

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6404313号
(P6404313)

(45) 発行日 平成30年10月10日 (2018. 10. 10)

(24) 登録日 平成30年9月21日 (2018. 9. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/62 (2006. 01)

C 1 2 N 15/62 Z

C 1 2 N 15/13 (2006. 01)

C 1 2 N 15/13

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46 Z N A

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 24 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-502206 (P2016-502206)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)
 (65) 公表番号 特表2016-513467 (P2016-513467A)
 (43) 公表日 平成28年5月16日 (2016. 5. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/026658
 (87) 国際公開番号 W02014/151910
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)
 審査請求日 平成29年3月10日 (2017. 3. 10)
 (31) 優先権主張番号 61/791, 357
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/944, 841
 (32) 優先日 平成26年2月26日 (2014. 2. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500049716
 アムジェン・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 シーエー 91320,
 サウザンド オークス, ワン アムジェン
 センター ドライブ
 (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

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘテロ二量体性二重特異性抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 式V1-L1-V2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって、式中、V1およびV2は免疫グロブリン可変領域であり、L1およびL2はリンカーであり、L2は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CH1は第1の免疫グロブリン重鎖定常領域である、第1のポリペプチド鎖；ならびに

(b) 式V3-L3-V4-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、式中、V3およびV4は免疫グロブリン可変領域であり、L3およびL4はリンカーであり、L4は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CLは免疫グロブリン軽鎖定常領域である、第2のポリペプチド鎖

を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体であって、

V1およびV3がVL領域でありかつV2およびV4がVH領域であるか、またはV1およびV3がVH領域でありかつV2およびV4がVL領域であり；

V1およびV4の一方が、免疫グロブリン重鎖可変 (VH) 領域であり、もう一方が、免疫グロブリン軽鎖可変 (VL) 領域であり、V1およびV4が、IgGおよび / または scFv 抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができ；

V2およびV3の一方がVH領域であり、もう一方がVL領域であり、V2およびV3が、IgGおよび / または scFv 抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができ；

第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方が、さらに、(a) および (b) に記載

された領域から下流に半減期延長部分を含み；

V1、V2、V3、およびV4が、異なるアミノ酸配列を有し；

ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、標的細胞および免疫エフェクター細胞に結合し、かつ／または免疫エフェクター細胞による標的細胞の細胞溶解を媒介する、ヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 2】

(a) の第1のポリペプチド鎖および／または (b) の第2のポリペプチド鎖の半減期延長部分が、Fcポリペプチド鎖である、請求項1に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 3】

標的細胞ががん細胞である、請求項1または2に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

10

【請求項 4】

免疫エフェクター細胞がT細胞、NK細胞、マクロファージ、単球、または好中球である、請求項1～3のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 5】

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖が、ヒトIgG Fcポリペプチド鎖である、請求項2～4のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 6】

L1およびL3が、それぞれ12アミノ酸長以下である、請求項1～5のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 7】

20

エフェクター細胞が、ヒトTCR-CD3複合体の一部であるエフェクター細胞タンパク質を発現する、請求項1～6のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 8】

第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖が、それぞれFcポリペプチド鎖を含み、

各Fcポリペプチド鎖が、少なくとも1つの電荷対置換 (charge pair substitution) を含む、

請求項2～7のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 9】

第1のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換E356K、E356R、D356R、もしくはD356Kと、D399KもしくはD399Rとを含み、かつ第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換R409D、R409E、K409E、もしくはK409Dと、N392D、N392E、K392E、もしくはK392Dとを含むか、または

30

第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換E356K、E356R、D356R、もしくはD356Kと、D399KもしくはD399Rとを含み、かつ第1のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換R409D、R409E、K409E、もしくはK409Dと、N392D、N392E、K392E、もしくはK392Dとを含む、

請求項8に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 10】

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、Fc 受容体 (Fc R) の結合を阻害する1つまたは複数の改変を含む、請求項8または9に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

40

【請求項 11】

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、改変L234A、L235A、および／または位置297における任意の置換を含む、請求項10に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 12】

半減期を延長するFc改変を含む、請求項8～11のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 13】

50

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、EUナンバリングシステムによる残基384と385との間に挿入部を含み、該挿入部がSEQ ID NO:54～65のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項12に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項14】

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分に、ADCCを増強する改変を含む、請求項8～13のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項15】

(a) 式VH1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(b) 式VL2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(c) 式VH2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；ならびに

(d) 式VL1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖

からなる群より選択される2つのポリペプチド鎖を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体であって、

L1、L2、L3、およびL4が、リンカーであり；

L2およびL4が、存在するか、または存在せず；

VH1およびVL1が、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、標的細胞に結合することができ；

VH2およびVL2が、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、免疫エフェクター細胞に結合することができ；

VH1およびVH2が、異なるアミノ酸配列を有し；

第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方が、さらに、(a)～(d)に記載された式によって表される領域から下流に半減期延長部分を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項16】

第1および第2のポリペプチド鎖が、それぞれ、(a)～(d)に記載された式を有するアミノ酸配列から下流にFcポリペプチド鎖を含む、請求項15に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項17】

SEQ ID NO:42、44、または82中の重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびにSEQ ID NO:43、45、または83中の軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項18】

SEQ ID NO:42、44、もしくは82のアミノ酸配列を含むVH領域、またはSEQ ID NO:42、44、もしくは82に比べて10個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含むその変異体；および

SEQ ID NO:43、45、もしくは83のアミノ酸配列を含むVL領域、またはSEQ ID NO:43、45、もしくは83に比べて10個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含むその変異体

を含む、請求項17に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする1種または複数種の核酸。

【請求項20】

請求項19に記載の核酸を含む、1種または複数種のベクター。

【請求項21】

請求項19に記載の核酸または請求項20に記載のベクターを含有する、宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸を発現するような条件下で請求項21に記載の宿主細胞を培養する段階、および

細胞集団または細胞培養上清から抗体を回収する段階を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体を作製する方法。

【請求項 2 3】

医薬として使用するための請求項1～18のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【請求項 2 4】

請求項1～18のいずれか一項に記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む薬学的組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日出願の米国特許仮出願第61/791,357号および2014年2月26日出願の同第61/944,841号の恩典を主張し、それらの内容の全体は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 2】

分野

20

本発明は、抗体工学の分野に属する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

二重特異性抗体は、多様な適応症における治療剤として大いに有望である。標準的なIgG構成を有する二重特異性抗体は、4つの異なるポリペプチド鎖を含むので、生産が難しい場合がある。より小さな、より容易に生産される二重特異性分子の有効性は、非ホジキンリンパ腫において臨床的に実証されている。例えばBargou et al. (2008), Science 321(5891): 974-977(非特許文献1)を参照されたい。おそらく、この単鎖分子のインビボ半減期が短いことから、これらの結果を達成するために連日投与が使用された。同上。したがって、当技術分野において、治療有効性、投与の容易さ、および生産を簡単にする構成とともに、好都合な薬物動態特性を有する二重特異性治療剤の必要性がある。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 4】

【非特許文献 1】Bargou et al. (2008), Science 321(5891): 974-977

【発明の概要】

【0 0 0 5】

概要

本明細書記載の二重特異性ヘテロ二量体性抗体の構成は、2種の異なるタンパク質のそれぞれ1分子に結合することができ、かつ、半減期延長部分、例えば抗体のFc領域を含有する抗体を生成する。したがって、二重特異性抗体自体は、細胞表面上で上記タンパク質のどちらの多量体化も直接には引き起こさない。免疫エフェクター細胞上に発現されたある種のタンパク質の多量体化は、免疫エフェクター細胞の全般的活性化を引き起こし、これは、望ましくない全身性の炎症を潜在的に引き起こし得る状況である。Fc領域は、多様な他のタンパク質、例えば胎児性Fc受容体(FcRn)にも結合することができるので、抗体を二重特異性、三重特異性、四重特異性などと称する場合に、Fc領域の結合特異性は、通常は認識されないものの、本明細書記載の二重特異性ヘテロ二量体性抗体は、三重特異性として見ることもできる。該抗体は、また、半減期延長部分を欠如する分子に比べて好都合な薬物動態特性を有することができる。いくつかの態様では、該抗体が結合する一方の

40

50

タンパク質は、T細胞またはNK細胞のような免疫エフェクター細胞上に発現され、もう一方のタンパク質は、標的細胞、例えばがん細胞上に発現される。本明細書記載の二重特異性ヘテロ二量体性抗体は、望ましい薬物動態特性を有することができ、かつ2種の特異的タンパク質に結合することができる。それらのタンパク質の一方は、免疫エフェクター細胞上に発現され、それらのもう一方はがん細胞のような罹患細胞上に発現される。二重特異性ヘテロ二量体性抗体の結合は、免疫エフェクター細胞および標的細胞を結びつけ、免疫細胞を活性化し、おそらく他のいくつかの二重特異性抗体で観察されたメカニズムに類似したメカニズムにより、標的細胞を除去するように免疫エフェクター細胞を誘導する。例えば、Hass et al. (2009), Immunobiology 214(6): 441-53を参照されたい。

