

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-513836
(P2019-513836A)

(43) 公表日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-503903 (P2019-503903)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月4日 (2017.4.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月4日 (2018.12.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/025951
 (87) 国際公開番号 W02017/176760
 (87) 国際公開日 平成29年10月12日 (2017.10.12)
 (31) 優先権主張番号 62/317,906
 (32) 優先日 平成28年4月4日 (2016.4.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

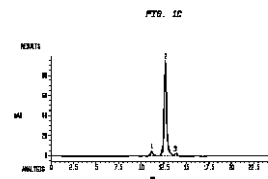
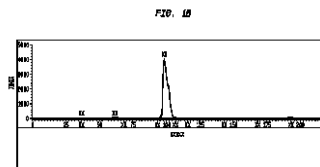
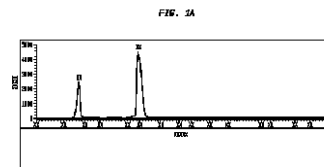
(71) 出願人 518353784
 ヘモジェニックス リミテッド ライアビ
 リティ カンパニー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 112
 26 ブルックリン パークサイド アベ
 ニュー 760 スイート 212
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性抗体を使用して患者の造血幹細胞/造血前駆細胞 (HSC/HP) を除去する方法

(57) 【要約】

記載した本発明は、ヒトチロシンキナーゼ受容体 F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質および T 細胞上に発現する C D 3 受容体タンパク質に結合する二重特異性抗体を含有する組成物、ならびに患者の造血幹細胞/造血前駆細胞 (HSC/HP) を除去するための医薬の調製における二重特異性抗体を含有する組成物の使用を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

造血細胞移植のためにそれを必要とする患者を前処置またはコンディショニングする方法であって、

ヒト F L T 3 とヒト C D 3 の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体を用意するステップ、および

二重特異性抗体を含む治療量の医薬組成物を患者に投与するステップを含み、

治療量が、

C D 4 5、C D 3、F L T 3、C D 1 9、C D 3 3 の 1 つまたは複数を発現する細胞集団の末梢血レベルを少なくとも 9 0 % 低減する、および

患者を前処置またはコンディショニングするプロトコールの毒性を低減するのに有効である、方法。

【請求項 2】

F L T 3 を結合する二重特異性抗体の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 であり、F L T 3 を結合する二重特異性抗体の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

二重特異性抗体が、ヒト C D 3 のサブユニットと反応するモノクローナル抗体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

二重特異性抗体またはその抗原結合部分が、免疫グロブリン G (I g G)、I g M、I g E、I g A、および I g D アイソタイプからなる群から選択されるアイソタイプを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記有効量が、0 . 0 1 m g / k g ~ 1 0 m g / k g、より良くは 0 . 0 5 m g / k g ~ 2 m g / k g、より良くは 0 . 1 m g / k g ~ 0 . 5 m g / k g、より良くは 0 . 1 m g / k g ~ 0 . 3 m g / k g、より良くは 0 . 1 m g / k g を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

それを必要とする患者が、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C L L)、C M L、末梢 T 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞種、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害、多発性骨髄腫、または S C I D を患っている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害が、鎌状赤血球貧血、ベータサラセミアメジャー、難治性 D i a m o n d - B l a c k f a n 貧血、骨髄異形成症候群、特発性重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、赤芽球癆、ファンconi 貧血、無巨核球性および先天性血小板減少症から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

組成物が抗腫瘍剤をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

二重特異性抗体がヒト化抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ヒト F L T 3 とヒト C D 3 の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体を調製する方法であって、F l t 3 モノクローナル抗体の F a b 抗原結合断片の C 末端を I g G 1 の C H 2 ドメインに接続するステップ、およびヒト C D 3 のサブユニットと反応するモノクローナル抗体 (U C H T 1) の単鎖可変断片 (S c F v) を I g G 1 の C H 2 ドメインに接続するステップを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

ヒトFLT3とヒトCD3の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体であって、IgG1のCH2ドメインに接続されている、Flt3モノクローナル抗体のFab抗原結合断片のC末端、およびIgG1のCH2ドメインに接続されている、ヒトCD3のサブユニットと反応するモノクローナル抗体(UCHT1)の単鎖可変断片(SCFv)を含む組換え単鎖二重特異性抗体。

【請求項 1 2】

Fab抗原結合断片の重鎖結合ドメインのアミノ酸配列が配列番号1(H3113)であり、Fab抗原結合断片の軽鎖結合ドメインのアミノ酸配列が配列番号2(L3133)である、請求項11に記載の組換え単鎖二重特異性抗体。

10

【請求項 1 3】

ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号5であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号7である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 4】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、1ng/mL(6.25pM)から2,000ng/mL(12.5nM)の間である、請求項13に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 1 5】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、10ng/mL(62.5pM)から200ng/mL(1.25nM)の間である、請求項14に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

細胞上のヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合するFLT3抗体が、細胞が結合抗体または抗原結合断片を内部移行させるのに有効である、請求項13に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号11である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 1 8】

抗体またはその断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、1ng/mL(6.25pM)と2,000ng/mL(12.5nM)の間である、請求項17に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、10ng/mL(62.5pM)と200ng/mL(1.25nM)の間である、請求項18に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 2 0】

細胞上のヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合するFLT3抗体が、細胞が結合抗体または抗原結合断片を内部移行させるのに有効である、請求項17に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号13であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号15である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 2】

50

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量 (EC_{50}) が、 1 ng/mL (6.25 pM) と $2,000 \text{ ng/mL}$ (12.5 nM) の間である、請求項 21 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 23】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量 (EC_{50}) が、 10 ng/mL (62.5 pM) と 200 ng/mL (1.25 nM) の間である、請求項 22 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 24】

細胞上のヒト FLT3 / FLK2 受容体タンパク質に結合する FLT3 抗体が、細胞が結合抗体または抗原結合断片を内部移行させるのに有効である、請求項 21 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 25】

ヒト FLT3 / FLK2 受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 17 であり、ヒト FLT3 / FLK2 受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号 19 である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 26】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量 (EC_{50}) が、 1 ng/mL (6.25 pM) と $2,000 \text{ ng/mL}$ (12.5 nM) の間である、請求項 25 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 27】

抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量 (EC_{50}) が、 10 ng/mL (62.5 pM) と 200 ng/mL (1.25 nM) の間である、請求項 26 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 28】

細胞上のヒト FLT3 / FLK2 受容体タンパク質に結合する FLT3 抗体が、細胞が結合抗体または抗原結合断片を内部移行させるのに有効である、請求項 25 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、「二重特異性抗体を使用して患者の造血幹細胞 / 造血前駆細胞 (HSC / HP) を除去する方法」と題され、その内容が参照によりその全体を本明細書に組み込まれる、米国特許仮出願第 62 / 317,906 (2016 年、4 月 4 日出願) の優先権の利益を主張する。

記載した本発明は一般に、造血細胞移植、治療抗体調製、およびそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

40

造血幹細胞

造血幹細胞は、全ての血液細胞の共通の祖先である。多能性細胞として、造血幹細胞は複数の細胞系列に分化できるが、全ての系列が 3 つの胚葉に由来するわけではない。造血幹細胞分化は、造血の 2 つの主要な分枝であるリンパ球および骨髓球性細胞系列を生じる (Kondo, M. "Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors," Immunol. Rev. 2010 Nov; 238(1): 37-46)。リンパ球系細胞は、T、B、およびナチュラルキラー (NK) 細胞を含む。骨髓球系細胞は、巨核球、および赤血球 (MegE)、ならびに骨髓球系細胞に属する顆粒球 (好中球、好酸球、および好塩基球)、単球、マクロファージおよび肥満細胞 (GM) の異なるサブセットを含む (Id. citing Kondo M, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implicatio

50

ns for clinical application. *Ann. Rev Immunol.* 2003;21:759-806、Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* (New York, NY. 2000 Feb 25;287(5457):1442-6 ; Iwaskaki, H. and Akashi, K. "Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell," *Immunity* 26 (6) June 2007, 726-40も参照)。

HSCは、自己再生能および血液系への分化能を示し、すなわち幹細胞が分裂する場合、平均して娘細胞の50%が細胞系列に分化決定されるが、残りの50%は分化しない。各分裂幹細胞が、1つの新しい幹細胞と1つの分化細胞を生成するように、このプロセスは、非対称細胞分裂によって同じ数の幹細胞を維持する。対照的に、対称分裂では、幹細胞は同一の幹細胞を100%生成する (Gordon, M. *Stem cells and haemopoiesis*. In: Hoffbrand, V., Catovsky, D., Tuddenham, E.G., 5th ed. Blackwell Publishing, (2005): Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia, pp. 1-12. New York)。

【0003】

リンパ球および骨髄球系列は、前駆細胞レベルで分離可能である。リンパ球性共通前駆細胞 (CLP) は生理的条件下で目立った骨髄球の可能性なく、リンパ球の全ての型に分化できるが (Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature*. 2000 Sep 21;407(6802):383-6)、実験条件によって、いくつかの骨髄球関連遺伝子がCLPで検出されることもある (Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity*. 2006 Mar;24(3):269-81)。

同様に、骨髄球性共通前駆細胞 (CMP) は、B細胞の可能性なくまたは非常に低いレベルで骨髄球性細胞の全てのクラスを生じ得る (Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):193-7)。別の細胞型、樹状細胞 (DC) は、CLPまたはCMPのいずれからも生じ得るため、リンパ球または骨髄球系列のいずれにも明確にグループ分けされない (Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3333-41、Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* (New York, NY. 2000 Dec 15;290(5499):2152-4)。CMPは、巨核球 - 赤血球 (MEG-E) 前駆細胞、および顆粒球 - 単球 (GM) 前駆細胞に増殖および分化でき、巨核球、赤血球、顆粒球、単球およびその他をさらに生じる (Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*. 2007;26:726-740)。

【0004】

転写因子の発現レベルの差は、分化する細胞の系列所属を決定するようである。転写因子PU.1およびGATA-1は、それぞれ骨髄および赤血球/巨核球系列分化に関係している (Gordon, M. *Stem cells and haemopoiesis*. In: Hoffbrand, V., Catovsky, D., Tuddenham, E.G., 5th ed. Blackwell Publishing, (2005): Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia, pp. 1-12. New York.)。

【0005】

HSCの特徴

HSCは、未分化であり、小リンパ球に似ている。HSCの大部分は細胞周期のG0期で静止状態にあり、細胞周期依存的な薬物の作用から保護されている。幹細胞の静止状態は、形質転換増殖因子 - (TGF-β) によって維持される。TGF-βの活性は、細胞増殖を制御し、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子p21を標的化する腫瘍抑制遺伝子であるp53によって媒介される (Gordon, M. *Stem cells and haemopoiesis*. In: Ho

10

20

30

40

50

ffbrand, V., Catovsky, D., Tuddenham, E.G., 5th ed. Blackwell Publishing, (2005) : Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia, pp. 1-12. New York.)。HSCの静止状態は、幹細胞コンパートメントを保護し、長期間に渡り幹細胞プールを持続するだけでなく、複製関連変異の蓄積を最小限にするのにも重要である。HSC静止状態を維持する多くの内因性転写因子は白血病と関連することが見出されている。例えば、FoxOと骨髄球/リンパ球の融合、または混合系列の白血病をもたらす染色体転座が、急性骨髄性白血病で報告されている(例えば、Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development, Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1参照)。

10

正常なHSCの大半は、CD34+ / CD38- / CD90+ 骨髄細胞画分中に存在し、いくつかのHSCはCD34- / Lin-細胞中でも観察される。CD34+ / CD38+細胞画分は、短期増殖活性を備えているいくつかのHSCを含有する。他の認識されたマーカーは、CD4およびCD8などの最終分化マーカーの欠如を伴うチロシンキナーゼ受容体c-kit (CD117)を含む(Rossi et al., Methods in Molecular Biology (2011) 750(2): 47-59)。

【0006】

HSCの分類

造血幹細胞プールは3つの主な群に細分化できる：(1)4~6週間のみ、分化細胞のクローンを生成できる短期HSC；(2)消衰する前、6~8カ月間分化細胞の子孫を継続できる中期HSC；および(3)いつまでも造血を維持できる長期HSC。(Testa U. Annals of Hematology (2011) 90(3): 245-271)。

20

造血

造血は、幹細胞および前駆細胞の運命の特定を調節する成分からなり、ならびに必要な因子を供給することによってそれらの発生を維持する特殊な制御性微小環境(「ニッチ」)によって支持される、HSCが成熟血液細胞に分化する高度に協調されたプロセスである。本明細書で使用する場合、用語「骨髄(BM)ニッチ」は、多様な系列の血液細胞の生存、成長、および分化に必須の役割を果たす要素(例えば、骨芽細胞、破骨細胞、骨髄内皮細胞、間質細胞、脂肪細胞、および細胞外マトリックスタンパク質(ECM))から構成される非常に組織化された構造を指す。骨髄ニッチは、HSCが増殖、成熟ならびに骨髄球およびリンパ球前駆細胞を生じるのに重要な生後の微小環境である。

30

【0007】

骨髄(BM)は、全ての動物の骨の髄腔に存在する。骨髄は、その両方が他の細胞型へと分化できることが分かっている造血細胞(成熟血液細胞の先駆細胞)および間質細胞(広範な結合組織細胞の先駆細胞)を含む様々な先駆細胞および成熟細胞型からなる。骨髄の単核画分は、間質細胞、造血先駆細胞、および内皮先駆細胞を含有する。

赤脾髄および白脾髄を含む明確な全体構造を有する脾臓などの二次リンパ器官とは違い、BMは骨芽細胞を含有する骨内膜以外にはっきりとした構造特性を持たない。骨内膜領域は石灰化した硬い骨と接触し、HSC活性の維持に必要な特別な微小環境を提供する(Kondo M, Immunology Reviews (2010) 238(1): 37-46; Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development, Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1)。

40

【0008】

ニッチ内で、HSCは、線維芽細胞、内皮細胞、および細網細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、および間葉系幹細胞(MSC)を含むいくつかの供給源から生じる支持および増殖シグナルを受けると考えられている。ニッチの主な機能は、栄養素、酸素、パラクラインおよびオートクラインシグナルの局所変化を統合し、体循環からのシグナルに応答するHSC静止状態、輸送、および/または増殖を変更することである(Broner, F. & Carson, M C. Topics in bone biology. Springer. 2009; 4: pp. 2-4. New York, USA.)。

