が該CH2ドメインおよび該CH3ドメインを介して互いに連結され、かつFc受容体への結合を仲介できる該CH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基が欠如しているかまたは変異している、組み換え二重特異性抗体分子。

[本発明1030]

Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメインの少なくとも1個のアミノ酸残基が欠如しているかまたは変異しており、配列位置228、230、231、232、233、234、235、236、237、238、265、297、327、および330 (EU指標にしたがう配列位置の付番)からなる群より選択

50

される、本発明1028または本発明1029の抗体分子。

[本発明1031]

アミノ酸228の欠失、アミノ酸230の欠失、アミノ酸231の欠失、アミノ酸232の欠失、アミノ酸233の欠失、置換Glu233 Pro、アミノ酸234の欠失、アミノ酸Leu234 Valの置換、アミノ酸235の欠失、置換Leu235 Ala、アミノ酸236の欠失、アミノ酸237の欠失、アミノ酸238の欠失、置換Asp265 Glu、置換Asn297 Gln、置換Ala327 Gln、および置換Ala330 Serからなる群より選択される少なくとも1つの変異を含む、本発明1030の抗体分子。

[本発明1032]

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが腫瘍関連表面抗原を結合する、本発明1025～1031のいずれかの抗体分子。

10

[本発明1033]

腫瘍関連表面抗原が、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CDw52、Fms様チロシンキナーゼ3 (FLT-3、CD135)、c-Kit (CD117)、CSF1R (CD115)、CD133、PDGFR- (CD140a)、PDGFR- (CD140b)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、EGFR、de2-7-EGFR、EGFRvIII、葉酸結合タンパク質、Her2neu、Her3、PSMA、PSCA、PSA、TAG-72、HLA-DR、IGFR、CD133、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、カルボアンヒドラーーゼIX (MN/CA IX)、がん胎児性抗原(CEA)、EpCAM、CDCP1、Derlin1、テネイシン、frizzled 1～10、血管抗原VEGFR2 (KDR/FLK1)、VEGFR3 (FLT4、CD309)、エンドグリン、CLEC14、Tem1～8、およびTie2からなる群より選択される、本発明1032の抗体分子。

20

[本発明1034]

第1の結合部位または第2の結合部位のいずれかが、T細胞に関連する受容体分子またはNK細胞に関連する受容体分子を結合する、本発明1025～1033のいずれかの抗体分子。

[本発明1035]

T細胞に関連する受容体分子またはNK細胞に関連する受容体分子が、CD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つである、本発明1034の抗体分子。

[本発明1036]

TCRがTCR (/)またはTCR (/)である、本発明1035の抗体分子。

30

[本発明1037]

Fab断片が、Fab断片の重鎖ドメインを介してまたはFab断片の軽鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1038]

Fab断片の重鎖ドメインが、ポリペプチド鎖のN末端に配置される、本発明1037の抗体分子。

[本発明1039]

CH2/CH3ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の軽鎖の可変ドメイン(VLドメイン)を介してscFv断片に連結される、本発明1038の抗体分子。

[本発明1040]

CH2/CH3ドメインが、第2の結合部位を含むscFv断片の重鎖の可変ドメイン(VHドメイン)を介してscFv断片に連結される、本発明1039の抗体分子。

40

[本発明1041]

Fab断片が、Fab断片の重鎖ドメインを介してまたはFab断片の軽鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される、前記本発明のいずれかの抗体分子。

[本発明1042]

第1の結合部位が腫瘍関連表面抗原を結合し、かつ第2の結合部位がCD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つを結合する、本発明1025～1041のいずれかの抗体分子。

[本発明1043]

配列位置226および/または229 (EU指標にしたがう配列位置の付番)にシステイン残基を

50

含む、本発明1029～1042のいずれかの抗体分子。

[本発明1044]

二量体化のためのジスルフィド架橋を形成できる少なくとも1個のシステイン残基が欠如しているかまたは変異している、本発明1029～1042のいずれかの抗体分子。

[本発明1045]

CH3ドメインの二量体化を妨害する、該CH3ドメインにおける少なくとも1つの改変を含む、本発明1029～1043のいずれかの抗体分子。

[本発明1046]

本発明1029～1043のいずれかの二重特異性抗体分子の二量体からなる四量体抗体分子。

[本発明1047]

二重特異性抗体分子のヒンジ領域間にジスルフィド架橋を含む、本発明1046の四量体抗体分子。

[本発明1048]

ジスルフィド架橋が、配列位置226または229 (EU指標にしたがう配列位置の付番)のシステイン残基の少なくとも1つによって形成される、本発明1047の四量体抗体分子。

[本発明1049]

前記本発明のいずれかの抗体分子を含む、薬学的組成物。

[本発明1050]

疾患の処置で用いるための、本発明1001～1048のいずれかの抗体分子。

[本発明1051]

疾患が増殖性疾患である、本発明1050の抗体分子。

[本発明1052]

増殖性疾患が、急性および慢性の骨髄球性白血病およびリンパ性白血病、ならびにリンパ腫などの造血性悪性腫瘍、胃腸管腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、間葉腫瘍およびメラノーマなどの固形腫瘍からなる群より選択される、本発明1051の抗体分子。

[本発明1053]

本発明1001～1048のいずれかの抗体分子をコードする、核酸分子。

[本発明1054]

ベクターに含まれる本発明1053の核酸分子。

[本発明1055]

本発明1053の核酸分子または本発明1054のベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1056]

抗体分子をコードする核酸を、該核酸の発現を可能にする条件の下で発現させる段階を含む、本発明1001～1048のいずれかの抗体分子を产生する方法。

[本発明1057]

抗体分子が宿主細胞または無細胞系において発現される、本発明1056の方法。

本発明のこれらの局面は、以下の説明、添付の図面および非限定的な実施例を考慮してさらに十分に理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

(図1) 本発明による二重特異性抗体分子の態様を模式的に示す。

図1Aは、Fab断片、CH2ドメインおよび一本鎖Fv断片を有する二価分子を示す。抗体分子は、CH2ドメインがそのN末端を介してFab断片の重鎖CH1およびVHドメインにカップリングされ、かつそのC末端を介して一本鎖Fv断片にカップリングされている主鎖を有する(bsFc-1/2-形式)。

図1Bは、CH2ドメインがFab断片の軽鎖に連結されている主鎖を有する、すなわち、主鎖がVLおよびCLドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む、二価抗体分子を示す。

図1Cは、主鎖がVLおよびCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメインならびに一本鎖Fv断片

10

20

30

40

50

を含む、二価抗体分子を示す。低い方の重量の第2鎖は、VHおよびCLドメインを含む。図1Cの抗体分子において、Fab断片はしたがって、軽鎖および重鎖の可変ドメインがその各定常ドメイン(それぞれCLまたはCH1)に融合している「古典的な(天然に存在する)」Fab断片ではなく、可変ドメインが「逆鎖の定常ドメインに融合している、すなわち、VHドメインがCLドメインに融合し、かつVLドメインがCH1ドメインに融合している、「ハイブリッド」Fab断片である。

図1Dは、CH2ドメインがCLおよびVHドメインに連結されている主鎖を有する、二価抗体分子を示す。低い方の重量の第2鎖は、VLおよびCH1ドメインを含む。図1Dの抗体分子はしたがって、図1Cの分子にも存在していたように、「ハイブリッドFab断片」(第1の結合部位を含む)を含む。
10

図1Eは、CH2ドメインおよび/またはヒンジ領域におけるアミノ酸が改変された(図10、bsFc^{k°}-1/2-形式に示されたように「X」により示された)、図1Aにあるような基本構造を有する二価抗体分子を示す。同様に、そのような改変を、1B～1Dに示された分子に挿入することができる。図1A～1Eに示された分子において、鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)が、二量体の形成を妨害するように交換されている()。

図1Fは、例示的な態様として、図1Aに示された単位の二量体である四価分子を示す。そのような分子は、図1Eに示されたFcの改変有りおよび無しで、図1B～1Dに示されたFabの立体配置で構築されてもよい。これらの改変は、図1Pに記載されている。

図1Gは、例示的な態様として、Fab断片、CH2ドメイン、CH3ドメインおよび一本鎖Fv断片を含む単位の二量体である、四価分子を示す。CH2ドメインにおけるおよびヒンジ領域におけるアミノ酸が改変されている(X); 図1Pに要約されている。抗体の2本の主鎖がVHおよびCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む(bsFc^{k°}-1-形式)。類似の分子が、図1A～1Eに示されたFabの立体配置で構築されてもよい。これらの全ての分子において、二量体は、ヒンジ領域中の保存されたシステイン(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)によって規定される。
20

図1Hは、Fab断片、CH2ドメイン、CH3ドメインおよび一本鎖Fv断片を含む単位の二量体である、四価分子を示す。Fab断片のなかで、抗体の2本の主鎖がVHおよびCLドメインを含む。

図1Iは、図1Gに示された一般的な基本構造を有する四価抗体を示す。図1Gの態様とは対照的に、この抗体の2本の主鎖のうちの1本だけが、改変されているCH2ドメインおよびヒンジ領域におけるアミノ酸(「X」により示された)を含む。
30

図1Jは、2本の主鎖がVLおよびCLドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む、四価分子を示す。

図1Kは、2つの構造的に異なるFab断片を有する四価分子を示す。抗体の第1の主鎖は、VLおよびCLドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む。抗体の第2の主鎖は、VHおよびCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む。

図1Lは、Fab断片、CH2ドメイン、CH3ドメインおよび一本鎖Fv断片を含む単位の二量体である、四価分子を示す。Fab断片のなかで、抗体の2本の主鎖がVLおよびCH1ドメインを含む。
40

図1Mは、2つの構造的に異なるFab断片を有するさらなる四価分子を示す。抗体の第1の主鎖は、VLおよびCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む。抗体の第2の主鎖は、VHおよびCLドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を含む。

図1Nは、例示的な態様として、Fab断片、CH2およびCH3ドメインならびに一本鎖Fv断片を有する二価分子を示す。この抗体分子は、CH2ドメインがそのN末端を介してFab断片の重鎖CH1およびVHドメインにカップリングされ、かつそのC末端を介して、一本鎖Fv断片にC末端を介してカップリングされているCH3ドメインにカップリングされている主鎖を有する。そのような分子は、図1A～1Dに示されたFabの立体配置で構築されてもよく、図1Eお
50

より10に示されたようにヒンジおよびCH2領域におけるFcの改変(「X」)を含んでもよい。さらに、それらはCH3ドメインにおける改変を含んでもよく、これによりこのドメインの二量体化を妨害し、かつ新生児型Fc受容体(FcRn)への結合に影響を与えてよい。二量体化に関与し、したがって欠失もしくは変異により改変されうる残基の例としてはT366、L368、F405、Y407、およびK409が挙げられる(Dall'Aqua et al. 「Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers」 Biochemistry (1998) Volume: 37, Issue: 26, Pages: 9266-9273を参照のこと。改変されうる、CH3ドメイン界面における他の接触残基には、Q347、Y349、T350、L351、L368、K370、K392、T394、P395、V397、L398、D399、F405、Y407、およびK409が含まれる。S.Miller Protein-Protein Recognition and the Association of Immunoglobulin Constant Domains. J.Mol.Biol. (1990) Volume 216 pp 965-973、およびJ. Deisenhofer Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry (1981) Volume 20 pp 2361-2370を参照されたく、新生児型Fc受容体の結合に関する限りでは、例えば、CH2ドメインの以下のアミノ酸残基: T250、M252、S254、T256、T307 H310およびCH3ドメインの以下のアミノ酸残基: E380 M428、H433、N434、H435 (Roopenian & Akilesh; FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nature Reviews Immunology (2007) Volume 7 pp:715-725の概説を参照のこと。本発明のこれらの分子の全てにおいて、鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)が、二量体の形成を妨害するように交換されている()。

10

20

図1A～1Nに示されていないさらなる例示的な態様には、示された態様に対して、C末端の一本鎖Fv部分が、示されたVH-VL方向ではなくVL-VH方向にあり、VLドメインが各定常ドメインに融合していることを意味しうる、分子が含まれる。

図10は、図1Eに例示されている、Fcを欠く誘導体を得るために図1A～Dおよび図1Nに示された二価抗体変種に導入されうる例示的な改変を記載している。改変は、保存されたシステイン(ヒトIgG-抗体におけるC226およびC229)を除いて図1Pに示されているものと同一である。アミノ酸の付番はKabat付番[EU指標]にしたがっている。wt = IgG1ヒト野生型配列; 1 = ノックアウト;

グリカン = Δ1-糖類部分の欠失によるノックアウト \approx 297

; 2-5 1に続いてのさらなるノックアウト変種; - = アミノ酸が欠失されている。

30

図1Pは、図1F～Mに示された四価分子を得るために使用されうる例示的な改変を記載している。アミノ酸の付番はKabat付番[EU指標]にしたがっている。wt = IgG1ヒト野生型配列; 1 = ノックアウト;

グリカン = Δ1-糖類部分の欠失によるノックアウト \approx 297

; 2-5 1に続いてのさらなるノックアウト変種; - = アミノ酸が欠失されている。

(図2) 図2A～2Cは、改変されたADCC減弱化Fc部分を有する二価または四価の二重特異性抗体としての、図1に示された抗体のために最適化された重鎖(主鎖)の作出のクローニング手順の略図を示す。

i) pcDNA3 (Invitrogen; CMVプロモーターおよびウシ成長ホルモン終結シグナルが欠失されている)のプラスミド主鎖に基づく、当初のベクターが示されている。このプラスミドは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の調節要素を有するヒト 1アイソタイプIg重鎖を含む。

40

ii) 制限エンドヌクレアーゼ部位AatIIおよびClaIを介したVDJ(重鎖の可変ドメイン)またはVJ(軽鎖の可変ドメイン)要素の交換が示されている。

iii) 二価の二重特異性抗体重鎖を生ずる、scFv断片のコード配列、CH3が欠失されてヒンジとCH2が改変されたDNA要素に対しての、完全ヒト 1アイソタイプIg重鎖の単純交換(制限部位MluIおよびSpeIを介した)が示されている。ある種の抗体変種、例えば図1Dに示されたものの場合、CH1ドメインがCLドメインによって置き換えられうる。

iv) (制限部位MluIおよびBspEIを介して)改変CH1-H-CH2断片を、ヒンジおよびCH2を改変したCH1-H-CH2-CH3要素に対して交換することで、四価の二重特異性抗体重鎖が得られ

50

、またはv)に示されている通りである。さらに、または単に、したがって、位置C226およびC229のシステインが交換されるなら、得られる分子は、図1Nに示されたように二価の二重特異性抗体分子である。

v) 任意の他の抗原特異性のscFv断片または異なるVHおよびVL方向のscFv断片に対しての(制限部位BspEIおよびSpeIを介した) scFv断片の交換。置換iv)およびv)を組み合わせることができる。

図2Bおよび2Cにおいて、それぞれ、挿入されたVDJ - CH1およびscFv要素に隣接する領域が詳細に示されている。

図2D～Fは、ヒト単一特異性抗体の軽鎖の作出のためのクローニング手順の略図を示す。

i) pCR-Script (Stratagene; lacZプロモーターおよび終結シグナルが欠失されている)のプラスミド主鎖に基づく親ベクターは、ヒト 遺伝子のVJ領域およびC領域ならびに免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の調節要素を含む。

ii) 制限エンドヌクレアーゼXholおよびSpeIを介したVJ (軽鎖の可変ドメイン)要素またはVDJ (重鎖の可変ドメイン)要素の交換。

iii) 制限エンドヌクレアーゼPmlIおよびBsmBIを介したCL (定常軽鎖)要素の交換。

図2Eおよび2Fにおいて、挿入されたVJおよびCL要素に隣接する領域が詳細に示されている。

ボックスはエクソンを表し、丸はエンハンサー要素を表し、細線はUT領域およびイントロン配列を表す。 L_1 および L_2 、2つの異なるエクソンによりコードされるリーダー配列(図2Bおよび2Eにおいても示されている); V, 可変領域; D, 多様性領域; J, 連結領域; CH1, CH2, CH3, CL それぞれ定常重鎖および定常軽鎖のエクソン、H, ヒンジ領域、scFv一本鎖Fv断片; X = アミノ酸改变。NotI, AatII, ClaI, MluI, BspEI, SpeI, XhoI, KpnI, XbaI, SphI, PmlI, BsmBI, SalI, クローニングに用いられた制限エンドヌクレアーゼ; Amp^RおよびNeo^Rは、それぞれ、アンピシリンおよびネオマイシン耐性のコード領域を表す。

分泌シグナルペプチドの切断部位が、|により示され; およびエクソン-イントロンの境界が、[,]により示されている。

(図3) 図3A: FLT3 × CD3特異性を有する、本発明による異なる形式の2種の二重特異性抗体による標的細胞限定的なT細胞活性化(³H-チミジン取り込み)を例示する。FLT3/CD19陽性REH細胞を含まない細胞(白抜きの記号)およびFLT3/CD19陽性REH細胞を含む細胞(黒塗りの記号)に対して抗体が使用されている。 , : 図1Eおよび図10に示された配列「グリカン」、FLT3結合部位を有するFab断片、CD3結合部位を有するscFv断片を有する、図1Aに示された二価抗体分子(bsFc^{k0}-1/2-形式)。 , : 図1Pに示された配列 1、FLT3結合部位を有するFab₂断片、CD3結合部位を有するscFv断片を有する、図1Gに示された四価抗体分子(bsFc^{k0}-1-形式)。 *: 標的細胞なしでのインタクトな単一特異性抗CD3抗体。標的細胞の非存在下で、インタクトな単一特異性CD3抗体は、Fc/FcR依存的な形でT細胞を効果的に活性化するが、二重特異性抗体は効果がない。これは、本発明の二重特異性の形式には完全に同程度良好なFc/FcR結合がないことを実証している。図3B: FLT3/CD19陽性REH細胞を含まない細胞(白抜きの記号)およびFLT3/CD19陽性REH細胞を含む細胞(黒塗りの記号)に対して使用された、本発明による異なる二価の二重特異性抗体による標的細胞限定的なT細胞活性化(TNF放出)を例示する。 , : 図1Eおよび図10に示された配列「グリカン」、FLT3結合部位を有するFab断片、CD3結合部位を有するscFv断片を有する、図1Aに示された二価抗体分子; , : 図10に示された配列「グリカン」、CD19結合部位を有するFab断片、TCR結合部位を有するscFv断片を有する、図1Eに示された二価抗体分子; , : 図10に示された配列「グリカン」、CSPG4結合部位を有するFab断片、CD3結合部位を有するscFv断片を有する、図1Eに示された二価抗体分子。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンCSPG4は、メラノーマ細胞の標的抗原であり、REH細胞には発現されない。

(図4) 4時間の⁵¹クロム放出試験での、本発明による二重特異性抗体および活性化CD8陽性Tキラー細胞による、それぞれ、FLT3/CD19発現REH細胞(A)およびCSPG発現SKMe163細胞(B)の特異的溶解を示す。 : 図1Eに示されたFLT3 × CD3, bsFc^{k0}-1/2形式; : 図1G

10

20

30

40

50

に示された $\text{FLT3} \times \text{CD3}$, $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ 形式; : 図1Eに示された $\text{CSPG4} \times \text{CD3}$, $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ 形式; : 図1Eに示された $\text{CD19} \times \text{TCR}$, $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ 形式。

(図5) 3種の異なる形式: 二重特異性の一本鎖形式(bs-scFv)、図1Eに示された $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ 形式、および図1Gに示された $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ 形式での同一の特異性の $\text{FLT3} \times \text{CD3}$ 抗体の比較を示す。A: ゲルろ過による凝集(百分率単位の値)の判定。凝集体は空隙容量に近接して移動しており、bs-scFv、 $\text{bsFc}_{\text{k}\circ}-1/2$ 、 $\text{bsFc}_{\text{k}\circ}-1$ に対し、それぞれ43%、0%、2%である。凝集体の形成は、抗体が $\text{bsFc}_{\text{k}\circ}-1/2$ または $\text{bsFc}_{\text{k}\circ}-1$ ではなくbs-scFvとして発現される場合に、かなり顕著であるものと結論付けられる。B: 産生細胞への抗体遺伝子のトランスフェクションおよびアフィニティクロマトグラフィーによる精製後の産生率。図に示すように、凝集体の形成は本発明による2種の $\text{Fc}^{\text{k}\circ}$ 形式の場合にはかなり低減され、産生率は二重特異性の一本鎖形式(bs-scFv)によるよりもかなり高い。

(図6 A) 本発明の抗体に含まれうる例示的な軽鎖の配列を示す。各ペプチド鎖は、対応するリーダーペプチド配列のない成熟タンパク質に対応する。配列には、太字で表されたN末端可変ドメインおよび斜体で示されたC末端定常ドメインが含まれる。可変ドメインの相補性決定領域(CDR)には下線が引かれている。

(図6 B) 本事例では、本発明の抗体に含まれうる重鎖と呼ぶこともできる、例示的な主鎖の配列を示す。 $\text{bsFc}-1/2$ 形式(図1E)のこの特定の主鎖には、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、改変CH2ドメイン、scFv断片のVLドメインおよびVHドメインが含まれる。配列の例21) (SEQ ID NO:26)において、主鎖には、例の図1G～M ($\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ -形式)に示されたCH3ドメインが含まれる。

VHドメインは太字テキストで、CH1ドメインは通常のテキストで、ならびにヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域は通常の、下線付きのテキストで示されている。主鎖にはscFv断片の、太字、斜体のテキストで示されたVLドメイン、およびVHドメイン(太字)がさらに含まれる。VHおよびVLドメインは、斜体、下線付きのテキストで表されているリンカーを介して互いにカップリングされている。各VLおよびVH領域の相補性決定残基(CDR)には下線が引かれている。CH2ドメインおよびscFv断片は、斜体で表されている小さなリンカー(GQ PSG)を介して互いにカップリングされている。