【0006】

一局面では、本明細書において、(a)式V1-L1-V2-L2-CH1を有する第1のポリペプチド鎖であって、式中、V1およびV2は免疫グロブリン可変領域であり、L1およびL2はリンカーであり、L2は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CH1は第1の免疫グロブリン重鎖定常領域である、第1のポリペプチド鎖；ならびに(b)式V3-L3-V4-L4-CLを有する第2のポリペプチド鎖であって、式中、V3およびV4は免疫グロブリン可変領域であり、L3およびL4はリンカーであり、L4は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CLは免疫グロブリン軽鎖定常領域である、第2のポリペプチド鎖、を含むヘテロ二量体性二重特異性抗体が提供され；ここで、第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方は、さらに、(a)および(b)に記載された式によって表される領域から下流に半減期延長部分を含み；V1、V2、V3、およびV4は、異なるアミノ酸配列を有し；ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞による、標的細胞タンパク質を提示している標的細胞の細胞溶解を媒介するが、免疫エフェクター細胞による、標的細胞タンパク質を提示していない細胞の細胞溶解を媒介せず、かつ/またはヘテロ二量体性抗体は、標的細胞および免疫エフェクター細胞に結合する。半減期延長部分は、ポリペプチドであることができる。半減期延長部分は、(a)に記載された領域および/または(b)に記載された領域から下流にあることができる。半減期延長部分は、Fcポリペプチド鎖であることができ、第1および第2のポリペプチド鎖は、それぞれ、(a)および(b)に記載された式によって表される領域から下流にFcポリペプチド鎖を含むことができる。標的細胞は、がん細胞であることができる。免疫エフェクター細胞は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、単球、または好中球であることができ、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、標的細胞の存在下でT細胞上のCD25およびCD69の発現増加を媒介することができるが、標的細胞の非存在下では媒介することができない。第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖は、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4 Fcポリペプチド鎖のようなヒトIgG Fcポリペプチド鎖、または配列のアミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸の欠失、挿入、もしくは置換を含むそれらの変異体であることができる。そのようなアミノ酸改変は、Fc受容体、または免疫細胞、たとえばマクロファージ、単球、もしくはNK細胞への結合を防止するまたは増大するように操作することができる。例えば、Fc受容体への結合が増大された場合、Fc受容体陽性細胞は、標的細胞の殺滅の増大に、より容易に関与することができる。いくつかの態様では、L1およびL3は、12アミノ酸長または10アミノ酸長以下である。いくつかの態様では、V1およびV4の一方は、免疫グロブリン重鎖可変(VH)領域であることができ、もう一方は、免疫グロブリン軽鎖可変(VL)領域であることができ、V1およびV4が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらは、標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができる。そのような態様では、V2およびV3の一方は、VH領域であることができ、もう一方は、VL領域であることができ、V2およびV3が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらは、標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができる。V1およびV3はVL領域であることができ、V2およびV4はVH領域であることができる。他の態様では、V1およびV3はVH領域であることができ、V2およびV4はVL領域であることができる。さらなる態様では、V1およびV2はVL領域であることができ、V3およびV4はVH領域であることができる。なお他の態様では、V1およびV2はVH領域であることができ、V3およびV4はVL領域であることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

別の局面では、V1およびV3の一方はVH領域であることができ、もう一方は、VL領域であることができ、V1およびV3が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらは、標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができる。そのような態様では、V2およびV4の一方はVH領域であることができ、もう一方は、VL領域であることができ、V2およびV4が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらは、標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができる。さらなる一局面では、V1およびV2はVH領域であることができ、V3およびV4はVL領域であることができる。あるいは、V1およびV2はVL領域であることができ、V3およびV4はVH領域であることができる。別の局面では、V1およびV4はVH領域であることができ、V2およびV3はVL領域であることができる。さらなる一局面では、V1およびV4はVL領域であることができ、V2およびV3はVH領域であることができる。

10

【 0 0 0 8 】

本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞に結合することができる。エフェクター細胞タンパク質は、ヒトTCR-CD3複合体の一部であることができる。そのような場合では、エフェクター細胞タンパク質は、例えば、CD3 鎖であることができる。

【 0 0 0 9 】

さらなる一態様では、本明細書において、(a) 式VH1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(b) 式VL2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(c) 式VH2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(d) 式VL2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(e) 式VL1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(f) 式VH1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(g) 式VH2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；ならびに(h) 式VL1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖からなる群より選択される、2つのポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体性二重特異性抗体が記載され；ここで、L1、L2、L3、およびL4はリンカーであり；L2およびL4は、存在してもよいし、または存在しなくてもよく；VH1およびVL1は、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、標的細胞に結合することができる；VH2およびVL2は、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、免疫エフェクター細胞に結合することができる；VH1およびVH2は、異なるアミノ酸配列を有し；第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方は、さらに、(a) ~ (h) に記載された式から下流に半減期延長部分を含む。VL1およびVL2は、同じまたは異なるアミノ酸配列を有することができる。第1および第2のポリペプチド鎖は、それぞれ、(a) ~ (h) に記載された式によって表される領域から下流にFcポリペプチド鎖を含むことができる。L1およびL3リンカーは、14、13、12、または10アミノ酸長以下であることができ、または少なくとも15アミノ酸長であることができる。

20

30

40

【 0 0 1 0 】

別の局面では、本明細書において、(a) 式VH1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(b) 式VH2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(c)

50

式VL1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(d)式VL2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(e)式VL1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(f)式VH2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(g)式VL2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；ならびに(h)式VH1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖からなる群より選択される、2つのポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体性二重特異性抗体が記載され；ここで、L1、L2、L3、およびL4はリンカーであり；L2およびL4は、存在してもよいし、または存在しなくてもよく；VH1およびVL1は、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に標的細胞に結合することができ；VH2およびVL2は、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、免疫エフェクター細胞に結合することができ；VH1およびVH2は、異なるアミノ酸配列を有し；第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方は、さらに、(a)～(h)に記載された式から下流に半減期延長部分を含む。VL1およびVL2は、同じまたは異なるアミノ酸配列を有することができる。第1および第2のポリペプチド鎖は、それぞれ、(a)～(h)に記載された式によって表される領域から下流にFcポリペプチド鎖を含むことができる。L1およびL3リンカーは、14、13、12、または10アミノ酸長以下であることができ、または少なくとも15アミノ酸長であることができる。

【0011】

別の局面では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、SEQ ID NO:42のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:42に比べて20個以下の挿入、欠失、もしくは置換を含有するSEQ ID NO:42の変異体を含むVH領域、およびSEQ ID NO:43のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:43に比べて20個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するSEQ ID NO:43の変異体を含むVL領域を含むことができる。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:44に比べて20個以下の挿入、欠失、もしくは置換を含有するSEQ ID NO:44の変異体を含むVH領域、およびSEQ ID NO:45のアミノ酸配列またはSEQ ID NO:45に比べて20個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するSEQ ID NO:45の変異体を含むVL領域を含むことができる。他の態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、それぞれSEQ ID NO:46または49、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:42、およびSEQ ID NO:48のアミノ酸配列を含むV1、V2、V3、およびV4を含むことができる。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、それぞれSEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46または49、SEQ ID NO:48、およびSEQ ID NO:42のアミノ酸配列を含む、上記のV1、V2、V3、およびV4を含むことができる。さらなる代替では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、それぞれSEQ ID NO:50、SEQ ID NO:46または49、SEQ ID NO:48、およびSEQ ID NO:51のアミノ酸配列を含む、上記のV1、V2、V3、およびV4を含むことができる。なお別の代替では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、それぞれSEQ ID NO:44、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、およびSEQ ID NO:45のアミノ酸配列を含む、上記のV1、V2、V3、およびV4を含むことができる。上述の構築物において、それぞれSEQ ID NO:82および83のアミノ酸配列を有するVHおよびVL領域は、SEQ ID NO:42および43、またはSEQ ID NO:44および45のVHおよびVL領域と置き換えることができる。本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、SEQ ID NO:82および83のアミノ酸配列を含むことができる。配列のアミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸の欠失、挿入、または置換を含有する、上述のアミノ酸配列の変異体が本明細書において提供されることが、さらに企図される。

【0012】

第1および第2のポリペプチド鎖の両方にFcポリペプチド鎖、任意でヒトIgG Fcポリペ

10

20

30

40

50

チド鎖を含む、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、各Fcポリペプチド鎖上に少なくとも1つの電荷対置換 (charge pair substitution) を含むことができる。いくつかのそのような態様では、第1のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分は、電荷対置換E356K、E356R、D356K、またはD356Rと、D399KまたはD399Rとを含むことができ、第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分は、電荷対置換R409D、R409E、K409D、またはK409Eと、N392D、N392E、K392D、またはK392Eとを含むことができる。他のそのような態様では、第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分は、電荷対置換E356K、E356R、D356K、またはD356Rと、D399KまたはD399Rとを含むことができ、第1のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分は、電荷対置換R409D、R409E、K409D、またはK409Eと、N392D、N392E、K392D、またはK392Eとを含む。

10

【 0 0 1 3 】

第1および第2のポリペプチド鎖の両方にFcポリペプチド鎖を含む、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、Fc 受容体 (Fc R) の結合を阻害する1つまたは複数の改変を含むことができる。そのような改変は、L234A、L235A、および/または位置297における任意の置換を含むことができる。

【 0 0 1 4 】

第1および第2のポリペプチド鎖の両方にFcポリペプチド鎖を含む、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、半減期を延長する1つまたは複数のFc改変を含むことができる。そのような改変は、第1および第2のポリペプチド鎖の各Fcポリペプチド鎖部分においてEUナンバリングシステムによる残基384と385との間に挿入部を含むことができ、ここで、該挿入部は、SEQ ID NO:54 ~ 65の任意の1つのアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 1 5 】

別の局面では、第1および第2のポリペプチド鎖の両方にFcポリペプチド鎖を含む、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分にADCCを増強する1つまたは複数の改変を含むことができる。これらの改変は、アミノ酸の置換、挿入、または欠失を含むことができる。ADCCの増強は、当技術分野において公知の多様な方法によるFcポリペプチド鎖の脱フコシル化によって操作することもできる。