50

本当のMSCの性質は誤解されたままであるが、CXCL12/CXCL12)発現CD146MSCは、類洞側表面に存在し、類洞壁構造の構成に寄与し、アンジオポエチン-1(Ang-1)を産生し、骨内膜性ニッチを形成する骨芽細胞を生成することができる、自己再生前駆体であることが近年報告された(Konopleva, MY, & Jordan, CT, *Biology and Therapeutic Targeting* (2011) 9(5): 591-599)。これらのCXCL12細胞は、必須であるが異なる維持シグナルが提供される骨芽細胞と血管ニッチの間を往復するHSCの輸送経路として働き得る。

【0009】

骨髄MSCによって産生されるサイトカインおよびケモカインは、局所産生の変動に次いで、およびサイトカイン結合グリコサミノグリカンの効果によって特定のニッチに濃縮する。このうち、CXCL12/間質細胞由来因子-1アルファは、HSCのホーミングを正に制御するが、形質転換増殖因子FMS様チロシンキナーゼ3(Flt3)リガンドおよびAng-1は静止因子として作用する(例えば、Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). *Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development*, *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1参照)。CXCL12-CXCR4シグナル伝達は、個体発生ならびにコロニー形成前駆細胞の生存および増殖中のHSCのBMへのホーミングに関与する。末梢血へのHSCのCXCR4-選択的アンタゴニスト誘導性動員は、造血器官でのHSCの保持におけるCXCL12の役割をさらに示す。

BM生着は、BMSC産生複合体細胞外マトリックスによる、続く細胞間相互作用を含む。したがって、血管細胞接着分子-1(VCAM-1)またはフィブロネクチンは、BM由来MSCへの接着に重要である。このように、造血幹細胞増殖動態の調節は、正しい造血細胞産生の制御に決定的に重要である。これらの調節メカニズムは、幹細胞に内因性もしくは外因性、または両方の組合せとして分類され得る(例えば、Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). *Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development*, *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1参照)。

【0010】

HSC自己再生および分化は、造血微小環境における細胞間相互作用またはSCF(幹細胞因子)とその受容体c-kit、Flt-3リガンド、TGF-、TNF-、およびその他などのサイトカインなど、外部因子(外因性調節)によって調節され得る。サイトカインは、複数のシグナル伝達経路の活性化によって様々な造血細胞機能を制御する。細胞増殖および分化に関連する主要な経路は、Janusキナーゼ(Jak)/シグナル伝達兼転写活性因子(STAT)、マイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼ、およびホスファチジルイノシトール(PI)3-キナーゼ経路である(Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). *Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development*, *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1)。

さらに、他の転写因子、例えば幹細胞白血病(SCL)造血転写因子;GATA-2などの発現;ならびに細胞周期調節に含まれる遺伝子産物、例えば、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CKI)p16、p21、およびp27は、最初期からの造血細胞発生に必須であることが示されている(内因性調節)(Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). *Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development*, *Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1)。

【0011】

Notch-1-Jagged経路は、細胞内シグナル伝達および細胞周期調節を伴う細胞外シグナルを組込む働きをし得る。Notch-1は、そのリガンドに結合する造血幹細胞膜の表面受容体である。Jaggedは間質細胞上にある。これは、Notch-1の細胞質部分の切断をもたらし、それは次いで転写因子として作用し得る(Gordon, M.

Stem cells and haemopoiesis. In: Hoffbrand, V., Catovsky, D., Tuddenham, E.G., 5th ed. Blackwell Publishing, (2005): Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia, pp. 1-12. New York.)。

骨髄 (BM) / 造血幹細胞 (HSC) 移植を使用して処置される障害

骨髄 (BM) / 造血幹細胞 (HSC) 移植を使用して処置される障害としては、限定はされないが、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、末梢T細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害 (例えば、鎌状赤血球貧血、ベータサラセミアメジャー、難治性Diamond-Blackfan貧血、骨髄異形成症候群、特発性重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、赤芽球癆、ファンコニ貧血、無巨核球性または先天性血小板減少症)、多発性骨髄腫、ならびに重症複合免疫不全症 (SCID) が挙げられる。

10

【0012】

造血器悪性腫瘍

ほとんどの造血器悪性腫瘍は、がん幹細胞として公知の、腫瘍維持を担当するサブセットのみを有する、機能的に異質の細胞を含む。がん幹細胞は、自己再生、生存延長、およびより分化した特徴を有する細胞を生じる能力を含む正常組織幹細胞と似ている質を保持するためそう呼ばれる (Jones RJ and Armstrong SA, Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan; 14 (Supplement 1): 12-16)。

20

造血幹細胞の形質転換イベントは、限定はされないが、腫瘍原生のヒットと関連する分化の程度により慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、およびおそらく急性リンパ性白血病さえも含むいくつかの異なる悪性腫瘍を産生し得る (Jones RJ and Armstrong SA, Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan; 14 (Supplement 1): 12-16)。

がん幹細胞の概念は、特定の組織の腫瘍が、起源の組織で見出される細胞の不均質性を再現しようと「試みる」ように見えることが多く、したがって、多様な細胞型を生じる幹細胞様である細胞が腫瘍中にあるという考えに基づく。この仮説の基本試験は、腫瘍細胞が、腫瘍を再生する能力を有するものと、この能力を持たないものに分けられるかどうかである。この細胞の階層は、ほとんどの細胞が白血病の発生を開始できないが、いくつかのAMLが免疫不全マウスにおいて白血病を発症することができる特有の免疫表現型を有する細胞を保持する急性骨髄性白血病において最もはっきりと実証されている。さらに、白血病を発症する細胞は、腫瘍発症活性を失い、したがって元々の腫瘍で見出された細胞の不均質性を再現する細胞も生じる (Lapidot T et al., Nature. 1994; 367: 645-648; Bonnet D et al., Nat Med. 1997; 3: 730-737)。

30

【0013】

急性骨髄性白血病

急性骨髄性白血病 (AML) は、骨髄における未成熟前駆細胞の蓄積を伴う骨髄球系列における分化の停止を特徴とするクローン性障害であり、造血不全をもたらす (Pollyea DA et al., British Journal of Haematology (2011) 152(5): 523-542)。白血病性芽球の出現には幅広い患者間の不均質性がある。急性骨髄性白血病 (AML) における白血病を引き起こす細胞の発見は、大多数のAML芽球が増殖せず、ごく少数のみが新しいコロニーを形成できるという発見から開始された (Testa U, Annals of Hematology (2011) 90(3): 245-271)。AMLの全症例に共通する特性は、骨髄において20%を超える芽球細胞の蓄積をもたらす異常分化の停止である (Gilliland, DG and Tallman MS, Cancer Cell (2002) 1(5): 417-420)。

40

80%を超える骨髄性白血病が、少なくとも1つの染色体再編と関連し (Pandolfi PP, Oncogene (2001) 20(40): 5726-5735)、100を超える異なる染色体転座がクローニングされている (Gilliland, DG and Tallman MS, Cancer Cell (2002) 1(5): 417-420)。これらの転座は、造血系列の発生に重要な役割を果たすことが示されている転写因子をコ

50

ードする遺伝子を頻繁に含む。したがって、転写装置の変更は、分化の停止をもたらす共通のメカニズムであるようである (Pandolfi PP, *Oncogene* (2001) 20(40): 5726-5735; Tenen DG, *Nature Reviews of Cancer* (2003) 3(2): 89-101)。

【 0 0 1 4 】

臨床的検討および実験動物モデルは、少なくとも2つの遺伝的変更が急性白血病の臨床症状に必要であることを示している。Gilliland & Tallman (*Cancer Cell* (2002) 1(5): 417-420)によって提唱されたモデルによると、分化の終結を誘導するクラスI活性化変異とクラスII変異間の協力はAMLを生じる。受容体チロシンキナーゼ遺伝子FLT3およびKIT、RASファミリーメンバーの変異などのクラスI変異、ならびにニューロフィブロミン1の機能の喪失は、典型的にはシグナル伝達経路の活性化の停止の結果として造血前駆細胞に増殖および/または生存の利点を付与する。クラスII変異は、転写因子または活性化補助因子による干渉によって分化の停止をもたらす (Frankfurt O et al., *Current Opinion in Oncology* (2007) 19(6): 635-649)。

10

【 0 0 1 5 】

白血病幹細胞(LSC)は、CD34、CD38、HLA-DR、およびCD71などHSCで以前に同定された多くの細胞表面マーカーを共有するようであるが、いくつかのグループは、2つの集団で差次的に発現される表面マーカーを報告した。

例えば、CD90またはThy-1は、LSCコンパートメントに特異的な可能性があるとして記載されている。最も初期の幹細胞が前駆細胞段階へ発達する場合、Thy-1は、正常な造血では下方制御される。(Hope KJ et al., *Archives of Medical Research* (2003) 34(6): 507-514)。

20

白血病性前駆細胞上でのCXCL12(間質細胞由来因子-1アルファ)とその受容体CXCR4の間の相互作用は、それらの骨髄微小環境へのホーミングに寄与する。CXCR4レベルは、AMLの患者由来の白血病細胞において著しく上昇し、CXCR4発現は転帰不良と関連する(Konopleva MY and Jordan CT, *Biology and Therapeutic Targeting* (2011) 29(5): 591-599)。

【 0 0 1 6 】

初期のヒトAML幹細胞における核因子カッパ(NF- κ)経路の恒常的活性化は、一般にNF- κ がLSCおよびAML細胞型の全体的な生存に重要な役割を果たすという証拠を提供した。(Konopleva MY and Jordan CT, *Biology and Therapeutic Targeting* (2011) 29(5): 591-599)。

30

クラスIIIチロシンキナーゼ受容体ファミリーのメンバー、FLT3は、正常な造血前駆細胞および白血病芽細胞で発現し、細胞の増殖、分化、および生存に重要な役割を果たす。FLT3リガンドによるFLT3受容体の活性化は、受容体の二量体化およびリン酸化、ならびにJanusキナーゼ(JAK)2シグナル伝達因子(JAK2)、シグナル伝達兼転写活性因子(STAT)5、およびマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路を含む下流のシグナル伝達経路の活性化をもたらす。AMLの患者のおよそ40%で見出されるFLT3遺伝子の変異は、その自己リン酸化および恒常的な活性化を促進し、リガンド非依存的な増殖をもたらすと考えられている (Frankfurt O et al., *Current Opinion in Oncology* (2007) 19(6): 635-649)。

40

【 0 0 1 7 】

リンパ性悪性腫瘍

ほとんどの組織における自己再生能は、細胞が分化の正常な段階を発達する際に失われる;例えば、造血幹細胞のレベルを超えた骨髄球系血液細胞はもはや自己再生能を保持していない。自己再生の分化関連喪失の顕著な例外はリンパ球システムであり、ここでは自己再生能は、生涯免疫記憶を維持するためにメモリーリンパ球段階まで保存される (Feron DT et al., *Science*. 2001; 293: 248-250; Luckey CJ et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 3304-3309)。体細胞高頻度変異は、B細胞悪性腫瘍が生じる分化の段階のマーカーとして役立つ。一般に、体細胞高頻度変異の存在は、胚中心または胚中心形成後のB細胞に生じている場合に腫瘍を同定するが、変異がない場合は胚中心形成前

50

のB細胞を同定する。骨髄性悪性腫瘍とは対照的であるが、系列の保存された自己再生能と一致して、免疫グロブリン(Ig)変異パターンは、B細胞悪性腫瘍がB細胞分化の段階を通して細胞から生じ得ることを示している(Lapidot T et al., Nature. 1994; 367: 645-648; Bonnet D and Dick JE, Nat Med. 1997; 3: 730-737; Jones RJ et al., J Natl Cancer Inst. 2004; 96: 583-585)。

【0018】

多発性骨髄腫(MM)は通常、形質細胞バルクから生じる疾患の多くの臨床結果を有する悪性形質細胞の疾患であると考えられている。しかし、正常な形質細胞は最終分化され、自己再生能を欠損し、30年に渡り、マウスおよびヒトMM由来細胞の少数のみがクローン原生であることが明らかである。これらの稀なクローン原生細胞は「腫瘍幹細胞」と呼ばれている(Park CH et al., J Natl Cancer Inst. 1971; 46: 411-422; Hamburger A W and Salmon SE, Science. 1977; 197: 461-463)。MM形質細胞は、メモリーB細胞に似ている自己再生がん幹細胞の小集団から生じる。これらのクローン形質B細胞はほとんどの患者で循環するだけでなく、多くの標準的な抗MM剤に耐性でもあり、したがってほとんどの疾患再発の要因であるようである(Matsui WH et al., Blood. 2004; 103: 2332-2336; Kukreja A et al., J Exp Med. 2006; 203: 1859-1865; Jones RJ and Armstrong SA, Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan; 14 (Supplement 1): 12-16)。

ホジキンリンパ腫(HL)の特徴である、リード・シュテルンベルク(RS)細胞は、形質細胞以外の血液細胞のみであり、場合によりCD138を発現する(Carbone A et al., Blood. 1998; 92: 2220-2228)。HL細胞株は、残りの細胞上には存在するRSマーカーであるCD15およびCD30を欠損する細胞の小集団を含むが、メモリーB細胞の表現型と一致するマーカーを発現することが示されている(Newcom SR et al., Int J Cell Cloning. 1988; 6: 417-431; Jones RJ et al., Blood. 2006; 108: 470)。表現型メモリーB細胞のこの小さい亜集団は、HL細胞株内の全てのクローン原生能を保持した。初期疾患の者を含む、ほとんどのHL患者は、患者のRS細胞として、同じクローンのIg遺伝子再配置を有する循環メモリーB細胞を持つ(Jones RJ et al., Blood. 2006; 108: 470; Jones RJ and Armstrong SA, Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan; 14 (Supplement 1): 12-16)。これらのデータは、これらのクローン形質のメモリーB細胞はHL幹細胞を表すようであることを示している。

【0019】

造血幹細胞(HSC)は、血液系悪性腫瘍および非悪性疾患の処置のための骨髄移植に使用される(Warner et al, Oncogene (2004) 23(43): 7164-7177)。骨髄切除患者において、どの細胞成分がドナーの造血および免疫系の生着を担当するか研究者らが発見するまで、骨髄(BM)は何年もの間、未分画の細胞プールとして移植されてきた(例えば、Sergio Paulo Bydlowski and Felipe de Lara Janz (2012). Hematopoietic Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia Development, Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), ISBN: 978-953-307-930-1参照)。

骨髄/造血幹細胞(BM/HSC)移植のための患者の前処置またはコンディショニングは、手順の重要な要素である。それは2つの主な目的を果たす:(1)移植した細胞をレシピエントに生着させる、患者の十分な免疫抑制を提供するおよび移植したHSCのための骨髄の十分なニッチ空間を明らかにする;ならびに(2)悪性腫瘍の源の根絶を助けることが多い。