【発明を実施するための形態】

【0024】

詳細な説明

本発明は、組み換え二重特異性抗体分子に関する。この抗体分子は、天然の、すなわち天然に存在する免疫グロブリンにも見られる要素、つまり免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のドメインから構成される。

【0025】

「抗体」という用語は広くは、免疫グロブリン様の機能を有するタンパク質性の結合分子をいう。抗体の典型的な例は、免疫グロブリン、および結合特異性を依然として保持する免疫グロブリンの誘導体または機能的断片である。抗体の産生のための技法は、当技術分野において周知である。「抗体」という用語には、異なるクラス(すなわちIgA、IgG、IgM、IgDおよびIgE)ならびにサブクラス(IgG1、IgG2などのような)の免疫グロブリン(Ig)も含まれる。抗体の説明のための例は、 F_{ab} 断片、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 F_v 断片、一本鎖 F_v 断片(scF_v)、ダイアボディまたはドメイン抗体である(Holt LJ et al., Trends Biotechnol. 21(11), 2003, 484-490)。ドメイン抗体は、他のV領域またはドメインとは無関係に抗原またはエピトープを特異的に結合する、VHまたはVLであってよい、ただ1つの可変ドメインを有する单ドメイン抗体、单可変ドメイン抗体または免疫グロブリン单可変ドメインでありうる。そのような免疫グロブリン单可変ドメインは、单離された抗体の单可変ドメインポリペプチドを包含しうるだけでなく、抗体の单可変ドメインポリペプチド配列の1つもしくは複数の单量体を含むか、またはそれからなるさらに大きなポリペプチドも包含しうる。「抗体」という用語の定義にはしたがって、キメラ抗体、一本鎖抗体およびヒト化抗体のような態様も含まれる。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明による抗体分子は、免疫グロブリンM、免疫グロブリンG、免疫グロブリンA、免疫グロブリンDまたは免疫グロブリンEの対応する天然ドメインと少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を持つ1つまたは複数のドメインを保有しうる。この関連で、本明細書において用いられる「約」または「およそ」という用語は、所与の値または範囲の10%の偏差内または5%内のような、20%の偏差内を意味することに留意されたい。

【0027】

したがって、本発明の抗体分子の主鎖(より長いポリペプチド鎖)は、免疫グロブリン μ 重鎖の、免疫グロブリン重鎖の、免疫グロブリン重鎖の、免疫グロブリン重鎖のまたは免疫グロブリン重鎖の対応するドメインと上記の配列同一性を有するドメインを含みうる(たとえば、からなる)。さらに、本発明の抗体分子は、免疫グロブリン軽鎖のまたは免疫グロブリン軽鎖の対応するドメインと上記の配列同一性を有するドメインを含みうる(たとえば、からなる)。いくつかの態様において、本発明による抗体分子の全重鎖ドメインは、免疫グロブリン μ 重鎖の、免疫グロブリン重鎖(1、2、3もしくは4重鎖のような)の、免疫グロブリン重鎖(1もしくは2重鎖のような)の、免疫グロブリン重鎖のまたは免疫グロブリン重鎖の対応する領域と少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する。いくつかの態様において、本発明による抗体分子に存在する全ての軽鎖ドメインは、免疫グロブリン軽鎖(1、2、3もしくは4軽鎖のような)のまたは免疫グロブリン軽鎖の対応する領域と少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する。

【0028】

本明細書において開示されるアミノ酸配列に関して「パーセント(%)配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を達成するために、必要なら、ギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとし、参照配列、すなわち本開示の抗体分子におけるアミノ酸残基と対同一である候補配列におけるアミノ酸残基の割合と定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を判定する目的のためのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内であるさまざまな方法で、例えば、BLAST、ALI GN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成することができる。当業者は、比較される配列の完全長に対して最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するのに適したパラメータを判定することができる。同じことが、本明細書において開示されるヌクレオチド配列にも当てはまる。

【0029】

「可変」という用語は、配列の多様性を示し、かつ特定の抗体の特異性および結合親和性の決定に関する、免疫グロブリンドメインの部分(すなわち「可変ドメイン」)をいう。多様性は、抗体の可変ドメインの全体にわたって均一には分布せず、それは、重鎖および軽鎖可変領域の各々のサブドメインに集中する。これらのサブドメインは、「超可変領域」、「HVR」もしくは「HV」または「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる。可変ドメインの、より保存された(すなわち、非超可変)部分は、「フレームワーク」領域(FR)と呼ばれる。天然に存在する重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、4つのFR領域を含み、大部分は、-シート構造の一部を接続し、場合によっては-シート構造の一部を形成する、ループを形成する3つの超可変領域によって接続される-シート立体配置を取っている。各鎖における超可変領域は、FRにより極めて接近した状態で一緒に保持され、他鎖由来の超可変領域とともに、抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al参照、下記参照)。一般

10

20

30

40

50

に、天然に存在する免疫グロブリンは、6つのCDR（下記参照）；VHの中に3つ(H1、H2、H3)、およびVLの中に3つ(L1、L2、L3)を含む。天然に存在する免疫グロブリンにおいては、H3およびL3は6つのCDRのうちで最も高い多様性を示し、H3は、特に、免疫グロブリンに良好な特異性を与えるうえで固有の役割を果たすものと考えられる。定常ドメインは、抗原結合に直接関与しないが、例えば、抗体依存性細胞仲介性細胞傷害および補体活性化のような、さまざまなエフェクタ機能を示す。

【0030】

対応する免疫グロブリンμ重鎖、重鎖、重鎖、重鎖、軽鎖または軽鎖は、任意の種、例えばげっ歯類種を含む哺乳動物種、例えば平滑両生亜綱の両生類、例えばカエル、ヒキガエル、サンショウウオもしくはイモリなど、または無脊椎動物種に由来してよい。哺乳動物の例としては、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、リス、ハムスター、ハリネズミ、カモノハシ、ナキウサギ、アルマジロ、イヌ、キツネザル、ヤギ、ブタ、ウシ、クロネズミ、ウマ、コウモリ、ウッドチャック、オランウータン、アカゲザル、ウーリーモンキー、マカク、チンパンジー、タマリン(ワタボウシタマリン(*saguinus oedipus*))、マーモセットまたはヒトが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0031】

「免疫グロブリン」という用語は、ジスルフィド結合によって連結された少なくとも2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分をいう。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてV_Hと省略される)および重鎖定常領域を有する。いくつかの態様において、重鎖定常領域は3つのドメインC_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてV_Lと省略される)および軽鎖定常領域を有する。軽鎖定常領域は、1つのドメインC_Lを含む。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存された領域が散在した、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域へと、さらに細分することができる。CDRは、抗原との抗体の特異的相互作用に関与する残基の大部分を含む。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順に配列される3つのCDRおよび4つのFR：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4を有する。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原のエピトープと相互作用する結合ドメインを含む。

【0032】

免疫グロブリンの各軽鎖は、N末端可変(V)ドメイン(VL)および定常(C)ドメイン(CL)を含む。各重鎖は、N末端Vドメイン(VH)、3つまたは4つのCドメイン(CH)、およびヒンジ領域を含む。本発明による抗体分子もまた、これらのドメインおよび領域を含む(たとえ二重特異性抗体分子の1つの結合部位が一本鎖Fv断片によって形成されるだけでも)。

【0033】

本明細書において用いられる場合の免疫グロブリンは、典型的には、各およそ25 kDaの2本の軽(L)鎖および各およそ50 kDaの2本の重(H)鎖から構成される四量体の糖化タンパク質である。およびと呼ばれる2種の軽鎖が免疫グロブリンにおいて見出されうる。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは5つの主要なクラス：A、D、E、G、およびMに分けることができ、これらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2にさらに分類されうる。IgM免疫グロブリンは、J鎖と呼ばれる付加ポリペプチドとともに、5つの基本となるヘテロ四量体単位からなり、10個の抗原結合部位を含み、その一方で、IgA免疫グロブリンは、重合しJ鎖との組み合わせで多価集合体を形成できる、2~5つの基本となる4本鎖単位を含む。IgGの場合、4本鎖単位は一般に、約150,000ダルトンである。

【0034】

「アミノ酸」または「アミノ酸残基」という用語は、-または-アミノカルボン酸をいう。

【0035】

タンパク質またはペプチドに関連して用いられる場合、「アミノ酸」または「アミノ酸

10

20

30

40

50

残基」という用語は、典型的には、例えばタウリン、オルニチン、セレノシステイン、ホモ시스チン、ヒドロキシプロリン、チオプロリン、ヨード-チロシン、3-ニトロ-チロシン、オルニチン、シトルリン、カナバニン、5-ヒドロキシトリプトファン、カルノシン、シクロロイシン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、N-アセチルシステイン、プロリノール、アリルグリシンまたはアセチジン-2-カルボン酸のような改変アミノ酸、合成アミノ酸または希アミノ酸が所望により用いられてもよいが、L-アラニン(AlaまたはA)；L-アルギニン(ArgまたはR)；L-アスパラギン(AsnまたはN)；L-アスパラギン酸(AspまたはD)；L-システイン(CysまたはC)；L-グルタミン(GlnまたはQ)；L-グルタミン酸(GluまたはE)；グリシン(GlyまたはG)；L-ヒスチジン(HisまたはH)；L-イソロイシン(IleまたはI)；L-ロイシン(LeuまたはL)；L-リジン(LysまたはK)；L-メチオニン(MetまたはM)；L-フェニルアラニン(PheまたはF)；L-プロリン(ProまたはP)；L-セリン(SerまたはS)；L-トレオニン(ThrまたはT)；L-トリプトファン(TrpまたはW)；L-チロシン(TyrまたはY)；およびL-バリン(ValまたはV)からなる群より選択されるアミノ酸のような、その技術分野において認識されている定義を有する¹⁰ -アミノカルボン酸をいう。一般に、アミノ酸は、非極性側鎖(例えば、Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Val)；陰性荷電側鎖(例えば、Asp、Glu)；陽性荷電側鎖(例えば、Arg、His、Lys)；または非荷電極性側鎖(例えば、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、およびTyr)を有するとしてグループ化ができる。

【0036】

「抗原決定基」としても知られる「エピトープ」という用語は、抗体またはT細胞受容体が特異的に結合し、それによって複合体を形成する抗原の部分をいう。したがって、「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体への特異的結合の能力がある任意の分子またはタンパク質決定基を含む。本明細書において記述される抗体分子の結合部位(パラトープ)は、標的構造に固有である、高次構造的または連続的エピトープに特異的に結合しうる/高次構造的または連続的エピトープと相互作用しうる。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖のような分子を分類する化学的に活性な表面からなり、通常、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を有する。いくつかの態様において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルのような、化学的に活性な表面分子団を含み、ある種の態様において、特異的な三次元構造の特徴および/または特異的な荷電特徴を有しうる。ポリペプチド抗原に関して、高次構造エピトープまたは不連続エピトープは、一次配列中では分け隔てられているものの、ポリペプチドが天然のタンパク質/抗原に折り畳まれる際、分子表面上の一貫した構造に集合する、2つまたはそれ以上の別個のアミノ酸残基の存在によって特徴付けられる(Sela, M., Science (1969) 166, 1365-1374; Laver, W.G., et al. Cell (1990) 61, 553-556)。²⁰ エピトープに寄与する2つまたはそれ以上の別個のアミノ酸残基は、1つまたは複数のポリペプチド鎖の別々のセクションに存在しうる。これらの残基は、ポリペプチド鎖が三次元構造に折り畳まれる際に分子の表面上で一緒にになって、エピトープを構成する。対照的に、連続エピトープまたは直線エピトープは、ポリペプチド鎖の単一の直線セグメントに存在する2つまたはそれ以上の別個のアミノ酸残基からなる。説明のための例として、「コンテクスト依存性」CD3エピトープとは、前記エピトープの高次構造をいう。CD3の鎖に局在するそのようなコンテクスト依存性エピトープは、鎖の残部に埋め込まれかつ鎖とCD3または鎖とのヘテロ二量体化により正しい位置に保持される場合にのみ、その正しい高次構造をとることができる。それとは対照的に、コンテクスト非依存性CD3エピトープは、CD3のN末端1~27アミノ酸残基のポリペプチドまたはその機能的断片である。概して、エピトープは本質的に直線状であってよく、または不連続エピトープであってもよい。したがって、本明細書において用いられる場合、「高次構造エピトープ」という用語は、切れ目のない一連のアミノ酸以外の抗原のアミノ酸の間の空間的関係によって形成される、不連続エピトープをいう。「エピトープ」という用語はまた、より大きな分子、例えばタンパク質などの、より大きな物質への結合によって1つまたは複数の免疫学的に認識されるエピトープを提示することにより抗原として働きうる低分子として公知³⁰⁴⁰⁵⁰

の、ハプテンの抗原決定基を含む。

【0037】

抗体または抗体分子/断片は、タンパク質および/または巨大分子の複合混合物中のその標的抗原を認識する場合、抗原に特異的に結合するといわれる。1つの抗体しか所与の時点でエピトープに結合できないように、すなわち一方の抗体がもう一方の結合作用または調節作用を妨害するように抗体が交差競合するなら、抗体は「同じエピトープに結合する」といわれる。

【0038】

これに関連して「特異的な」、または「に向けられる」としても使われる「特異的に認識する」という用語は、本発明によれば、抗体分子がエピトープの少なくとも2個、例えば少なくとも3個または少なくとも4個のアミノ酸と特異的に相互作用し、および/またはそれに結合しうるが、しかし別のエピトープまたは抗原に本質的には結合しないことを意味する。そのような結合は、「鍵と鍵穴の原理」の特異性によって例示されうる。特異的結合は、抗体の結合領域のアミノ酸配列における特異的モチーフにより達成されるものと考えられ、抗体およびエピトープまたは抗原は、その一次、二次または三次構造の結果として、かつ該構造の二次的改変の結果として互いに結合する。エピトープ/抗原-相互作用部位と、その特異的エピトープ/抗原との特異的な相互作用は同様に、該部位の抗原への単純結合をもたらしうる。さらに、抗原-相互作用部位と、その特異的エピトープ/抗原との特異的な相互作用は、あるいは、例えば抗原のオリゴマー形成または抗原の高次構造の変化の誘導によるよう、シグナルの開始をもたらしうる。

10

【0039】

典型的には、結合は、結合親和性が 10^{-6} Mよりも高い場合に特異的と見なされる。特に、結合は、結合親和性が約 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ M (K_D)、または約 $10^{-9} \sim 10^{-11}$ Mもしくはそれよりもさらに高い場合に特異的と見なされる。したがって、ピコモル範囲の第1の結合部位および/または第2の結合部位の親和性を有する(10^{-12} Mの K_D を有する)抗体分子も、本発明に包含される。必要なら、結合条件を変化させることによって特異的結合に実質的に影響を与えることなく、結合部位の非特異的結合を低減することができる。

20

【0040】

いくつかの態様において、本発明による抗体が結合する抗原は、細胞外マトリックスに含まれる抗原であり、またはそれは細胞表面抗原である。いくつかの態様において、本発明による抗体が結合する抗原は、腫瘍関連抗原である。そのような腫瘍関連抗原は、細胞外マトリックスに含まれてもよく、または細胞表面抗原であってもよいことを理解されたい。

30

【0041】

「細胞外マトリックス」という用語は、細胞間隙中に、すなわち各組織の細胞間に見出される、ヒトを含めた多細胞動物の組織領域をいう。細胞外マトリックスは主として、線維状および非線維状コラーゲンまたはエラスチンのようなタンパク質の、ラミニンまたはフィブロネクチンのような糖タンパク質の、コンドロイチン硫酸またはケラタン硫酸のようなプロテオグリカンの、ならびにヒアルロン酸のような多糖類のネットワークである。細胞外マトリックスは、とりわけ、異なる組織を互いから隔離するのに、または細胞間伝達を調節するのに役立つ。いくつかの態様において、腫瘍関連抗原は、腫瘍の細胞外マトリックスで部分的にまたは排他的に発現されうる。

40

【0042】

本明細書において用いられる「細胞表面抗原」という用語は、細胞の表面に提示される分子をいう。典型的には、そのような分子は、この分子の少なくとも一部が周囲の環境から、すなわち細胞の外部から接近可能なまであるように細胞の原形質膜の内部または表面に位置する。各分子は、典型的には、アミノ酸および/もしくは糖類部分からなるか、またはそれらを含む。原形質膜内に位置する細胞表面分子の説明のための例は、三次元構造において、親水性および疎水性の領域を有する膜貫通タンパク質である。1つまたは複数の疎水性領域は、細胞表面分子が細胞の疎水性原形質膜の中に包埋され、または挿入さ

50

れることを可能にする一方、タンパク質の親水性領域は原形質膜のどちらの側にも延び、それぞれ細胞質および細胞外空間に入る。原形質膜上に位置する細胞表面分子の例としては、パルミトイル基を保有する、翻訳後修飾されたシステイン残基を有するタンパク質、ファルネシル基を保有する、C末端システイン残基の位置で修飾されたタンパク質、またはグリコシルホスファチジルイノシトール(「GPI」)アンカーを保有する、C末端の位置で修飾されたタンパク質が挙げられるが、これらに限定されることはない。これらの基は、原形質膜の外面へのタンパク質の共有結合を可能にし、ここで該タンパク質は、抗体のような細胞外分子による認識のために接近可能であり続ける。細胞表面抗原の例には、ほんのわずかに例を挙げると、細胞表面受容体分子、例えばGタンパク質共役受容体(例えばアドレナリン受容体)、チロシンキナーゼ受容体(例えばEGFR、EGFRvIII、Her2/neu、HER2/c-neu、PDGFR、ILR-1、TNFR、CD30、CD33もしくはGMCSFR)、関連したチロシンキナーゼ活性を有する膜受容体(例えばIL6RもしくはLIFR)またはSer/Thrキナーゼ活性を有する膜受容体(例えばTGF-R)が含まれる。

【0043】

細胞外マトリックスに含まれる腫瘍関連抗原の例には、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG4)またはCD44v6のようなプロテオグリカンが非限定的に含まれ、Muc-1のようなムチンまたはカルボニックアンヒドライザIX (CAIX)のような膜結合酵素が含まれる。そのような抗原の例は、テネイシンおよび線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)である。

【0044】

本明細書において用いられる「単離された抗体分子」という用語は、特定され、かつその天然環境の成分から分離および/または回収された抗体分子をいう。その天然環境の夾雑成分は、抗体の診断的または治療的使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含みうる。いくつかの態様において、抗体分子は、Lowry法によって判定された場合に抗体の95重量%を超える、例えば99重量%を超えるまで精製される。いくつかの態様において、抗体分子は、スピニングカップシーケンエレータ(spinning cup sequenator)の使用によりN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製される。いくつかの態様において、抗体は、クマシープルーまたは、好ましくは、銀染色を用いて還元条件または非還元条件下でのSDS-PAGEにより判断された場合に均一になるまで精製される。単離された抗体分子は、いくつかの態様において、抗体の天然環境の1つまたは複数の成分が存在していないので、組み換え細胞内に存在してもよい。典型的には、単離された抗体は、少なくとも1つの精製段階によって調製される。

【0045】

「V_H」および「V_L」という用語は、免疫グロブリンのそれぞれ重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをいうように本明細書において用いられる。免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域は、3つの超可変領域によって分断された「フレームワーク」領域からなる。したがって、「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基を含む。免疫グロブリンの可変部分の中には3つの重鎖および3つの軽鎖CDR(またはCDR領域)が存在する。したがって、本明細書において用いられる「CDR」は、適切な場合、全3つの重鎖CDR(CDRH1、CDRH2およびCDRH3)もしくは全3つの軽鎖CDR(CDRL1、CDRL2およびCDRL3)または全重鎖CDRと全軽鎖CDRの両方をいう。3つのCDRが軽鎖可変領域の結合特性を作り出し、3つが重鎖可変領域の結合特性を作り出す。CDRは、免疫グロブリン分子の抗原特異性を決定し、足場またはフレームワーク領域を含むアミノ酸配列によって隔てられている。正しい明確なCDRの境界および長さは、異なる分類および付番方式に影響を受ける。抗体の構造およびタンパク質折り畳みは、他の残基が抗原結合領域の一部と見なされ、当業者にとってそうであると理解されるものと考えられることを意味しうる。CDRは、免疫グロブリンと抗原またはエピトープとの結合のための接触残基の大部分を提供する。

【0046】

10

20

30

40

50

CDR3は、典型的には、抗体結合部位内の分子多様性の最も大きい起源である。例えば、H3は、2個のアミノ酸残基と同じぐらい短いか、または26アミノ酸より大きいこともある。さまざまなクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置が当技術分野において周知である。抗体構造の概説については、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988を参照されたい。当業者であれば、各々のサブユニット構造、例えば、CH、VH、CL、VL、CDR、FR構造が、活性断片、例えば、抗原に結合するVH、VLもしくはCDRサブユニットの部分、すなわち、抗原結合断片、または、例えば、Fc受容体および/もしくは補体に結合し、かつ/もしくはそれを活性化する例えばCHサブユニットの部分を含むことを認識するであろう。CDRは、典型的には、Sequences of Proteins of immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.に記述のKabat CDRをいう。抗原結合部位を特徴付けるための別の標準は、Chothiaにより記述された超可変ループを参照することである。例えば、Chothia, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; およびTomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638を参照されたい。さらに別の標準は、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより用いられるAbM定義である。一般的には、例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)を参照されたい。あるいは、Kabat CDRに関して記述される態様を、Chothiaの超可変ループまたはAbMに定義されるループに関する類似する記述された関係を用いて実施することができる。

10

【0047】

「フレームワーク領域」または「FR」残基は、超可変領域以外の可変ドメイン残基である。さまざまな軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種のなかで比較的保存されている。したがって、「ヒトフレームワーク領域」は、天然に存在するヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域と実質的に(約85%またはそれ以上、通常は90~95%またはそれ以上)同一であるフレームワーク領域である。抗体のフレームワーク領域、すなわち、構成軽鎖および重鎖のフレームワーク領域を組み合わせたものは、CDRを配置および整列させる働きをする。CDRは、抗原のエピトープへの結合に主に関与する。