【 0 0 1 6 】

加えて、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体の任意のポリペプチド鎖をコードする1種または複数種の核酸が、本明細書において提供される。例示的な核酸配列には、SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37、38、および39が含まれる。そのような核酸を含む1種または複数種のベクター、およびそのような核酸またはベクターを含有する宿主細胞がさらに提供される。別の局面では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸を発現するような条件下でそのような核酸を含有する宿主細胞を培養する段階、および細胞集団または細胞培養上清から抗体を回収する段階を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体を作製する方法が本明細書において記載される。

30

【 0 0 1 7 】

異なる一局面では、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効量をがん患者に投与する段階を含む、該患者を処置する方法であって、標的細胞タンパク質ががん細胞抗原である方法が、本明細書において記載される。いくつかの態様では、化学療法または放射線を、抗体の投与と同時、投与の前、または投与の後に、患者に施すことができる。別のアプローチでは、非化学療法的抗腫瘍剤を、抗体の投与と同時、投与の前、または投与の後に、患者に投与することができる。

40

【 0 0 1 8 】

さらなる一局面では、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効用量を、感染症を有する患者に投与する段階を含む、該患者を処置するための方法であって、標的細胞が感染細胞である方法が、本明細書において記載される。

【 0 0 1 9 】

さらなる一局面では、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効

50

用量を、自己免疫性もしくは炎症性状態、または線維性状態を有する患者に投与する段階を含む、該患者を処置するための方法が、本明細書において提供される。

【0020】

本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体の医薬としての使用が、本明細書において提供される。

【0021】

さらなる一局面では、本明細書記載の任意のヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む薬学的組成物が、本明細書において記載される。薬学的組成物は、がん、感染症、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または線維性疾患の処置のためのものであることができる。

[本発明1001]

(a) 式V1-L1-V2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって、式中、V1およびV2は免疫グロブリン可変領域であり、L1およびL2はリンカーであり、L2は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CH1は第1の免疫グロブリン重鎖定常領域である、第1のポリペプチド鎖；ならびに

(b) 式V3-L3-V4-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、式中、V3およびV4は免疫グロブリン可変領域であり、L3およびL4はリンカーであり、L4は存在してもよいし、または存在しなくてもよく、CLは免疫グロブリン軽鎖定常領域である、第2のポリペプチド鎖

を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体であって、

第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方が、さらに、(a)および(b)に記載された領域から下流に半減期延長部分を含み；

V1、V2、V3、およびV4が、異なるアミノ酸配列を有し；

ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、標的細胞および免疫エフェクター細胞に結合し、かつ/または免疫エフェクター細胞による標的細胞の細胞溶解を媒介する、ヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1002]

半減期延長部分がポリペプチドであり、かつ/またはL2およびL4が存在しない、本発明1001のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1003]

(a)に記載された領域から下流に半減期延長部分を含む、本発明1001または1002のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1004]

(b)に記載された領域から下流に半減期延長部分を含む、本発明1001～1003のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1005]

(a)の第1のポリペプチド鎖および/または(b)の第2のポリペプチド鎖の半減期延長部分が、Fcポリペプチド鎖である、本発明1003または1004のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1006]

(a)の第1のポリペプチド鎖および(b)の第2のポリペプチド鎖の両方が、Fcポリペプチド鎖を含む、本発明1005のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1007]

標的細胞ががん細胞である、本発明1001～1006のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1008]

免疫エフェクター細胞がT細胞であり、ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、標的細胞の存在下でT細胞上のCD25およびCD69の発現増加を媒介することができるが、標的細胞の非存在下では媒介することができない、本発明1001～1007のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1009]

10

20

30

40

50

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖が、ヒトIgG Fcポリペプチド鎖である、本発明1006のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1010]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖が、ヒトIgG1 Fcポリペプチド鎖である、本発明1009のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1011]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖が、ヒトIgG2 Fcポリペプチド鎖である、本発明1009のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1012]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖が、ヒトIgG4 Fcポリペプチド鎖である、本発明1009のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

10

[本発明1013]

L1およびL3が、それぞれ12アミノ酸長以下である、本発明1001～1012のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1014]

L1およびL3が、それぞれ10アミノ酸長以下である、本発明1013のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1015]

V1およびV4の一方が、免疫グロブリン重鎖可変(VH)領域であり、もう一方が、免疫グロブリン軽鎖可変(VL)領域であり、V1およびV4が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができ、

20

V2およびV3の一方がVH領域であり、もう一方がVL領域であり、V2およびV3が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合することができる、

本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1016]

V1およびV4が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞に結合することができ、

V2およびV3が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが免疫エフェクター細胞に結合することができる、

30

本発明1015のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1017]

V1およびV4が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが免疫エフェクター細胞に結合することができ、

V2およびV3が、IgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞に結合することができる、

本発明1015のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1018]

V1およびV3が、VL領域であり、

V2およびV4が、VH領域である、

40

本発明1001～1017のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1019]

V1およびV3が、VH領域であり、

V2およびV4が、VL領域である、

本発明1001～1017のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1020]

V1およびV2が、VL領域であり、

V3およびV4が、VH領域である、

本発明1001～1017のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1021]

50

V1およびV2が、VH領域であり、
V3およびV4が、VL領域である、
本発明1001～1017のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1022]

V1およびV3の一方がVH領域であり、もう一方がVL領域であり、V1およびV3が、IgGおよ
び／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞
に結合することができ、

V2およびV4の一方がVH領域であり、もう一方がVL領域であり、V2およびV4が、IgGおよ
び／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞または免疫エフェクター細胞
に結合することができる、

本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1023]

V1およびV3が、IgGおよび／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞に
結合することができ、

V2およびV4が、IgGおよび／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが免疫エフェ
クター細胞に結合することができる、

本発明1022のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1024]

V1およびV3が、IgGおよび／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが免疫エフェ
クター細胞に結合することができ、

V2およびV4が、IgGおよび／またはscFv抗体の一部である場合に、それらが標的細胞に
結合することができる、

本発明1022のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1025]

V1およびV2が、VH領域であり、
V3およびV4が、VL領域である、
本発明1022～1024のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1026]

V1およびV2が、VL領域であり、
V3およびV4が、VH領域である、
本発明1022～1024のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1027]

V1およびV4が、VH領域であり、
V2およびV3が、VL領域である、
本発明1022～1024のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1028]

V1およびV4が、VL領域であり、
V2およびV3が、VH領域である、
本発明1022～1024のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1029]

エフェクター細胞が、ヒトTCR-CD3複合体の一部であるエフェクター細胞タンパク質を
発現する、本発明1001～1028のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1030]

エフェクター細胞タンパク質が、CD3 鎖（CD3 ）である、本発明1029のヘテロ二量体
性二重特異性抗体。

[本発明1031]

第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖が、それぞれFcポリペプチド鎖を含み
、

各Fcポリペプチド鎖が、少なくとも1つの電荷対置換（charge pair substitution）を
含む、

10

20

30

40

50

本発明1001～1030のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1032]

第1のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換E356K、E356R、D356R、もしくはD356Kと、D399KもしくはD399Rとを含み、かつ第2のポリペプチドのFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換R409D、R409E、K409E、もしくはK409Dと、N392D、N392E、K392E、もしくはK392Dとを含むか、または

第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換E356K、E356R、D356R、もしくはD356Kと、D399KもしくはD399Rとを含み、かつ第1のポリペプチドのFcポリペプチド鎖部分が、電荷対置換R409D、R409E、K409E、もしくはK409Dと、N392D、N392E、K392E、もしくはK392Dとを含む、

本発明1031のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1033]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、Fc 受容体 (Fc R) の結合を阻害する1つまたは複数の改変を含む、本発明1031または1032のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1034]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、改変L234A、L235A、および/または位置297における任意の置換を含む、本発明1033のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1035]

半減期を延長するFc改変を含む、本発明1031～1034のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1036]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分が、EUナンバリングシステムによる残基384と385との間に挿入部を含み、該挿入部がSEQ ID NO:54～65のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、本発明1035のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1037]

第1および第2のポリペプチド鎖のFcポリペプチド鎖部分に、ADCCを増強する改変を含む、本発明1031～1036のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1038]

(a) 式VH1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(b) 式VL2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(c) 式VH2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(d) 式VL2-L1-VL1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH1-L3-VH2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(e) 式VL1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(f) 式VH1-L1-VH2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL2-L3-VL1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；

(g) 式VH2-L1-VH1-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VL1-L3-VL2-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；ならびに

(h) 式VL1-L1-VL2-L2-CH1を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖および式VH2-L3-VH1-L4-CLを有するアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖

からなる群より選択される2つのポリペプチド鎖を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体であって、

L1、L2、L3、およびL4が、リンカーであり；

L2およびL4が、存在するか、または存在せず；

10

20

30

40

50

VH1およびVL1が、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、標的細胞に結合することができ；

VH2およびVL2が、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域であり、それらがIgGおよび/またはscFv抗体の一部である場合に、免疫エフェクター細胞に結合することができ；

VH1およびVH2が、異なるアミノ酸配列を有し；

第1および第2のポリペプチド鎖の一方または両方が、さらに、(a)～(h)に記載された式によって表される領域から下流に半減期延長部分を含む、

ヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1039]

VL1およびVL2が、異なるアミノ酸配列を有する、本発明1038のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

10

[本発明1040]

VL1およびVL2が、同じアミノ酸配列を有する、本発明1038のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1041]

第1および第2のポリペプチド鎖が、それぞれ、(a)～(h)に記載された式を有するアミノ酸配列から下流にFcポリペプチド鎖を含む、本発明1038～1040のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1042]

L1およびL3が、それぞれ12アミノ酸長以下であり、かつ/またはL2およびL4が存在しない、本発明1038～1041のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