【0020】

患者のコンディショニングは、放射線ありまたはなしで化学療法剤のカクテルの最大投与可能量を投与することによって従来行われてきた。カクテルの成分は、毒性が重複しないように選択されることが多い。現在使用されている全ての前処置レジメンは毒性であり、生命を脅かし得る重度の副作用がある。これらの副作用は、粘膜炎、吐き気、および嘔吐、脱毛、下痢、発疹、末梢神経障害、不妊、肺毒性、および肝毒性である。これらの副作用の多くは、年配および病気の患者で特に危険であり、患者が移植を受けるかどうか決定する決定的な要素となることが多い。

したがって、これらの毒性なく、骨髄/造血幹細胞(BM/HSC)移植に適するように患者を前処置またはコンディショニングする必要がある。記載した本発明は、ヒトCD3受容体タンパク質に結合する二重特異性抗体を使用して患者の造血幹細胞/造血前駆細胞(HSC/HP)を除去する組成物および方法を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0021】

一態様によると、記載した本発明は、造血細胞移植のためにそれを必要とする患者を前処置またはコンディショニング(調整、調節)する方法であって、ヒトFLT3とヒトCD3の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体を用意するステップ、および二重特異性抗体を含む治療量の医薬組成物を患者に投与するステップを含み、治療量が、CD45、CD3、FLT3、CD19、CD33の1つまたは複数を発現する細胞集団の末梢血レベルを少なくとも90%低減する、および患者を前処置またはコンディショニングするプロトコルの毒性を低減するのに有効である方法を提供する。

10

一実施形態によると、FLT3を結合する二重特異性抗体の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列は配列番号1であり、FLT3を結合する二重特異性抗体の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列は配列番号2である。別の実施形態によると、二重特異性抗体は、ヒトCD3のサブユニットと反応するモノクローナル抗体を含む。別の実施形態によると、二重特異性抗体またはその抗原結合部分は、免疫グロブリンG(IgG)、IgM、IgE、IgA、およびIgDアイソタイプからなる群から選択されるアイソタイプを含む。

20

一実施形態によると、有効量は、0.01mg/kg~10mg/kg、より良くは0.05mg/kg~2mg/kg、より良くは0.1mg/kg~0.5mg/kg、より良くは0.1mg/kg~0.3mg/kg、より良くは0.1mg/kgを含む。

一実施形態によると、それを必要とする患者は、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CLL)、CML、末梢T細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害、多発性骨髄腫、またはSCIDを患っている。別の実施形態によると、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害は、鎌状赤血球貧血、ベータサラセミアメジャー、難治性Diamond-Blackfan貧血、骨髄異形成症候群、特発性重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、赤芽球癆、ファンコニ貧血、無巨核球性および先天性血小板減少症から選択される。

30

【0022】

一実施形態によると、組成物は抗腫瘍剤をさらに含む。

一実施形態によると、二重特異性抗体はヒト化抗体である。

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3とヒトCD3の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体を調製する方法であって、Flt3モノクローナル抗体のFab抗原結合断片のC末端をIgG1のCH2ドメインに接続するステップ、およびヒトCD3のサブユニットと反応するモノクローナル抗体(UCHT1)の単鎖可変断片(ScFv)をIgG1のCH2ドメインに接続するステップを含む方法を提供する。

40

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3とヒトCD3の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体であって、IgG1のCH2ドメインに接続されているFlt3モノクローナル抗体のFab抗原結合断片のC末端、およびIgG1のCH2ドメインに接続されているヒトCD3のサブユニットと反応するモノクローナル抗体(UCHT1)の単鎖可変断片(ScFv)を含む、組換え単鎖二重特異性抗体を用意する。

【0023】

一実施形態によると、Fab抗原結合断片の重鎖結合ドメインのアミノ酸配列は配列番号1(H3113)であり、Fab抗原結合断片の軽鎖結合ドメインのアミノ酸配列は配列番号2(L3133)である。

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結

50

合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号5であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号7である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用意する。

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号11である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用意する。

【0024】

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号13であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号15である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用意する。

別の態様によると、記載した本発明は、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号17であり、ヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する抗体またはその断片の抗原結合部分の重鎖のアミノ酸配列が配列番号19である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用意する。

別の実施形態によると、抗体またはその断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)は、1 ng/mL(6.25 pM)と2,000 ng/mL(12.5 nM)の間である。別の実施形態によると、抗体またはその抗原結合断片の有効濃度の最大半量(EC₅₀)は、10 ng/mL(62.5 pM)と200 ng/mL(1.25 nM)の間である。別の実施形態によると、細胞上のヒトFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合するFLT3抗体は、細胞が結合抗体または抗原結合断片を内部移行させるのに有効である。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1Aおよび図1Bは、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンなどのアミノ酸の固有蛍光を示す図である。図1Cは、合成抗体の純度の測定を示す図である。

【図2】HSC/HPによって発現されるFLT3/FLK2およびT細胞によって発現されるCD3に結合する二重特異性抗体の投与が、ヒト化免疫力低下マウスの末梢血におけるキメラ化のレベルを低減することを示す図である。図2Aは、CD3-FLT3二重特異性抗体の適用前(対照;上列)および3週間後のヒト化NOGマウスの末梢血のフローサイトメトリ分析の例を示す図である。左から右へ:ヒトhCD45+細胞(全hCD45+細胞の%)、ヒトhCD3+細胞(全hCD45+細胞の%;T細胞)、ヒトhCD19+細胞(全hCD45+細胞の%;B細胞)、ヒトhCD33+細胞(全hCD45+細胞の%;骨髓球性細胞)の量の分析。図2Bは、ヒト化マウス(n=27)の末梢血におけるキメラ化のレベルへの二重特異性抗体投与の効果を示す図である。図2Cは、末梢血(n=27)におけるT細胞(全hCD45+細胞中のhCD3+細胞の%)、B細胞(全hCD45+細胞中のhCD19+細胞の%)、および骨髓球系(全hCD45+細胞中のhCD33+細胞の%)のレベルへの二重特異性抗体投与の効果を示す図である。図2Dは、ヒトhCD3+細胞(n=3)の量が低減したヒト化免疫力低下マウス(Cにおいてアスタリスクで標識した)における二重特異性抗体適用の効果の低減を示す図である。

【図3】クローン的に増殖したハイブリドーマからの培養上澄み液のスクリーニングを示す図である。図3Aは、9つの陽性ハイブリドーマクローンの上澄み液のフローサイトメトリ分析から得た蛍光強度のヒストグラムである。上澄み液は、REH細胞(初回再発時のALLの15歳の少女の末梢血から確立したヒトB細胞先駆白血病細胞)によって発

10

20

30

40

50

現される F L T 3 / F L K 2 に対する免疫反応性を示す。図 3 B は、図 3 A のヒストグラムの中央蛍光強度 (M F I) を示す表である。9 つのクローン全てが、ヒト F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質を発現する R E H 細胞と反応する。

【図 4】増殖したハイブリドーマから精製したモノクローナル抗体のスクリーニングを示す図である。図 4 A は、9 つの陽性ハイブリドーマクローンから精製したモノクローナル抗体のフローサイトメトリー分析から得た蛍光強度ヒストグラムである。上澄み液は、S P 2 / 0 細胞によって発現されるヒト F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質への免疫反応性を示す。モノクローナル抗体は、ヒト F L T 3 / F L 2 受容体タンパク質を発現しない野生型 S P 2 / 0 細胞と非反応性であった。図 4 B は、図 4 A のヒストグラムの中央蛍光強度 (M F I) を示す表である。9 つのクローン全てが、ヒト F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質を発現する S P 2 / 0 細胞と反応し、野生型 S P 2 / 0 細胞とは反応しなかった。

【図 5】フローサイトメトリーを使用する有効濃度 (E C) 曲線によって決定される抗ヒト F L T 3 / F L K 2 抗体の親和性を示す図である。図 5 A は、抗体クローン A b 2 ~ 8 1。図 5 B は、抗体クローン A b 1 ~ 2 3 D A。図 5 C は、抗体クローン A b 3 ~ 1 6 H A。図 5 D は、抗体クローン A b 0 ~ 3 0 A。図 5 E は、抗体クローン A b 1 ~ 1 8 N e w。

【図 6】抗 F L T 3 / F L K 2 抗体内部移行の時間経過を示す図である。モノクローナルマウス抗ヒト C D 1 3 5 抗体の平均蛍光強度 (M F I) は二次 A l e x a F l u o r 4 8 8 で検出し、生存 R e h 細胞集団を時間に対してプロットした。内部移行アッセイは、氷上に 4 で 1 0、3 0、6 0、および 1 2 0 分間保たれた対照細胞と並行して、3 7 で実施した。各抗体 (クローン 1 2 3 D、A 2 8 1 A、3 3 0 A、および 3 1 6 H A) の M F I の増減率は、1 0 分での M F I を 1 0 0 % に設定して、4 および 3 7 においてトリプレートで 2 時間にわたり、時間に対してグラフ化した。

【発明を実施するための形態】

【0026】

用語

用語「活性化」または「リンパ球活性化」は、RNA、タンパク質および DNA の合成ならびにリンホカインの産生をもたらす特異的抗原、非特異的マイトジェン、または同種異系細胞によるリンパ球の刺激を指し；それは様々なエフェクターおよびメモリー細胞の増殖および分化に続く。例えば、成熟 B 細胞は、その細胞表面免疫グロブリン (I g) によって認識されるエピトープを発現する抗原との遭遇によって活性化され得る。活性化プロセスは、抗原による膜 I g 分子の架橋に依存する直接的なもの (架橋依存的 B 細胞活性化) またはヘルパー T 細胞との密接な相互作用によって最も効率的に起こる間接的なもの (「同種のヘルププロセス」) であり得る。T 細胞活性化は、T C R / C D 3 複合体のその同種リガンドとの相互作用に依存し、ペプチドはクラス I またはクラス I I M H C 分子の溝に結合される。受容体会合によって開始される分子イベントは複雑である。最も初期のステップは、いくつかのシグナル伝達経路を調節する基質のセットのチロシンリン酸化をもたらすチロシンキナーゼの活性化であるようである。これらは、T C R を r a s 経路に連結するアダプタータンパク質のセット、チロシンリン酸化がその触媒活性を増大し、イノシトールリン脂質代謝経路に会合し、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇およびプロテインキナーゼ C の活性化をもたらすホスホリパーゼ C 1、ならびに細胞の成長および分化を調節する一連の他の酵素を含む。T 細胞の完全な応答性は、受容体会合に加えて、アクセサリ細胞由来共刺激活性、例えば、抗原提示細胞 (A P C) 上の C D 8 0 および / または C D 8 6 による T 細胞上の C D 2 8 の会合を必要とする。活性化 B リンパ球の可溶性生成物は免疫グロブリン (抗体) である。活性化 T リンパ球の可溶性生成物はリンホカインである。

【0027】

抗体：

抗体は、その分子が、それらの標的上の小さい化学基に相補的なそれらの表面の小さい

領域を持つ血清タンパク質である。これらの相補的な領域（抗体結合部位または抗原結合部位と呼ばれる）は、抗体分子あたり少なくとも2つあり、抗体分子のいくつかの型では、10、8、またはいくつかの種では多くても12あり、抗原上のそれらの相当する相補的な領域（抗原決定基またはエピトープ）と反応し、多価抗原のいくつかの分子を共に連結し、格子を形成する。

完全抗体分子の基本構造単位は、4つのポリペプチド鎖、2つの同一の軽（L）鎖（それぞれ約220アミノ酸を含有する）および2つの同一の重（H）鎖（それぞれ通常約440アミノ酸を含有する）からなる。2つの重鎖および2つの軽鎖は非共有および共有（ジスルフィド）結合の組合せによって一緒に維持される。分子は2つの同一の半分から構成され、それぞれ軽鎖のN末端領域および重鎖のN末端領域から構成される同一の抗原結合部位を有する。軽鎖と重鎖の両方は通常協力して抗原結合表面を形成する。

【0028】

ヒト抗体は、2種類の軽鎖、および を示す；免疫グロブリンの個々の分子は通常1つのみまたはその他である。正常な血清では、60%の分子が 決定因子を有し、30%が を有することが見出されてきた。多くの他の種が、2種類の軽鎖を示すことが見出されているが、それらの割合は多様である。例えば、マウスおよびラットでは、 鎖を含むが全体の数パーセントに過ぎず；イヌおよびネコでは、 鎖は非常に少なく；ウマは 鎖を持たないようであり；ウサギは株およびb-遺伝子座アロタイプに依存して5~40%の を有し；トリの軽鎖は、 よりも により相同性である。

哺乳動物では、抗体の5つのクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、それぞれその自身の重鎖のクラス - （IgA）、（IgD）、（IgE）、（IgG）、およびμ（IgM）を有する。さらに、それぞれ 1、 2、 3、および 4重鎖を有するIgG免疫グロブリン（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）の4つのサブクラスがある。その分泌形態では、IgMは、全部で10の抗原結合部位を付与する5つの鎖単位から構成される5量体である。各5量体は、2つの隣接する尾部領域間に共有結合的に挿入される1コピーのJ鎖を含有する。

【0029】

5つの免疫グロブリンクラスは全て、広範な電気泳動移動度を示し、均一ではないという点で他の血清タンパク質と異なる。この不均一性、例えば互いに正味荷電が異なる個々のIgG分子は、免疫グロブリンの内在特性である。

「抗原決定基」または「エピトープ」は、分子の抗原決定部位である。一連の抗原決定基/エピトープは基本的に直鎖である。らせん状ポリマーまたはタンパク質などの規則的な構造では、抗原決定基/エピトープは基本的に互いに近づくことができる分子の異なる部分のアミノ酸側鎖を含む構造の表面内または上の限られた領域またはパッチである。これらは構造決定因子である。

鍵と鍵穴の関係とたとえられることが多い相補性の原理は、2つの反応分子が互いに非常に近く接近でき、実際に1つの分子の突出する構成原子または原子群が、他方の相補的な凹みまたは陥没に適合できるほど近い場合にのみ効果的に作用できる比較的弱い結合力（疎水および水素結合、ファンデルワールス力、ならびにイオン性相互作用）を含む。抗原-抗体相互作用は高い特異性を示し、多くのレベルで明らかである。分子レベルまで下げると、「特異性」は抗体の抗原への結合部位が、無関係の抗原の抗原決定基に全く似ていない相補性を有することを意味する。2つの異なる抗原の抗原決定基が何らかの構造類似性を有する場合でさえも、1つの決定基の他方のいくつかの抗体の結合部位へのある程度の適合が起こり、この現象は交差反応を生じる。交差反応は、抗原-抗体反応の相補性または特異性を理解するうえで非常に重要である。免疫学的特異性または相補性は、抗原中の少量の不純物/夾雑物の検出を可能にする。