【0048】

「Fab」、「Fab領域」、「Fab部分」または「Fab断片」という用語は、V_H、C_H1、V_L、およびC_L免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドを規定するものと理解される。Fabは、単離状態にあるこの領域、または完全長免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン断片はもちろん、本発明による抗体分子との関係にあるこの領域をいうことができる。典型的には、Fab領域は抗体の軽鎖全体を含む。Fab領域は、免疫グロブリン分子の「アーム」を規定するものと解釈することができる。Fab領域は、そのIgのエピトープ結合部分を含む。天然に存在する免疫グロブリンのFab領域は、パパイン消化によりタンパク質分解断片として得ることができる。「F(ab')₂部分」は、ペプシン消化された免疫グロブリンのタンパク質分解断片である。「Fab'部分」は、F(ab')₂部分のジスルフィド結合を還元することから生じる生成物である。本明細書において用いられる場合、「Fab」、「Fab領域」、「Fab部分」または「Fab断片」という用語は、抗体アームのC末端を規定するヒンジ領域をさらに含んでもよい(上記参照)。このヒンジ領域は、完全長免疫グロブリン内のC_H1ドメインのC末端に見出されるヒンジ領域に対応し、その位置で、抗体分子のアームはYを規定するように姿勢を取ることができる。ヒンジ領域という用語は、免疫グロブリンがこの領域でいくらかの可動性を有するので、当技術分野において用いられる。

【0049】

「Fv」または「Fv断片」は、免疫グロブリンの「单一アーム」のV_LおよびV_Hドメインだけからなる。したがって「Fv」は、完全な抗原認識および結合の部位を含んだ最小の抗体断片である。「二本鎖」Fv断片は、密な、非共有結合性会合状態の、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv種(scFv)は、免疫グロブリンのV_HおよびV_Lドメインを含むが、これらのドメインは单一のポリペプチド鎖に存在し

20

30

40

50

、そのなかでそれらは可動性ペプチドリンカーによって互いに共有結合的に連結されている。典型的には、scFv断片において、軽鎖および重鎖の可変ドメインは、二本鎖Fv種におけるそれと類似の二量体構造で会合する。一本鎖Fv断片において、単一のポリペプチド鎖のN末端に配置された軽鎖の可変ドメインに続いて、リンカー、および該ポリペプチド鎖のC末端に配置された重鎖の可変ドメインを有するか、または逆に、N末端に配置された重鎖の可変ドメインおよびC末端の軽鎖の可変ドメインと、その間に配置されたペプチドリンカーとを有するかのいずれかが可能である。ペプチドリンカーは、当技術分野において知られた、例えば、グリシンおよびセリン残基から作出された任意の可動性リンカーでありうる。ジスルフィド結合を、保存されたフレームワーク領域へ導入することにより、V_HドメインとV_Lドメインとの間のドメイン会合をさらに安定化させることも可能である(Reitter et al. Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions, Biochemistry 1994, 33, 6551-5459を参照のこと)。そのようなscFv断片は、ジスルフィド安定化scFv断片(ds-scFv)としても公知である。

【0050】

「Fc領域」または「Fc断片」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するように本明細書において用いられ、天然配列Fc領域および変種Fc領域を含む。Fc部分は、抗体のエフェクタ機能、例えば補体系の活性化およびNK細胞のような、Fc受容体を担持する免疫エフェクタ細胞の活性化を仲介する。ヒトIgG分子では、Fc領域は、Cys226のN末端側のパバイン切断によって作出される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は異なることがあるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、位置Cys226のアミノ酸残基から、またはPro230からそのカルボキシル末端に及ぶものと規定される。Fc領域のC末端リジン(EU付番方式による残基番号447)は、例えば、抗体分子の產生もしくは精製の間に、または抗体分子の重鎖をコードする核酸を組み換え操作することにより除去されうる。したがって、インタクトな抗体の組成物は、全てのK447残基が除去されている抗体集団、K447残基が全く除去されていない抗体集団、ならびにK447残基有りおよび無しの抗体の混合物を有する抗体集団を含みうる。本発明の抗体で用いるのに適した天然配列Fc領域は、哺乳動物、例えばヒトまたはマウスのIgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3およびIgG4を含む。Fc領域は抗体のクラスに依り、2つまたは3つの定常ドメインを含む。免疫グロブリンがIgGである態様において、Fc領域はC_H2およびC_H3ドメインを有する。

【0051】

本発明による抗体分子は2本の鎖、つまり、いくつかの態様において軽鎖でありうる短い方の鎖、および、いくつかの態様において重鎖とも呼ばれる主鎖を有する。抗体分子は、通常、これらの2本の鎖の二量体である。本発明の抗体分子に含まれるドメインに基づいて、抗体分子は、ヒンジ領域を一般的に含むFab断片、C_H2ドメイン、および一本鎖Fv断片を有するものと解釈することができる。いくつかの態様において、抗体分子はまた、一般的にはC_H2ドメインのC末端側に配置された、C_H3ドメインを有する。いくつかの態様において、本発明の抗体のドメインの配置は、免疫グロブリンにおけるドメインの配置に対応する。2つの例として、本発明の抗体分子の短い方の鎖は、該短い方の鎖のN末端の位置にVLドメインをおよびC末端の位置にCLドメインを有し、かつ主鎖は、そのN末端の位置にVHドメインをおよびC末端側にCH1ドメインを有しうる。いくつかの態様において、短い方の鎖は、該短い方の鎖のN末端の位置にVLドメインをおよびC末端の位置にCH1ドメインを有しうる。いくつかの態様において、短い方の鎖は、該短い方の鎖のN末端の位置にVHドメインをおよびC末端の位置にCLドメインを有しうる。いくつかの態様において、主鎖は、そのN末端の位置にVLドメインをおよびC末端側にCH1ドメインを有しうる。いくつかの態様において、主鎖は、そのN末端の位置にVHドメインをおよびC末端側にCLドメインを有しうる。いくつかの態様において、主鎖は、そのN末端の位置にVLドメインをおよびC末端側にCLドメインを有しうる。

【0052】

10

20

30

40

50

抗体の短い方の鎖は、1つまたは複数の、例えば2つまたは3つのジスルフィド結合によって、抗体の主鎖に連結されうる。各ジスルフィド結合は、抗体の主鎖のヒンジ領域内のシステイン残基と小さい方の鎖のC末端システイン残基との間の架橋を規定しうる。

【0053】

本発明による抗体分子において、主鎖のC末端領域は、一本鎖Fv断片により規定されうる。主鎖のC末端は、いくつかの態様において、scFv断片のVHドメインにより規定されうる。いくつかの態様において、主鎖のC末端は、scFv断片のVLドメインにより規定されうる。したがって、いくつかの態様において、scFv断片は、VHドメイン、例えばVHドメインのN末端を介して、主鎖のCH2ドメインに、または(存在するならば)CH3ドメインにカップリングされうる。いくつかの態様において、scFv断片は、VLドメイン、例えばVLドメインのN末端を介して、主鎖のCH2ドメインに、または(存在するならば)CH3ドメインにカップリングされうる。いくつかの態様において、抗体分子のCH2ドメインまたは(存在するならば)CH3ドメインは、scFv断片の軽鎖の可変ドメイン(VLドメイン)を介してscFv断片に連結される。いくつかの態様において、CH2ドメインは、scFv断片の重鎖の可変ドメイン(VHドメイン)を介してscFv断片に連結される。

【0054】

本発明による抗体分子のFab断片は、いくつかの態様において、Fab断片の重鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される。したがって、抗体の主鎖は、CH1ドメインのような重鎖ドメインを有しうる(前記)が、これがCH2ドメインにカップリングされる。上記で説明されたように、各CH1ドメインはヒンジ領域を介してCH2ドメインにカップリングされうる。Fab断片の各重鎖ドメインは、いくつかの態様において、抗体の主鎖のポリペプチド鎖のN末端に配置されうる。いくつかの態様において、本発明による抗体分子のFab断片は、Fab断片の軽鎖ドメインを介してCH2ドメインに連結される。したがって、抗体分子の主鎖は、CLドメインのような軽鎖ドメインを有しうるが、これがCH2ドメインにカップリングされる。この場合も先と同様に、各CLドメインはヒンジ領域を介してCH2ドメインにカップリングされうる。Fab断片の各軽鎖ドメインは、いくつかの態様において、抗体分子の主鎖のポリペプチド鎖のN末端に配置されうる。二価の態様(図1A～Eおよび1N)における分子の二量体化を妨害するために、鎖間ジスルフィド結合を提供するヒンジ領域中のシステイン残基が交換されうる。四価の態様(図1F～M)において、これらのシステイン残基は保存される。これらの態様において、抗体分子は、したがって、上記の二価の、二量体抗体分子の二量体を規定するものと解釈することができ、各主鎖および各短い方の鎖を個別に選択することができる。一例として、第1の短い方の鎖は、N末端の位置にVHドメインをおよびC末端の位置にCLドメインを有しうる。第1の主鎖は、そのN末端の位置にVLドメインをおよびC末端側にCH1ドメインを有しうる。さらに、第1の主鎖は、CH2およびCH3ドメイン、ならびにC末端scFv断片を有しうる。scFv断片はVLドメインを介してCH3ドメインにカップリングされうる。第2の短い方の鎖は、N末端の位置にVHドメインをおよびC末端の位置にCH1ドメインを有しうる。第2の主鎖は、そのN末端の位置にVLドメインをおよびC末端側にCLドメインを有しうる。第2の主鎖は同様に、CH2およびCH3ドメイン、ならびにC末端scFv断片を有しうる。scFv断片はVLドメインを介してCH3ドメインにカップリングされうる。

【0055】

各四量体抗体分子は、1つまたは複数の、例えば2つのジスルフィド結合を介して互いに連結される2つの二量体抗体分子から構成されうる。そのようなジスルフィド結合は、第1の二量体抗体分子の主鎖のシステイン残基と第2の二量体抗体分子の主鎖のシステイン残基との間の架橋を規定しうる。典型的には、各システイン残基は、各二量体抗体分子の、対応する主鎖のヒンジ領域内に位置する。いくつかの態様において、四量体抗体分子の2つの主鎖、すなわち第1の二量体分子の主鎖および第2の二量体分子の主鎖の一方または両方が、(Kabat付番[EU指標]にしたがう)各ヒンジドメインの1つの配列位置226におよびまたは配列位置229にシステイン残基を有する。1つの態様において、第1の主鎖のヒンジドメインと第2の主鎖のヒンジドメインとの間のジスルフィド結合は、(Kabat付番[EU指

10

20

30

40

50

標]にしたがう) ヒンジドメインの1つの配列位置226のシステイン残基および配列位置229のシステイン残基の少なくとも1つによって規定される。いくつかの態様において、四量体抗体分子は、二量体抗体分子の2つの主鎖のヒンジ領域を連結する1つまたは複数のジスルフィド結合および二量体抗体分子の2つの主鎖のヒンジ領域を連結するジスルフィド結合を有しうる。いくつかの態様において、本発明による四量体抗体分子の2つの二量体抗体分子は、第1の二量体抗体分子の主鎖のCH2ドメインに含まれるシステイン残基および第2の二量体抗体分子の主鎖のCH2ドメインに含まれるシステイン残基により規定されるジスルフィド結合によって連結されうる。

【 0 0 5 6 】

さらなる例として、第1の短い方の鎖は、N末端の位置にVLドメインをおよびC末端の位置にCH1ドメインを有しうる。第1の主鎖は、N末端の位置にVHドメインをおよびそのC末端に連結されたCLドメインを有しうる。さらに、第1の主鎖は、CH2およびCH3ドメイン、ならびにC末端scFv断片を有しうる。scFv断片はVHドメインを介してCH3ドメインにカップリングされうる。第2の短い方の鎖は、N末端の位置にVLドメインをおよびC末端の位置にCLドメインを有しうる。第2の主鎖は、そのN末端の位置にVHドメインをおよびC末端側にCH1ドメインを有しうる。第2の主鎖は同様に、CH2およびCH3ドメイン、ならびにC末端scFv断片を有しうる。scFv断片はVHドメインを介してCH3ドメインにカップリングされうる。

【 0 0 5 7 】

「二重特異性」または「二官能性」抗体分子は、2つの異なるエピトープ/抗原結合部位を有し、かつしたがって2つの異なる標的エピトープに対する結合特異性を有する抗体分子である。これらの2つのエピトープは、同じ抗原のエピトープまたは異なる抗原のエピトープでありうる。それとは対照的に、「二価抗体」は、同一の抗原特異性の結合部位を有しうる。

【 0 0 5 8 】

「二重特異性抗体」は、重鎖および軽鎖の第1の対または主鎖および短い方の鎖/小さい方の鎖の第1の対によって規定される、2つまたはそれ以上の結合アームの1つにて1つの抗原またはエピトープを結合し(前記)、かつ重鎖および軽鎖の第2の対または主鎖および小さい方の鎖の第2の対によって規定される、第2のアームにて異なる抗原またはエピトープを結合する抗体分子でありうる。二重特異性抗体のそのような態様では、特異性とCDR配列の両方が異なる2つの抗原結合アームを有する。典型的には、二重特異性抗体は、それが結合する各抗原に対して一価である。二重特異性抗体は、第1の軽鎖可変領域および第1の重鎖可変領域によって規定される第1の結合領域、ならびに第2の軽鎖可変領域および第2の重鎖可変領域によって規定される第2の結合領域を有しうる、ハイブリッド抗体分子である。いくつかの態様において、これらの結合領域の1つが重鎖/軽鎖の対によって規定されうる。上記で説明されたように、本発明との関連で、二重特異性抗体分子は、主鎖および小さい方の鎖の可変領域によって規定される、第1の結合部位、ならびに抗体分子の主鎖に含まれるscFv断片の可変領域によって規定される第2の、異なる結合部位を有する。

【 0 0 5 9 】

二重特異性抗体分子を作出する方法、例えば2種の異なるモノクローナル抗体の化学的結合または例えば、同じく2種の抗体断片の、例えば、2種のFab断片の化学的結合は、当技術分野において公知である。あるいは、二重特異性抗体分子は組み換えにより作出される。伝統的に、二重特異性抗体の組み換え產生は、2つの免疫グロブリンH鎖-L鎖の対の同時発現に基づき、ここで2つのH鎖が異なる結合特異性を有する。HおよびL鎖の無作為の組み合わせのため、異なる10種の抗体構造の潜在的混合物が產生され、そのうちの1種のみが所望の結合特異性を有する。代替的アプローチは、ヒンジ領域の少なくとも一部を含む重鎖定常領域、CH2およびCH3領域に、所望の結合特異性を有する可変ドメインを融合させることを伴う。1つの態様において、軽鎖の結合に必要な部位を含んだCH1領域が融合体の少なくとも1つに存在する。これらの融合体、および必要なら、L鎖をコードするDNAを、別個の発現ベクターに挿入し、次いで適当な宿主生物に同時トランスフェクションする。しかし、2つまたは全3つの鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能で

10

20

30

40

50

ある。

【0060】

本発明の二重特異性抗体分子は、各標的に対してモノクローナル抗体(MAb)として作用することができる。いくつかの態様において、抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト抗体である。

【0061】

例えば完全長の免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様の結合特性を有する構築体でありうる「デュアル特異性抗体」は一般に、アームの各々において2つの異なる抗原またはエピトープを結合できる、2つの結合アーム、特にHC/LCの対によって規定されるアームを有するものと理解される(PCT公開WO 02/02773を参照のこと)。したがって、デュアル特異性結合タンパク質は、同一の特異性および同一のCDR配列を有する、2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して二価である。10

【0062】

T細胞受容体(TCR)は、T細胞、すなわちTリンパ球の細胞表面上に存在する特定の受容体である。インビボで、T細胞受容体はいくつかのタンパク質の複合体として存在する。T細胞受容体は一般に、2つの別個のペプチド鎖、典型的にはT細胞受容体 および (TCR およびTCR)鎖、一部のT細胞に関しては、T細胞受容体 および (TCR およびTCR)を有する。複合体中の他のタンパク質は、CD3タンパク質: CD3 およびCD3 ヘテロ二量体ならびに、最も重要な、CD3 ホモ二量体であり、これは計6つのITAMモチーフを有する。CD3 のITAMモチーフは、Lckによりリン酸化され、これが次に、ZAP-70を動員することができる。Lckおよび/またはZAP-70はまた、多くの他の分子、特にCD28、LATおよびSLP-7 6のチロシンをリン酸化することができ、それによってこれらのタンパク質の周囲でのシグナル伝達複合体の凝集が可能になる。20

【0063】

本発明による抗体分子は、VLドメインおよびCLドメインを有する軽鎖を含む。抗体分子は、VHドメイン、CH1ドメインおよびヒンジ領域を含む主鎖をさらに含む。VHドメインは主鎖のN末端に配置され、VHドメインはCH1ドメインに連結され、これはそれに直接連結されるか、または、典型的には20個もしくはそれ以下、例えば10個もしくはそれ以下のアミノ酸残基からなる連結用ペプチドを介してカップリングされる。ヒンジ領域はCH1ドメインのC末端に連結される。したがって、VL、CL、VHおよびCH1ドメインならびにヒンジ領域の隣接した配置によって規定される抗体分子の部分は、Fab断片を規定するものと解釈することができ、したがって、本明細書においてそのように意図される。天然に存在する免疫グロブリンと同様に、VHおよびVLドメインの対合は単一の抗原結合部位をともに規定する。ゆえに、本発明の抗体のFab断片は第1の抗原に対する結合部位を含む。各抗体分子において、軽鎖はジスルフィド結合によって主鎖に連結される。いくつかの態様において、本発明による抗体分子は、上記のように2本の主鎖および2本の軽鎖を含む二量体である(下記も参照のこと)。30

【0064】

いくつかの態様において、以下でさらに例示されるように、本発明による組み換え二重特異性抗体分子の配列は、IgG1の配列とある程度の類似性を有するので、IgG1の配列に対して比較することができる。Kabatら(1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)によるIgG1のアミノ酸配列と比較して、本発明による抗体分子の主鎖はいくつかの態様において、アミノ酸位置1~117にV_Hドメイン、位置118~215にC_H1ドメイン、位置216~230にヒンジ領域および位置231~340にC_H2ドメインを含む。40

【0065】

本発明の抗体の主鎖のアミノ酸配列によれば、V_Hドメイン、C_H1ドメインおよびヒンジ領域からなるFab断片は、これらの態様において、典型的には、アミノ酸1~230に及ぶ。このFab断片のなかで、Kabat付番にしたがって、V_Hドメインは、典型的には、アミノ酸1~118により規定され、C_H1ドメインはアミノ酸119~216により規定され、ヒンジ領域はア50

ミノ酸217～231により規定される。SEQ ID NO:6の配列を有する抗体鎖は、各態様の例として役立ちうる。いくつかの態様において、本発明による抗体分子は、主鎖の位置342(以下参照)に、 V_H ドメインおよび V_L ドメインから構成されるキメラ配列を有する。いくつかの態様において、 V_L ドメインは、このキメラ配列のC末端ドメインを規定するように配置される。いくつかの態様において、本発明による抗体は、KabatらにしたがうIgG1のアミノ酸配列と比較して、位置342～447に C_{H3} ドメインと、その後に V_H ドメインおよびC末端 V_L ドメインから構成されるキメラ配列を有する。本発明による抗体に C_{H3} ドメインが含まれるそのような態様において、この C_{H3} ドメインは、抗体分子の主鎖のアミノ酸配列にしたがってアミノ酸342～448により規定される。いくつかの態様においてC末端にありうる、 V_H ドメインおよび V_L ドメインから構成されるキメラ配列(前記)はこれらの態様において、抗体分子の主鎖のアミノ酸配列の位置449(以下参照)に位置する。

【0066】

本発明による二重特異性抗体分子は、任意の所望の特異性を構成する2つの結合部位を持ちうる。いくつかの態様において、結合部位の1つは、腫瘍関連抗原を結合することができる。いくつかの態様において、Fab断片に含まれる結合部位は、腫瘍関連表面抗原に特異的な結合部位である。いくつかの態様において、一本鎖Fv断片に含まれる結合部位は、腫瘍関連表面抗原のような腫瘍関連抗原に特異的な結合部位である。

【0067】

本明細書において用いられる「腫瘍関連表面抗原」という用語は、腫瘍細胞上にまたは腫瘍細胞内に位置する表面上に提示されるまたは提示されうる抗原をいう。これらの抗原は、該分子の膜貫通部分および細胞質部分と組み合わされることが多い細胞外部分により、細胞表面上に提示されうる。これらの抗原は、いくつかの態様において、腫瘍細胞によってのみ提示され得、正常細胞すなわち非腫瘍細胞によっては提示され得ない。腫瘍抗原は、腫瘍細胞に限定して発現されてもよく、または非腫瘍細胞と比べて腫瘍特異的な変異を示してもよい。そのような態様において、各抗原は腫瘍特異的抗原といわれうる。抗原のなかには腫瘍細胞および非腫瘍細胞の両方によって提示されるものもあり、それらは腫瘍関連抗原といわれうる。これらの腫瘍関連抗原は、非腫瘍細胞と比べて腫瘍細胞上に過剰発現されうるか、または、腫瘍組織の構造が非腫瘍組織と比べて密でないことから腫瘍細胞内での抗体結合のために接近可能である。いくつかの態様において、腫瘍関連表面抗原は腫瘍の脈管構造上に位置する。