20

[本発明1043]

SEQ ID NO:42、44、または82中の重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびにSEQ ID NO:43、45、または83中の軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、本発明1001～1037のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1044]

SEQ ID NO:42、44、もしくは82のアミノ酸配列を含むVH領域、またはSEQ ID NO:42、44、もしくは82に比べて10個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含むその変異体；および

SEQ ID NO:43、45、もしくは83のアミノ酸配列を含むVL領域、またはSEQ ID NO:43、45、もしくは83に比べて10個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含むその変異体

30

を含む、本発明1043のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1045]

SEQ ID NO:42、44、または82のアミノ酸配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO:43、45、または83のアミノ酸配列を含むVL領域を含む、本発明1044のヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1046]

V1、V2、V3、およびV4が、それぞれSEQ ID NO:46もしくは49、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:42、およびSEQ ID NO:48のアミノ酸配列、またはこれらの配列の1つに比べて20個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するこれらの配列の変異体を含む、本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

40

[本発明1047]

V1、V2、V3、およびV4が、それぞれSEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46もしくは49、SEQ ID NO:48、およびSEQ ID NO:42のアミノ酸配列、またはこれらの配列の1つに比べて20個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するこれらの配列の変異体を含む、本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1048]

V1、V2、V3、およびV4が、それぞれSEQ ID NO:50、SEQ ID NO:46もしくは49、SEQ ID NO:48、およびSEQ ID NO:51のアミノ酸配列、またはこれらの配列の1つに比べて20個以下

50

の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するこれらの配列の変異体を含む、本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1049]

V1、V2、V3、およびV4が、それぞれSEQ ID NO:44、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、およびSEQ ID NO:45のアミノ酸配列、またはこれらの配列の1つに比べて20個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含有するこれらの配列の変異体を含む、本発明1001～1014のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

[本発明1050]

本発明1001～1049のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする1種または複数種の核酸。

10

[本発明1051]

本発明1050の核酸を含む、1種または複数種のベクター。

[本発明1052]

本発明1050の核酸または本発明1051のベクターを含有する、宿主細胞。

[本発明1053]

ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸を発現するような条件下で本発明1052の宿主細胞を培養する段階、および

細胞集団または細胞培養上清から抗体を回収する段階を含む、ヘテロ二量体性二重特異性抗体を作製する方法。

20

[本発明1054]

本発明1001～1049のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効量をがん患者に投与する段階を含む、該患者を処置する方法であって、標的細胞タンパク質ががん細胞抗原である、方法。

[本発明1055]

化学療法または放射線が、抗体の投与と同時に、投与の前、または投与の後に患者に施される、本発明1054の方法。

[本発明1056]

非化学療法的抗腫瘍剤が、抗体の投与と同時に、投与の前、または投与の後に患者に投与される、本発明1054の方法。

[本発明1057]

30

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効用量を、感染症を有する患者に投与する段階を含む、該患者を処置するための方法であって、標的細胞が感染細胞である、方法。

[本発明1058]

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効用量を、自己免疫性状態または炎症性状態を有する患者に投与する段階を含む、該患者を処置するための方法。

[本発明1059]

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体の治療有効用量を、線維性状態を有する患者に投与する段階を含む、該患者を処置するための方法。

40

[本発明1060]

本発明1001～1049のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体の医薬としての使用。

[本発明1061]

本発明1001～1049のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む薬学的組成物。

[本発明1062]

本発明1001～1049のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む、がんの処置のための薬学的組成物。

[本発明1063]

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む、感染症の処置のための薬学的組成物。

50

[本発明1064]

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む、自己免疫疾患または炎症性疾患の処置のための薬学的組成物。

[本発明1065]

本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む、線維性疾患の処置のための薬学的組成物。

[本発明1066]

SEQ ID NO:82および83のアミノ酸配列を含む、本発明1001～1045のいずれかのヘテロ二量体性二重特異性抗体。

【図面の簡単な説明】【0022】

【図1】ヘテロ二量体性二重特異性抗体の例示的なサブタイプを示す図である。これらの図において、VH1およびVL1は、「標的細胞タンパク質」に結合することができる免疫グロブリン重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対であり、VH2およびVL2は、「エフェクター細胞タンパク質」に結合することができる免疫グロブリン重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対である。図に示される他の領域は、図中から特定される。CLおよびCH1領域を囲む破線は、いくつかの態様でこれらの領域を除外できることを意味する。いくつかの態様では、CLおよびCH1領域の両方が除外される。半減期延長部分を表す四角を描いている破線も、いくつかの態様でこれらを除外できることを示す。しかし、この場合、半減期延長部分の両方でなく、一方またはもう一方のみを除外することができる。

【図2】ヘテロ二量体性二重特異性抗MSLN/CD3 抗体が、ヒトT細胞の存在下でMSLN発現腫瘍細胞系の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、抗体濃度 (log nM) を示し、y軸は、特異的細胞溶解率を示す。全ての方法を実施例2に記載し、使用された特定のヘテロ二量体性二重特異性抗体構築物を図中に示す。

【図3】ヘテロ二量体性二重特異性抗MSLN/CD3 抗体が、ヒトT細胞の存在下でMSLN発現腫瘍細胞系の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、抗体濃度 (log nM) を示し、y軸は、特異的細胞溶解率を示す。全ての方法を実施例2に記載し、使用された特定のヘテロ二量体性二重特異性抗体構築物を図中に示す。

【図4】ヘテロ二量体性二重特異性抗MSLN/CD3 抗体が、カニクイザルT細胞の存在下でMSLN発現腫瘍細胞系の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、抗体濃度 (log nM) を示し、y軸は、特異的細胞溶解率を示す。全ての方法を実施例2に記載し、使用された特定のヘテロ二量体性二重特異性抗体構築物を図中に示す。

【図5】多様な構成の二重特異性抗MSLN/CD3 抗体が、ヒトT細胞の存在下でMSLN発現腫瘍細胞系の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、抗体濃度 (log nM) を示し、y軸は、特異的細胞溶解率を示す。全ての方法を実施例3に記載し、使用された特定のヘテロ二量体性二重特異性抗体構築物を図中に示す。

【図6】ヘテロ二量体性二重特異性抗HER2/CD3 抗体 (P136797.3、黒丸および実線) ならびに抗HER2/CD3 単鎖二重特異性分子 (P136629.3、白丸および破線) が、ヒトT細胞の存在下で、HER2発現腫瘍細胞系 (JIMT-1およびT47D) の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、抗体濃度 (pM) を示し、y軸は、特異的細胞溶解率を示す。使用された細胞系、すなわちJIMT-1、T47D、またはSHP77 (これは、HER2を発現しない) を各パネルに表示する。方法を実施例4に開示する。

【図7】抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下でのHER2発現腫瘍標的細胞の溶解が、T細胞の非存在下でなく存在下で起こることを示す図である。方法を実施例4に記載する。y軸は、JIMT-1細胞の特異的溶解率を示す。x軸に示すように、個々の棒線は、以下を含有する試料を表す: (1) JIMT-1細胞のみ、二重特異性なし (2) JIMT-1細胞 + T細胞、二重特異性なし (3) JIMT-1細胞のみ、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体あり、および (4) JIMT-1細胞 + T細胞、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体あり。

【図8】末梢CD3⁺T細胞が、HER2発現腫瘍標的細胞の存在下で抗HER2/CD3 ヘテロ二量体

10

20

30

40

50

性二重特異性抗体または単鎖抗HER2/CD3 二重特異性抗体による処理に応答して、CD25およびCD69の上方制御を示すことを示す図である。CD3⁺末梢血T細胞中のCD25（左パネル）およびCD69（右パネル）の発現を、実施例5に説明した蛍光標式細胞分取（FACS）によって測定した。x軸は、両方のパネルにおいて、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体（P136797.3）または単鎖抗HER2/CD3 二重特異性抗体（P136629.3）の濃度（pM）を示し、y軸は、CD25陽性（左パネル）またはCD69陽性（右パネル）でもあったCD3⁺細胞のパーセントを示す。記号は以下を示す：破線で結ばれた白四角＝単鎖抗HER2/CD3 二重特異性抗体、腫瘍標的細胞あり；実線で結ばれた下向き黒三角＝抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体、腫瘍標的細胞あり；破線で結ばれた白丸＝単鎖抗HER2/CD3 二重特異性抗体、腫瘍標的細胞なし；および上向き黒三角＝抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体、腫瘍標的細胞なし。

10

【図9】ヘテロ二量体性抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体（黒丸および実線）または単鎖抗FOLR1/CD3 分子（白丸および破線）が、FOLR1発現腫瘍細胞系の溶解を誘導することを示す図である。x軸は、ヘテロ二量体性抗FOLR1/CD3 二重特異性抗体または抗FOLR1/CD3 単鎖分子の濃度（pM）を示し、y軸は、溶解された腫瘍標的細胞のパーセントを示す。方法を実施例6に記載する。表示のように、Cal-51、T47D、およびBT474細胞系からのデータを、それぞれ上、中、および下のパネルに示す。

【図10A】抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖抗FOLR1/CD3 分子がFOLR1発現腫瘍細胞系（T47D）の存在下でT細胞からのサイトカイン分泌を刺激することを示す図である。用いられた方法を実施例6に記載する。各パネルにおいて、x軸は、TDCC アッセイに使用された抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖分子の濃度（pM）を示す。y軸は、上清中から検出されたサイトカインの濃度（pg/mL）を示す。破線で結ばれた白丸は、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含有する試料からのデータを示し、一方で、実線で結ばれた黒丸は、抗FOLR1/CD3 単鎖分子を含有する試料からのデータを示す。アッセイされたサイトカインを各パネルに示す。表示のように、左側のパネルに、T47D細胞を含有する試料からのデータを示し、右側のパネルに、BT474細胞を含有する試料からのデータを示す。表示のように、インターフェロン（IFN、上）、腫瘍壊死因子（TNF、中）、およびインターロイキン-10（IL-10、下）に関するデータを示す。