【0030】

「モノクローナル抗体」（mAb）は、免疫したドナー由来のマウス脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞株との融合によって生成され、選択培地中で成長する確立されたマウスハイブリドーマクローンを産生できる。「ハイブリドーマ細胞」は抗体分泌B細胞と骨髄腫細胞

10

20

30

40

50

の *in vitro*での融合から生じる不死化ハイブリッド細胞である。培養抗原特異的 B細胞の最初の活性化を指す「*In vitro*免疫」は、マウスモノクローナル抗体を産生する別のよく確立された手段である。

末梢血リンパ球由来の免疫グロブリン重鎖 (VH) および軽鎖 (VL および VH) バリアブル遺伝子の多様なライブラリーもポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅によって増幅できる。重鎖および軽鎖可変ドメインがポリペプチドスペーサーによって連結される単一のポリペプチド鎖をコードする遺伝子 (単鎖 Fv または scFv) は、PCR を使用して無作為に重鎖および軽鎖 V 遺伝子を組み合わせることによって作成できる。次いで、コンビナトリアルライブラリーは、ファージのチップにおけるマイナーコートタンパク質への融合によって、糸状バクテリオファージの表面上に提示するためにクローニングできる。

【0031】

ガイド選択の技術は、ヒト免疫グロブリン V 遺伝子のげっ歯類免疫グロブリン V 遺伝子とのシャッフリングに基づく。本方法は、(i) ヒト軽鎖のレパートリーを目的の抗原と反応性のマウスモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (VH) ドメインとシャッフリングするステップ; (ii) 抗原上の半ヒト Fab を選択するステップ、(iii) 二度目のシャッフリングにおいてヒト重鎖のライブラリーのための「ドッキングドメイン」として選択した軽鎖遺伝子を使用してヒト軽鎖遺伝子を有する Fab 断片クローンを単離するステップ; (v) 遺伝子を含む哺乳動物細胞発現ベクターをエレクトロポレーションによってマウス骨髄腫細胞にトランスフェクトするステップ; および (vi) マウス骨髄における完全 IgG1、抗体分子として抗原と反応性の Fab の V 遺伝子を発現するステップを必要とする。

本明細書で使用する場合、用語「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)」は、細胞の表面に結合する抗体がナチュラルキラー (NK) 細胞上の Fc 受容体と相互作用する場合に引き起こされる。NK 細胞は、IgG1 および IgG3 サブクラスを認識する受容体 FcγRIII (CD16) を発現する。死滅メカニズムは、パーフォリンおよびグランザイムを含む細胞質顆粒の放出を含む、細胞傷害性 T 細胞のものと類似している (以下を参照)。

【0032】

CD3 (TCR 複合体) は 4 つの異なる鎖から構成されるタンパク質複合体である。哺乳動物では、複合体は、T 細胞受容体 (TCR) および鎖と関連して T リンパ球の活性化シグナルを生成する CD3 鎖、CD3 鎖、および 2 つの CD3 鎖を含む。TCR、鎖および CD3 分子は共に TCR 複合体を構成する。CD3 分子の細胞内尾部は、TCR のシグナル伝達能に必須である、免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) として公知の保存モチーフを含む。ITAM のリン酸化時、CD3 鎖は、T 細胞のシグナル伝達カスケードに含まれるキナーゼ、ZAP70 (ゼータ関連タンパク質) を結合できる。

本明細書で使用する用語「造血細胞移植」(HCT) は、血液および骨髄移植 (BMT)、患者の造血システムを再構築するための細胞 (造血幹細胞; また造血前駆細胞とも呼ばれる) の注入を含む手順を指す。

用語「リンパ球」は、体全体に渡りリンパ組織で形成される小さい白血球を指し、正常な成人では循環血液中の全白血球数の約 22 ~ 28% を占め、疾患に対する体の防御に大きな役割を果たす。個々のリンパ球は特定化され、構造的に関連する抗原の限定されたセットに应答するように分化決定される。この分化決定は、免疫システムの所与の抗原との最初の接触より前に存在し、抗原上の決定基 (エピトープ) に特異的な受容体のリンパ球表面膜上の提示によって発現される。各リンパ球は受容体の集団を持ち、その全てが同一の結合部位を有する。リンパ球の 1 セットまたはクローンは、その受容体の結合領域の構造が別のクローンとは異なり、したがってそれが認識できるエピトープが異なる。リンパ球は、それらの受容体の特異性だけでなく、それらの機能も互いに異なる。

【0033】

リンパ球の 2 つの広範なクラスが認識される: 抗体分泌細胞の先駆細胞である B リンパ

10

20

30

40

50

球（B細胞）、およびTリンパ球（T細胞）。

Bリンパ球

Bリンパ球は、骨髄の造血細胞由来である。成熟B細胞は、その細胞表面によって認識されるエピトープを発現する抗原によって活性化され得る。活性化プロセスは、抗原による膜Ig分子の架橋に依存する直接的なもの（架橋依存的B細胞活性化）、または同種の援助と呼ばれるプロセスにおいて、ヘルパーT細胞による相互作用を介する間接的なものであり得る。多くの生理学的状況において、受容体架橋刺激と同種の援助が共同してより活発なB細胞応答を生み出す（Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," *Fundamental Immunology*, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999)）。

10

【0034】

架橋依存的B細胞活性化は、各B細胞が同一の可変領域を有するIg分子を発現するため、抗原が細胞表面受容体の結合部位に相補的な複数コピーのエピトープを発現することを必要とする。そのような要求は、微生物の莢膜多糖類またはウイルスエンベロープタンパク質など、反復エピトープを有する他の抗原によって満たされる。架橋依存的B細胞活性化は、これらの微生物に対して開始される主要な防御免疫応答である（Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," *Fundamental Immunology*, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999)）。

同種の援助により、B細胞は受容体と架橋できない抗原に対する応答を開始し、同時に、それらが弱い架橋イベントによって刺激される場合、不活性化からB細胞を救出する共刺激シグナルを提供する。同種の援助は、B細胞の膜免疫グロブリン（Ig）、抗原のエンドサイトーシス、および細胞のエンドソーム/リソソームコンパートメント内でのペプチドへのその断片化による抗原の結合に依存する。生じたペプチドのいくつかは、クラスII主要組織適合複合体（MHC）分子として公知の細胞表面タンパク質の特定のセットの溝にロードされる。生じたクラスII/ペプチド複合体は細胞表面に発現され、CD4+T細胞として表されるT細胞のセットの抗原特異的受容体のリガンドとして作用する。CD4+T細胞はそれらの表面上にB細胞のクラスII/ペプチド複合体に特異的な受容体を持つ。B細胞活性化は、そのT細胞受容体（TCR）によるT細胞の結合に依存するだけでなく、この相互作用もT細胞上の活性化リガンド（CD40リガンド）をB細胞上のその受容体（CD40）に結合させ、B細胞活性化のシグナル伝達を可能にする。さらに、ヘルパーT細胞は、B細胞上のサイトカイン受容体への結合によって、刺激したB細胞の成長および分化を制御するいくつかのサイトカインを分泌する（Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," *Fundamental Immunology*, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1999)）。

20

30

【0035】

抗体産生のための同種の援助の間、CD40リガンドは活性化CD4+ヘルパーT細胞上に一過的に発現され、それは抗原特異的B細胞上のCD40に結合し、それにより二次共刺激シグナルを伝達する。後者のシグナルは、B細胞の成長および分化、ならびに抗原と遭遇した胚中心のB細胞のアポトーシスを防ぐことによるメモリーB細胞の生成に必須である。B細胞とT細胞の両方におけるCD40リガンドの高発現は、ヒトSLE患者における病原性自己抗体産生に関係する。（Desai-Mehta, A. et al., "Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production," *J. Clin. Invest.*, 97(9): 2063-2073 (1996)）。

40

【0036】

Tリンパ球

造血組織の先駆細胞由来のTリンパ球は、胸腺で分化し、次いで末梢リンパ組織およびリンパ球の再循環プールに播種される。Tリンパ球またはT細胞は、広範な免疫機能を媒介する。これらは、B細胞が抗体産生細胞へと発生するのを援助する能力、単球/マクロファージの殺菌作用を増大する能力、特定の型の免疫応答の阻害、標的細胞の死滅、および炎症応答の動員を含む。これらの効果は、特異的細胞表面分子の発現およびサイトカイ

50

ンの分泌に依存する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

【0037】

T細胞は、それらの抗原認識のメカニズムがB細胞とは異なる。B細胞の受容体である免疫グロブリンは、可溶性分子または特定の表面上の個々のエピトープに結合する。B細胞受容体は天然分子の表面上に発現したエピトープを参照する。抗体およびB細胞受容体は、細胞外液中の微生物に結合、および保護するように進化した。対照的に、T細胞は他の細胞表面上の抗原を認識し、相互作用することによってそれらの機能を媒介し、これらの抗原提示細胞(APC)の挙動を変更する。T細胞を活性化できる末梢リンパ器官の抗原提示細胞の3つの主な型がある：樹状細胞、マクロファージ、およびB細胞。これらのうちで最も効力があるのは樹状細胞であり、その唯一の機能はT細胞に外来抗原を提示することである。未成熟な樹状細胞は、皮膚、腸、および呼吸器を含む体中の組織に局在する。未成熟な樹状細胞がこれらの部位で侵入した病原菌に遭遇する場合、病原体およびその産物をエンドサイトーシスし、局所リンパ節または腸関連リンパ器官へとリンパを介してそれらを運ぶ。病原体との遭遇は、抗原捕捉細胞からT細胞を活性化できる抗原提示細胞(APC)へと、樹状細胞の成熟を誘導する。APCは、エフェクター細胞になるようにT細胞を活性化する役割を持つ3つの型のタンパク質分子をそれらの表面上に提示する：(1)外来抗原をT細胞受容体に提示するMHCタンパク質；(2)T細胞表面上の相補的な受容体に結合する共刺激タンパク質；および(3)活性化されるのに十分長い期間、T細胞が抗原提示細胞(APC)に結合するようにする細胞間接着分子。("Chapter 24: The adaptive immune system," Molecular Biology of the Cell, Alberts, B. et al., Garland Science, NY, 2002)。

10

20

【0038】

T細胞は、それらが発現する細胞表面受容体に基づき2つの異なるクラスに細分される。大半のT細胞は、および鎖からなるT細胞受容体(TCR)を発現する。T細胞の小さい群は、および鎖で作成される受容体を発現する。/ T細胞の中には、2つの重要なサブ系列がある：共受容体分子CD4を発現するもの(CD4+T細胞)；およびCD8を発現するもの(CD8+T細胞)。これらの細胞は、それらが抗原を認識する方法ならびにそれらのエフェクターおよび制御機能が異なる。

30

CD4+T細胞は、免疫系の主要な制御細胞である。それらの制御機能は、T細胞が活性化される時に発現が誘導されるCD40リガンドなど、それらの細胞表面分子の発現、および活性化されるときにそれらが分泌する多様なサイトカインの両方に依存する。

T細胞は重要なエフェクター機能も媒介し、そのいくつかはそれらが分泌するサイトカインのパターンによって決定される。サイトカインは、標的細胞に直接毒性であり、強力な炎症メカニズムを動員し得る。

さらに、T細胞、特にCD8+T細胞は、CTLによって認識される抗原を発現する標的細胞を効率的に溶解可能な細胞障害性Tリンパ球(CTL)に発生できる。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

40

【0039】

T細胞受容体(TCR)は、クラスIIまたはクラスI MHCタンパク質の、特定の溝に結合する抗原のタンパク質分解に由来するペプチドからなる複合体を認識する。CD4+T細胞はペプチド/クラスII複合体のみを認識するが、CD8+T細胞はペプチド/クラスI複合体を認識する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

TCRのリガンド(すなわちペプチド/MHCタンパク質複合体)は、抗原提示細胞(APC)内で創製される。一般に、クラスII MHC分子は、エンドサイトーシスプロセスによってAPCにより取り込まれたタンパク質由来のペプチドに結合する。これらの

50

ペプチドをロードしたクラスII分子は、次いで細胞の表面上で発現され、そこでは発現された細胞表面複合体を認識することができるTCRによってCD4+T細胞に結合され得る。したがって、CD4+T細胞は細胞外の原因に由来する抗原と反応するように特定化される。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

【0040】

反対に、クラスI MHC分子は、ウイルスタンパク質など内部で合成されたタンパク質由来のペプチドを主にロードする。これらのペプチドは、プロテオソームによるタンパク質分解によって細胞質タンパク質から産生され、粗面小胞体に移動される。一般に9アミノ酸長のそのようなペプチドは、クラスI MHC分子に結合され、細胞表面に運ばれ、ここでそれらは適切な受容体を発現するCD8+T細胞によって認識され得る。これはT細胞系、特にCD8+T細胞に、その完全形態にあるこれらのタンパク質が細胞表面上に発現されないまたは分泌されない場合でさえも、生物の残りの細胞のもの(例えば、ウイルス抗原)または変異抗原(活性がん遺伝子産物など)と異なる、またはそれよりはるかに多くの量が産生されるタンパク質を発現する細胞を検出する能力を付与する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

T細胞は、ヘルパーT細胞；細胞性免疫の誘導に関与するT細胞；サブレッサーT細胞；および細胞障害性T細胞としてのそれらの機能に基づいても分類され得る。

【0041】

ヘルパーT細胞

ヘルパーT細胞は、B細胞を刺激してタンパク質および他のT細胞依存的抗原に応答する抗体を作成するT細胞である。T細胞依存的抗原は、個々のエピトープが1度または限られた回数だけ出現し、B細胞の膜免疫グロブリン(Ig)と架橋できないまたは効率的に架橋できない免疫原である。B細胞はそれらの膜Igによって抗原を結合し、複合体はエンドサイトーシスを受ける。エンドソームおよびリソソームコンパートメント内で、抗原はタンパク質分解酵素によってペプチドに断片化され、生成されたペプチドの1つまたは複数はクラスII MHC分子にロードされ、この小胞コンパートメントによって運搬される。生じたペプチド/クラスII MHC複合体は、次いでB細胞表面膜に輸送される。ペプチド/クラスII分子複合体に特異的な受容体を有するT細胞は、B細胞表面上のこの複合体を認識する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