【0068】

腫瘍関連表面抗原の説明のための例は、CD10、CD19、CD20、CD22、CD33、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3、CD135)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、上皮成長因子受容体(EGFR)、Her2neu、Her3、IGFR、CD133、IL3R、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、CDCP1、デルリン1、テネイシン、frizzled 1～10、血管抗原VEGFR2(KDR/FLK1)、VEGFR3(FLT4、CD309)、PDGFR-(CD140a)、PDGFR-(CD140b)エンドグリン、CLEC14、Tem1～8、およびTie2である。さらなる例としては、A33、CAMPATH-1(CDw52)、がん胎児性抗原(CEA)、カルボアンヒドライゼIX(MN/CA IX)、CD21、CD25、CD30、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CD133、de2-7 EGFR、EGFRvIII、EpCAM、葉酸結合タンパク質、G250、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3、CD135)、c-Kit(CD117)、CSF1R(CD115)、HLA-DR、IGFR、IL-2受容体、IL3R、MCSP(メラノーマ関連細胞表面コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異抗原(PSA)、およびTAG-72が挙げられる。腫瘍の細胞外マトリックス上に発現される抗原の例は、テネイシンおよび線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)である。

【0069】

いくつかの態様において、本発明による抗体分子の結合部位の1つは、T細胞特異的な受容体分子および/またはナチュラルキラー細胞(NK細胞)特異的な受容体分子を結合することができる。T細胞特異的な受容体は、いわゆる「T細胞受容体」(TCR)であり、これはT細胞を、抗原提示細胞またはAPCと呼ばれる別の細胞により提示されたエピトープ/抗原に結

10

20

30

40

50

合させ、さらなるシグナルが存在するなら、該エピトープ/抗原によって活性化させ、該エピトープ/抗原に応答させる。T細胞受容体は、天然に存在する免疫グロブリンのFab断片に似ていることが知られている。T細胞受容体は一般的に、一価であって、鎖および鎖を包含し、いくつかの態様において、T細胞受容体は鎖および鎖を包含する(前記)。したがって、いくつかの態様において、TCRはTCR(/)であり、いくつかの態様において、それはTCR(/)である。T細胞受容体はCD3 T細胞共受容体と複合体を形成する。CD3は、タンパク質複合体であり、4本の異なる鎖から構成される。哺乳動物では、この複合体はCD3鎖、CD3鎖、および2本のCD3鎖を含有する。これらの鎖は、T細胞受容体(TCR)として知られる分子および鎖と会合し、Tリンパ球において活性化シグナルを生ずる。ゆえに、いくつかの態様において、T細胞特異的な受容体はCD3 T細胞共受容体である。いくつかの態様において、T細胞特異的な受容体は、T細胞上にも発現されるタンパク質CD28である。CD28は、T細胞活性化に必要な、共刺激シグナルを与えることができる。CD28は、T細胞の増殖および生存、サイトカインの産生、ならびにTヘルパー2型の発生において重要な役割を果たす。さらに、T細胞特異的な受容体のさらなる例は、OX40とも呼ばれる、CD134である。CD134/OX40は活性化に続く24~72時間後に発現されており、二次的な共刺激分子を規定するものと解釈されうる。T細胞受容体の別の例は、抗原提示細胞(APC)上の4-1BB-リガンドに結合できる4-1BBであり、それによってT細胞に対する共刺激シグナルが生み出される。T細胞上に主として見出される受容体の別の例は、CD5であり、これは低レベルでB細胞上にも見出される。T細胞機能を改変する受容体のさらなる例は、Fas受容体としても知られる、CD95であり、これは、他の細胞の表面上に発現されたFasリガンドによるアポトーシスシグナル伝達を仲介する。CD95は、休止Tリンパ球においてTCR/CD3駆動シグナル伝達経路を調節することが報告されている。

【0070】

NK細胞特異的な受容体分子の例はCD16、つまり低親和性Fc受容体およびNKG2Dである。T細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞の両方の表面上に提示される受容体分子の例は、CD2およびCD2スーパーファミリーのさらなるメンバーである。CD2は、T細胞およびNK細胞上の共刺激分子として作用することができる。

【0071】

いくつかの態様において、抗体分子の第1の結合部位は腫瘍関連表面抗原を結合し、第2の結合部位はT細胞特異的な受容体分子および/またはナチュラルキラー(NK)細胞特異的な受容体分子を結合する。いくつかの態様において、抗体分子の第1の結合部位は、A33、CAMPATH-1(CDw52)、がん胎児性抗原(CEA)、カルボアンヒドラーIX(MN/CA IX)、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CD133、CDCP1、Her3、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、CLEC14、Derlin1、上皮成長因子受容体(EGFR)、de2-7 EGFR、EGFRvIII、EpCAM、エンドグリン、Ep-CAM、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、葉酸結合タンパク質、G250、Fms様チロシンキナーゼ3(FLT-3、CD135)、c-Kit(CD117)、CSF1R(CD115)、frizzled 1~10、Her2/neu、HLA-DR、IGFR、IL-2受容体、IL3R、MCSP(メラノーマ関連細胞表面コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異抗原(PSA)、TAG-72、テネイシン、Tem1~8、Tie2およびVEGFR2(KDR/FLK1)、VEGFR3(FLT4、CD309)、PDGFR-(CD140a)、PDGFR-(CD140b)のうちの1つを結合し、第2の結合部位はT細胞特異的な受容体分子および/またはナチュラルキラー(NK)細胞特異的な受容体分子を結合する。いくつかの態様において、抗体分子の第1の結合部位は腫瘍関連表面抗原を結合し、第2の結合部位はCD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、OX40、4-1BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つを結合する。

【0072】

いくつかの態様において、抗体分子の第1の結合部位はT細胞特異的な受容体分子および/またはナチュラルキラー(NK)細胞特異的な受容体分子を結合し、第2の結合部位は腫瘍関連表面抗原を結合する。いくつかの態様において、抗体の第1の結合部位はT細胞特異的な受容体分子および/またはナチュラルキラー(NK)細胞特異的な受容体分子を結合し、第2の

結合部位はA33、CAMPATH-1 (CDw52)、がん胎児性抗原(CEA)、カルボアンヒドライゼIX (MN/CA IX)、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD37、CD44v6、CD45、CD133、CDCP1、Her3、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、CLEC14、Derlin1、上皮成長因子受容体(EGFR)、de2-7 EGFR、EGFRvIII、EpCAM、エンドグリン、Ep-CAM、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、葉酸結合タンパク質、G250、Fms様チロシンキナーゼ3 (FLT-3、CD135)、frizzled 1～10、Her2/neu、HLA-DR、IGFR、IL-2受容体、IL3R、MCSP (メラノーマ関連細胞表面コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、Muc-1、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺特異抗原(PSA)、TAG-72、テネイシン、Tem1～8、Tie2およびVEGFRのうちの1つを結合する。いくつかの態様において、抗体の第1の結合部位はCD3、T細胞受容体(TCR)、CD28、CD16、NKG2D、Ox40、4-1 BB、CD2、CD5およびCD95のうちの1つを結合し、第2の結合部位は腫瘍関連表面抗原を結合する。

【0073】

「グリコシル化」という用語は、糖タンパク質へのオリゴ糖(一緒に連結された2個またはそれ以上の单糖、例えば一緒に連結された2個～約12個の单糖を含む糖質)の付着を意味する。オリゴ糖側鎖は、典型的には、N-結合またはO-結合を通じて糖タンパク質の主鎖に連結される。生じる、本明細書において開示される抗体のオリゴ糖は、通常は、N-結合オリゴ糖としてFc領域のCH2ドメインに付着される。「N-結合グリコシル化」は、糖タンパク質鎖におけるアスパラギン残基への糖質部分の付着をいう。当業者は、例えば、マウス IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3ならびにヒト IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgD CH2ドメインの各々が残基番号297の位置にN-結合グリコシル化のための単一部位を有することを認識するであろう。

【0074】

本発明による抗体分子に含まれるドメインまたは領域の配列は、任意の所望の種の配列でありうる。しかしながら抗体分子のその後の使用に依って、いくつかの態様において、抗体により引き起こされる望ましくない副作用を妨害する改変を導入することが望ましい場合がある。インタクトな非ヒト抗体をヒト疾患または障害の処置に用いることは、それに伴い、現在十分に立証されている免疫原性の問題の可能性を生じ、このことは、患者の免疫系がインタクトな非ヒト抗体を非自己と認識して中和応答を開始しうることを意味する。これは、ヒト患者への非ヒト抗体の複数回投与で特に明白である。これらの問題を克服するために、長年にわたってさまざまな技法が開発されてきたが、こうした技法は一般に、免疫した動物、例えばマウス、ラットまたはウサギから非ヒト抗体を得ることの相対的な容易さを維持する一方で、インタクトな抗体における非ヒトアミノ酸配列の構成割合を減らすことを必要とする。概して、これを達成するために2つのアプローチが用いられてきた。第1はキメラ抗体であって、これは一般に、ヒト定常領域に融合した非ヒト(例えば、マウスのようななげっ歯類)可変ドメインを有する。抗体の抗原結合部位は可変ドメイン内の残基によって規定されるので、キメラ抗体は、抗原に対するその結合親和性を維持するが、しかしヒト定常領域のエフェクタ機能を獲得しているため、上記のようなエフェクタ機能を果たすことができる。キメラ抗体は、典型的には、組み換えDNA法を用いて產生される。従来の手順を用いて(例えば本発明の抗体のHおよびL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)、抗体をコードするDNA(例えばcDNA)を単離し、配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの典型的な供給源となる。単離されたら、DNAを発現ベクターに入れ、その発現ベクターを次に、本来免疫グロブリンタンパク質を產生しない大腸菌(E. coli)、COS細胞、CHO細胞または骨髄腫細胞のような宿主細胞にトランスフェクションして、抗体の合成を得る。DNAは、ヒトLおよびH鎖のコード配列を、対応する非ヒト、例えばマウスHおよびL定常領域の代わりに用いることによって改変されうる(例えばMorrison; PNAS [1984] 81, 6851を参照のこと)。

【0075】

第2のアプローチは、可変ドメインをヒト化することによって抗体の非ヒト含量を減少

10

20

30

40

50

させる、ヒト化抗体の作出を伴う。ヒト化について2つの技法が広く支持されている。第1は、CDRグラフティングによるヒト化である。CDRはループ(前記)を規定し、抗体の抗原結合特異性は、そのCDR表面の化学的性質によっておよび幾何学的形態によって主に規定される。次いで、これらの特徴は、個別のCDRの立体配置によって、CDRの相対的配置によって、ならびにCDRを構成する残基の側鎖の性質および配置によって決定される。免疫原性の大幅な低下は、非ヒト、例えばマウス抗体(「ドナー」抗体)のCDRのみを、ヒトのフレームワーク(「アクセプターフレームワーク」)および定常領域上にグラフティングすることによって達成することができる(Jones et al (1986) Nature 321, 522-525およびVerhoeyen M et al (1988) Science 239, 1534-1536を参照のこと)。しかしながら、CDRグラフティングは本質的に、抗原結合特性の完全な保持をもたらさない可能性があり、有意な抗原結合親和性を回復したいなら、ドナー抗体のフレームワーク残基(「復帰変異」といわれることもある)の一部をヒト化分子内に保存する必要があることが、しばしば認められている(Queen C et al (1989) PNAS 86, 10,029-10,033、Co, M et al (1991) Nature 351, 501-502を参照のこと)。この場合、ヒトフレームワーク(FR)を提供するために、非ヒトドナー抗体に対して最大の配列相同性を示すヒト可変ドメインをデータベースから選び出す。ヒトFRの選択は、ヒトコンセンサスまたは個別のヒト抗体のどちらからも行うことができる。必要なら、ドナー抗体由来の重要な残基をヒトアクセプターフレームワークに代入して、CDR立体配置を保存するが、抗体のコンピュータモデリングを用いて、そのような構造的に重要な残基を特定するのを補助してもよい。例えば、WO99/48523を参照されたい。10
20

【0076】

あるいは、ヒト化は「ベニヤリング(veneering)」のプロセスによって達成されてもよい。特異なヒトおよびマウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変ドメインの統計分析によって、露出した残基の正確なパターンがヒトおよびマウスの抗体で異なること、ならびにほとんどの個々の表面位置は、少数の異なる残基に対する強い選好性を有することが明らかにされた(Padlan E. A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498およびPedersen J. T. et al (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973を参照のこと)。それゆえ、そのフレームワーク領域内の、ヒト抗体に通常見出されるものとは異なる、露出した残基を置き換えることによって、非ヒトFvの免疫原性を低下させることができある。タンパク質の抗原性は、表面への接近可能性と相關しうるので、表面残基を置き換えることは、マウス可変ドメインをヒトの免疫系に「見えない」ようにするのに十分でありうる(Mark G. E. et al (1994) Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp 105-134中も参照のこと)。このヒト化の手順は、抗体の表面だけを改変し、支持する残基はそのままになっているので、「ベニヤリング」といわれる。30

【0077】

本発明の抗体分子は、任意の公知のおよび十分に確立した発現系および組み換え細胞培養技術を用いて、例えば、細菌宿主(原核細胞系)、または酵母、真菌、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞のような真核細胞系における発現によって産生されうる。本発明の抗体分子はトランスジェニック生物、例えばヤギ、植物またはXENOMOUSEトランスジェニックマウス、つまりヒト免疫グロブリン遺伝子座の大断片を有し、かつマウス抗体の産生を欠いている遺伝子操作マウス系統において産生されうる。抗体は化学合成によっても産生されうる。40

【0078】

本発明の抗体分子の組み換え産生の場合、典型的には、抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、さらなるクローニング(増幅)または発現のための、プラスミドなどの複製可能なベクターに挿入する。適当な発現系の説明のための例は、グルタミン酸シンテターゼ系(Lonza Biologicsが販売しているものなどの)であり、この宿主細胞は、例えばCHOまたはNS0である。抗体をコードするポリヌクレオチドは、従来の手順を用いて容易に単離され、配列決定される。使用されうるベクターには、プラスミド、ウイルス、ファージ、50

トランスポゾンが含まれ、プラスミドのミニ染色体は典型的な態様である。一般にこのようなベクターは、発現を促進するように、軽鎖および/または重鎖ポリヌクレオチドに機能的に連結された、シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーターおよび転写終結配列をさらに含む。軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチドは、別々のベクターに挿入され、同じ宿主細胞にトランスフェクションされてもよく、または所望により、重鎖および軽鎖の両方が宿主細胞へのトランスフェクション用の同じベクターに挿入されてもよい。Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*, Gene 151, 131-135、またはSkerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of an antibody Fab fragments, Gene 141, 79-8に記述されているように両鎖を、例えば、ニシストロン性オペロンの制御下に整列させ、発現させて、機能的なかつ正しく折り畳まれた抗体分子をもたらすことができる。したがって、本発明の1つの局面によれば、本発明の抗体またはその抗原結合断片の軽鎖および/または重鎖をコードするベクターを構築するプロセスであって、ベクターの中に、本発明の抗体分子の軽鎖および/または重鎖をコードするポリヌクレオチドを挿入する段階を含む、該方法が提供される。

【0079】

組み換え技法を用いる場合、抗体分子は細胞内に、ペリプラズム空間に產生されても、または培地中に直接分泌されてもよい(Skerra 1994、前記も参照のこと)。抗体が細胞内に產生されるなら、第一段階として、宿主細胞または溶解断片のいずれかの、微粒子状破片は、例えば、遠心分離または限外ろ過によって除去される。Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)は、大腸菌のペリプラズム空間へ分泌される抗体を単離するための手順について記述している。抗体は任意の酸化性環境中で產生させることもできる。そのような酸化性環境は、大腸菌のようなグラム陰性細菌のペリプラズムにより、グラム陽性細菌の細胞外環境中にまたは真核細胞(昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞のような動物細胞を含む)の小胞体の内腔中に提供されうるが、通常は、構造的ジスルフィド結合の形成に有利に働く。しかしながら、大腸菌のような宿主細胞の細胞質ゾル中に本発明の抗体分子を產生することも可能である。この場合、ポリペプチドは、可溶性かつ折り畳まれた状態で直接得られ、または封入体の形態で回収され、その後にインピトロで再生されうる。さらなる選択肢は、酸化性の細胞内環境を有する特定の宿主系統を用いることであり、この結果、細胞質ゾルにおけるジスルフィド結合の形成が可能とされうる(Venturi M, Seifert C, Hunte C. (2002) 「High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm.」 J. Mol. Biol. 315, 1-8)。

【0080】

細胞により產生された抗体分子は、任意の従来の精製技術、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およ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るが、アフィニティークロマトグラフィーが1つの好ましい精製技法である。抗体分子は、CH1またはCLドメインのような定常ドメインを特異的かつ可逆的に結合するタンパク質/リガンドを用いたアフィニティー精製を介して精製されうる。そのようなタンパク質の例はプロテインA、プロテインG、プロテインA/GまたはプロテインLのような免疫グロブリン結合性の細菌タンパク質であり、ここでプロテインLの結合は、軽鎖を含む抗体分子に限定される。軽鎖を有する抗体の精製のための代替方法は、ビーズにカップリングされた抗抗体(KappaSelect)の使用である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインのアイソタイプおよび種に依存する。抗体を精製するためにプロテインAを用いることができる(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。全てのマウスアイソタイプにはおよびヒト3にはプロテインGが推奨される(Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。本発明の特定の抗体分子に用いられる精製方法の選択は、当業者の知識の範囲内である。

【0081】

10

20

30

40

50

本発明の抗体分子の鎖の1つに親和性タグを備えることも可能である。Strep-タグ(登録商標)もしくはStrep-タグ(登録商標) II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、myc-タグ、FLAG(商標)-タグ、His6-タグまたはHA-タグのような親和性タグは、組み換え抗体分子の容易な検出、および同様に、簡易な精製を可能にする。

【0082】

核酸またはポリペプチドに関連して「変異した」、「変異体」および「変異」という用語は、天然に存在する核酸またはポリペプチドと比べて、すなわち、野生型を規定するために採用されうる参照配列と比べて、それぞれ、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失または挿入をいう。

【0083】

この関連で「位置」という用語は、本発明によって用いられる場合、本明細書において示されたアミノ酸配列内のアミノ酸の位置を意味することを理解されたい。この位置は、類似している天然配列、例えば天然に存在するIgGドメインまたは鎖の配列に対して示されうる。本明細書において用いられる「対応する」という用語には、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数よって、位置が必ずしも決まるわけではなく、または決まるだけではないことも含まれる。したがって、置換されうる本発明による所与のアミノ酸の位置は、抗体鎖中の他の部分でのアミノ酸の欠失または付加によって変化することもある。

【0084】

したがって、本発明による「対応する位置」の下では、アミノ酸は示された番号が異なる場合もあるが、しかしそれでもなお、類似の隣接アミノ酸を有しうることが理解されるべきである。交換され、欠失されまたは付加されうるアミノ酸も、「対応する位置」という用語によって包含される。所与のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基が、天然に存在する免疫グロブリンドメインまたは鎖のアミノ酸配列における特定の位置に対応するかどうか判定するために、当業者は、当技術分野において周知の手段および方法、例えば、アライメントを、手動によりあるいはBasic Local Alignment Search Toolを表すBLAST2.0もしくはClustalWのようなコンピュータプログラムまたは配列アライメントを作出するのに適した任意の他の適当なプログラムの使用により、用いることができる。

【0085】

いくつかの態様において、置換(または置き換え)は保存的置換である。保存的置換は一般に、以下の置換であり、変異させるアミノ酸にしたがって、各々の後に、保存的であるものと解釈されうる1つまたは複数の置き換えを記載した: Ala Gly, Ser, Val; Arg Lys; Asn Gln, His; Asp Glu; Cys Ser; Gln Asn; Glu Asp; Gly Ala; His Arg, Asn, Gln; Ile Leu, Val; Leu Ile, Val; Lys Arg, Gln, Glu; Met Leu, Tyr, Ile; Phe Met, Leu, Tyr; Ser Thr; Thr Ser; Trp Tyr; Tyr Trp, Phe; Val Ile, Leu。その他の置換も許容され、経験的にまたは他の既知の保存的もしくは非保存的置換にしたがって判定することができる。さらなる指南として、以下の8つの群には各々、通例、互いに対する保存的置換を規定するものと解釈されうるアミノ酸が含まれる。

- 1) アラニン(Ala)、グリシン(Gly);
- 2) アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu);
- 3) アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln);
- 4) アルギニン(Arg)、リジン(Lys);
- 5) イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、バリン(Val);
- 6) フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp);
- 7) セリン(Ser)、トレオニン(Thr); および
- 8) システイン(Cys)、メチオニン(Met)

【0086】

そのような置換が生物学的活性の変化をもたらすなら、以下のような、またはアミノ酸クラスに関連して以下でさらに記述されるような、さらに実質的な変化を導入し、その産物を、所望の特徴についてスクリーニングしてもよい。そのようなさらに実質的な変化の

10

20

30

40

50

例は、Ala Leu, Ile; Arg Gln; Asn Asp, Lys, Arg, His; Asp Asn; Cys Ala; Gln Glu; Glu Gln; His Lys; Ile Met, Ala, Phe; Leu Ala, Met, ノルロイシン; Lys Asn; Met Phe; Phe Val, Ile, Ala; Trp Phe; Tyr Thr, Ser; Val Met, Phe, Alaである。

【0087】

いくつかの態様において、本発明による抗体分子は、システイン残基を介した二量体化を妨害するために、またはFc機能を調節するために変異される1個または複数個のアミノ酸残基、例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個または18個のアミノ酸残基を含む。これらの態様のいくつかにおいて、Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメインのおよび/またはヒンジ領域の1個または複数個のアミノ酸残基が変異される。存在するなら、Fc受容体への結合を仲介できる1個または複数個のアミノ酸残基は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)または補体仲介性細胞傷害(CDC)を活性化できるアミノ酸残基でありうる。いくつかの態様において、Fc受容体への結合を仲介できる各アミノ酸残基は、一般的には、その配列をIgGのような、免疫グロブリン中の対応する天然ドメインの配列と比べた場合に、別のアミノ酸によって置換される。いくつかの態様において、Fc受容体への結合を仲介できるそのようなアミノ酸残基は、一般的には、IgGのような、免疫グロブリン中の対応する天然ドメインの配列と比べて、欠失される。しかしながら、Fab断片、一本鎖Fv断片および免疫グロブリンCH2ドメインからなる二重特異性抗体分子に関する本発明の他の態様において、例えば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を最適化するヒト1のCH2ドメインにおける変異を導入することは、本発明の範囲内である。そのような変異は、例えば、国際特許出願WO2011/076922およびWO2011/089211に記述されている。
10
20
21