20

【図10B】抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖抗FOLR1/CD3 分子がFOLR1発現腫瘍細胞系（T47D）の存在下でT細胞からのサイトカイン分泌を刺激することを示す図である。用いられた方法を実施例6に記載する。各パネルにおいて、x軸は、TDCC アッセイに使用された抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖分子の濃度（pM）を示す。y軸は、上清中から検出されたサイトカインの濃度（pg/mL）を示す。破線で結ばれた白丸は、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含有する試料からのデータを示し、一方で、実線で結ばれた黒丸は、抗FOLR1/CD3 単鎖分子を含有する試料からのデータを示す。アッセイされたサイトカインを各パネルに示す。表示のように、左側のパネルに、T47D細胞を含有する試料からのデータを示し、右側のパネルに、BT474細胞を含有する試料からのデータを示す。表示のように、インターロイキン-2（IL-2、上）およびインターロイキン-13（IL-13、下）に関するデータを示す。

30

40

【図11A】抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または抗HER2/CD3 単鎖分子が、HER2発現腫瘍細胞系（JIMT-1）の存在下でT細胞からのサイトカインの放出を刺激することを示す図である。用いられた方法を実施例7に記載する。各パネルにおいて、x軸は、TDCCアッセイに使用された抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖分子の濃度（pM）を示す。y軸は、上清中から検出されたサイトカインの濃度（pg/mL）を示す。破線で結ばれた白丸は、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含有する試料からのデータを示し、一方で、実線で結ばれた黒丸は、抗HER2/CD3 単鎖分子を含有する試料からのデータを示す。アッセイされたサイトカインを各パネルに示す。表示のように、左側のパネルに、JIMT-1細胞を含有する試料からのデータを示し、右側のパネルに、SHP77細胞を含有する試料からのデータを示す。表示のように、IFN（上）、TNF（中）、お

50

よびIL-10(下)に関するデータを示す。

【図11B】抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または抗HER2/CD3 単鎖分子が、HER2発現腫瘍細胞系(JIMT-1)の存在下でT細胞からのサイトカインの放出を刺激することを示す図である。用いられた方法を実施例7に記載する。各パネルにおいて、x軸は、TDCCアッセイに使用された抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖分子の濃度(pM)を示す。y軸は、上清中から検出されたサイトカインの濃度(pg/mL)を示す。破線で結ばれた白丸は、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含有する試料からのデータを示し、一方で、実線で結ばれた黒丸は、抗HER2/CD3 単鎖分子を含有する試料からのデータを示す。アッセイされたサイトカインを各パネルに示す。表示のように、左側のパネルに、JIMT-1細胞を含有する試料からのデータを示し、右側のパネルに、SHP77細胞を含有する試料からのデータを示す。表示のように、IL-2(上)およびIL-13(下)に関するデータを示す。

10

【図12】サイトカイン放出が、JIMT-1細胞およびT細胞の両方に加えて抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を必要とすることを示す図である。方法を実施例7に記載する。y軸は、検出された各サイトカインのレベルを示す。アッセイされたサイトカインを各パネルに示す。x軸に示すように、試料は、以下を含有する：(1)T細胞単独、二重特異性なし、(2)JIMT-1細胞単独、二重特異性なし、(3)T細胞およびJIMT-1細胞の両方、二重特異性なし、(4)T細胞単独、二重特異性あり、(5)JIMT-1細胞単独、二重特異性あり、ならびに(6)T細胞およびJIMT-1細胞の両方、二重特異性あり。

【図13】抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体による腫瘍成長のインビボ阻害を示す図である。方法を実施例8に記載する。x軸は、腫瘍細胞をマウスに移植してから経過した時間(日)を示す。y軸は、腫瘍体積(mm³)を示す。x軸上方の下向き矢印は、抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体、対照二重特異性抗体、またはダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)がマウスに投与された時刻を示す。x軸下方の上向き矢印は、抗MSLN IgG1抗体が投与された時刻を示す。記号の意味は、以下の通り：DPBS = 白丸；P56019.5(抗MSLN抗CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体) = 黒四角；対照二重特異性抗体(抗ヒトEGFRviii/抗ヒトCD3) = 黒三角；抗ヒトMSLN IgG1 = 黒菱形；およびNSG対照マウス = 黒丸。

20

【図14】ヘテロ二量体性二重特異性抗体および単鎖二重特異性分子の静脈内薬物動態特性を示す図である。方法を実施例9に説明する。x軸は、抗体の注射後の時間(時間)を示し、y軸は、抗体の血清中濃度(ng/mL)を示す。実線で結ばれた黒丸は、単鎖二重特異性抗体の注射からのデータを表す。実線で結ばれた黒菱形は、ヘテロ二量体性二重特異性抗体の注射からのデータを表す。

30

【図15】ヘテロ二量体性二重特異性抗体の皮下薬物動態特性を示す図である。方法を実施例9に説明する。x軸は、抗体の注射後の時間(時間)を示し、y軸は、抗体の血清中濃度(ng/mL)を示す。記号は図11と同様である。

【図16】抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体によるFOLR1発現腫瘍細胞のインビボ阻害を示す図である。方法を実施例10に記載する。x軸は、ヒト腫瘍細胞をマウスに移植してから経過した時間(日)を示す。y軸は、腫瘍体積(mm³)を示す。記号の意味は、以下の通り：ピヒクル(0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0) = 黒三角；抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性分子 = 黒丸；および抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体 = 白丸。

40

【図17】抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下でのCD33発現腫瘍標的細胞の溶解が、T細胞の非存在下でなく存在下で起こることを示す図である。方法を実施例11に記載する。y軸は、MoIm-13細胞の特異的溶解率を示す。x軸に示すように、個々の棒線は、以下を含有する試料を表す：(1)MoIm-13細胞のみ、二重特異性なし、(2)MoIm-13細胞+T細胞、二重特異性なし、(3)MoIm-13細胞のみ、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体あり、および(4)MoIm-13細胞+T細胞、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体あり。

【図18】抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体によるCD33発現MoIm-13腫瘍成長

50

のインビボ阻害を示す図である。方法を実施例11に記載する。x軸は、腫瘍細胞をマウスの右側腹部に皮下移植してから経過した時間（日）を示す。y軸は、腫瘍のバイオルミネセンスを示す。縦の点線は、ヒトT細胞 20×10^6 個をマウスに投与した日を示す。記号の意味は、以下の通り：ピヒクル対照（0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH 7.0）＝実線で結ばれた黒三角；抗MEC/CD3 単鎖二重特異性＝破線で結ばれた白三角；抗CD33/CD3 単鎖二重特異性＝実線で結ばれた黒丸；抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性＝破線で結ばれた白丸；およびナイーブ動物＝破線で結ばれた黒丸。縦の点線は、マウスがT細胞 20×10^6 個の投与をIP注射によって受けた日を示す。

【図19】抗CD33/CD3 Fc-クロスポディー（crossbody）によるCD8⁺T細胞のインビボ増大を示す図である。方法を実施例11に記載する。x軸は、マウスが受けた以下のような処置を示す：1、ピヒクル（0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0）；2、抗MEC/CD3 単鎖二重特異性；3、抗CD33/CD3 単鎖二重特異性；および4、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体。y軸は、最終投薬の24時間後に測定された生存白血球に対するヒトCD4⁺T細胞（黒丸）またはCD8⁺T細胞（白丸）のパーセントを示す。

【図20】抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体による腫瘍成長阻害のインビボ用量反応を示す図である。方法を実施例12に記載する。x軸は、Molm-13-luc腫瘍細胞100万個を各マウスの右側腹部に皮下移植してから経過した時間（日）を示す。y軸は、腫瘍のバイオルミネセンスを示す。縦の点線は、ヒトT細胞 20×10^6 個をマウスに投与した日を示す。記号の意味は、以下の通り：ピヒクル（0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0）＝破線で結ばれた白丸；1mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体＝実線で結ばれた黒丸；0.1mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体＝破線で結ばれた下向き白三角；0.03mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体＝実線で結ばれた上向き白三角；0.01mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体＝破線で結ばれた白四角；0.001mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体＝実線で結ばれた上向き黒三角；およびナイーブ＝破線で結ばれた黒丸。

【0023】

配列の簡単な説明

10

20

SEQ ID NO	説明
SEQ ID NO:1	ヒトフィブロネクチン3ドメインのアミノ酸配列
SEQ ID NO:2	ヒトIgG1 Fc領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:3	ヒトIgG2 Fc領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:4	ヒトIgG3 Fc領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:5	ヒトIgG4 Fc領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:6	P57216.9の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:7	P57216.9の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:8	P56019.5の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:9	P56019.5の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:10	H71362.2の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:11	H71362.2の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:12	P69058.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:13	P69058.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:14	P69059.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:15	P69059.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:16	E73356.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:17	E73356.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:18	E73352.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:19	E73352.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:20	P136797.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:21	P136797.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:22	P136795.3の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:23	P136795.3の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:24	H69070.4の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:25	H69070.4の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:26	H69071.4の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:27	H69071.4の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:28	H69072.4の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:29	H69072.4の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:30	H71365.2の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:31	H71365.2の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:32	P57216.9の第1のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列