【0042】

B細胞活性化は、そのTCRによるT細胞の結合およびT細胞CD40リガンド(CD40L)とB細胞上のCD40との相互作用の両方に依存する。T細胞は、恒常的にCD40Lを発現しない。むしろ、CD40L発現は、T細胞のTCRによって認識される同種の抗原とCD80またはCD86の両方を発現するAPCとの相互作用の結果として誘導される。CD80/CD86は通常活性化されたB細胞によって発現されるが、休止B細胞によっては発現されず、活性化されたB細胞およびT細胞を含むヘルパー相互作用は、効率的な抗体産生をもたらし得る。しかし、多くの場合、T細胞上のCD40Lの最初の誘導は、樹状細胞など、CD80/86を恒常的に発現するAPCの表面上の抗原のそれらの認識に依存する。そのような活性化されたヘルパーT細胞は、次いで効率的にB細胞と相互作用し、B細胞を援助する。B細胞上の膜Igの架橋は、効率的でないにしても、CD40L/CD40相互作用と共同して様々なB細胞活性化をもたらす。増殖、Ig分泌、および(発現されるIgクラスの)クラススイッチを含む、B細胞応答の続くイベントは、T細胞由来サイトカインの作用に依存するまたは増強される。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edit

10

20

30

40

50

ion, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

【 0 0 4 3 】

CD4 + T細胞は、サイトカインIL - 4、IL - 5、IL - 6、およびIL - 10を主に分泌する細胞 (TH2細胞) またはIL - 2、IFN - γ 、およびリンホトキシンを主に産生する細胞 (TH1細胞) に分化する傾向がある。TH2細胞は、抗体産生細胞へのB細胞の発生を援助するのに非常に有効であるが、TH1細胞は、単球およびマクロファージの殺菌作用の増強、ならびに結果として増加した細胞内の小胞コンパートメントにおける微生物溶解の効率を含む、細胞免疫応答の有効な誘導因子である。TH2細胞の表現型 (すなわちIL - 4、IL - 5、IL - 6、およびIL - 10) を有するCD4 + T細胞は効率的なヘルパー細胞であるが、TH1細胞もヘルパーの能力を有する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))

10

細胞性免疫の誘導に關与するT細胞

T細胞は、細胞内微生物を破壊する単球およびマクロファージの能力を増強するためにも作用し得る。特に、ヘルパーT細胞によって産生されるインターフェロン - ガンマ (IFN - γ) は、いくつかのメカニズムを増強し、それにより単核貪食細胞は、一酸化窒素の生成および腫瘍壊死因子 (TNF) 産生の誘導を含む細胞内細菌および寄生体を破壊する。TH1細胞は、IFN - γ を産生するため、殺菌作用の増強に有効である。反対に、TH2細胞によって産生される2つの主なサイトカイン、IL - 4およびIL - 10は、これらの作用を遮断する。(Paul, W. E., "Chapter 1: The immune system: an introduction," Fundamental Immunology, 4th Edition, Ed. Paul, W. E., Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1999))。

20

【 0 0 4 4 】

サプレッサーまたは制御性T (T r e g) 細胞

免疫応答の開始と下方制御の間の調節されたバランスは免疫恒常性の維持に重要である。アポトーシスとT細胞アネルギー (抗原遭遇後にT細胞が内因的に機能的に不活性化される耐性機構 (Schwartz, R. H., "T cell anergy," Annu. Rev. Immunol., 21: 305-334 (2003)) の両方とも、免疫応答の下方制御に寄与する重要なメカニズムである。第三のメカニズムは、サプレッサーまたは制御性CD4 + T (T r e g) 細胞による、活性化されたT細胞の能動抑制によって提供される。(Reviewed in Kronenberg, M. et al., "Regulation of immunity by self-reactive T cells," Nature 435: 598-604 (2005))。IL - 2受容体アルファ (IL - 2 R α) 鎖 (CD4 + CD25 +) を恒常的に発現するCD4 + T r e gは、アネルギー性および抑制性である自然発生のT細胞サブセットである。(Taams, L. S. et al., "Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population," Eur. J. Immunol., 31: 1122-1131 (2001))。CD4 + CD25 + T r e gの枯渇はマウスの全身性自己免疫疾患をもたらす。さらに、これらのT r e gの移植は、自己免疫疾患の発生を防ぐ。ヒトCD4 + CD25 + T r e gは、そのマウスの対応物と類似して、胸腺で生成され、細胞間接触依存的なメカニズムによって、レスポンダーT細胞の増殖を抑制する能力、IL - 2を産生できないこと、およびin vitroでのアネルギー表現型によって特徴付けられる。ヒトCD4 + CD25 + T細胞は、CD25発現のレベルによって、抑制性 (CD25高) および非抑制性 (CD25低) 細胞に分けられ得る。転写因子のフォークヘッドファミリーのメンバー、FOX P3は、マウスおよびヒトCD4 + CD25 + T r e gに発現されることが示されており、CD4 + CD25 + T r e g発生を調節するマスター遺伝子のようである。(Battaglia, M. et al., "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25 +Foxp3+ regulator T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients," J. Immunol., 177: 8338-8347 (200))。

30

40

【 0 0 4 5 】

細胞障害性Tリンパ球 (C T L)

50

標的細胞内で産生されたタンパク質由来のペプチドを認識するCD8+T細胞は細胞傷害特性を有し、標的細胞の溶解をもたらす。CTL誘導溶解のメカニズムは、標的細胞の膜に挿入され細胞の溶解を促進し得る分子であるパーフォリンのCTLによる産生を含む。パーフォリン媒介溶解は、グランザイムと呼ばれる活性化CTLによって産生された一連の酵素によって増強される。多くの活性化CTLは、それらの表面に大量のfasリガンドも発現する。CTLの表面上のfasリガンドの、標的細胞の表面上のfasとの相互作用は、標的細胞のアポトーシスを開始し、これらの細胞の死をもたらす。CTL媒介溶解は、ウイルス感染細胞の破壊のための主なメカニズムであるようである。

【0046】

プライミング

本明細書で使用する場合、用語「プライミングされていない細胞」(バージン(virgin)、ナイーブ(naive)、または未経験細胞とも呼ばれる)は、特定の特異性の抗原受容体(T細胞ではTCR、B細胞ではBCR)を生成したが、抗原に遭遇していないT細胞およびB細胞を指す。本明細書で使用する場合、用語「プライミング」は、それによりT細胞およびB細胞先駆細胞が、それらが特異的である抗原に遭遇するプロセスを指す。

【0047】

例えば、ヘルパーT細胞およびB細胞が相互作用し、特定の抗体を産生する前、抗原特異的T細胞先駆細胞はプライミングされなければならない。プライミングはいくつかのステップを含む: 抗原取り込み、プロセッシング、および抗原提示細胞によるクラスII MHC分子に結合する細胞表面発現、リンパ組織におけるヘルパーT細胞先駆細胞の再循環および抗原特異的トラップ、ならびにT細胞増殖および分化。Janeway, CA, Jr., "The priming of helper T cells, Semin. Immunol. 1(1): 13-20 (1989)。ヘルパーT細胞はCD4を発現するが、全てのCD4T細胞がヘルパー細胞ではない。同文献。ヘルパーT細胞のクローン増殖のために必要なシグナルは他のCD4T細胞に必要とされるものとは異なる。ヘルパーT細胞のプライミングに重要な抗原提示細胞は、マクロファージのようであり; およびヘルパーT細胞の成長に重要な第二のシグナルはマクロファージ産物インターロイキン1(IL-1)である。同文献。プライミングされたT細胞および/またはB細胞が第二の共刺激シグナルを受ける場合、それらは活性化されたT細胞またはB細胞になる。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「移植」は、個体の一部から別の部分への細胞、組織、または器官の除去および移動を指す。

一態様によると、記載した本発明は、ヒトFlt3およびヒトCD3の両方に結合する組換え二重特異性抗体を用意する。いくつかの実施形態によると、Flt3抗体はFLT3/FLK2受容体タンパク質に結合する。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質は哺乳動物タンパク質である。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質はヒトである。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質は天然である。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質は改変形態である。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質は変性された形態である。いくつかの実施形態によると、FLT3/FLK2受容体タンパク質は非改変形態である。いくつかの実施形態によると、Flt3抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片および合成抗体模倣物からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、Flt3抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態によると、Flt3モノクローナル抗体は、合成抗体および工学的に改変した抗体からなる群から選択される。いくつかの実施形態によると、合成抗体は組換え抗体である。いくつかの実施形態によると、組換え抗体は単鎖可変断片(scfv)抗体である。いくつかの実施形態によると、単鎖抗体はIgG1のCH2ドメインに接続されているFlt3抗体のFab断片のC末端を含む。いくつかの実施形態によると、IgG1のCH2ドメインは、ヒトCD3のサブユニットと反応する抗体の単鎖可変断片(scfv)に接続されている。いくつかの実施形態によると、単鎖可変断

10

20

30

40

50

片はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態によると、ヒトCD3のサブユニットはUCHT1である。いくつかの実施形態によると、工学的に改変した抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態によると、工学的に改変した抗体はヒト化抗体である。

【0049】

いくつかの実施形態によると、FLT3抗体のFlt3への結合は、FLT3リガンドのFLT3/FLK2受容体タンパク質への結合を遮断するのに有効である。いくつかの実施形態によると、FLT3抗体の細胞上のFlt3への結合は、細胞の結合した抗体を内部移行させるのに有効である。

いくつかの実施形態によると、Flt3抗体は、有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、約1 ng/mL(6.25 pM)と約2,000 ng/mL(12.5 nM)の間である。いくつかの実施形態によると、Flt3抗体は、有効濃度の最大半量(EC₅₀)が、約10 ng/mL(62.5 pM)と約200 ng/mL(1.25 nM)の間である。いくつかの実施形態によると、ヒトFlt3とヒトCD3の両方に結合する二重特異性抗体は、造血幹細胞(HPC)、初期の造血前駆細胞(HP)、およびがん細胞の1つまたは複数除去するのに有効である。いくつかの実施形態によると、HPC、HP、およびがん細胞の1つまたは複数FLT3を発現する。いくつかの実施形態によると、それを必要とする対象はBM/HPC移植を受けるまたは受けていると認定される患者である。がん細胞の例としては、限定はされないが、急性骨髄性白血病(AML)の芽細胞、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病の急性転化期(BC-CML)、および慢性リンパ性白血病(CLL)が挙げられる。いくつかの実施形態によると、二重特異性抗体は、骨髄(BM)/造血幹細胞(HSC)移植を受ける患者をコンディショニングするのに有効である。いくつかの実施形態によると、HSC/HP移植は血液系悪性腫瘍または過剰増殖性障害、例えば急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、末梢T細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害(例えば、鎌状赤血球貧血、ベータサラセミアメジャー、難治性Diamond-Blackfan貧血、骨髄異形成症候群、特発性重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、赤芽球癆、ファンconi貧血、無巨核球性または先天性血小板減少症)、多発性骨髄腫、または重症複合免疫不全症(SCID)を処置するためである。

【0050】

別の態様によると、ヒトFLT3とヒトCD3の両方に結合する組換え単鎖二重特異性抗体を調製する方法は、Flt3モノクローナル抗体のFab断片のC末端をIgG1のCH2ドメインに接続するステップ、およびヒトCD3のサブユニットと反応するモノクローナル抗体(UCHT1)の単鎖可変断片(ScFv)をIgG1のCH2ドメインに接続するステップを含む。

別の態様によると、記載した本発明は、それを必要とする患者の造血幹細胞/造血前駆細胞(HSC/HP)を除去する方法を提供する。いくつかの実施形態によると、本方法は、HSC/HPおよびT細胞に特異的に結合する二重特異性抗体を前記患者に投与するステップを含む。特に、二重特異性抗体は、HSC/HPによって発現されるヒトFLT3およびT細胞によって発現されるヒトCD3に結合する。抗体の同時結合は、T細胞をリダイレクトし、患者のHSC/HPを特異的に除去する。

【0051】

本方法は、患者への有効量の特定の抗体の投与も提供する。有効量は0.01 mg/kg ~ 10 mg/kg、より良くは0.05 mg/kg ~ 2 mg/kg、より良くは0.1 mg/kg ~ 0.5 mg/kg、より良くは0.1 mg/kg ~ 0.3 mg/kg、より良くは0.1 mg/kgである。

いくつかの実施形態によると、霊長類およびヒトCD3に結合する二重特異性抗体はヒト化抗体である。

いくつかの実施形態によると、二重特異性抗体またはその抗原結合部分はFLT3抗体

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態によると、二重特異性抗体またはその抗原結合部分はCD3抗体のアミノ酸配列を含む。

いくつかの実施形態によると、二重特異性抗体またはその抗原結合部分は、免疫グロブリンG (IgG)、IgM、IgE、IgA、またはIgDアイソタイプからなる群から選択されるアイソタイプを含む。

別の態様によると、本発明は、それを必要とする患者のHSC/HPを除去する方法も提供し、ここでHSC/HPはFLT3を発現する。本方法は、HSC/HPの除去を必要とする患者を選択するステップならびにHSC/HPによって発現されるヒトFLT3およびT細胞によって発現されるヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体を含む治療有効量の医薬組成物を患者に投与するステップを含み、ここでは二重特異性抗体がT細胞をリダイレクトし、患者のHSC/HPを死滅させる。

HSC/HPを除去する必要がある患者は、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、末梢T細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、非悪性の遺伝性および後天性骨髄障害(例えば、鎌状赤血球貧血、ベータサラセミアメジャー、難治性Diamond-Blackfan貧血、骨髄異形成症候群、特発性重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、赤芽球癆、ファンコニ貧血、無巨核球性または先天性血小板減少症)などの非血液系悪性腫瘍、多発性骨髄腫、重症複合免疫不全症(SCID)、ならびに骨髄(BM)/造血幹細胞(HSC)移植を使用して処置される他の障害を患っている患者である。

【0053】

医薬組成物は、抗体および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む。担体は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つまたは複数、およびそれらの組合せから選択される。薬学的に許容される担体は、結合タンパク質の有効期間または有効性を増強する湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤、または緩衝剤などの少量の補助剤をさらに含み得る。医薬組成物は、当技術分野で周知のように、投与後の活性成分の速い、持続した、または遅延した放出を提供するように製剤化され得る(Mishra, M. K. (2016). Handbook of encapsulation and controlled release. Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an Informa business、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