【0088】

いくつかの態様において、1個または複数個の、変異される、例えば置換されるまたは欠失される、アミノ酸残基は、位置226、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、265、297、327、および330のうちの1つに位置するアミノ酸である。かさねて、用いられるアミノ酸の付番は、Kabat付番[EU指標]による配列位置に対応する。対応するアミノ酸欠失は、例えば、アミノ酸228、一般的にIgGではプロリンの欠失、アミノ酸229、一般的にIgGではシステインの欠失、アミノ酸230、一般的にIgGではプロリンの欠失、アミノ酸231、一般的にIgGではアラニンの欠失、アミノ酸232、一般的にIgGではプロリンの欠失、アミノ酸233、一般的にIgGではグルタミン酸の欠失、アミノ酸234、一般的にIgGではロイシンの欠失、アミノ酸235、一般的にIgGではロイシンの欠失、アミノ酸236、一般的にIgGではグリシンの欠失、アミノ酸237、一般的にIgGではグリシンの欠失、アミノ酸238、一般的にIgGではプロリンの欠失およびアミノ酸265、一般的にIgGではアスパラギン酸の欠失でありうる。対応するアミノ酸置換は、例えば、アミノ酸226、一般的にIgGではシステインの置換、アミノ酸228、一般的にIgGではプロリンの置換、アミノ酸229、一般的にIgGではシステインの置換、アミノ酸230、一般的にIgGではプロリンの置換、アミノ酸231、一般的にIgGではアラニンの置換、アミノ酸232、一般的にIgGではプロリンの置換、アミノ酸233、一般的にIgGではグルタミン酸の置換、アミノ酸234、一般的にIgGではロイシンの置換、アミノ酸235、一般的にIgGではロイシンの置換、アミノ酸265、一般的にIgGではアスパラギン酸の置換、アミノ酸297、一般的にIgGではアスパラギンの置換、アミノ酸327、一般的にIgGではアラニンの置換、およびアミノ酸330、一般的にIgGではアラニンの置換でありうる。各置換は置換Cys226 Ser、置換Cys229 Ser、置換Glu233 Pro、置換Leu234 Val、置換Leu235 Ala、置換Asp265 Gly、置換Asn297 Gln、置換Ala327 Gln、置換Ala327 Gly、および置換Ala330 Serのうちの1つでありうる。上記から判断できるように、いくつかの態様において、ヒンジ領域中の位置226および229のシステイン残基の1つまたは2つが別のアミノ酸に置換されている、例えばセリン残基に置換されている。それにより、別の主鎖とのジスルフィド結合の形成が妨害されうる。さらに、および同様に、以下で説明されるように、Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメイン中の、選択したアミノ酸残基を欠失させることおよび/または置換すること(変異させること)
30
40
41
50

によって、抗体依存性細胞仲介性細胞傷害および補体の固定という点で本発明の抗体分子に、より低い活性を持たせるまたは活性を持たせないようにすることができる。

【0089】

抗体の別のタイプのアミノ酸変種は、抗体分子の元々のグリコシル化パターン(もしあれば)を変化させる。変化させると、抗体に見出される1つもしくは複数の糖質部分を欠失させること、および/または抗体に存在しない1つもしくは複数のグリコシル化部位を付加することを意味する。抗体のグリコシル化は典型的には、N結合またはO結合のどちらかである。N結合は、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の付着をいう。Xがプロリンを除く任意のアミノ酸である、トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンは、アスパラギン側鎖への糖質部分の酵素的付着のための認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のどちらかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの糖N-アセチルガラクトサミン(N-acetylgalactosamine)、ガラクトースまたはキシロースの1つの付着をいうが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンが用いられてもよい。抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位のための)上記のトリペプチド配列の1つまたは複数を含むようにアミノ酸配列を変化させることによって都合よく達成される。当初の抗体の配列への、(O結合グリコシル化部位のための)1つもしくは複数のセリンもしくはトレオニン残基の付加、または1つもしくは複数のセリンもしくはトレオニン残基による置換によって変化がなされてもよい。

10

【0090】

本発明との関連で、いくつかの態様において、免疫グロブリンのFc領域に相当する、本発明の抗体分子の主鎖の部分は、典型的には、Fc受容体への結合に関して、不活性であり、または少なくとも本質的に影響が低い。繰り返しになるが、これは、Fc受容体への結合を仲介できるCH2ドメイン中の、選択したアミノ酸残基の少なくとも1つを欠失させることおよび/または置換すること(変異させること)によって達成される。そのような分子は、本明細書において「Fc減弱化」抗体分子または「Fc^{k0}」抗体分子ともいわれる。Fc断片の部分、すなわちCH2ドメイン、および、存在する場合、CH3ドメインに相当するように利用されうる本発明による抗体鎖の部分は、したがって、例えば、エフェクタ機能のような特定の生物学的機能を提供せずに「足場」を規定しうる。しかしながら、この足場は、公知の抗体分子と比べて本発明の抗体分子の精製、產生効率および/または安定性という点で大きな利益をもたらしうることが、本発明において分かった(実施例参照)。

20

【0091】

いくつかの態様において、所与のFc受容体に対する、このFcに対応する部分の認識、およびしたがって結合は、天然に存在する免疫グロブリンのFc領域よりも約2倍、約5倍、約8倍、約10倍、約12倍、約15倍、約20倍以下のものである。いくつかの態様において、このFcに対応する部分は、Fc受容体へのその結合能が完全にない。解離定数の決定を含めて、Fc受容体への抗体の結合は、表面プラズモン共鳴のような標準的な技法を用いて、例えばBiacore(商標)測定を用いて当業者により容易に判定されうる。生体分子の結合を測定する任意の他の方法が同様に用いられてもよく、それは、例えば、分光学的手段、光化学的手段、光度測定手段または放射線学的手段に依存しうる。対応する検出方法の例は、それぞれ、蛍光相關分光法であり、光化学的架橋結合であり、および光活性標識または放射活性標識の使用である。これらのことのいくつかには、電気泳動またはHPLCのような、さらなる分離技法が含まれうる。

30

【0092】

必要とされる場合、上記で説明されたように、アミノ酸残基の置換または欠失が、この効果のために行われてもよい。適当な変異は、例えば、Armourら(Eur. J. Immunol. [1999] 29, 2613-2624)から取り入れることができる。抗体鎖の配列に対する変異に適したさらなる位置は、Fc RIIIとヒトIgG1 Fc断片との間の複合体に関して公開されている結晶構造データ(Sondermann et al., Nature [2000] 406, 267-273)から取り入れることができ

40

50

きる。「Fc減弱化」のレベルまたは結合親和性の喪失を評価するために上記のように結合親和性を測定することに加えて、Fc受容体への結合を仲介する能力(の欠如)を機能的に評価することも可能である。1つの標的としてCD3を結合する抗体分子の場合、例えば、細胞上の、そのようなCD3結合抗体分子の分裂促進性を通じて結合を評価することが可能である。分裂促進性は、単球のような、補助細胞上のFc受容体へのCD3抗体の結合によって仲介される。CD3に対する1つの結合部位を有する本発明の抗体分子が、いかなる分裂促進効果も示さず、その一方で、機能的Fc部分を有する親モノクローナル抗CD3抗体がT細胞において強力な有糸分裂を誘導するなら、有糸分裂の欠如によって、本発明の抗体分子はFc結合の能力を欠いており、したがって「Fcノックアウト」分子と見なせることが明らかである。抗CD3を介した分裂促進性を評価する方法の説明のための例は、Davis, Vida & Lipsky (J. Immunol. (1986) 137, 3758)により、およびCeuppens, JL, & van Vaeck, F, (J. Immunol. (1987) 139, 4067、またはCell. Immunol. (1989) 118, 136を参照のこと)により記述されている。抗体の分裂促進性を評価するためのアッセイ法の説明のためのさらなる適当な例は、Rosenthal-Allieriら(Rosenthal-Allieri MA, Ticcioli M, Deckert M, Breittmeyer JP, Rochet N, Rouleaux M, and Senik A, Bernerd A, Cell Immunol. 1995 163(1):88-95)およびGrosse-Hovestら(Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Rammensee H-G, and Jung G, Eur J Immunol. [2003] May;33(5):1334-1340)により記述されている。さらに、Fc結合の欠如は、Fc部分の周知のエフェクタ機能の1つまたは複数を仲介する本発明の抗体分子の能力によって評価することができる。

【0093】

上記のように、1つまたは複数のジスルフィド結合を導入するためにまたは除去するために、例えば潜在的なまたは既存のジスルフィド結合を導入するためにまたは除去するために、システイン残基の置換または消失が行われる。それにより、本発明による抗体分子の、重量が低い/長さが短い方の鎖と主鎖との間の結合が樹立され、強化されまたは消失されうるなど、制御されうる。1つまたは複数のシステイン残基を導入することまたは除去することにより、ジスルフィド架橋が導入または除去されうる。説明のための例として、本発明による四量体抗体分子は一般に、2つの二量体抗体分子を連結する1つまたは複数のジスルフィド結合を有する。1つのそのようなジスルフィド結合は、典型的には、第1の二量体抗体分子の主鎖中のシステインおよび第2の二量体抗体分子のヒンジ領域中のシステインによって規定される。この関連で、いくつかの態様において、本発明による抗体はKabat付番[EU指標]によるヒトIgG免疫グロブリンの配列と比べて、別のアミノ酸残基による、位置226および/または229の天然システイン残基のアミノ酸置換を含みうる。

【0094】

アルギニン、アスパラギン、セリン、トレオニンまたはチロシン残基のようなアミノ酸残基の置換または消失は、抗体のグリコシル化パターンを改変するために行われる。説明のための例として、IgG分子は、CH2ドメインのAsn297の位置に单一N結合二分岐の糖質を有する。血清由来IgGまたはハイブリドーマもしくは遺伝子操作細胞においてエクスビオ產生されたIgGの場合、IgGは、Asn297結合糖質に関して不均一である。ヒトIgGの場合、コアオリゴ糖は、典型的には、GlcNAc₂Man₃GlcNAcからなり、異なる数の外側残基を有する。

【0095】

示されるように、抗原/エピトープの結合に加えて、免疫グロブリンはさらなる「エフェクタ機能」、つまり免疫グロブリンのFc領域(天然配列のFc領域またはアミノ酸配列変種のFc領域)に起因し、かつ免疫グロブリンアイソタイプによって異なった生物学的活性を有することが知られている。抗体エフェクタ機能の例としては、CIq結合および補体仲介性細胞傷害(CDC); Fc受容体結合; 抗体依存性細胞仲介性細胞傷害(ADCC); 食作用; 細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御; およびB細胞活性化が挙げられる。抗体のエフェクタ機能の行使は一般に、エフェクタ細胞の動員を伴う。いくつかの免疫グロブリンエフェクタ機能が、抗体のFc領域を結合するFc受容体(FcR)によって仲介される。FcRは、免疫グロブリンアイソタイプに対するその特異性によって規定される; IgG抗体に対

10

20

30

40

50

するFc受容体はFc Rといわれ、IgEに対してはFc Rといわれ、IgAに対してはFc Rといわれるなどである。CDCまたはADCCのようなこれらのエフェクタ機能のいずれか(またはそのようなエフェクタ機能の喪失)を、本発明の抗体分子がFc結合の能力を欠くかどうか評価するために用いることができる。

【0096】

これに関連して、「Fc受容体」または「FcR」という用語は、受容体、一般的には抗体のFc領域に結合できるタンパク質を規定することに留意されたい。Fc受容体は生物の免疫系の、ある種の細胞、例えばナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球および肥満細胞の表面に見出される。インビボでFc受容体は、感染細胞上に固定化されているか、または侵入病原体上に存在している免疫グロブリンに結合する。それらの活性は食細胞または細胞傷害性細胞を刺激して、抗体仲介性食作用または抗体依存性細胞仲介性細胞傷害により微生物または感染細胞を破壊する。フラビウイルスのような一部のウイルスは、抗体依存性感染増強作用として知られる機構により、それらが細胞に感染するのを補助するようFc受容体を用いる。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)に概説されている。10

【0097】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解をいう。古典的な補体経路の活性化は、同族抗原に結合した(適切なサブクラスの)抗体への補体体系の第1成分(C1q)の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzan o-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1997)に記述されているように、CDCアッセイ法が行われてもよい。20

【0098】

「補体体系」という用語は、不活性前駆体(前駆タンパク質)として血液中に、一般的には循環血液中に見出される、補体因子と呼ばれる、いくつかの低分子タンパク質をいうように当技術分野において用いられる。この用語は、この不变かつ非適合性の系が、生物から、細菌のような病原体のほか、抗原-抗体複合体を取り除く抗体および食細胞の能力を「補完する」能力をいう。補体因子の一例は複合体C1であり、これにはC1qならびに2つのセリンプロテアーゼ、C1rおよびC1sが含まれる。複合体C1はCDC経路の成分である。C1qは、およそ460,000の分子量、および6つのコラーゲン様の「茎」が6つの球状頭部領域に接続されたチューリップのブーケに似た構造を有する六価分子である。補体力スケードを活性化するためには、C1qがIgG1、IgG2またはIgG3の少なくとも2つの分子に結合しなければならない。30

【0099】

「抗体依存性細胞仲介性細胞傷害」またはADCCは、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージのような、ある種の細胞傷害性細胞上に存在するFc受容体(FcR)へ結合された分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクタ細胞を抗原担持標的細胞に特異的に結合させ、その後、標的細胞を細胞毒素で死滅させる細胞傷害性の形態をいう。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装し」、この機構による標的細胞の死滅化に必要とされる。ADCC仲介の主細胞であるNK細胞は、Fc RIIIのみを発現するが、その一方で、単球はFc RI、Fc

RIIおよびFc RIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。関心対象の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記述されているような、インビトロADCCアッセイ法が行われる。そのようなアッセイ法に有用なエフェクタ細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれるが、これらに限定されることはない。いくつかの態様において、関心対象の分子のADCC活性はインビボで、例えば、Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998)に開示されているような動物モデルで評価されうる。40

【0100】

いくつかの抗体エフェクタ機能が、抗体のFc領域を結合するFc受容体(FcR)によって仲

介される。FcRは、免疫グロブリンアイソタイプに対するその特異性によって規定される； IgG抗体に対するFc受容体はFc Rといわれ、IgEに対してはFc Rといわれ、IgAに対してはFc Rといわれるなどである。Fc Rの3つのサブクラス：Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)およびFc RIII (CD16)が特定されている。

【0101】

ここで本発明の核酸に目を向けると、本発明による抗体の1つまたは複数の鎖をコードする核酸分子は、一本鎖、二本鎖またはその組み合わせのような、任意の可能な配置の任意の核酸であってよい。核酸には、例えば、DNA分子、RNA分子、ヌクレオチド類似体を用いてまたは核酸化学を用いて作出されたDNAまたはRNAの類似体、ロックされた核酸分子(LNA)、およびタンパク質核酸分子(PNA)が含まれる。DNAまたはRNAは、ゲノム由来または合成由来であってもよく、一本鎖または二本鎖であってもよい。そのような核酸は、例えばmRNA、cRNA、合成RNA、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、DNAとRNAとの共重合体、オリゴヌクレオチドなどであることができる。各核酸はさらに、非天然ヌクレオチド類似体を含んでもよく、および/または親和性タグもしくは標識に連結されてもよい。

10

【0102】

いくつかの態様において、本発明による抗体の主鎖および/または小さい方の鎖のような、鎖をコードする核酸配列は、プラスミドのようなベクターに含まれる。抗体の天然のドメインまたは領域と比べて、抗体鎖の中に置換または欠失を含めたい場合、例えば免疫グロブリンの配列中に含まれる、各天然ドメイン/領域のコード配列を、突然変異誘発のための開始点として用いることができる。選択されたアミノ酸位置での突然変異誘発の場合、当業者は、部位特異的突然変異誘発のために確立されたさまざまな標準的方法を自由に使える。一般的に用いられる技法は、所望の配列位置に縮重塩基組成を保有する合成オリゴヌクレオチドの混合物を用いたPCR (ポリメラーゼ連鎖反応)による変異の導入である。例えば、コドンNNKまたはNNS (ここでN = アデニン、グアニンまたはシトシンまたはチミン； K = グアニンまたはチミン； S = アデニンまたはシトシン)を用いることで、突然変異誘発中に全20種のアミノ酸に加えてアンバー停止コドンの取り込みが可能になるが、コドンVVSは、アミノ酸Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Valがポリペプチド配列の選択位置に取り込まれることを除外するので、取り込まれる可能性のあるアミノ酸の数を12に限定し； コドンNMS (ここでM = アデニンまたはシトシン)を用いることで、例えば、アミノ酸Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Valが、選択された配列位置に取り込まれることが除外されるので、選択された配列位置での、可能性のあるアミノ酸の数が11に制限される。この点において、セレノシステインまたはピロリシンのような(天然に存在する正規の20種のアミノ酸以外の)他のアミノ酸のコドンが抗体分子の核酸に取り込まれてもよいことに留意されたい。Wang, L., et al. (2001) Science 292, 498-500、またはWang, L., and Schultz, P.G. (2002) Chem. Comm. 1, 1-11によって記述されているように、他の異常アミノ酸、例えばo-メチル-L-チロシンまたはp-アミノフェニルアラニンを挿入するために、停止コドンとして通常認識されるUAGなどの「人工的な」コドンを用いることも可能である。

20

【0103】

例えばイノシン、8-オキソ-2'デオキシグアノシンまたは6(2-デオキシ- -D-リボフラノシリル)-3,4-ジヒドロ-8H-ピリミド(pyrimin-do)-1,2-オキサジン-7-オン(Zaccolo et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603)のような、塩基対特異性の低下したヌクレオチド構成要素を用いることは、選択された配列セグメントへの変異の導入のための別の選択肢である。さらなる可能性は、いわゆるトリプレット突然変異誘発である。この方法では、コード配列中への取り込みのための、各々が1つのアミノ酸をコードする異なるヌクレオチドトリプレットの混合物を用いる(Virnekas B, et al., 1994 Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

30

【0104】

本発明による抗体の主鎖および/または小さい方の鎖のような、鎖をコードする核酸分子は、任意の適当な発現系を用いて、例えば適当な宿主細胞にてまたは無細胞系にて発現

50

させることができる。得られた抗体分子は、選択および/または単離によって濃縮される。

【0105】

上記で説明されたように、本発明による抗体分子は、任意の所望の標的エピトープ/抗原に対して作製されうる。選択されたエピトープ/抗原に依って、抗体は疾患の処置または予防において適当でありうる。したがって、いくつかの態様において、本発明による抗体は、障害または疾患のような医学的状態を処置するおよび/または予防する方法において用いられうる。二重特異性抗体に組み入れられる抗体の1つがFcR依存的な形で免疫細胞を活性化しうる態様において、Fc受容体への結合の低減を示すFcに対応する部分を有した抗体分子を選択することが特に有用でありうる。この手段により、FcR結合によって仲介される望ましくない免疫活性化が妨害される。いくつかの態様において、処置または予防される疾患は、増殖性疾患でありうる。増殖性疾患の例としては、造血器悪性腫瘍、例えば急性および慢性の骨髄球性白血病およびリンパ性白血病、ならびにリンパ腫、または固体腫瘍が挙げられるが、これらに限定されることはない。固体腫瘍の例としては、胃腸管腫瘍、骨腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、精巣腫瘍、間葉腫瘍および皮膚腫瘍、例えばメラノーマが挙げられるが、これらに限定されることははない。10

【0106】

本発明は、本発明の抗体分子および、任意で薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物も提供する。20

【0107】

本発明による抗体分子は、タンパク質性薬物に対して治療的に有効である任意の非経口または非-非経口(経腸)経路を介して投与することができる。例えば、非経口の適用方法には、例えば注射液、輸液またはチンキの形態での、皮内の、皮下の、筋肉内の、気管内の、鼻腔内の、硝子体内のまたは静脈内の注射および注入技法、ならびに例えばエアロゾル混合物、スプレーまたは粉末の形態での、エアロゾル装置および吸入が含まれる。肺薬物送達、すなわちエアロゾル吸入(これは鼻腔内投与においても使用されうる)または気管内注入を介した肺薬物送達に関する概要は、例えば、J.S. Patton et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. Proc. Amer. Thoracic Soc. 2004 Vol. 1 pages 338-344により与えられている。例えば、非-非経口送達様式は、例えば丸剤、錠剤、カプセル、溶液もしくは懸濁液の形態での、経口によるもの、または例えば坐薬の形態での、直腸によるものである。本発明の抗体分子は、従来の無毒性の薬学的に許容される賦形剤または担体、添加物および媒体を所望により含有する製剤中で全身にまたは局所に投与することができる。30

【0108】

本発明の1つの態様において、医薬品(pharmaceutical)は、哺乳動物に、および特に、ヒトに非経口投与される。例えば、対応する投与方法には、例えば注射液、輸液またはチンキの形態での、皮内の、皮下の、筋肉内の、気管内のまたは静脈内の注射および注入技法、ならびに例えばエアロゾル混合物、スプレーまたは粉末の形態での、エアロゾル装置および吸入が含まれるが、これらに限定されることはない。比較的短い血清中半減期を有する化合物の場合、静脈内および皮下の注入および/または注射の組み合わせが最も好都合かもしれない。薬学的組成物は、水溶液、水中油型乳濁液または油中水型乳濁液であつてもよい。40