10

20

30

SEQ ID NO	説明	
SEQ ID NO:33	P57216.9の第2のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:34	P69058.3の第1のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:35	P69058.3の第2のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:36	P69059.3の第1のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:37	P69059.3の第2のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	10
SEQ ID NO:38	P136795.3の第1のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:39	P136795.3の第2のポリペプチド鎖をコードする ポリヌクレオチド配列	
SEQ ID NO:40	ホモ サピエンス (<i>Homo sapiens</i>) のCD3 ϵ 鎖の 成熟アミノ酸配列	
SEQ ID NO:41	カニクイザル (<i>Macaca fascicularis</i>) のCD3 ϵ 鎖の 成熟アミノ酸配列	
SEQ ID NO:42	抗CD3 ϵ VH領域 (9C11) のアミノ酸配列	20
SEQ ID NO:43	抗CD3 ϵ VL領域 (9C11) のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:44	抗CD3 ϵ VH領域 (F12Q) のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:45	抗CD3 ϵ VL領域 (F12Q) のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:46	P69058.3の第1の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:47	P69058.3の第3の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:48	P69058.3の第4の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:49	P69059.3の第2の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:50	H69072.4の第1の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:51	H69072.4の第4の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:52	P136795.3の第2の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	30
SEQ ID NO:53	P136795.3の第3の免疫グロブリン可変領域のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:54	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:55	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:56	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:57	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:58	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:59	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	
SEQ ID NO:60	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列	

SEQ ID NO	説明
SEQ ID NO:61	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列
SEQ ID NO:62	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列
SEQ ID NO:63	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列
SEQ ID NO:64	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列
SEQ ID NO:65	半減期を増大させるペプチド挿入部のアミノ酸配列
SEQ ID NO:66	リンカーのアミノ酸配列
SEQ ID NO:67	リンカーのアミノ酸配列
SEQ ID NO:68	リンカーのアミノ酸配列
SEQ ID NO:69	リンカーのアミノ酸配列
SEQ ID NO:70	CH1領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:71	λ CL領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:72	MSLNに特異的なVLのアミノ酸配列
SEQ ID NO:73	κ CL領域のアミノ酸配列
SEQ ID NO:74	リンカーのアミノ酸配列
SEQ ID NO:75	抗HER2/CD3 ϵ 単鎖二重特異性分子のアミノ酸配列
SEQ ID NO:76	抗FOLR1/CD3 ϵ 単鎖二重特異性分子のアミノ酸配列
SEQ ID NO:77	重鎖CDR1に先行するアミノ酸配列
SEQ ID NO:78	重鎖CDR2に先行するアミノ酸
SEQ ID NO:79	重鎖CDR3に後続するアミノ酸配列
SEQ ID NO:80	軽鎖CDR3に先行するアミノ酸配列
SEQ ID NO:81	CD3 ϵ 上のエピトープの部分のアミノ酸配列
SEQ ID NO:82	抗CD3 ϵ VH領域 (12C) のアミノ酸配列
SEQ ID NO:83	抗CD3 ϵ VL領域 (12C) のアミノ酸配列
SEQ ID NO:84	抗FOLR1/CD3 ϵ ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-30056) の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:85	抗FOLR1/CD3 ϵ ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-30056) の第2のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列
SEQ ID NO:86	抗FOLR1/CD3 ϵ ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-30056) の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:87	抗FOLR1/CD3 ϵ ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-30056) の第1のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列
SEQ ID NO:88	抗FOLR1/CD3単鎖二重特異性 (PL-30055) のアミノ酸配列
SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:88の抗FOLR1/CD3 ϵ 単鎖二重特異性をコードするポリヌクレオチド配列
SEQ ID NO:90	抗Mec/CD3 ϵ 単鎖二重特異性 (P137424.7) のアミノ酸配列
SEQ ID NO:91	抗Mec/CD3 ϵ 単鎖二重特異性 (P137424.7) のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列
SEQ ID NO:92	抗CD33/CD3 ϵ 単鎖二重特異性 (P138241.3) のアミノ酸配列
SEQ ID NO:93	抗CD33/CD3 ϵ 単鎖二重特異性 (P138241.3) のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列

10

20

30

40

SEQ ID NO	説明
SEQ ID NO:94	抗CD33/CD3εヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-144537.6) の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:95	抗CD33/CD3εヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-144537.6) の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列
SEQ ID NO:96	抗CD33/CD3εヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-144537.6) の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列
SEQ ID NO:97	抗CD33/CD3εヘテロ二量体性二重特異性抗体 (PL-144537.6) の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列

10

【発明を実施するための形態】

【0024】

詳細な説明

新規な形態の二重特異性抗体が本明細書において記載される。その二重特異性抗体は、それぞれが2つの免疫グロブリン可変領域と、任意で、CH1ドメインまたはC_H1もしくはC_Hドメインのいずれかとを含む、2つの異なるポリペプチド鎖を含有する、ヘテロ二量体性分子である。全体で、これら2つの鎖は、2つの異なる結合部位を含有し、そのそれぞれが重鎖および軽鎖免疫グロブリン可変（VHおよびVL）領域を含み、それぞれが異なるタンパク質に結合する。いくつかの態様では、一方のタンパク質は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、単球、または好中球のような免疫エフェクター細胞の表面上に発現され、もう一方のタンパク質は、標的細胞、例えばがん細胞、ウイルスなどの病原体に感染している細胞、または線維性疾患、自己免疫疾患、もしくは炎症性疾患を媒介する細胞の表面上に発現される。本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、それが結合する各タンパク質に対して結合部位を1つだけ有する（すなわち、それは各タンパク質に「一価的」に結合する）ので、その結合により、それが結合するタンパク質が細胞表面上でオリゴマー化されることはない。例えば、上記の二重特異性抗体がT細胞表面上のCD3に結合するならば、CD3は、T細胞表面上でオリゴマー化されない。CD3のオリゴマー化は、T細胞の全般的活性化を引き起こすことができ、これは望ましくない場合がある。本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞を標的細胞に係留し、細胞間に密接な物理的結合を形成することによって、標的細胞に対する特異的な細胞溶解活性を誘発する。作用機序は、他の二重特異性抗体について詳細に調査された作用機序と類似であり得る。例えば、Haas et al. (2009), Immunobiology 214(6): 441-453を参照されたい。さらに、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、少なくとも1つ、任意で2つの半減期延長部分を含む。したがって、それらは、好都合な薬物動態特性を有し、2つの異なるポリペプチド鎖のみを含有するので製造は過度に複雑ではない。

20

30

【0025】

定義

本明細書において意味される「抗体」は、少なくとも1つのVH領域またはVL領域、多くの場合、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含有する、タンパク質である。したがって、「抗体」という用語は、単鎖Fv抗体（scFv、リンカーによって連結されたVHおよびVL領域を含有する）、Fab、F(ab)₂、Fab'、scFv:Fc抗体（Carayannopoulos and Capra, Ch. 9 in FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3rd ed., Paul, ed., Raven Press, New York, 1993, pp. 284-286記載）、または哺乳類に見られる天然IgG抗体などの2つの完全長重鎖および2つの完全長軽鎖を含有する完全長抗体を含む、多様な構成を有する分子を包含する。同上。そのようなIgG抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプであることができ、ヒト抗体であることができる。抗体の構造を記載しているCarayannopoulos and Capraの部分は、参照により本明細書に組み入れられる。さらに、「抗体」という用語には、ラクダおよび他のヒトコブラクダ種ならびにサメに見られる天然抗体のような、2つの重鎖を含有し軽鎖を含有しない二量体性抗体が含まれる。例えばMuldermans et al., 2001, J. Biotechnol. 74:277-302; Desmyter et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26285-90; Stre

40

50

Itsov et al. (2005), Protein Science 14: 2901-2909を参照されたい。抗体は、「単一特異性」(すなわち、1種の抗原だけに結合する)、「二重特異性」(すなわち、2種の異なる抗原に結合する)、または「多重特異性」(すなわち、2種以上の異なる抗原に結合する)であることができる。さらに抗体は、一価、二価、または多価であることができ、これは、一度にそれぞれ1つ、2つ、または複数の抗原分子に結合できることを意味する。抗体が別のタンパク質にも同様に結合し得るものの、抗体1分子が特定のタンパク質1分子のみに結合する場合、抗体は、その特定のタンパク質に「一価的」に結合する。すなわち、抗体が各タンパク質の1つの分子のみに結合する場合、抗体は、2種の異なるタンパク質に、本明細書が意味する「一価的」に結合する。そのような抗体は「二重特異性」であり、2種の異なるタンパク質のそれぞれに「一価的」に結合する。抗体は、「単量体性」であることができ、すなわち単一のポリペプチド鎖を含むことができる。抗体は、複数のポリペプチド鎖を含む(「多量体性」)ことができ、または2つ(「二量体性」)、3つ(「三量体性」)、もしくは4つ(「四量体性」)のポリペプチド鎖を含むことができる。多量体性であるならば、抗体はホモ多量体であることができ、すなわち1種のみポリペプチド鎖の2つ以上の分子を含有することができ、これは、ホモ二量体、ホモ三量体、またはホモ四量体を含む。あるいは、多量体性抗体は、ヘテロ多量体であることができ、すなわち異なる2種以上のポリペプチド鎖を含有することができ、これは、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体を含む。抗体は、多様な可能な構成を有し得、これは例えば、数ある可能な抗体構成の中でもとりわけ、それらが結合する分子を阻害または活性化し得る単一特異性一価性抗体(関連部分が参照により本明細書に組み入れられる、国際公開公報第2009/089004号および米国特許出願公開第2007/0105199号に記載)、二価単一特異性または二重特異性二量体性Fv-Fc、scFv-Fc、またはダイアボディーFc(diabody Fc)、米国特許出願公開第2009/0311253号に記載された単一特異性一価scFv-Fc/Fc'、多重特異性結合タンパク質および二重可変ドメイン免疫グロブリン(それらの関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる)、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体、ならびにBISPECIFIC ANTIBODIES, Kontermann, ed., Springer, 2011の1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14章(これらの章は、参照により本明細書に組み入れられる)に記載された二重特異性抗体についての多数の構成を含む。