医薬組成物は、T細胞または抗腫瘍剤などの別の成分をさらに含み得る。抗体と併せて投与される抗腫瘍剤は、腫瘍または悪性腫瘍細胞を破壊または損傷する任意の薬剤を含む。

【0054】

抗腫瘍剤は、当業者に公知であり、アントラサイクリン(例えばダウノマイシンおよびドキソルビシン)、オーリスタチン、メトトレキサート(MTX)、ビンデシン、ネオカルチノスタチン、シスプラチン、クロラムブシル、シトシンアラビノシド、5-フルオロウリジン、メルファラン、リシン、およびカリチアマイシンを含む好適な抗悪性腫瘍剤からなる群から選択され、ドキソルビシン、プレオマイシン、ピンブラスチン、およびダカルバジン(ABVD)などとの多剤併用療法、BEACOPPまたは増大したBESOPP(プレオマイシン、エトポシド、ドキソルビシン、シクロフォスファミド、ピンクリスチン、プロカルバジン、およびプレドニゾン)、ならびにStanford V療法(ドキソルビシン、ピンブラスチン、メクロレタミン、ピンクリスチン、プレオマイシン、エトポシド、およびプレドニゾン)を含む。抗腫瘍剤はまた、免疫療法(例えば、抗CD20抗体リツキシマブ)、免疫毒素(例えば、プレントキシマブベドチン(SGN-35)は、抗チューブリン剤モノメチルオーリスタチンE(MMAE)に連結するCD-30に対する抗体を含む免疫毒素である)、養子免疫治療(細胞障害性Tリンパ球)、プロゲ

ラム死 1 (P D - 1) 遮断 (例えば、ニボルマブ、ペンプロリズマブ) であってよい。

【 0 0 5 5 】

別の態様によると、本発明は、T細胞をリダイレクトし、*in vivo*の動物モデルにおいてHSC/HPを死滅させる二重特異性抗体を試験する方法をさらに提供し、ここで前記動物モデルはキメラマウス - ヒト造血系の免疫無防備状態のヒト化マウスであり、前記ヒト化マウスはヒトHSC/HPの移植またはヒト出生後血管芽細胞の前記骨髄破壊された免疫無防備状態のマウスへの移植によって創製される。

本発明の二重特異性抗体は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるDurben et al. (Molecular Therapy, vol. 23, no. 4 April 2015)に記載の方法に従って合成されている。

10

使用したFLT3抗体配列は、その全体が参照により本明細書にも組み込まれるGrosse-Hovest et alの米国特許第9,023,996号に記載されている。

本発明は、その好ましい実施形態と併せて記載されるが、当業者は他の実施形態も本発明の趣旨から逸脱することなく行われ得ることに気づくと理解される。

値の範囲が提供される場合、文脈が他にはっきりと示さない限り、下限の単位の10分の1まで、その範囲の上下限の間、および任意の他の言及した介在値、または言及した範囲の介在値が本発明に包含されることが理解される。より小さな範囲に独立して含まれ得るこれらのより小さな範囲の上下限も本発明に包含され、言及した範囲の任意の特別に除外した限界を対象とする。言及した範囲が1つまたは両方の限界を含む場合、これらの含まれる限界の両方ともを除外する範囲も本発明に含まれる。

20

【 0 0 5 6 】

他に定義しない限り、本明細書で使用した全ての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価の任意の方法および材料も記載した本発明の実施または試験に使用され得るが、例示的な方法および材料を記載している。本明細書に述べた全ての刊行物は参照により本明細書に組み込まれて開示され、刊行物が引用されるものと関連して方法および/または材料を記載する。

本明細書に使用される場合および添付の請求項において、単数形「1つ(a)」、「および(and)」および「その(the)」は、文脈が他にはっきりと示さない限り複数の参照を含む。

30

【 実施例 】

【 0 0 5 7 】

以下の実施例は、記載した本発明の作成および使用方法の完全な開示および記載を当業者に提供するために記載され、本発明者らが彼らの発明と見なす範囲を限定することを意図せず、彼らは以下の実験が実施した実験全てまたは実施した実験のみを表すことを意図しない。使用した数値(例えば量、温度など)に関する正確性を確実にする努力がなされているが、いくつかの実験エラーおよび逸脱は説明されるべきである。他に示さない限り、部は質量部であり、分子量は質量平均分子量であり、温度はセ氏であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。

本発明をより詳しく示すために以下の例をあげる。

40

【 0 0 5 8 】

(例 1)

抗体合成説明

背景情報

F a b s c は組換え二重特異性抗体フォーマットである。F L T 3 (4 G 8 クローンを使用) および C D 3 (U C H T 1 抗体配列を使用し、h u x C D 3 v 1 と呼ばれる) を標的化する二重特異性抗体のための F a b s c フォーマットは以下である : F l t 3 m A b の F a b 断片の C 末端は、I g G 1 の C H 2 ドメイン、続いて U C H T 1 の S c F v に接続される。

4 G 8 クローンおよび U C H T 1 の配列は、それぞれその全体が参照により本明細書に

50

組み込まれる米国特許第 9 , 0 2 3 , 9 9 6 B 2 号および米国特許第 6 , 0 5 4 , 2 9 7 号から得た。

実験の範囲

背景に記載したフォーマットに基づく 4 G 8 および U C H T 1 可変重鎖および軽鎖配列の遺伝子合成。

I g G 発現ベクターの分子構築。

H E K 2 9 3 細胞における 0 . 1 リットルプレミアム一過性産生。

カスタム精製 (K a p p a S e l e c t およびプロテインLカラムならびに p H 2 . 3 での溶出)。

S E - H P L C によるタンパク質凝集分析。

輸送可能な標的

0 . 1 リットル産生から精製した全てのタンパク質。

分析証明書、C E - S D S 分析、S E - H P L C 分析報告書を含む試験報告書。

発現および精製後に得られた収量に依存して、産生した抗体が以下の解析ステップに使用されるかどうか顧客が決定する：

S E - H P L C (0 . 1 m g) による試験純度、モノマー含量、および凝集。

様々な濃度の抗原を使用する結合および解離ならびに F o r e B i o O c t e t Q K e (0 . 2 m g) による k D の算出。

【 0 0 5 9 】

結果

F a b s c 抗体は高発現哺乳動物ベクターシステムにクローニングされ、少量 (0 . 1 リットル) プレミアム一過性産生を H E K 2 9 3 細胞で完了した。タンパク質は、プロテインL精製によって精製され、20 . 1 7 m g のタンパク質が得られた。収量が報告され、顧客は S E - H P L C が行われるべきであることを確認した。抗体は S E - H P L C によって 9 2 % 非凝集モノマーであることが決定された。

ベクター構築および一過性産生

発現ベクターの分子構築

D N A S t u d i o 遺伝子を合成し、プログラムされた配列を高発現哺乳動物ベクターの 1 つへクローニングした。完全構築物はトランスフェクションに進む前に配列を確認した。

【 表 1 】

表A

構築物名	Fabsc HC	Fabsc LC
内部コード	H3113	L3113
抗体詳細	ヒトIgG1 Fab	ヒトカッパ
注	配列はコドン最適化した	

【 0 0 6 0 】

小規模一過性トランスフェクション

H E K 2 9 3 細胞をトランスフェクションの 1 日前に振盪フラスコに播種し、無血清合成培地を使用して成長させた。D N A 発現構築物は、一過性トランスフェクションの標準的な操作手順を使用して 0 . 1 リットルの浮遊 H E K 2 9 3 細胞に一過的にトランスフェクトした。20 時間後、細胞を採取し、生存能力および生存細胞数を得て、力価を測定した (O c t e t Q K e , F o r t e B i o) 。 5 日目に培養物を回収し、さらなる読み取りを行った。

プロテインLアフィニティー精製

Fabsc用馴化培地を回収し、遠心分離および濾過により一過性トランスフェクション産生工程から浄化した。上澄み液をプロテインLカラムに通し、低pH緩衝液によって溶出した。分割する前に、0.2μmの膜フィルターを使用する濾過を行った。精製および濾過後、タンパク質濃度をOD280および吸光係数から算出した。収量および分割量の要約は表1を参照。CE-SDS分析を実施し(LabChip GXII、Perkin Elmer)、電気泳動図をプロットし、図1Aおよび図1Bに示す。

【0061】

SE-HPLC分析

5μLの精製抗体を、0.2mL/分の流速で25分間、MAbPac SEC-1、5μm、4×300mmカラムに注入した。タンパク質は、92%その非凝集形態で、期待時間溶出した。SE-HPLCのクロマトグラムおよび仕様を図1Cに概説する。

凝集レベルの要約については表1を参照。

【表2】

タンパク質名	ロット番号	HC番号	LC番号	濃度 (mg/mL)	容積 (mL)	バイアル番号	To総収量 (mg)	SE-HPLC分析(モノマーの%)
Fabsc	4622-848799				0.5	7	19.07	
	4622-848799	H3113	L3113	5.45	0.2	1	1.09	>92

表1. 最終収量および分割量

【0062】

企画概要

Fabsc抗体をLakePharmaの高発現哺乳動物ベクターシステムにクローニングし、小規模(0.1リットル)プレミアム一過性産生をHEK293細胞で完了した。タンパク質は、プロテインL精製によって精製し、20.17mgのタンパク質を得て、19.07mgが送達された。抗体は、SE-HPLCによって92%非凝集であることが決定された。収量および分割量の要約は表1を参照。

【0063】

タンパク質精製結果

プロセス概要および仕様

プロテインLアフィニティークロマトグラフィー

0.2μm滅菌濾過

【表 3】

タンパク質名	Fabsc
ロット番号	4622-848799
吸光係数 (濃度の算出に使用)	1.67 mg/ml ⁻¹ cm ⁻¹
タンパク質濃度	5.45 mg/ml
容積	0.50 ml
総タンパク質	2.72 mg
エンドトキシン	測定せず
物理状態	液体
緩衝液	230 mM HEPES, 115 mM NaCl, 58 mM na OAc, pH 7.0

10

表2

【表 4】

試験	SE-HPLC
SR番号	3916
試料ID	Fabsc (PP4622)
日付	2015-12-09
科学者	SW

20

表3

【 0 0 6 4 】

方法

【表 5】

ピーク番号	時間(分)	ピークサイズ (kDa)	ピーク 領域%	ピークID
1	11.2	~230	5.8	凝集体
2	12.7	~100	91.8	モノマー
3	13.9	~40	2.4	断片
4				
5				
6				

30

表4

40

【表 6】

カラム	MabPac SEC-1, 5 μ m, 4x 300 mm
移動相	50mMリン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, pH 6.2
均一濃度	0~25分
流速(mL/分)	0.2
注射容積(μ L)	5

表5

10

【 0 0 6 5 】

(例 2)

骨髄 / 造血幹細胞 (BM / HSC) 移植のための患者の前処置またはコンディショニング

骨髄 / 造血幹細胞 (BM / HSC) 移植のための患者の前処置またはコンディショニングは手順の重要な要素である。それは2つの主な目的を果たす：(1) 患者の十分な免疫抑制を提供し、移植したHSCのための骨髄の十分なニッチ空間を明らかにする。これは移植した細胞をレシピエントに生着させる；(2) 悪性腫瘍の源の根絶を助けることが多い。

患者のコンディショニングは、放射線ありまたはなしで化学療法剤のカクテルの最大投与可能量を投与することによって従来行われてきた。カクテルの成分は、毒性が重複しないように選択されることが多い。現在使用されている全ての前処置レジメンは毒性であり、生命を脅かし得る重度の副作用がある。これらの副作用は、粘膜炎、吐き気、および嘔吐、脱毛、下痢、発疹、末梢神経障害、不妊、肺毒性、および肝毒性である。これらの副作用の多くは、年配および病気の患者で特に危険であり、患者が移植を受けるかどうか決定する決定的な要素となることが多い。

20

【 0 0 6 6 】

BM / HSC 移植を受ける患者のコンディショニングのための化学療法剤の使用を除去するため、本発明者らはリダイレクトT細胞殺傷を使用する造血幹細胞 / 造血前駆細胞 (HSC / HP) の選択的除去の方法を開発した。この方法は、HSC / HPの表面上の標的 (FLT3) およびT細胞の表面上の標的 (CD3) にも結合し、HSC / HPに対してT細胞を動員する二重特異性抗体の使用に基づく。

30

開発した本方法が、HSC / HPを除去するために有用である原理の証明として、本発明者らは、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の始原末梢血単球における白血病芽の殺傷のために設計された二重特異性 (FLT3 x CD3) 抗体を試験した (Durben, Schmiedel et al. 2015)。

【 0 0 6 7 】

免疫無防備状態のNOG (NOD . Cg - Prkdc scid Il2rg tm1 Sug / JicTac) マウスの雌 (4 ~ 6 週齢) を、臍帯血 (CB) 由来のヒトCD34 + HSC / HPの移植に使用した。CBの単核球画分は、Ficol1 - Paque (GE Healthcare Life Sciences) を使用して、密度勾配遠心分離によって分離した。簡単にいうと、抗凝集体で処置したCBは、1 : 1の比でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と混合し、50mlの円錐遠心分離チューブ内でFicol1 - Paque (10ml) の層上に置いた (混合物の35ml)。次いで、チューブを、400 x gの速さでスピントした。単球リンパ球層を注意深く取り除き、その層から得た細胞はPBSで2回洗浄した。

40

CD34 + HSC / HPは、血小板減少によるネガティブセレクションによって単離した (Stemcell Technologies)。望まない細胞は、CD2、CD3、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD61、CD66b、グリコフォリンA、およびデキストラン被覆マグネット粒子を認識す

50

る四量体抗体複合体による除去の標的となった。標識細胞は、カラムを使用せずに Easy Sep (登録商標) マグネットを使用して分離された。

【0068】

CD34 + HSC / HP は、骨髓機能を廃絶した NOG マウスへの移植のため、200 μl 当たり 10,000 ~ 50,000 個の細胞で PBS に再懸濁した。

マウスは移植 24 時間前に腹腔内注射によってブスルファン (10 mg / kg) を使用して骨髓機能を廃絶した。CD34 + HSC / HP は、200 μl の細胞懸濁液 (n = 52) の尾静脈注射によって移植した。移植の 18 週後、移植したマウスの末梢血を、ヒト CD45 + 細胞の存在に関して試験した。さらなる実験のため、40% キメラ化のレベル (全 CD45 + 細胞のうちヒト CD45 + 細胞 40% の%) のマウスを選択した (n = 27; 図 1 A、B)。キメラ化のレベルは、末梢血において試験し、以下のように算出した。

10

【数 1】

$$\frac{\%hCD45^+}{\%hCD45^+ + \%mCD45^+} * 100\%$$

【0069】

選択したマウスの末梢血は、ヒト B 細胞 (hCD19+)、ヒト T 細胞 (hCD3+)、および骨髓球系列に属するヒト細胞 (hCD33+) の存在についても試験した。大半のマウスは、3つの系列全ての強い発生を示した (図 1 A、B)。何匹かのマウス (n = 3) は CD3+ 細胞の発生を欠損していた (図 1 B 星印、D)。これらの T 細胞欠損マウスは実験内で内部対照群として使用した。

20

【0070】

インサートのタンパク質配列

F a b s c H C [H 3 1 1 3] (配列番号 1) :