【0109】

この関連で、Meidan VM and Michniak BB 2004 Am. J. Ther. 11 (4): 312-316に記述されているように、経皮送達技術、例えばイオン導入、超音波導入またはマイクロニードル強化送達も、本明細書において記述される抗体分子の経皮送達に用いられうることに留意されたい。例えば、非-非経口送達様式は、例えば丸剤、錠剤、カプセル、溶液もしくは懸濁液の形態での、経口投与、または例えば坐薬の形態での、直腸投与である。本発明の抗体分子は、さまざまなかつての無毒性の薬学的に許容される賦形剤または担体、添加物50

、および媒体を含有する製剤中で全身にまたは局所に投与することができる。

【0110】

適用される抗体分子の投与量は、所望の予防効果または治療反応を達成するために広い範囲内で変化しうる。それは、例えば、選択された標的にに対する抗体分子の親和性に依り、およびインビボでの抗体分子とリガンドとの間の複合体の半減期に依るであろう。さらに、最適な投与量は、抗体分子またはその結合体の体内分布、投与の方法、処置される疾患/障害の重症度、および患者の医学的状態に依るであろう。例えば、局所適用のための軟膏において用いられる場合、高濃度の抗体分子を用いることができる。しかし、必要ななら、抗体分子は持続放出製剤、例えばPolyActive(商標)またはOctoDEX(商標)のような、リポソーム分散液またはヒドロゲルに基づく重合体マイクロスフェアで与えられてもよい(Bos et al., Business Briefing: Pharmatech 2003: 1-6を参照のこと)。他の利用可能な持続放出製剤は、例えば、PLGAに基づく重合体(PR pharmaceuticals)、PLA-PEGに基づくヒドロゲル(Medincell)およびPEAに基づく重合体(Medivas)である。10

【0111】

したがって、本発明の抗体分子を、薬学的に許容させる成分および確立された調製方法を用いて組成物に製剤化することができる(Gennaro, A.L. and Gennaro, A.R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。薬学的組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機性または有機性の賦形剤を用いることができる。例えば丸剤、粉末、ゼラチンカプセルまたは坐薬を調製するために、例えば、ラクトース、タルク、ステアリン酸およびその塩、脂質、ろう、固体または液体ポリオール、天然油および硬化油を用いることができる。溶液、懸濁液、乳濁液、エアロゾル混合物または使用の前に溶液もしくはエアロゾル混合物に再構成するための粉末の作出に適した賦形剤には、水、アルコール、グリセロール、ポリオールおよびそれらの適当な混合物、ならびに植物油が含まれる。20

【0112】

薬学的組成物は、例えば、增量剤、結合剤、湿潤剤、滑剤、安定剤、防腐剤、乳化剤のような添加物、およびさらに、溶媒もしくは可溶化剤またはデポ効果を達成するための薬剤を含有してもよい。後者は、融合タンパク質が、リポソームおよびマイクロカプセルのような、緩徐性もしくは徐放性の放出または標的化送達システムに組み入れられることである。30

【0113】

製剤は、細菌保持フィルタを通じたろ過を含む、多数の手段によって、または使用の直前に滅菌水もしくは他の滅菌媒質に溶解もしくは分散されうる無菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み入れることによって、滅菌されうる。

【0114】

本発明の抗体分子に可能な多数の用途が医学の分野に存在する。インビトロ診断または薬物送達における使用に加えて、例えば、組織特異的または腫瘍特異的な細胞表面分子を結合する、本発明の抗体分子を作出することができる。

【0115】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに例示される。40

【実施例】

【0116】

実施例

図1Eに模式的に示されたように、腫瘍×CD3特異性を有する、bsFc^{k0}-1/2-形式のものであるとも指定された、二重特異性Fc減弱化二価分子を作出した。ヒンジ領域のおよびC_H2ドメインのアミノ酸の改変を、図10に示されているように導入した。図1Gに模式的に示されたように、腫瘍×CD3特異性を有する、bsFc^{k0}-1-形式のものであるとも指定された、二重特異性Fc減弱化四価分子を作出した。ヒンジ領域のおよびC_H2ドメインのアミノ酸の改変を、図1Pに示されているように導入した。

【0117】

50

プラスミドのクローニングおよび増幅は、大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 (*In vitrogen*, Karlsruhe, Germany)を用いて行われた。各ベクターの基本構造は、図2に示されている。

【0118】

示された特異性の、重鎖および軽鎖ということもできる、主鎖および小さい方の鎖をコードする発現ベクターの同時トランスフェクションは、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション(ATCC, Manassas, VA)から入手した、Sp2/0形質細胞腫細胞にて行った。各ベクターの基本構造については、図2を参照されたい(同様に以下の実施例IIを参照のこと)。10%ウシ胎仔血清(PAN-Biotech, Aidenbach, Germany)、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン(Lonza, Basel, Switzerland)を補充したIMDM培地中にて、細胞を培養した。1 mg/mlのG418 (*Invitrogen*, Karlsruhe, Germany)を加えることにより、安定なトランスフェクタントを選択した。

【0119】

Fc^{k^o} -1形式の場合はプロテインAおよびbs Fc^{k^o} -1/2形式の場合はKappaSelectを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、安定にトランスフェクションされた細胞の培養物の上清から二重特異性抗体を精製した(どちらのクロマトグラフィー媒質もGE Healthcare, Munich, Germanyから入手した)。

【0120】

実施例II

免疫グロブリンV領域を発現ベクター中で、所望の定常C領域と組み合わせた。ここで示されるクローニング手順により、完全なIg V領域の導入およびリンパ細胞中のその発現が、そのアミノ酸配列の改変なしで可能になる。この目的のために、単一特異性抗体のVDJおよびVJ断片のヌクレオチド配列を用いて、プライマー対(C C'; D D'; 表1)をデザインした。再増幅されたVセグメントDNA断片を、(VJは直接およびVDJはプライマー対E E'による再増幅後 表1)適切な制限ヌクレアーゼで消化し(表1に要約されている)、その後、発現ベクターへ核酸連結した。あるいは、VドメインはGeneArt, Regensburg, GermanyでDNA断片として合成された。この方法は、EGFRに対する抗体(クローンC225)のV領域をコードする遺伝子に用いられた。ベクター(図2)は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖定常領域の遺伝子を含む。かくして、増幅され消化されたVセグメントの挿入により、V領域のいずれのアミノ酸も改変させずにベクター中のIg遺伝子の当初のゲノム構成の再構成が行われる。

【0121】

重鎖用の当初のベクターは、ヒト 1アイソタイプIg重鎖を含む(図2A)。AatII-ClaI断片をモノクローナル抗体4G8 (抗Flt3)、BV10 (抗FLT3)、4G7 (抗CD19)、C225 (抗EGFR)もしくは9.2.27 (抗CSPG4)または任意の他のモノクローナル抗体の重鎖のVDJ断片と置き換えるために、イントロン中の必要な位置に制限部位を導入した。VDJ断片のクローニングに関連した領域は図2Bに、拡大して示されている。交換される断片は、AatII制限部位を有する第1イントロンの部分、リーダー配列の第2エクソン、VDJ領域、および制限部位Cla Iを有する重鎖イントロンの部分を含む。ヒト 1重鎖の定常領域の全エクソンの置換のために、図2Aおよび2Cに示されるように、制限部位を重鎖イントロン(MluI)中の、および5'-UTR重鎖ポリA領域(pA領域; SpeI)中の必要な位置に導入した。

【0122】

さらに、発現ベクターが構築されることで、ヒトIg 1アイソタイプの全定常領域(MluI-SpeI断片; 図2A参照)を、その他全ての抗体アイソタイプの定常領域にまたは最適化されもしくは低減されたエフェクタ機能を有するFc部分に交換することが可能である。ADCCの誘発用に最適化された抗体の場合、国際特許出願WO2011/076922およびWO2011/089211に示されているように、ヒト 1定常領域のCH2ドメインにアミノ酸置換を導入した。図1A~Nに示された二重特異性抗体を作出するために、Ig重鎖の野生型または改変型定常ドメインをコードするエクソンを含んだ、MluIおよびSpeI隣接DNA断片を挿入することができる。交換されるMluI-SpeI断片は図2Cに、拡大して示されている。二重特異性抗体の第2の抗原特異性の付加の場合、同様に図2Aに示されているように、制限酵素部位BspEIおよびSpeI

10

20

30

40

50

を介してVH-VLまたはVL-VH方向のscFv断片を含めることができる。VL-VH方向のscFv断片のクローニングに関連した領域は図2Cに、拡大して示されている。CD3（クローンヒト化UCHT1；VL-VH方向）、CD28（クローン9.3；VL-VH方向）、TCR /（クローンBMA031；VH-VL方向）に対する特異性を有するScFv断片を、表2に記載されているオリゴヌクレオチドFおよびF'を用いたPCRによって作出した。あるいは、それらはGeneArt, Regensburg, GermanyでDNA断片として合成された。この方法は、CD16に対する抗体（クローン3G8；VL-VH方向）をコードする遺伝子に用いられた。それぞれ、VH-VLおよびVL-VH方向のscFvセグメントのDNA断片を、適切な制限ヌクレアーゼ（表2に要約されている）で消化し、その後、発現ベクターへ核酸連結した。

【0123】

10

軽鎖用の当初のベクターは、ヒト 遺伝子のC領域および軽鎖のVJ領域を含む（図2D）。軽鎖Xhol-SpeI断片をモノクローナル抗体4G8（抗FLT3）、BV10（抗FLT3）、4G7（抗CD19）、C225（抗EGFR）もしくは9.2.27（抗CSPG4）または任意の他のモノクローナル抗体の軽鎖の適切なVJ断片と置き換えるために、必要な位置に制限部位（XholおよびSpeI）を導入した。交換される、この断片に隣接する領域は、図2Eに示されている。この領域は、リーダー配列の第2エクソンの部分、読み枠内融合のための適当な制限部位（Xhol）、VJ領域、および制限部位SpeIを有する 鎖イントロンの部分を含む。軽鎖の定常ドメイン（CL）を置き換えるために、必要な位置に制限部位（PmIIおよびBsmBI）を導入した。交換される、この断片に隣接する領域は図2Fに、拡大して示されている。この領域は、鎖イントロンの部分、適当な制限部位（PmII）、CL領域、および制限部位（BsmBI）を有する3'-UTR領域 鎖ポリA領域（pA領域）の部分を含む。

【0124】

20

（表1）発現ベクターへの挿入用のVDJおよびVJセグメントの増幅に用いられたオリゴヌクレオチド

重鎖VDJセグメントに用いられたオリゴヌクレオチド		
C	4G7-H-for	5'-ctc ttc aca ggt gtc ctc tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct g-3' (SEQ ID NO: 27)
C'	4G7-H-rev	5'-ggg aga agg tag gac tca cct gag gag act gtg aga gtg gtg cct tgg ccc cag tag tc-3' (SEQ ID NO: 28)
C	9.2.27-H-for	5'-tct tca cag gtg tcc tct ccc agg tga agc tgc agc aat ctg gac ctg agc- 3' (SEQ ID NO: 29)
C'	9.2.27-H-rev	5'-aat ggg aga agg tag gac tca cct gag gag acg gtg acc gtc cct tgg-3' (SEQ ID NO: 30)
C	4G8-H-for	5'-tct ctt cac agg tgt cct ctc tca ggt cca act gca gca gcc tgg ggc tga gc-3' (SEQ ID NO: 31)
C'	4G8-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac tgt gag agt ggt gcc ttg gcc cca g-3' (SEQ ID NO: 32)
C	BV10-H-for	5'-aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc cca ggt gca gct gaa gca gtc-3'(SEQ ID NO: 33)
C'	BV10-H-rev	5'-gag aag gta gga ctc acc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc c- 3' (SEQ ID NO: 34)
E	汎用for (AatII)	5'- aga cgt cca ctc tgt ctt tct ctt cac agg tgt cct ctc c-3' (SEQ ID NO: 35)
E'	汎用rev (Clal)	5'- tat cga ttt aga atg gga gaa ggt agg act cac-3' (SEQ ID NO: 36)

10

20

30

軽鎖VJセグメントに用いられたオリゴヌクレオチド		
D	4G7-L-for (Xhol)	5'- act cga gga gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct ata c-3' (SEQ ID NO: 37)
D'	4G7-L-rev (Spel)	5'- aac tag tac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cca gca ccg aac gtg-3' (SEQ ID NO: 38)
D	9.2.27-L-for (Xhol)	5'- tct cga gga gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg-3' (SEQ ID NO: 39)
D'	9.2.27-L-rev (Spel)	5'- aac tag tac tta cgt ttg atc tcc agc ttg gtg ccc cct cca aag g-3' (SEQ ID NO: 40)
D	4G8-L-for (Xhol)	5'- act cga gga gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg-3' (SEQ ID NO: 41)
D'	4G8-L-rev (Spel)	5'- tac tag tac tta cgt ttt att tcc agc ttg gtc ccc cct cc-3' (SEQ ID NO: 42)
D	BV10-L-for (Xhol)	5'- act cga gga gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc c-3' (SEQ ID NO: 43)
D'	BV10-L-rev (Spel)	5'- act agt act tac gtt tca gct cca gct tgg tcc cag cac cga acg tg-3' (SEQ ID NO: 44)

制限部位は太字で示されており、括弧内の文字によって表示されている。

【 0 1 2 5 】

(表2) 発現ベクターへの挿入用のscFvセグメントの増幅に用いられたオリゴヌクレオチド

scFvセグメントに用いられたオリゴヌクレオチド		
F	UCHT1-for (BspEI)	5'- atc cgg aga tat cca gat gac cca gtc ccc gag ctc cct g-3' (SEQ ID NO: 45)
F'	UCHT1-rev (Spel)	5'- tac tag tta tca cga gga gac ggt gac cag ggt tcc ttg acc cca-3' (SEQ ID NO: 46)
F	BMA031-for (BspEI)	5'- atc cgg aga agt gca gct gca gtc cgg ccc tga gct-3' (SEQ ID NO: 47)
F'	BMA031-rev (Spel)	5'- tac tag tta tca ctt cag ttc cag ctt ggt gcc agc gcc gaa ggt-3' (SEQ ID NO: 48)
F	9.3-for (BspEI)	5'- atc cgg aga cat tgt gct gac cca gtc ccc tgc ctc cct gg-3' (SEQ ID NO: 49)
F'	9.3-rev (Spel)	5'- tac tag tta tca aga gct cac agt cac tgt ggt gcc ctg gcc cca -3' (SEQ ID NO: 50)

10

20

30

40

50

制限部位は太字で示されており、括弧内の文字によって表示されている。

【0126】

かくして、四価bsFc^{-KO}-1および二価bsFc^{-KO}-1/2としてFLT3×CD3 (4G8×UCHT1、BV10×UCHT1)、FLT3×TCR / (4G8×BMA031、BV10×BMA031)、FLT3×CD28 (4G8×9.3、BV10×9.3)、FLT3×CD16 (4G8×3G8、BV10×3G8)、CD19×CD3 (4G7×UCHT1)、CD19×TCR / (4G7×BMA031)、CD19×CD28 (4G7×9.3)、CD19×CD16 (4G7×3G8)、CSPG4×CD3 (9.2.27×UCHT1)、CSPG4×TCR / (9.2.27×BMA031)、CSPG4×CD28 (9.2.27×9.3)、CSPG4×CD16 (9.2.27×3G8)、EGFR×CD3 (C225×UCHT1)、EGFR×TCR / (C225×BMA031)、EGFR×CD28 (C225×9.3)、EGFR×CD16 (C225×3G8)を有する二重特異性抗体分子を得た。対応する鎖の配列は、SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:26としておよび図6に示されている。10

【0127】

キメラ重鎖および軽鎖(IgG1/)または改変重鎖をコードする発現ベクターの、非Ig産生骨髄腫細胞株Sp2/0への同時トランスフェクションによって、所望の抗原に特異的に結合できる二重特異性モノクローナル抗体を分泌する安定なトランスフェクトーマを得た。これらの抗体分子の機能的な特徴付けは、FLT3×CD3、CD19×TCR / およびCSPG×CD3二重特異性抗体分子を用いた以下の実験において例示される。

【0128】

実施例III

FLT3/CD19陽性REH細胞有りおよび無しでの、実施例Iの2つの抗体形式、つまりbsFc^{KO}-1/2-形式およびbsFc^{KO}-1-形式によるT細胞活性化を判定した。データを図3に示す。使用した二重特異性抗体分子は、クローン4G8のFLT3結合部位(第1の結合部位)およびクローンUCHT1のCD3結合部位(第2の結合部位)を有していた。「bsFc^{KO}-1/2-形式」の分子はSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:6の鎖から構成され、「bsFc^{KO}-1-形式」の分子はSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:26の鎖から構成された。CSPG4およびCD3を結合する二重特異性抗体分子は、「bsFc^{KO}-1/2-形式」であり、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:18の鎖から構成された。さらに、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:15の鎖から構成された、CD19およびTCR / を結合する「bsFc^{KO}-1/2-形式」の二重特異性抗体分子を用いた。20

A) ヒト単核細胞(PBMC)を健常ドナーの末梢血から得て、密度勾配遠心分離を用いて単離した。PBMCを96ウェルプレートに移し入れた(100,000個/ウェル)。その後、照射されたFLT3/CD19陽性REH細胞(50,000個/ウェル)または培地を加え、最後に抗体を表示した通りの濃度で加えた(図3A)。24時間後、細胞を³Hチミジン(0.5 μCi/ウェル)とともにインキュベートした。さらに24時間後、細胞を、細胞ハーベスターを用いてガラス纖維フィルタ上に適用した。放射能をその後、シンチレーションカウンタによって検出した。30

B) ヘパリン化された全血(50 μl/ウェル)を、FLT3/CD19陽性REH細胞(50,000個/ウェル)有りおよび無しで、ならびに図3Bに示された濃度の抗体とともに96ウェルプレート中でインキュベートした。24時間後に、上清中のTNFの濃度をELISAによって決定した。

【0129】

REH細胞(Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Germany)およびPBMCは、10%ウシ胎仔血清(PAN-Biotech, Aidenbach, Germany)、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン(Lonza, Basel, Switzerland)を補充したRPMI 1640培地中で培養された。40

【0130】

実施例IV

二重特異性抗体および活性化CD8+Tキラー細胞によるFLT3/CD19発現REH細胞(図4A)およびCSPG発現SKMe163細胞(図4B)の溶解を、判定した。

【0131】

ヒト単核細胞(PBMC)を3日間、单一特異性CD3抗体UCHT1 (10 ng/ml)を用いて刺激した。その後、磁気細胞選別を用いて陽性選択により活性化CD8+T細胞を単離した。この細胞を⁵Cr標識FLT3/CD19陽性REH細胞(図4A)またはCSPG4陽性SKMe163細胞(図4B)に加え、表示した通りの濃度の抗体とともにインキュベートした。4時間後、細胞上清をシンチレーションカウンタによって検出した。50

ンプレートに収集し、放射能をシンチレーションカウンタ中で決定した。

【 0 1 3 2 】

百分率単位の特異的溶解を、以下の通りの、規定の実験条件の下で分析した: $\text{cpm}(\text{exp}) - \text{cpm}(\text{bg}) / \text{cpm}(100) - \text{cpm}(\text{bg})$ 、式中で $\text{cpm}(\text{bg})$ は抗体およびエフェクタ細胞なしでのクロム放出に対応し、 $\text{cpm}(100)$ は、標的細胞を界面活性剤とともにインキュベーションした後のクロム放出に対応する。

【 0 1 3 3 】

SKMe163細胞は、Dr. B. Guckel, Klinik fur Gynakologie, University of Tubingen, Germanyから入手した。

【 0 1 3 4 】

実施例V

同一の特異性を有するFLT3 × CD3抗体(FLT結合部位: クローン4G8、CD3結合部位: クローンUCHT1)の凝集率および産生率を、異なる3形式: 二重特異性の一本鎖形式(bs-scFv)、 $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ -形式、 $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ -形式の間で比較した。「 $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ -形式」の抗体分子はSEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:6の鎖から構成され、「 $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ -形式」の抗体分子はSEQ ID N 0:1およびSEQ ID NO:26の鎖から構成された。

【 0 1 3 5 】

二重特異性の一本鎖分子は、プロテインLを用いたアフィニティーコロマトグラフィーによって精製された。

【 0 1 3 6 】

superdex 200 PC3.2/30カラムおよびSMARTSystem (GE-Healthcare, Munich, Germany) を用いてゲルろ過を行った。使用した標準タンパク質はカタラーゼ(232 kDa、ウシ肝臓由来)、アルドラーゼ(158 kDa; ウサギ筋肉由来)、アルブミン(67 kDa; ウシ血清由来)およびリボヌクレアーゼA (13.7 kDa; ウシ臍臓由来)であった。結果を図5Aに示す。図5Aから、抗体が $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ (凝集の検出なし)または $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ (凝集率2%)ではなくbs-scFv (凝集率43%)として発現される場合に、凝集体の形成がかなり著しいこと、すなわち、本発明の二重特異性抗体分子は、本質的には凝集傾向がなく、単量体分子のままであることが明らかである。

【 0 1 3 7 】

産生率の比較のため、示された形式で4G8 (抗FLT3) およびUCHT1 (抗CD3) 特異性を含む二重特異性分子をコードする遺伝子を、Sp2/0細胞へ導入し、アフィニティーコロマトグラフィーを用いて抗体を精製した。最大産生のために選択したクローナンの上清から精製された抗体の量を、図5Bに示す。1 mg/mlの抗体濃度に対して280 nmでの光学密度1.4を推定する光分光法により、抗体濃度を判定した。本発明の $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1/2$ および $\text{bsFc}^{\text{k}\circ}-1$ 抗体分子の産生率は、各bs-scFv分子の産生率よりも顕著に高かった。