【0026】

本明細書において意味される「がん細胞抗原」は、がん細胞の表面上に発現されたタンパク質である。いくつかのがん細胞抗原は、いくつかの正常細胞上にも発現され、いくつかはがん細胞に特異的である。がん細胞抗原は、がん細胞表面上に高度に発現され得る。多種多様ながん細胞抗原がある。がん細胞抗原の例には、数ある中でもとりわけ以下のヒトタンパク質: 上皮成長因子受容体(EGFR)、EGFRvIII(突然変異型EGFR)、黒色腫関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)、メソテリン(MSLN)、葉酸受容体1(FOLR1)、CD33、CDH19、および上皮成長因子2(HER2)が非限定的に含まれる。

【0027】

本明細書に使用される「化学療法」は、がん細胞に対して細胞傷害効果または細胞増殖抑制効果を有する「化学療法剤」を用いたがん患者の処置を意味する。「化学療法剤」は、細胞分裂に関与していない細胞ではなく、細胞分裂に関与している細胞を特異的に標的とする。化学療法剤は、例えばDNA複製、RNA合成、タンパク質合成、紡錘体の集合、分散、もしくは機能のような細胞分裂に密接に結び付いている過程、および/またはヌクレオチドもしくはアミノ酸のようなこれらの過程に役割を果たす分子の合成もしくは安定性を直接妨害する。したがって化学療法剤は、がん細胞および細胞分裂に関与している他の細胞の両方に対して細胞傷害効果または細胞増殖抑制効果を有する。化学療法剤は、当技術分野において周知であり、それらには、当技術分野において公知の多数のものの中でもとりわけ、例えば: アルキル化剤(例えばブスルファン、テモゾロミド、シクロホスファミド、ロムスチン(CCNU)、メチルロムスチン、ストレプトゾトシン、cis-ジアンミンジクロロ白金、アジリジニルベンゾキノン、およびチオテパ); 無機イオン(例えばシスプラチンおよびカルボプラチン); ナイトロジェンマスタード(例えばメルファラン塩酸塩、

イホスファミド、クロラムブシル、およびメクロレタミンHCl)；ニトロソウレア（例えばカルムスチン（BCNU））；抗腫瘍性抗生物質（例えばアドリアマイシン（ドキソルビシン）、ダウノマイシン、マイトマイシンC、ダウノルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、およびブレオマイシン）；植物性誘導体（例えばピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルビン、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンデシン、VP-16、およびVM-26）；代謝拮抗物質（例えばロイコボリン併用または非併用のメトトレキサート、ロイコボリン併用または非併用の5-フルオロウラシル、5-フルオロデオキシウリジン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシウレア、デオキシコホルマイシン、ゲムシタピン、およびフルダラビン）；ポドフィロトキシン（例えばエトポシド、イリノテカン、およびトポテカン）；ならびにアクチノマイシンD、ダカルバジン（DTIC）、mAMSA、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、L-アスパラギナーゼ、およびミトキサントロンが含まれる。例えば、関連部分が参照により本明細書に組み入れられるCancer: Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993)を参照されたい。アルキル化剤およびナイトロジェンマスタードは、DNAをアルキル化することによって作用し、それが鎖の巻き戻し（uncoiling）および複製を制限する。メトトレキサート、シタラビン、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル、およびゲムシタピンは、ヌクレオチドの合成を妨害する。パクリタキセルおよびピンブラスチンのような植物性誘導体は紡錘体毒である。ポドフィロトキシンはトポイソメラーゼを阻害することでDNA複製を妨害する。抗生物質であるドキソルビシン、ブレオマイシン、およびマイトマイシンは、それぞれDNAの塩基の間にインターカレートする（巻き戻しを阻害する）こと、鎖切断を引き起こすこと、およびDNAをアルキル化することによって、DNA合成を妨害する。他の作用機序には、アミノ酸のカルバモイル化（ロムスチン、カルムスチン）、およびアスパラギンブールの枯渇（アスパラギナーゼ）が含まれる。Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Edition, Section 11, Hematology and Oncology, 144. Principles of Cancer Therapy, Table 144-2 (1999)。化学療法剤の中に具体的に含まれるのは、上掲の化学療法剤によって直接影響されるのと同じ細胞過程に直接影響する化学療法剤である。

【0028】

薬物または処置は、本明細書において意味されるヘテロ二量体性二重特異性抗体と同じ全般的時間枠内で、任意で継続的に、施されるならば、その抗体と「同時に」施されることになる。例えば、患者が薬物Aを1週間に1回継続的に、および抗体を6ヶ月に1回継続的に摂取するならば、薬物Aおよび抗体が同じ日に投与されようと投与されなかりと、それらは同時に投与されることになる。同様に、抗体が1週間に1回継続的に摂取され、薬物Aが1日に1回または数回だけ投与されるならば、薬物Aおよび抗体は、本明細書に意味されるところでは、同時に投与されることになる。同様に、薬物Aおよび抗体の両方が、1ヶ月以内に1回または複数回のいずれかで短期間投与されるならば、両方の薬物が同じ月内に投与される限り、それらは本明細書に意味されるところでは、同時に投与されることになる。

【0029】

本明細書において意味される「保存的アミノ酸置換」は、類似の特性を有する別のアミノ酸によるアミノ酸の置換である。考慮される特性には、電荷および疎水性などの化学特性が含まれる。下の表1に、本明細書において意味される保存的置換であると見なされる、各アミノ酸についての置換を挙げる。

【0030】

（表1）保存的アミノ酸置換

10

20

30

40

元の残基	保存的置換
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン

10

20

【 0 0 3 1 】

本明細書において意味される「Fc領域」は、1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結された2つのポリペプチド鎖からなる二量体であり、各鎖が、ヒンジドメインの一部または全部に加えてCH2およびCH3ドメインを含む、二量体である。各ポリペプチド鎖は、「Fcポリペプチド鎖」と呼ばれる。2つのFcポリペプチド鎖を区別するために、場合により、一方は本明細書において「A鎖」と呼ばれ、もう一方は「B鎖」と呼ばれる。より具体的には、本発明を用いた使用のために企図されているFc領域は、IgG Fc領域であり、これは、哺乳類、例えばヒトのIgG1 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域、またはIgG4 Fc領域であることができる。ヒトIgG1 Fc領域の中で、少なくとも2種の対立遺伝子型が公知である。他の態様では、2つのFcポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、哺乳類Fcポリペプチドのアミノ酸配列に比べて、配列のアミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸の置換、挿入、および/または欠失により、哺乳類Fcポリペプチドのアミノ酸配列から変異していることができる。いくつかの態様では、そのような変異は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成を促進する「ヘテロ二量体化改変」、半減期を延長するFc改変、Fc 受容体 (FcR) の結合を阻害する改変、および/またはFc 受容体の結合を増強し、かつADCCを増強する改変であることができる。

30

40

【 0 0 3 2 】

本明細書において意味される「半減期を延長するFc改変」は、改変を含有しないこと以外は同一のFcポリペプチドを含有する類似タンパク質の半減期に比べて、改変されたFcポリペプチド鎖を含有するタンパク質のインビボ半減期を延長する、Fcポリペプチド鎖内の改変である。そのような改変は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の一部であるFcポリペプチド鎖中に含まれることができる。改変M252Y、S254T、およびT256E（位置252のメチオニンがチロシンに変化；位置254のセリンがトレオニンに変化；位置256のトレオニンがグルタミン酸に変化；表2に示すようにEUナンバリングにより番号付け）は、半減期を延長するFc改変であり、かつ一緒に、別々に、または任意の組み合わせで使用することができる。これらの改変および他のいくつかは、米国特許第7,083,784号に詳細

50

に記載されている。そのような改変を記載している米国特許第7,083,784号の部分は、参照により本明細書に組み入れられる。同様に、M428LおよびN434Sは、半減期を延長するFc改変であり、かつ一緒に、別々に、または任意の組み合わせで使用することができる。これらの改変および他のいくつかは、米国特許出願公開第2010/0234575号および米国特許第7,670,600号に詳細に記載されている。そのような改変を記載している米国特許出願公開第2010/0234575号および米国特許第7,670,600号の部分は、参照により本明細書に組み入れられる。加えて以下の部位：250、251、252、259、307、308、332、378、380、428、430、434、436のうちの1つにおける任意の置換は、本明細書において意味される、半減期を延長するFc改変と見なすことができる。これらの各改変またはこれらの改変の組み合わせは、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の半減期を延長するために使用することができる。半減期を延長するために使用することができる他の改変は、2012年12月17日に出願された国際出願であるPCT/US2012/070146に詳細に記載されている。そのような改変を記載しているこの出願の部分は、参照により本明細書に組み入れられる。この出願に記載されているいくつかの具体的な態様には、とりわけ、以下のアミノ酸配列：

GGCVFNMFNCGG (SEQ ID NO:54),

GGCHLPFAVCGG (SEQ ID NO:55), GGCGHEYMWCGG (SEQ ID NO:56),

GGCWPLQDYCGG (SEQ ID NO:57), GGCMQMKNKWC GG (SEQ ID NO:58),

GGCDGR TKYCGG (SEQ ID NO:59), GG CALYPTNCGG (SEQ ID NO:60),

GGCGKHWHQCGG (SEQ ID NO:61), GGCHSFKHFC GG (SEQ ID NO:62),

GGCQGMWTWCGG (SEQ ID NO:63), GGCAQQWHHEYCGG (SEQ ID NO:64), および

GGCERFHHACGG (SEQ ID NO:65)