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYN QKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDFWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKHTHTSPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVGVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKQLPSPIEKTSKAKGGGGAGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY TMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVW GQGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLE SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR*

30

F a b s c L C [H 3 1 1 3] (配列番号 2) :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

シグナルペプチド

可変重

可変軽

インサートの DNA 配列

F a b s c H C [H 3 1 1 3] (配列番号 3) :

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTCTCTTCTTCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG TGCCGAGCTCGTAAACCTGGCGCCTCCCTGAAGCTGTCTGCAAGTCCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGC ACTGGGTGCGACAGAGGCCCTGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAGATCGACCCCTCCGACTCCTACAAGGACTACAAC CAGAAGTTCAAGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGATCCTCCAACACCCGCTACATGCACCTGTCTCCCTGACCTC CGACGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCATCACAACACCCCTTCGATTTCTGGGGCCAGGGCACCACACTGA CAGTGTCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTTCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCC GCTCTGGGTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGT GCACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGCGGCCCTGTACTCCCTGTCCAGCGTGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTCTGC

40

50

GACAAGACCCACACCAGCCCTCCAAGCCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAA
 GGATACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGTGTTGAGTGTCTCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGT
 TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCTAGAGAGGAACAGTACCAGTCCACCTACCGG
 GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGCAGCT
 GCCAGCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCGGAGGCGGAGCTGGTGGTGGCGGAGAAGTGCAGCTGGTGG
 AATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTACTCTTTACCGGCTAT
 ACCATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCCTGATCAACCCCTACAAGGGCGTGACCAC
 CTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCGTGGACAAGTCCAAGAATACCGCTTACCTGCAGATGAACTCCC
 TGCGGGCCGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTGCTAGATCCGGCTACTACGGCGACAGCGATTGGTACTTTCGACGTGTGG
 GGACAGGGAACCCCTGTGACTGTGTATCAGGCGGCGGTGGTCTGGCGGAGGGGGATCTGGGGGCGGTGGATCCGATAT
 CCAGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGCGGCCTCTCAGGACA
 TCCGGAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCTCCCGGCTGGAA
 AGCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGAACCGACTATACCCTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCCCGAGGA
 CTTCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCAACACCCCTGCCCTGGACCTTTGGCCAGGGAACAAAGGTGGAATCAAGCGGT
 GA

10

F a b s c L C [L 3 1 1 3] (配列番号 4) :

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACATCGTGCTGACCCAGTC
 TCCCGCCACCCTGTCTGTGACCCCTGGCGACTCTGTGTCCCTGTCTGCAGAGCCTCCCAGTCCATCTCCAACAACCTGC
 ACTGGTATCAGCAGAAGTCCCACGAGAGCCCTCGGCTGCTGATTAAGTACGCCAGCCAGTCTATCTCCGGCATCCCTCC
 AGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGTCCATCAACTCCGTGGAACCGAGGACTTCCGGCGTACTT
 CTGCCAGCAGTCCAACACCTGGCCCTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCA
 GCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
 CCCCAGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGA
 CTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCT
 GCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

20

【 0 0 7 1 】

(例 3)

F l t 3 / F L K 2 ヒト受容体タンパク質に対するモノクローナル抗体の精製および特
 徴付け

マウス骨髄腫細胞株 S P 2 / 0 由来の細胞を、ヒト F T 3 / F L K 2 受容体タンパク質
 の完全コード配列およびピューロマイシン耐性の選択マーカーを発現するレンチウイルス
 によって形質導入した。形質導入細胞は、*in vitro* でピューロマイシンの存在下
 で選択した。ヒト F L T 3 / F L K 2 タンパク質細胞 (S P 2 / 0 - H u - F L T 3) の
 発現を選択および確認した細胞を抗原として使用した。

30

【 0 0 7 2 】

8 週齢の B a l b / c マウスは、F L T 3 / F L K 2 タンパク質に特異的な抗体を精製
 するため、5 日ごとに腹腔内注射によって 1 0 7 S P 2 / 0 - H u - F L T 3 細胞で 3
 回免疫した。抗体の発生は、フローサイトメトリーを使用して F L T 3 / F L K 2 抗原の
 結合について、免疫したマウスの血清をスクリーニングすることによって試験した。

40

【 0 0 7 3 】

最初の免疫からおよそ 3 週間後、免疫したマウスの脾臓を回収し、脾細胞の単離に使用
 した。本発明者らは、単離した脾細胞を S P 2 / 0 細胞と融合し、ハイブリット表現型 (
 ハイブリドーマ) を選択した。ハイブリドーマは *in vitro* で培養し、ハイブリド
 マの培養液からの上澄み液を、フローサイトメトリーによって抗 F L T 3 / F L K 2 抗
 体の存在についてスクリーニングした (図 3) 。 9 つのハイブリドーマクローンが、抗 H
 L T 3 / F L K 2 抗体の産生を実証した。これらのハイブリドーマクローンはモノクロー
 ナル抗体の単離のために増殖させた。単離したモノクローナル抗 F L T 3 / F L K 2 抗体
 を精製し、それらの選択性について試験した (図 4) 。

【 0 0 7 4 】

(例 4)

50

ヒト F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質に対するモノクローナル抗体の特異性の特徴付け

モノクローナル抗体の特異性は、F L T 3 / F L K 2 抗原に対するそれらの親和性を評価することによって決定した。抗ヒト F L T 3 / F L K 2 抗体の親和性を明らかにするため、フローサイトメトリーを使用して有効濃度 (E C) 曲線を構築した。9つのモノクローナル抗体クローンを使用して、ヒト F L T 3 / F L K 2 を内因的に発現するヒト R E H 細胞を染色した。クローンの濃度は 1 n g / m l (6 . 2 5 p M) ~ 1 0 , 0 0 0 n g / m l (6 2 . 5 n M) の範囲であった。約 7 0 n g / m l (4 3 7 . 5 p M) ~ 1 5 6 6 n g / m l (9 . 7 9 n M) の範囲の E C ₅₀ を有する5つのクローン (図 5) を、シーケンスのために選択した。クローンのシーケンスにより、クローン 1 ~ 2 3 D A および 1 ~ 1 8 は同じアミノ酸配列を有することが明らかになった。クローンの配列を以下に示す。

【 0 0 7 5 】

M H C 1 6 9 2 - 1 ~ 2 3 D A 配列 :

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 2 L C . 2 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 5)

> MHC1692LC.2\ ;M13F

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASLHSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISRLES
EDVADYYCLQYASYPFTFGSGTKLEIR

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 2 L C . 2 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 6)

> MHC1692LC.2\ ;M13F

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTTCGGGCAAGTCA
GGAAATTAGTGGTTACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGAACATATTAACGCCTGATCTACGCCGCATCCACTT
TACATTCTGGTGTCCCAAAAAGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTTCAGATTACTCTCTCACCATCAGCAGGCTTGAGTCT
GAAGATGTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTATCCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAG
A

【 0 0 7 6 】

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 2 H C . 1 \ ; M 1 3 F) - 重鎖 (配列番号 7)

> MHC1692HC.1\ ;M13F

QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSTMGVGWI RQPSGKGLEWLLHILWNDSKYYPALKSRLTISKDTYNKQV
FLKIANVDTADTATYYCARIVYYSTYVGYFDVWGAGTTVTVSS

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 2 H C . 1 \ ; M 1 3 F) - 重鎖 (配列番号 8)

> MHC1692HC.1\ ;M13F

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTT
TTCTCTGAGCACTTCTACTATGGGTGTAGGCTGGATTCGTTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGTTACACATTT
TGTGGAATGATAGTAAGTATTATAACCCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTACAACAAGCAGGTA
TTCCTCAAGATCGCCAATGTGGACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAATAGTTTACTACTCTACCTACGT
CGGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

M H C 1 6 9 3 - 3 ~ 1 6 H A 配列 :

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 3 L C . 1 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 9)

> MHC1693LC.1\ ;M13F

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQSPKLLIYAVSNQGSVGPARGSGSGSDFSLNIH
PMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGKLEIK

【 0 0 7 7 】

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 3 L C . 1 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 1 0)

10

20

30

40

50

> MHC1693LC.1 \ ;M13F

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGA
AAGTGTGATAATTATGGCATTAGTTTTATGAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGTCACCCAAACTCCTCATCTATG
CTGTATCCAACCAAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGCCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAA
GCTGGAAATCAAA

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 3 H C . 3 \ ; M 1 3 F) - 重鎖 (配列番号 1 1)

> MHC1693HC.3 \ ;M13F

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKGSGFN I KDYY I HWVKQRPEQGLEW I GR I DPEND I TMYDPKFGKAS I TADTSSNTAY
LQLSSLTSEDTA VYYCARNGNFFAYWGQGLTVTSA

10

【 0 0 7 8 】

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 3 H C . 3 \ ; M 1 3 F)
- 重鎖 (配列番号 1 2)

> MHC1693HC.3 \ ;M13F

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCCAGGGCCCTTAGTCAAGTTGTCTGCAAAGTTCTGGCTT
CAACATTAAGACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTG
AGAATGATATTACTATGTATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCAGTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTAC
CTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGAAATGGTAATTTCTTTGCTTACTGGGG
CCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

20

M H C 1 6 9 5 - 3 ~ 3 O A 配列 :

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 5 L C . 8 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 1 3)

> MHC1695LC.8 \ ;M13F

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCSRASQE I SGYLSWLQKQPDGT I KRL I YAASLTNSGVPRRFSGRSRSGSDYSLT I SSLES
EDFADYYCLQYASYPFTFGSGTKLE I K

【 0 0 7 9 】

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 5 L C . 8 \ ; M 1 3 F)
- 軽鎖 (配列番号 1 4)

> MHC1695LC.8 \ ;M13F

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGTCA
GGAAATTAGTGGTTACTTAAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGGAACTATTAACGCCTGATCTACGCCGCATCCACTT
TAAATCTGGTGTCCAAGAAGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTGAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCT
GAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTATCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAA
A

30

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 5 H C . 3 \ ; M 1 3 F) - 重鎖 (配列番号 1 5)

> MHC1695HC.3 \ ;M13F

QVTLKESGPG I LQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSHMGVGV I RQPSGKGLEWLLH I LWNDSVYYNPALKSRLT I SKDTYNKQV
FLK I ANVDTADTATYYCAR I VYYG I SYVGYFDVWAGTTVTVSS

40

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 5 H C . 3 \ ; M 1 3 F)
- 重鎖 (配列番号 1 6)

> MHC1695HC.3 \ ;M13F

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTT
TTCAGTGAAGACTTCTCACATGGGTGTAGGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGTTACACATTT
TGTGGAATGATAGTGTACTATAACCCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTACAACAAGCAGGTA
TTCCTCAAGATCGCCAAATGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAATAGTTTACTACGGTATTAGTTA
CGTCGGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAACCGTCTCTCTCA

【 0 0 8 0 】

M H C 1 6 9 6 - 2 ~ 8 I A 配列 :

50

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 6 L C . 3 \ ; M 1 3 F) - 軽鎖 (配列番号 1 7)

> MHC1696LC.3\ ;M13F

DTVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQS I SNNLHWYQQKSHESPRLL I KYGFQS I SG I PSRFSGSGSGTDFTLR I NSVET
EDFGMYFCQQTNSWPLTFGAGTKLELK

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 6 L C . 3 \ ; M 1 3 F)
- 軽鎖 (配列番号 1 8)

> MHC1696LC.3\ ;M13F

GATACTGTGCTAACTCAATCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCTGCAGGGCCAGCCA
AAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATGGTTTCCAGT
CCATCTCTGGGATCCCTCCAGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGAATCAACAGTGTGGAGACT
GAAGATTTTGAATGTATTTCTGTCAACAGACTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA
A

10

【 0 0 8 1 】

F A S T A フォーマットのアミノ酸配列 (M H C 1 6 9 6 H C . 2 \ ; M 1 3 F) - 重鎖 (配列番号 1 9)

> MHC1696HC.2\ ;M13F

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

F A S T A フォーマットのヌクレオチド配列 (M H C 1 6 9 6 H C . 2 \ ; M 1 3 F)
- 重鎖 (配列番号 2 0)

> MHC1696HC.2\ ;M13F

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTA
CTCATTTCATTGACTACAACATGTACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTT
ACAATGGTGGTACTAGCAACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTTC
ATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGTACTACGGGTGACTACTGGGGCCA
AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

20

【 0 0 8 2 】

(例 5)

ヒト F L T 3 / F L K 2 受容体タンパク質に対するモノクローナル抗体の内部移行の特徴付け

30

F L T 3 / F L K 2 (例 3) に対するモノクローナル抗体の内部移行は、内部移行アッセイによって定量した。

簡単に言うと、染色緩衝液 (2 % 仔牛血清 - B C S を含む 1 × リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)) 中の抗体 2 8 1 A 、 3 3 0 A 、 3 1 6 H A 、 および 1 2 3 D A について、抗体の 2 X (4 μ g / m l) 作用ストックを氷上で調製した。抗ヒト C D 1 3 5 (F L T 3 / F L K 2) 抗体 (B i o L e g e n d 3 1 3 3 0 2 、 クローン B V 1 0 A 4 H 2) の 4 μ g / m l ストックおよび 4 μ g / m l アイソタイプ対照 (B i o L e g e n d 4 0 0 1 0 2 、 クローン M O P C - 2 1) を、それぞれ陽性および陰性 C D 1 3 5 染色対照として調製した。C D 1 3 5 を発現するヒト細胞株、 R e h 細胞を洗浄し、 2 × 1 0 ⁶ 個の細胞 / m l の濃度で染色緩衝液中に再懸濁した。一次抗体は、最終濃度 2 μ g / m l になるように等量の細胞と 1 : 1 で添加した。細胞は、洗浄を容易にするため 1 5 m L の遠心チューブで染色した。次に、細胞を 3 0 分間氷上でインキュベートし、次いで 5 m l の P B S で 3 回洗浄し、未結合の一次抗体を除去した。染色した細胞は、完全培地中 (グルタミンおよび 2 % B C S を含有する R P M I 1 6 4 0) に再懸濁し、平行 9 6 ウェルプレートにウェルあたり 1 0 0 μ l で、各時点につき別々のプレートでトリプリケートのウェルに分けた。プレートの 1 つ目のセットを 3 7 % C O ₂ のインキュベーターに移し、プレートの 2 つ目のセットを 4 % C O ₂ に保った。インキュベーション時間は 1 0 分、 3 0 分、 1 時間、 2 時間、 3 時間、 および 4 時間であった。インキュベーション後、プレートを 1 × P B S で洗浄した。次いで細胞を暗所中氷上で 3 0 分間、 1 : 8 0 0 希釈の抗マウス