【 0 1 3 8 】

当業者は、本発明が目的を果たすために、ならびに述べられた目的および利点を得るためにうまく適合されることも、それらに固有のものも容易に理解するであろう。さらに、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本明細書において開示される発明に対して、さまざまな置換および改変が行われうることが当業者には容易に明らかであろう。本明細書において記述される組成物、方法、手段、処理、分子および特定の化合物は、例示であって、本発明の範囲の限定と意図されない、ある種の態様の目下の代表例である。当業者は、その変更および他の使用に想到するものと考えられ、それらは、特許請求の範囲により規定される本発明の趣旨のなかに包含される。本明細書における既刊の文献の一覧または論述は、その文献が最先端技術の一部であるという、または一般常識であるという自認と必ずしも解釈されるべきではない。

【 0 1 3 9 】

本明細書において例示的に記述された本発明は、本明細書において特異的に開示されたものではない、いずれの要素、限定がなくとも適当に実践されうる。したがって、例えば「含む(comprising)」、「含む(including)」、「含む(containing)」などの用語は、拡

10

20

30

40

50

張的かつ非限定的に解釈されるものとする。さらに、本明細書において利用される用語および表現は、限定ではなく、記述のための用語として用いられており、示され、記述された特徴またはその一部分の任意の等価物を除外するような用語および表現の使用が意図されるわけではなく、主張される本発明の範囲内でさまざまな改変が可能であることが理解される。したがって、本発明を例示的な態様および選択的な特徴により具体的に開示してきたが、その中で具体化されている本発明の変更および変形が当業者によって依拠されること、ならびにそのような変更および変形は本発明の範囲内であると見なされることが理解されるべきである。

【 0 1 4 0 】

本発明は、本明細書において広範かつ一般的に記述されている。一般的な開示のなかに入る下位の種および亜属の分類の各々も、本発明の一部を形成する。これには、切り取られた材料が本明細書において具体的に列挙されているか否かにかかわらず、その属から任意の主題を取り除くただし書きまたは消極的限定を有する本発明の一般的な記述が含まれる。

10

【 0 1 4 1 】

他の態様は、以下の特許請求の範囲内にある。さらに、本発明の特徴または局面がマーカッッシュ群によって記述される場合、当業者は、本発明がそれにより、マーカッッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの部分群によっても記述されることを認識するであろう。

【 0 1 4 2 】

参考文献一覧表

20

- 1 Davis,L., Vida,R. and Lipsky,P.E. Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3, *J.Immunol.*, 137: 3758-3767, 1986.
- 2 Jung,G., Ledbetter,J.A. and Muller-Eberhard,H.J. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84: 4611-4615, 1987.
- 3 Jung,G. and Eberhard,H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol.Today*, 9: 257-260, 1988. 10
- 4 Staerz,U.D., Kanagawa,O. and Bevan,M.J. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells, *Nature*, 314: 628-631, 1985.
- 5 Perez,P., Hoffman,R.W., Shaw,S., Bluestone,J.A. and Segal,D.M. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody, *Nature*, 316: 354-356, 1985. 20
- 6 Jung,G., Honsik,C.J., Reisfeld,R.A. and Muller-Eberhard,H.J. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83: 4479-4483, 1986.
- 7 Jung,G. and Eberhard,H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with antibody heteroconjugates, *Immunol.Today*, 9: 257-260, 1988. 30
- 8 Jung,G., Freimann,U., Von,M.Z., Reisfeld,R.A. and Wilmanns,W. Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments, *Eur.J.Immunol.*, 21: 2431-2435, 1991.
- 9 Rosenberg,S.A., Lotze,M.T., Yang,J.C., Aebersold,P.M., Linehan,W.M., Seipp,C.A. and White,D.E. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients, *Ann.Surg.*, 210: 474-484, 1989. 40
- 10 Tibben,J.G., Boerman,O.C., Massuger,L.F., Schijf,C.P., Claessens,R.A. and Corstens,F.H. Pharmacokinetics, biodistribution and biological effects of

- intravenously administered bispecific monoclonal antibody OC/TR F(ab')2 in ovarian carcinoma patients, *Int.J.Cancer*, 66: 477-483, 1996.
- 11 Kroesen,B.J., Buter,J., Sleijfer,D.T., Janssen,R.A., van der Graaf,W.T.,
The,T.H., de,L.L. and Mulder,N.H. Phase I study of intravenously applied
bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous
interleukin 2, *Br.J.Cancer*, 70: 652-661, 1994. 10
- 12 Jung,G. and Eberhard,H.J. An in-vitro model for tumor immunotherapy with
antibody heteroconjugates, *Immunol.Today*, 9: 257-260, 1988.
- 13 Jung,G., Freimann,U., Von,M.Z., Reisfeld,R.A. and Wilmanns,W. Target
cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments,
Eur.J.Immunol., 21: 2431-2435, 1991.
- 14 Bargou,R., Leo,E., Zugmaier,G., Klinger,M., Goebeler,M., Knop,S.,
Noppeneij,R., Viardot,A., Hess,G., Schuler,M., Einsele,H., Brandl,C.,
Wolf,A., Kirchinger,P., Klappers,P., Schmidt,M., Riethmuller,G.,
Reinhardt,C., Baeuerle,P.A. and Kufer,P. Tumor regression in cancer
patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science*, 321: 974-
977, 2008. 20
- 15 Topp,M.S., Kufer,P., Gokbuget,N., Goebeler,M., Klinger,M., Neumann,S.,
Horst,H.A., Raff,T., Viardot,A., Schmid,M., Stelljes,M., Schaich,M.,
Degenhard,E., Kohne-Volland,R., Bruggemann,M., Ottmann,O., Pfeifer,H.,
Burmeister,T., Nagorsen,D., Schmidt,M., Lutterbuese,R., Reinhardt,C.,
Baeuerle,P.A., Kneba,M., Einsele,H., Riethmuller,G., Hoelzer,D.,
Zugmaier,G. and Bargou,R.C. Targeted therapy with the T-cell-engaging
antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease
in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response
rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.*, 29: 2493-2498,
2011. 30 40
- 16 Brischwein,K., Parr,L., Pflanz,S., Volkland,J., Lumsden,J., Klinger,M.,
Locher,M., Hammond,S.A., Kiener,P., Kufer,P., Schlereth,B. and
Baeuerle,P.A. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific

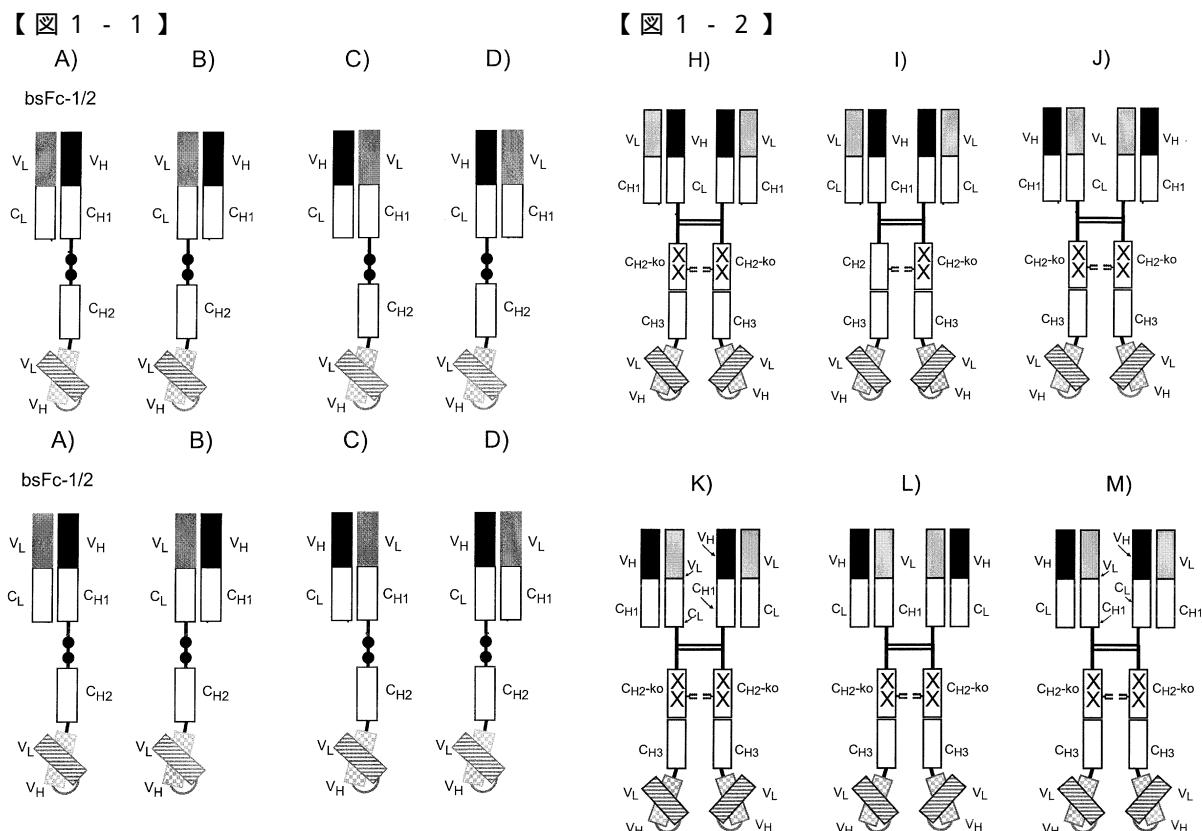
- single-chain antibody constructs of the BiTE class, *J.Immunother.*, 30: 798-807, 2007.
- 17 Bargou,R., Leo,E., Zugmaier,G., Klinger,M., Goebeler,M., Knop,S., Noppeney,R., Viardot,A., Hess,G., Schuler,M., Einsele,H., Brandl,C., Wolf,A., Kirchinger,P., Klappers,P., Schmidt,M., Riethmuller,G., Reinhardt,C., Baeuerle,P.A. and Kufer,P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody, *Science*, 321: 974-977, 2008. 10
- 18 Topp,M.S., Kufer,P., Gokbuget,N., Goebeler,M., Klinger,M., Neumann,S., Horst,H.A., Raff,T., Viardot,A., Schmid,M., Stelljes,M., Schaich,M., Degenhard,E., Kohne-Volland,R., Bruggemann,M., Ottmann,O., Pfeifer,H., Burmeister,T., Nagorsen,D., Schmidt,M., Lutterbuese,R., Reinhardt,C., Baeuerle,P.A., Kneba,M., Einsele,H., Riethmuller,G., Hoelzer,D., Zugmaier,G. and Bargou,R.C. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival, *J.Clin.Oncol.*, 29: 2493-2498, 2011. 20
- 19 Grosse-Hovest,L., Hartlapp,I., Marwan,W., Brem,G., Rammensee,H.G. and Jung,G. A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing, *Eur.J.Immunol.*, 33: 1334-1340, 2003. 30
- 20 Grosse-Hovest,L., Muller,S., Minoia,R., Wolf,E., Zakhartchenko,V., Wenigerkind,H., Lassnig,C., Besenfelder,U., Muller,M., Lytton,S.D., Jung,G. and Brem,G. Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101: 6858-6863, 2004. 40
- 21 Marvin,J.S. and Zhu,Z. Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies, *Acta Pharmacol.Sin.*, 26: 649-658, 2005.

- 22 Mabry,R., Lewis,K.E., Moore,M., McKernan,P.A., Bukowski,T.R.,
Bontadelli,K., Brender,T., Okada,S., Lum,K., West,J., Kuijper,J.L.,
Ardourel,D., Franke,S., Lockwood,L., Vu,T., Frank,A., Appleby,M.W.,
Wolf,A., Reardon,B., Hamacher,N.B., Stevens,B., Lewis,P., Lewis,K.B.,
Gilbertson,D.G., Lantry,M., Julien,S.H., Ostrander,C., Chan,C., Byrnes-
Blake,K., Brody,J., Presnell,S., Meengs,B., Levin,S.D. and Snavely,M.
Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23, 10
Protein Eng Des Sel, 23: 115-127, 2010.
- 23 Marvin,J.S. and Zhu,Z. Recombinant approaches to IgG-like bispecific
antibodies, Acta Pharmacol.Sin., 26: 649-658, 2005.
- 24 Mabry,R., Lewis,K.E., Moore,M., McKernan,P.A., Bukowski,T.R.,
Bontadelli,K., Brender,T., Okada,S., Lum,K., West,J., Kuijper,J.L.,
Ardourel,D., Franke,S., Lockwood,L., Vu,T., Frank,A., Appleby,M.W.,
Wolf,A., Reardon,B., Hamacher,N.B., Stevens,B., Lewis,P., Lewis,K.B.,
Gilbertson,D.G., Lantry,M., Julien,S.H., Ostrander,C., Chan,C., Byrnes-
Blake,K., Brody,J., Presnell,S., Meengs,B., Levin,S.D. and Snavely,M.
Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23, 20
Protein Eng Des Sel, 23: 115-127, 2010.
- 25 Dall'Aqua et al. "Contribution of domain interface residues to the stability of
antibody CH3 domain homodimers" Biochemistry (1998) Volume: 37, Issue:
26, Pages: 9266-9273. 30
- 26 S.Miller Protein-Protein Recognition and the Association of Immunoglobulin
Constant Domains. J.Mol.Biol. (1990) Volume 216 pp 965-973
- 27 J. Deisenhofer, Crystallographic refinement and atomic models of a human
Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from
Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry (1981)
Volume 20 pp 2361-2370 40
- 28 Roopenian & Akilesh; FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nature
Reviews Immunology (2007) Volume 7 pp:715-725.
- 29 Reiter Y., Brinkmann U., Kreitman R.J., Jung S-H., Lee B and Pastan I.,

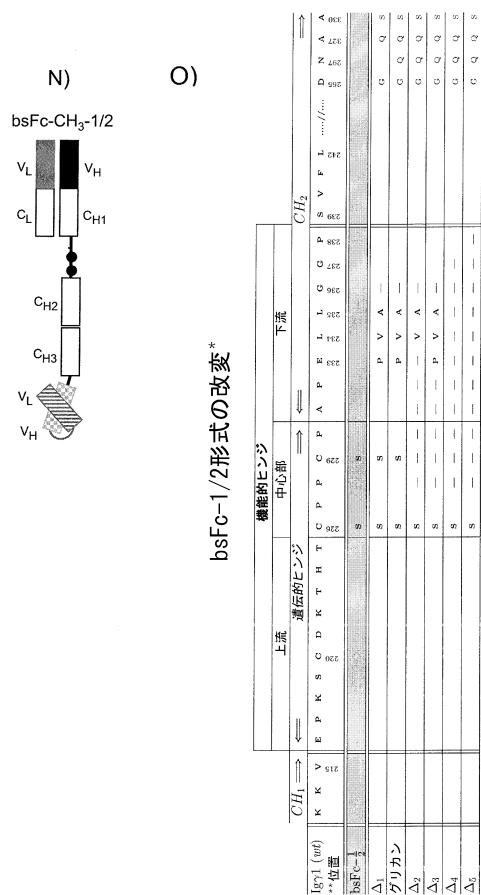
Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions, Biochemistry 1994, 33, 6551-5459.

30 International Patent Application WO2011/076922

31 International Patent Application WO2011/089211



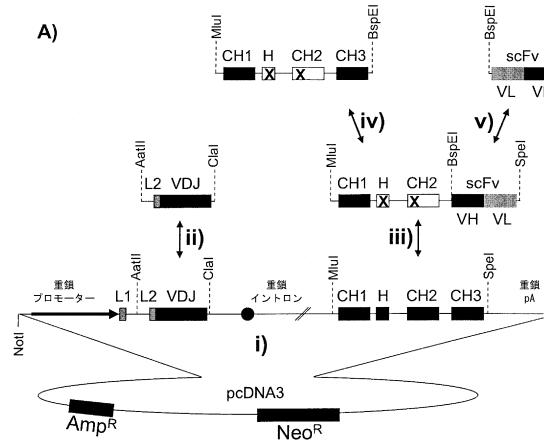
【図 1 - 3】



【図 1 - 4】

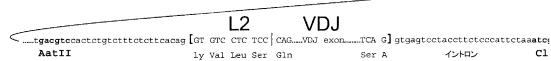
アミノ酸の位置の付番はEU指標にしたがう。

【 図 2 - 1 】



B)

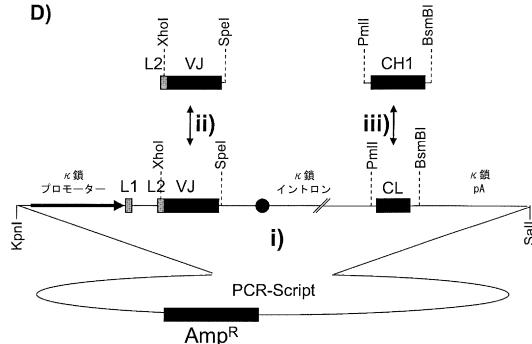
ATG GGA TGG AGC TGG ATC TTT CTC TCT CTG TCA GGA ACT GCA G] gtaaagggtt.....インtron I
Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala G
-19



c)

MuI CH1 BspEI SCFv S1
 atcacatacgegtttttcttgtag [CC TCC ACC ANG...//....acccacag [GG CAG CCC TCC GGA GAT ATC.../-TCC TCG TGA TAAc
 イントロン la Ser Thr Lys イントロン ly Gln Pro Ser Gly Asp Ile Ser Ser Stop Stc

【図2-2】



E L1

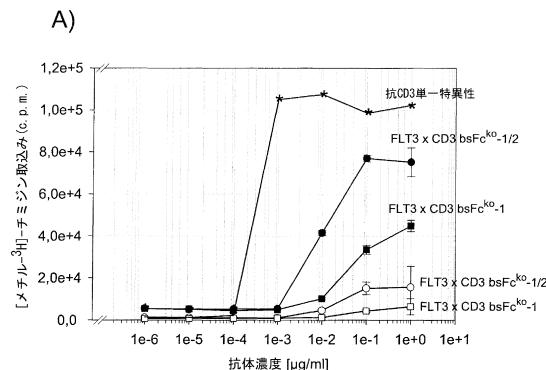
ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA G] gatgtactgtcct.....インtron
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser G
-20



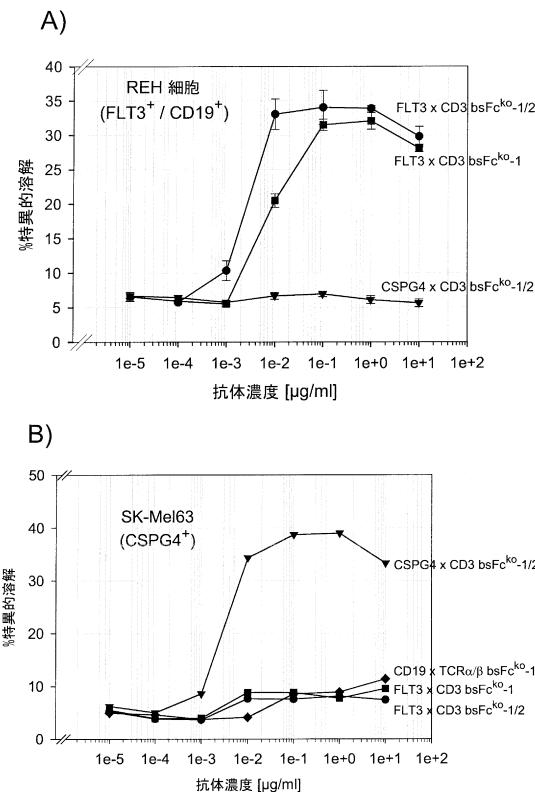
F

PmlI CL **BsmBI**
cataccatccatccatcgcttcatttccatc [GG ACT GTG GCT .. / .. GGA GAG TGT TAG] agacaacaaaggcttcgagacgcx
(イソロム イソロム ヴル ヴル ヴル) Gly Glu Cys 価値 価値

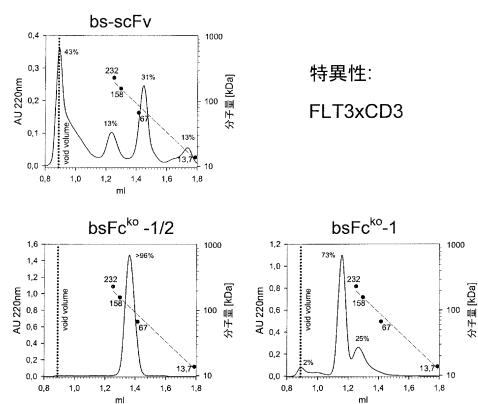
【図3】
標的細胞限定的T細胞活性化



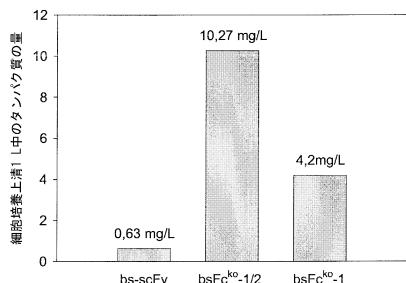
【図4】
腫瘍細胞の特異的溶解



【図5】
A) サイズ排除クロマトグラフィー



B) 产生率



【図6 A】

軽鎖配列

1) 抗FLT3キメラ軽鎖(クローン4G8): (SEQ ID NO:1)
DILTLQSPATLSVTGDSVSLSCRASQSIISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIQGIPSRFGSGS
GSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNNTWPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTA
SVVCLLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

2) 抗FLT3キメラ軽鎖(クローンBV10): (SEQ ID NO:2)
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVCLLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYE
YEHKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

3) 抗CSPG4キメラ軽鎖(クローン9.2.27): (SEQ ID NO:3)
DIELTQSPASLAWSLGQRATISCRASESVDSYGNFSMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA
RFSGSGSGRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNNEDPLTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVCLLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYE
KVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

4) 抗CD19キメラ軽鎖(クローン4G7): (SEQ ID NO:4)
DIVMTQAAPIVTPGEGVSISCRSSKSLLNSNGNTYLWFLQRPQGSPQLIYRMSNLASGV
PDRFSGSGSGTAFTRLIRSRVEAEDVGVYYCMQHLEYPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

5) 抗EGFR軽鎖(クローンC225): (SEQ ID NO:5)
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSGITNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFGSG
SGTDFTLSINSVSESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

【図 6 B - 0 1】

重鎖/主鎖配列

1) FLT3 × CD3: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローン4G8)およびC末端CD3一本鎖(クローンUCHT1: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:6)

**QVQLQQPGGAELVKPGASLKLSCCKSSGYFTTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHSSLSDSAAVYYCARAITTTPDFWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLS SSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
TPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
YKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
K P G K A P K L I Y T S R L E S G V P S R F S G S G S G D Y T L T I S L Q P E D F A T Y C Q Q G N T L P W
K V E K / G G G S G G G S G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T G Y T M N
G K G L E W V A L I N P Y K G V S T Y N Q K F K D R F T I S V D K S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
S D W Y F D V W Q Q G T L V T V S S ***

2) FLT3 × CD3: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローンBV10)およびC末端CD3一本鎖(クローンUCHT1: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:7)

**QVQLQSGPGLVQPSQSLITCTVGSFSLTNYGLHWVRQS PGKLEWLGIVWSGGSTDYNA
FISRLS IKDN SKS QV FF KM NSL QADD TAI YY CAR KGG I YY AN H YY AM DY W G Q G T S V T V S S A
KG PSV FPLAPSSKSTS GGTA ALG CLVKD YFPEPVTV WSNG ALT SGVHTFP AVLQSS GLYLS SSS
VVTVPSSSL GTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
LMISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
LNGKEYKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
N W Y Q Q K P G K A P K L I Y T S R L E S G V P S R F S G S G S G D Y T L T I S L Q P E D F A T Y C Q Q G N T L P W
I FG Q Q G T K V E I K / G G G S G G G S G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T G Y T M N
W V R Q A P G K G L E W V A L I N P Y K G V S T Y N Q K F K D R F T I S V D K S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R S G Y Y G D S D W Y F D V W Q Q G T L V T V S S ***

【図 6 B - 0 2】

3) FLT3 × TCR α / β : bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローン4G8)およびC末端TCR α / β一本鎖(クローンBMA031: VH-VL方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:8)

**QVQLQQPGGAELVKPGASLKLSCCKSSGYFTTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHSSLSDSAAVYYCARAITTTPDFWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLS SSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
EYKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
WVVKCPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSKSS STAYMELSSLTSEDAVHYCAR
GSYYDGFVYGGT L V T V S S G G G S G G G S G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T
S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P K R W I D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A D A A T Y C Q
QWSSNPLTFGAGTKELEK***

4) FLT3 × TCR α / β : bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローンBV10)およびC末端TCR α / β一本鎖(クローンBMA031: VH-VL方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:9)

**QVQLQSGPGLVQPSQSLITCTVGSFSLTNYGLHWVRQS PGKLEWLGIVWSGGSTDYNA
FISRLS IKDN SKS QV FF KM NSL QADD TAI YY CAR KGG I YY AN H YY AM DY W G Q G T S V T V S S A
KG PSV FPLAPSSKSTS GGTA ALG CLVKD YFPEPVTV WSNG ALT SGVHTFP AVLQSS GLYLS SSS
VVTVPSSSL GTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
LMISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
LNGKEYKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
YVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSKSS STAYMELSSLTSEDAVHYCAR
YCARGSYDDYDGFVYGGT L V T V S S G G G S G G G S G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T
CSATSSVS Y M H W Y Q Q K S G T S P K R W I D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A D A A T Y
YCQQWSSNPLTFGAGTKELEK***

【図 6 B - 0 3】

5) FLT3 × CD28: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローン4G8)およびC末端CD28一本鎖(クローン9.3: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:10)

**QVQLQQPGGAELVKPGASLKLSCCKSSGYFTTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHSSLSDSAAVYYCARAITTTPDFWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLS SSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
TPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
YKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
W Y Q Q K P G Q P P K L I F A A S N V E S G V P A R F S G S G S G D Y T L T I S L Q P E D F A T Y C Q Q G N T L P W
F G G G T K L E I K R / G G G S G G G S G G G S Q V K L Q Q S G P G L V T P S Q S L S I T C V S G F S L S D Y G V H W
V R Q S P G Q G L E W L V G V I W A G G T N Y N S A L M S R K S I K D N S K Q V F L K M N S L Q A D D T A V Y Y C A R D
K G Y S Y Y S M D Y W G Q G T T V T V S S ***

6) FLT3 × CD28: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローンBV10)およびC末端CD28一本鎖(クローン9.3: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:11)

**QVQLQSGPGLVQPSQSLITCTVGSFSLTNYGLHWVRQS PGKLEWLGIVWSGGSTDYNA
FISRLS IKDN SKS QV FF KM NSL QADD TAI YY CAR KGG I YY AN H YY AM DY W G Q G T S V T V S S A
KG PSV FPLAPSSKSTS GGTA ALG CLVKD YFPEPVTV WSNG ALT SGVHTFP AVLQSS GLYLS SSS
VVTVPSSSL GTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
LMISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
LNGKEYKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
DIEL T Q S P A S L A V S L G Q R A T I C R A S E S V E Y Y V T S L M Q W Y Q Q K P G Q P P K L I F A A S N V E S G V P A
R F S G S G S T N F S L N I H P V D E D D V A M Y F C Q S R K V P Y T F G G G T K L E I K R / G G G S G G G S G G G G
S Q V K L Q Q S G P G L V T P S Q S L S I T C V S G F S L S D Y G V H W V R Q S P G Q G L E W L G V I W A G G T N Y N S
A L M S R K S I K D N S K Q V F L K M N S L Q A D D T A V Y Y C A R D K G Y S Y Y S M D Y W G Q G T T V T V S S ***

【図 6 B - 0 4】

7) FLT3 × CD16: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローン4G8)およびC末端CD16一本鎖(クローン368: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:12)

**QVQLQQPGGAELVKPGASLKLSCCKSSGYFTTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHSSLSDSAAVYYCARAITTTPDFWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLS SSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
TPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
YKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
W Y Q Q K P G Q P P K L I Y T T S N L E S G I P A R F S A S G S G T D F T L N I H P V E E E D T A T Y C Q Q S N E D P Y T F
G G G T K L E I K / G G G S G G G S G G G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L R T S G M V G W
I R Q S P G K G L E W L A H I W W D D D K R Y N P A L K S R L T I S K D T S S N Q V F L K I A S V D T A D T A T Y C A Q I N
A W F A Y W G Q G T L V T V S S ***

8) FLT3 × CD16: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローンBV10)およびC末端CD16一本鎖(クローン368: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:13)

**QVQLQSGPGLVQPSQSLITCTVGSFSLTNYGLHWVRQS PGKLEWLGIVWSGGSTDYNA
FISRLS IKDN SKS QV FF KM NSL QADD TAI YY CAR KGG I YY AN H YY AM DY W G Q G T S V T V S S A
KG PSV FPLAPSSKSTS GGTA ALG CLVKD YFPEPVTV WSNG ALT SGVHTFP AVLQSS GLYLS SSS
VVTVPSSSL GTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TSPSPAPPVAGPSVFLFPPPKPDLMISR
LMISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLV LHQDWLNKE
LNGKEYKCKVSNKQLP SPIEKTI KAKG QPSGD I QM T QSPSSL SAS VGD RV IT C RAS QD IR NYL
D S F M N W Y Q Q K P G Q P P K L I Y T T S N L E S G I P A R F S A S G S G T D F T L N I H P V E E E D T A T Y C Q Q S N E
D P Y T F G G G T K L E I K / G G G S G G G S G G G S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L R T S G M V G W
M G V W I R Q S P G K G L E W L A H I W W D D D K R Y N P A L K S R L T I S K D T S S N Q V F L K I A S V D T A D T A T Y C A Q I N
A W F A Y W G Q G T L V T V S S ***

【图 6 B - 05】

9) CD19^xCD3、bsFc^{ko}-1/2 [N末端抗CD19キメラ重鎖(クローニング4G7)およびC末端抗CD3一本鎖(クローニングUCHT1: VL-VH方向)]：グリカン-ko-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:14)

EVQLQSGQPELIPKGAVSKMMSCKASGYTFTSYVMHWVKQPKPGGLEWIGYINPYNDGDTKYNE
KFKGKATLTDKSSTAYMELSSLSEDASVYYCARGTYYSSRVDHYWGQGTTLTVSSAASK
GPSVFLAPSKSTSGGAALGKVLDFPVEPTVWSNGLSNTGSHVTFPAVLQSSGLP
VTVPSSSLGTQTYC1CNVHKSPTNKDVKKPEKSCDKTHSPSPAPPVAGFPLFPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVGVSHEDEPKFNRYWDGVFHVNAKTKPREEQYQSTYRVSVTLVHQDWL
NGKEYKCKVSNQLPSPIEKTISKAQGQPSGDQMTPQSPLSSASVGDRVITTCRASQDINRYNLYN
WYQCGPKGAKPLIYTTSLESGVPSRFSGSGSGTDTYLTISSLQPEDFATYQCQGNLTLPWT
FGQQTKVEIKGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNW
VRQAPKGLEWWALINPYKGKVSTYQNKFDRTISVDKSNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
VYGGDSDWYFDWGGTLTVTSS*

10) CD19 \times TCR α/β 、bsFc $k^{-1}/2$ [N末端抗CD19キメラ重鎖(クローニング4G7)およびC末端抗TCR α/β -一本鎖(クローニングBMA031: VH-VL方向)]：グリカン-ko-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:15)

EVQLQSGQPELKPAGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQPKPGGLEWIGYINPYNDGKTYNE
KFKGKATLTSOKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYCARGTYYGSRVFDYWGQTTLTVSSAASK
GPSVFPLAPSKSTSGGTAALGLVKLYDVFPEPTVWSNGALSTGSVTFPAVLLOSSGLSLSV
GPSSVPLGQTQYICNWNHKPSNTVKDKVKEPKSCDKHTSPSPSAPPVGAPSFLFPKPKDTL
MISRTPEVTCVVGVSHDEPFVNKFVWYDGVFHVNAHKTPREEQYQSTYRVSVLTVHLQDWI
NGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISAKQGPSEGVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSY
VMHWVKQPKPGGLEWIGYINPYNDGKTYNEKFKGKATLTSOKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY
CARGSYYYDVFQFGVYQGQTLTVSTSAGGGGGGGGGGGGGSQIVLTQSPAIMSSAPGEKVTMTC
SATSSVSYMHWWKQGSPKRWYIDTSLKLASGVPARFSGSGSGTYSLTISSMEAEDAATYY
CQWWSNPNTFAGTKLELK*

【図6B-07】

13) CSPG4×CD3、bsFc^{k0-1/2} [N末端抗CSPG4キメラ重鎖(クローニー9.2.27)およびC末端抗CD3一本鎖(クローニーUCHT1: VL-VH方向)]、グリカン-k0-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:18)

QVQLKQSGSPVELVKPGASVVKISCKASGYAFSRSWMNWKQRPGQQGLEWIGRIPGDGDTNYN
GKFKGKAATLADKSSSTAYMQVSLSVTSDAASYFCARGNTVVYPYTMWDYQGGTTVTVSSAS
TKGSPVFPLAPSSKSTGSGTAAGLCKVDFPEPVTVWSNGALTSGVHTPQFLGSQSLYSL
SVTPVTPSSSLGTOTYICNVNKHPSNTKUDKKV~~EPKSCDHTTSPSPSAPPVAGPSVFLPPKPKD~~
~~TLMSIRPTEVCTVVVGSHEDPEVKFNWVYDGEVHNAKTKPREEYQSTYRVSVLTVLHOD~~
~~WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTSIAKGQPSGDIQMTQSPSSLLASVGDRTVITCRASQDIRNY~~
~~LNWYQOKPGKAPKLLIYTSLRESGPSSRFSSGSGSTDYLTISLQPEDFATYYCQCGQNTLP~~
~~WTFGQQGTKVEIKGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACASGYSTGTYM~~
~~NWVRQAPGKLEWVALPNYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMSNLRAEDTAVYYC~~
~~ARSGYGHDSDWYFDWVGGGTLVSS*~~

14) CSPG4 x TCR α / β 、bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗CSPG4キメラ重鎖(クローン9.2.27)およびC末端抗TCR α / β 一本鎖(クローンBMA031: VH-VL方向)]：グリカン-k0-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:19)

QVQLKQSGSPVELVKPGASVVISCKASGYAFSRSSWNVKQRPQGGLEWIGIYPGDGDNTYN
GKFKGKAATLADKSSTAYMQVSSLTSVDSAVYFCARGNTVVYPYTMIDYWQGGTTVTVSSAS
TKGPSVFLPAPSKSTGGTAAGLCKVLPFPEPVTVWSNLGALTSGVHTFPVALQSSLYSL
SVVTPSSPLGTTQYICNWNHKPSNTKVDKKVPEKSCDKTHSPSPSAPPVGAPSFLPPPKD
TLMSRTPTEVTCVVGSHSEDEPFKVNWWYDGVEVHNAKTJKPREEQYOSTYRVSVLTVLHOD
WLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTISAKQGPSPGEVQLQQSGPELVKPGASVKMCSKASGYKFT
SYVMHWVKQKPGQGLEWIGIYINPYNDVTKYNEFKKGKAATLTDKSSTAYMELSSLTSEDAS
HYCARGSYYDDGFVWQGGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSGPEKVMT
TCATSATSVSYMHWWYQQKSSTPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAAT
YCCQWNSNPLTFLGAGTKLELK*

【図6B-06】

11) CD19×CD28: bsFc^{ko}-1/2 [N末端抗CD19キメラ重鎖(クローニング4G7)およびC末端CD28一本鎖(クローニング9.3: VL-VH方向)]、グリカン-ko-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:16)

EVLLQQSGSPPELIPKGAVSKMMSCKASGYTFTSYVMWVKQPKPGGLEWIGYINPYNDGTYNE
KFKGKATLTSKDKSSATYMEELSLSEDASAVYCARGTYYGSRVFDYWWCGQGTTLTVAASSAK
GPSVFPLAPSKTSTGGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNLGATTCFPAVLQSSGLYSLSSLV
VTVPSSLDLQTGYTCVNHWKPNSTVKDKVKEPFKSCDKTHITSPSPAPVAGVGPSFLVPPKPKDL
MISRTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYDVGVEHNAHTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNIQLPSPIEKTISKAKGQPSG
DIELTGSPASLAWSLGQRATISCRASESVEYYTSLMQWYQQKPGQPPLKLIAFASNVESGVPA
RFSGSGSGTNLSNLIHPVDDEDDAVMFYCQGSRKVPYTFGGGTKEIKRGGGGSGGGGGGGGG
SQVKLQNSQGPGLTPQSLSITCTVFGFSLSDYGHVWRQSPGQGLEWLGIWAGGGTNYS
ALMRSKSISKDMSKQSVFLKMNSLQADDAVYCCARDKGYSYSSWMDYWGQGTTVTVS*

12) CD19×CD16: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗CD19キメラ重鎖(クローニング4G7)およびC末端CD16一本鎖(クローニング3G8: VL-VH方向)]、グリカン-ko-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:17)

EVILQQSGSPPEIUKPGAVSKMSCKASGYTFTSY/MWHWVKQPKPGGLEWIGY/INPYNDGTKYNE
KFKGKATLTSKDSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRSVFDYWGQGTTLTVSASSTK
GPSVFLAPSSKSSTSGTAALGLKVDYFPEPVTWSNGALTSVGH/PFTPAVLQSSGGLSYLSLV
VTVPSSSLGQTTYCNCVNHKPSNTVKDKVKEPVKSCDKHTSPSPAPPVAGPSVFLPPPKDTL
MSIRTEPTCVVGVSHEDPEVFKNWVYDGEVHNAKTPKREEQYQSTYR/VSVSVLTHWLHDWL
NGKEYKCKVSNKQLSPPIEKTSIKAQGPQSGDIVLTQSPPASLAvgLQRATISCKASQSVDFGD
SFMNWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSQTDFTLNHPIVEEEDTATYCCQNSNED
PYTFGGGTKEIKGGGGGGGGGGGGSQVTLESGPGLQPSQTSLTCFSFGSFLRTSGM
AQINPWAQFWYGGQTLTVB**

【図6B-08】

15) CSPG4×CD28: bsFc^{ko}-1/2 [N末端抗CSPG4キメラ重鎖(クローン9.2.27)およびC末端CD28一本鎖(クローン9.3; VL-VH方向)]、グリカン-ko-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO:20)

QVQLKQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYAFRSRWMMWVKQRPGQQGLEWIGRIPGDGDTNYN
GKFKGKATLADKSSTAYMQVSLSVTSDAVYFCARGNTVVWPYTMWDGGGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCKVDFYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVTVPVPSLLGTOTYICNVNHHKPSNTKVDDKKVKEPKSCDKTHSPSPSAPPVAGPSVFLFPKPKD
TLMSRTPVETCIVVGVSHEDPEVKFNWVYDGVEVHNAKTKPREEYQYQSTYRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNQKLPSPIEKTSKAGQPG
DIELTOSPLASLVSLQGRATISCRASESEVYVYTSMLQMWWYQQKPGQPPLKLLIAFAASNVESGVPA
RFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKPVYTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGG
SQVQLKQQSGPVLPTPSQSLSICTVSGFLSLDYGVHWRQSPGQQGLEWLVWIWAGGTNTYN

16) CSPG4×CD16: bsFc^{k0-1/2} [N末端抗CSPG4キメラ重鎖(クローン9.2.27)およびC末端CD16一本鎖]

QVQLKQSGSPELVKPGASVKISCKASGYAFRSWMNVVKQRPGQQGLEWIGRIYPGDGTNYN
GKFKGKATLTDKSSSTAYMQVSSLTSDAVYFCARGNTVVYPYTMWDWGGBTTVTSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCKVDFPPEPVTSWSNSGALTSGVHFTFPAVLQSSGLYSL
SVTVPSSSLGTQTYICNVNHNPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTSSPPSAPPVAGPSVFLPPKPD
TLMSRTPTEVTCVVGSHEDPEVFKFNWYUDGEVHNAAKTPREEQYQSYTRVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKLQPLSPKIECTISAKGQPSGDIVLTQSPLASLVLGRQATISCASQSVDFD
GDSFMWWYQKQPQPKPLYIYTSSLESGIPFARSFSGSGTDFDLNHPVEEADTTYQCQSN
EDPYTFGGGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPGLQPSQTLSLTSFCSGFSLRTSG
MGVGWIRQPSKGLEWLAIHWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVTDATATYY

【図6B-09】

17) EGFR×CD3: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗EGFRキメラ重鎖(クローンC225)およびC末端CD3一本鎖(クローンUCHT1: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO: 22)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVGSFLTNYGHVWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTP
FTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSNDTAIYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVTSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMIS
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKQLPPIEKTIKAKGQPSGDIQMTQSPSSLASVGDRVITTCRASQDIRNYLNYYQ
QKPGKAPKLIVYTSRLESGVPSRFSGSGGTDYLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQ
GTVKEKGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWRQ
APGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY
GDSDWYFDVWQGQTLTVSS*

18) EGFR×TGF α /β: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗EGFRキメラ重鎖(クローンC225)およびC末端TGF α /β一本鎖(クローンBMA031: VH-VL方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO: 23)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVGSFLTNYGHVWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTP
FTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSNDTAIYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVTSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMIS
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKQLPPIEKTIKAKGQPSGEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMH
WVKQPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDASHYCAR
GSYYDGFVYGGQTLTVTSSGG
SSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ
QWSNPLTFGAGTKLELK*

【図6B-10】

19) EGFR×CD28: bsFc^{k0}-1/2 [N末端抗EGFRキメラ重鎖(クローンC225)およびC末端CD28一本鎖(クローン9.3: VL-VH方向)]、グリカン-kο-変種-半分子の鎖である(SEQ ID NO: 24)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVGSFLTNYGHVWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTP
FTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSNDTAIYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVTSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMIS
RTPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNGK
EYCKVSNKQLPPIEKTIKAKGQPSGDIVLTQSPASLAWSLQRATISCKASOSVDFGDSFM
NWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSASGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYT
FGGGTKLEIKGG
WIRQPSGKGLEWLIAHWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQIN
PAWFAYWGQGTLTVSS*

【図6B-11】

21) FLT3×CD3: bsFc^{k0}-1 [N末端抗FLT3キメラ重鎖(クローン468)およびC末端CD3一本鎖(クローンUCHT1: VL-VH方向)]: CH3ドメインを含む-kο-変種-(全)分子の鎖であり、糖変異体ではない(SEQ ID NO: 26)

QVQLQQGAELVKPGASLKLSQLKSSGGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQ
KFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSLTSDSAVYCARAITTIPDFWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTV
SSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMIS
TPEVTCVVGVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE
YCKVSNKQLPPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQOPENNYKTPPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQGQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
KSGDIQMTQSPSSLASVGDRVITTCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLIVYTSRLESGVPSR
FSGSGSGTDYLTISLQPEDFATYYCQGGNTLPWTFGQGKTVIEKGGGGGGGGGGGGGGG
VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQ
KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWQGQTLTVSS*

【配列表】

0006441079000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
			A 6 1 P	35/02

(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 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 ユング ガンドラム

ドイツ連邦共和国 ロッテンブルク ヴェンデルスハイム シュバーブシュトラーセ 30

(72)発明者 ドゥアベン ミヒヤエル

ドイツ連邦共和国 テュービンゲン ハンス ガイガー ヴェーク 18

(72)発明者 グロッセ ホーヴェスト ルドガー

ドイツ連邦共和国 テュービンゲン マオアーシュトラーセ 19ビー

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2011/047180 (WO, A1)

特表2002-514406 (JP, A)

国際公開第2009/041613 (WO, A1)

国際公開第2006/046661 (WO, A1)

LU DAN, JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, 2002年 9月15日, V267 N2, P213-22

6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 16 / 0 0

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI / STN

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

UniProt / GeneSeq