40

50

IgG Alexa 488 二次抗体 (Jackson Immuno 115545164) によって染色した。未染色細胞および二次抗体のみで染色した細胞を含有するトリプレートの対照ウェルも調製した。二次抗体とのインキュベーション後、細胞は 2% BCS を含有する 1 x PBS で最後に洗浄し、FACS の直前に 7AAD で染色した。

【0083】

染色した細胞は、Beckman Coulter Cytoflex のフローサイトメトリーにより、試料流速 60 μl / 分で分析した。各ウェルにつき 10,000 イベントを捕らえ、FCS ファイルは FloJo ソフトウェア、バージョン 10 を使用して評価した。平均蛍光強度 (MFI) は Alexa 488 で生存細胞集団について算出し、各抗体の MFI の変化を 4 および 37 で時間に対してグラフ化した。

10

【0084】

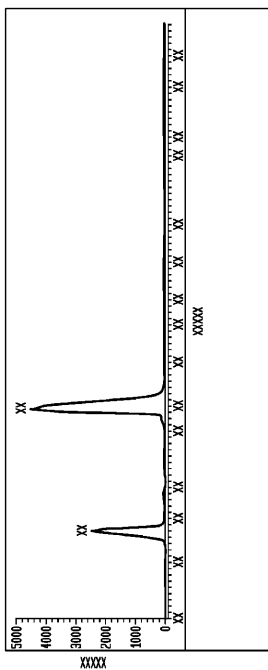
図 6 に示すように、全てのクローンは内部移行を示し、クローン 330A および 123DA は最も速い内部移行を示した (図 6)。理論に制限されることなく、抗 FLT3 / FLK2 抗体 (クローン 330A、123DA、316HA および 281A) の内部移行特性は、標的細胞内に薬物 / 毒素を送達するビヒクル (例えば、抗体 - 薬物コンジュゲート - ADC) としてそれらを有効にすると仮定される。

【0085】

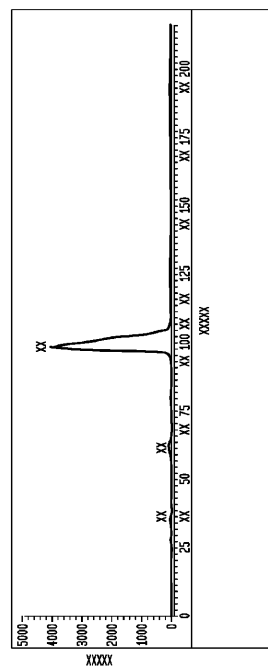
本発明はその特定の実施形態を参照して記載されているが、様々な変更を行うことが可能であり、等価物が本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく置き換えられ得ることは当業者に理解される。さらに、多くの改変を行い、特定の状況、材料、物質の組成、プロセス、1つまたは複数のプロセスステップを本発明の目的の趣旨および範囲に採用することができる。全てのそのような改変は本明細書に添付した請求項の範囲内である。

20

【図 1 A】

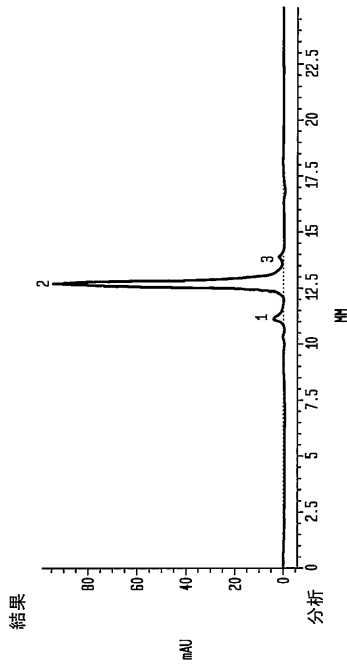


【図 1 B】



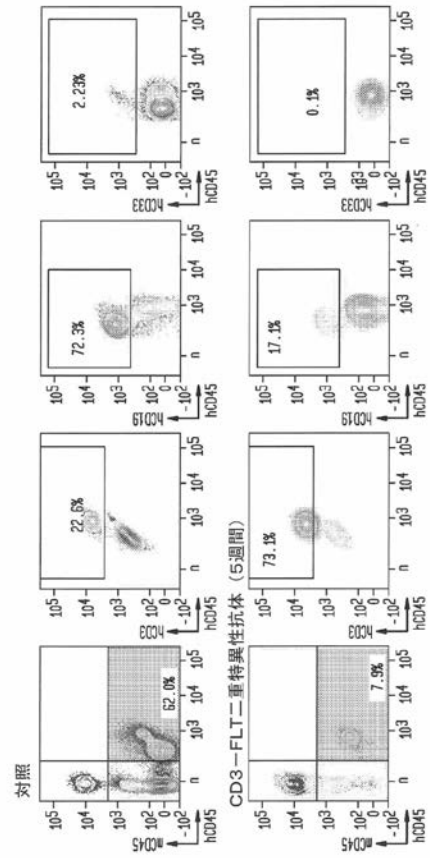
【 図 1 C 】

FIG. 1C



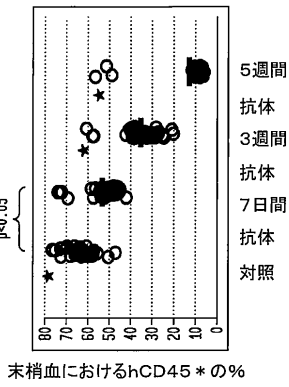
【 図 2 A 】

FIG. 2A



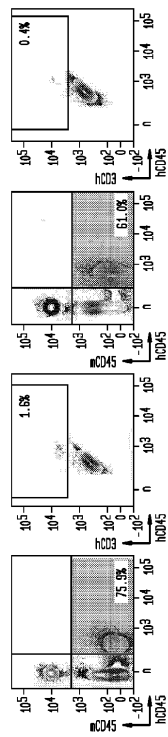
【 図 2 B 】

FIG. 2B



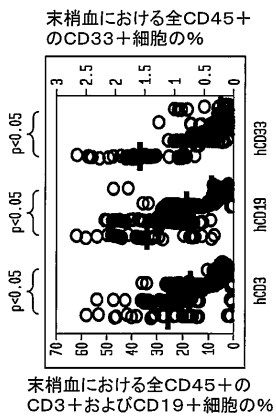
【 図 2 D 】

FIG. 2D

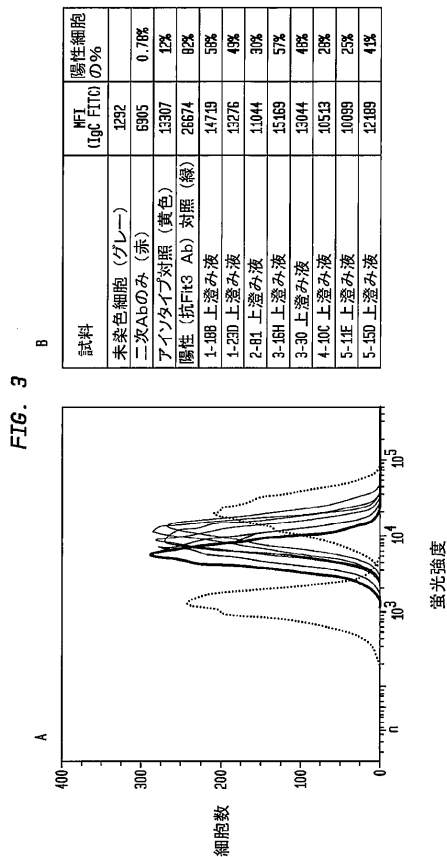


【 図 2 C 】

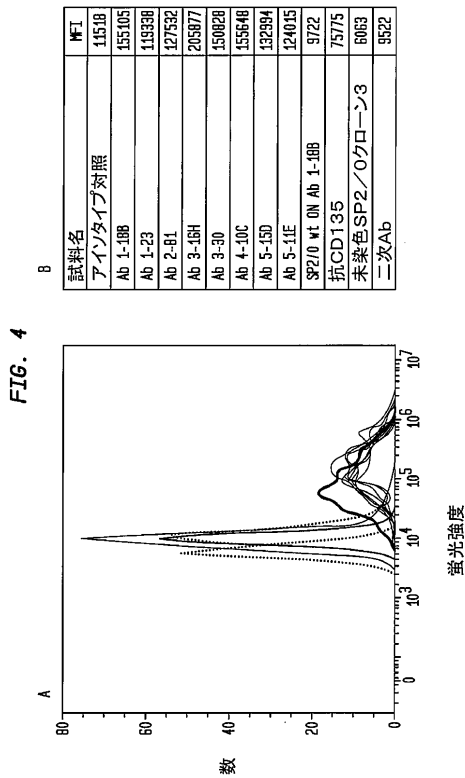
FIG. 2C



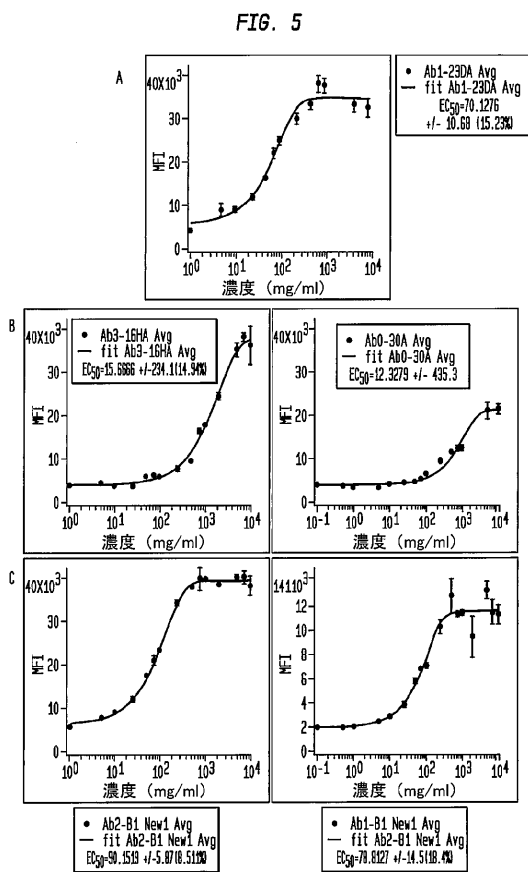
【 図 3 】



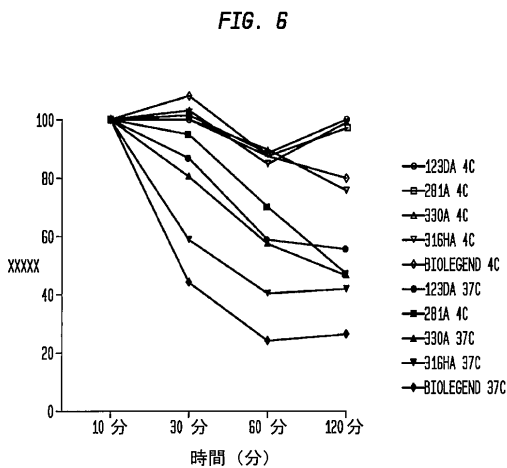
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2019513836000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US17/25951
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/395; C07K 16/28, 16/46; C12N 5/078 (2017.01) CPC - A61K 39/001, 39/395; C07K 16/28, 16/2809, 16/468; C12N 5/0634		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2015/0119555 A1 (SYNIMMUNE GMBH) 30 April 2015; paragraphs [0011], [0020], [0058], [0061], [0084], [0096], [0170]; Figures 6A1 and 6B.	10, 11 1, 3, 4-9
Y	US 2012/0328612 A1 (GROSSE-HOVEST, et al.) 27 December 2012; paragraphs [0004], [0022], [0024], [0025], [0027], [0058], [0097], [0123], [0128], [0141], [0200], [0206], [0207], [0215], [0220], [0246], [0268], [0269]; Figure 13A	1, 3, 4-9
A	WO 2016/023909 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCHUNG-SZENTRUM, et al.) 18 February 2016; paragraph [0098]	2, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2017 (13.09.2017)		Date of mailing of the international search report 04 OCT 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/25951

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

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

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

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

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

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

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

-Please see supplemental page-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-12

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/25951

-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-12 are directed toward a bi-specific antibody that binds to human FLT3 and CD3; a method for preparing the antibody; and a method for preparing or conditioning a patient therewith.

Groups II+, Claims 13-28 and SEQ ID NOs: 5 and 7 are directed toward a monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof that binds to human FLT3/FLK2.

The monoclonal antibody can be searched to the extent that it comprises a light chain encompassing SEQ ID NO: 5 (first exemplary light chain); and a heavy chain encompassing SEQ ID NO: 7 (first exemplary heavy chain). Applicant is invited to elect additional pair(s) of light and heavy chain sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional pair(s) of light and heavy chain sequence(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 13-16 encompass this first named invention of Groups (II)+ and thus these claims can be searched with payment of a fee for the search of Groups (II)+, to the extent that they encompass SEQ ID NO: 5 (light chain); and SEQ ID NO: 7 (heavy chain). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected pair(s) of light and heavy chain sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention of Groups (II)+, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups (II)+ to be searched/examined. An exemplary election would be a light chain encompassing SEQ ID NO: 9 (first exemplary elected light chain) and a heavy chain encompassing SEQ ID NO: 11 (first exemplary elected heavy chain).

The inventions listed as Groups I and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a bi-specific antibody that binds to CD3, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include SEQ ID NO: 5, not present in Group I.

No technical features are shared between the sequences of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I and II+ share the technical features including: an antibody or antigen binding fragment thereof that binds to human FLT3 and comprises a light chain sequence and a heavy chain sequence. Groups II+ share the additional technical features including: a monoclonal antibody.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2012/0328612 A1 to Grosse-Hovest et al. (hereinafter 'Grosse-Hovest').

Grosse-Hovest discloses an antibody or antigen binding fragment thereof that binds to human FLT3 (an antibody or antigen binding fragment thereof that binds to human FLT3; paragraph [0005]) and comprises a light chain sequence (and comprises a light chain sequence; paragraphs [0005], [0011]) and a heavy chain sequence (and a heavy chain sequence; paragraphs [0005], [0011]); a monoclonal antibody (a monoclonal antibody; paragraph [0035]).

Since none of the special technical features of the Groups I and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Grosse-Hovest reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

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

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100168631

弁理士 佐々木 康匡

(72)発明者 サンドラー グラディスラフ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 4 ニューヨーク ウェスト エイティサード ストリート 3 2 0 アpartment 6 エイ

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01

4C085 AA13 AA14 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 DD62 EE01
GG01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 DA86 EA20

FA72 FA74 GA26