を含む、位置384と385（表2に示すようなEUナンバリング）との間の半減期を延長する挿入部が含まれる。そのような挿入部を含有するヘテロ二量体性二重特異性抗体が企図されている。

【0033】

本明細書において意味される「半減期延長部分」は、半減期延長部分を有さないタンパク質のインビボ半減期に比べて、それを結合させたタンパク質のインビボ半減期を延長する分子である。半減期を測定するための方法は、当技術分野において周知である。半減期を確認するための方法は、実施例9に開示されている。半減期延長部分は、ポリペプチド、例えばFcポリペプチド鎖、またはアルブミンに結合することができるポリペプチドであることができる。アルブミンに結合するように操作されたヒトフィブロネクチンIII型（Fn3）ドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:1に提供され、多様なヒトIgG Fcポリペプチド配列は、SEQ ID NO:2～5に示される。代替的な態様では、半減期延長部分は、非ポリペプチド分子であることができる。例えば、ポリエチレングリコール（PEG）分子は、半減期延長部分であることができる。

【0034】

「ヘテロ二量体化改変」は、一般に、ヘテロ二量体性Fc領域の形成、すなわちFc領域のA鎖およびB鎖が同一のアミノ酸配列を有さない、Fc領域の形成を促進する、Fc領域のA鎖およびB鎖における改変を表す。そのような改変は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の一部であるFcポリペプチド鎖内に含まれることができる。ヘテロ二量体化改変は、非対称性であることができ、すなわち、ある改変を有するA鎖は、異なる改変を有するB鎖と対形成することができる。これらの改変は、ヘテロ二量体化を促進し、かつホモ二量体化に不利に作用する。ヘテロ二量体またはホモ二量体が形成したかどうかは、状況によりポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定されるサイズの差によって、または抗体、もしくは分子タグを含むヘテロ二量体のある部分を認識する他の分子による結合を含む、異なる荷電もしくは生物物理的特徴のような他の適切な手段によって評価することができる。そのような対形成するヘテロ二量体化改変の一例は、いわゆる「ノブ（knob

）およびホール（hole）」置換である。例えば、そのような突然変異を記載している部分が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,695,936号および米国特許出願公開第2003/0078385号を参照されたい。本明細書において意味されるように、1対のノブおよびホール置換を含有するFc領域は、A鎖に1つの置換を含有し、B鎖に別の置換を含有する。例えば、以下のIgG1 Fc領域のAおよびB鎖におけるノブおよびホール置換は、未改変のAおよびB鎖で見られるものに比べてヘテロ二量体形成を増大させることが見出された：1）一方の鎖にY407Tおよびもう一方にT366Y；2）一方の鎖にY407Aおよびもう一方にT366W；3）一方の鎖にF405Aおよびもう一方にT394W；4）一方の鎖にF405Wおよびもう一方にT394S；5）一方の鎖にY407Tおよびもう一方にT366Y；6）一方の鎖にT366YおよびF405Aならびにもう一方にT394WおよびY407T；7）一方の鎖にT366WおよびF405Wならびにもう一方にT394SおよびY407A；8）一方の鎖にF405WおよびY407Aならびにもう一方にT366WおよびT394S；ならびに9）Fcの一方のポリペプチドにT366Wならびにもう一方にT366S、L368A、およびY407V。この突然変異表記方法は、以下のように説明することができる。EUナンバリングシステム（Edelman et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. 63:78-85に発表されている；下の表2も参照されたい）を用いて、CH3領域中の所与の位置に通常存在するアミノ酸（一文字コードを使用）にEU位置が続き、これにその位置に存在する代替のアミノ酸が続く。例えば、Y407Tは、通常、EU位置407に存在するチロシンがトレオニンによって置換されていることを意味する。代替的にまたはそのような改変に加えて、新たなジスルフィド架橋を生み出す置換がヘテロ二量体の形成を促進することができる。例えば、そのような突然変異を記載している部分が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2003/0078385号を参照されたい。IgG1 Fc領域におけるそのような改変には、例えば、以下の置換：一方のFcポリペプチド鎖にY349Cおよびもう一方にS354C；一方のFcポリペプチド鎖にY349Cおよびもう一方にE356C；一方のFcポリペプチド鎖にY349Cおよびもう一方にE357C；一方のFcポリペプチド鎖にL351Cおよびもう一方にS354C；一方のFcポリペプチド鎖にT394Cおよびもう一方にE397C；または一方のFcポリペプチド鎖にD399Cおよびもう一方にK392C、が含まれる。同様に、例えばC_H3-C_H3界面における、1つまたは複数の残基の荷電を変更する置換は、国際公開公報第2009/089004号に説明されているようにヘテロ二量体の形成を増強することができる。そのような置換を記載している該公報の部分は、参照により本明細書に組み入れられる。そのような置換は、本明細書において「電荷対置換」と呼ばれ、1対の電荷対置換を含有するFc領域は、A鎖中の1つの置換およびB鎖中の別の置換を含有する。電荷対置換の全般的な例には、以下：1）一方の鎖中のK409DまたはK409Eに加えてもう一方におけるD399KまたはD399R；2）一方の鎖中のK392DまたはK392Eに加えてもう一方におけるD399KまたはD399R；3）一方の鎖中のK439DまたはK439Eに加えてもう一方におけるE356KまたはE356R；および4）一方の鎖中のK370DまたはK370Eに加えてもう一方におけるE357KまたはE357Rが含まれる。加えて、両方の鎖中の置換R355D、R355E、K360D、またはK360Rは、他のヘテロ二量体化改変と共に使用される場合にヘテロ二量体を安定化することができる。特定の電荷対置換は、単独でまたは他の電荷対置換と一緒に使用することができる。単一对の電荷対置換およびその組み合わせの具体例には、以下：1）一方の鎖中のK409Eに加えてもう一方におけるD399K；2）一方の鎖中のK409Eに加えてもう一方におけるD399R；3）一方の鎖中のK409Dに加えてもう一方におけるD399K；4）一方の鎖中のK409Dに加えてもう一方におけるD399R；5）一方の鎖中のK392Eに加えてもう一方におけるD399R；6）一方の鎖中のK392Eに加えてもう一方におけるD399K；7）一方の鎖中のK392Dに加えてもう一方におけるD399R；8）一方の鎖中のK392Dに加えてもう一方におけるD399K；9）一方の鎖中のK409DおよびK360Dに加えてもう一方におけるD399KおよびE356K；10）一方の鎖中のK409DおよびK370Dに加えてもう一方におけるD399KおよびE357K；11）一方の鎖中のK409DおよびK392Dに加えてもう一方におけるD399K、E356K、およびE357K；12）一方の鎖中のK409DおよびK392Dならびにもう一方におけるD399K；13）一方の鎖中のK409DおよびK392Dに加えてもう一方におけるD399KおよびE356K；14）一方の鎖中のK409DおよびK392Dに加えてもう一方におけるD399KおよびD357K；15）一方の鎖中のK409DおよびK370Dに加えてもう一方におけるD399KおよびD357K；16）一方の鎖中のD399Kに加えてもう一方にお

10

20

30

40

50

けるK409DおよびK360D；ならびに17) 一方の鎖中のK409DおよびK439Dに加えてもう一方におけるD399KおよびE356K、が含まれる。これらのヘテロ二量体化改変のいずれかを、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体のFc領域に使用することができる。

【0035】

本明細書において意味される「Fc Rの結合を阻害する改変」は、例えばALPHALISA（登録商標）に基づく競合結合アッセイ（PerkinElmer, Waltham, MA）によって測定されるようなFc RIIA、Fc RIIB、および/またはFc RIIIAの結合を阻害する、Fcポリペプチド鎖内の1つまたは複数の挿入、欠失、または置換である。そのような改変は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の一部であるFcポリペプチド鎖内に含まれることができる。より具体的には、Fc 受容体（Fc R）の結合を阻害する改変には、L234A、L235A、またはN297における任意の置換を含む、N297におけるグリコシル化を阻害する任意の改変が含まれる。加えて、N297におけるグリコシル化を阻害する改変と併せて、追加的なジスルフィド架橋を生み出すことによって二量体性Fc領域を安定化する追加的な改変も企図されている。Fc Rの結合を阻害する改変のさらなる例には、一方のFcポリペプチド鎖中のD265A改変およびもう一方のFcポリペプチド鎖中のA327Q改変が含まれる。

【0036】

本明細書において意味される「ADCCを増強する改変」は、抗体依存性細胞性細胞傷害作用（ADCC）を増強するFcポリペプチド鎖内の1つまたは複数の挿入、欠失、または置換である。そのような改変は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の一部であるFcポリペプチド鎖中に含まれることができる。多数のそのような改変が、国際公開公報第2012/125850号に記載されている。そのような改変を記載しているこの出願の部分は、参照により本明細書に組み入れられる。そのような改変は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の一部であるFcポリペプチド鎖中に含まれることができる。ADCCアッセイは、以下のように行うことができる。細胞表面上に、高い量およびより低い量のがん細胞抗原を発現する細胞系を標的細胞として使用することができる。これらの標的細胞を、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）で標識し、次にリン酸緩衝食塩水（PBS）で1回洗浄し、その後V形状のウェルを有する96ウェルマイクロタイタープレート中に入れることができる。精製された免疫エフェクター細胞、例えばT細胞、NK細胞、マクロファージ、単球、または末梢血単核細胞（PBMC）を、各ウェルに添加することができる。がん抗原に結合し、被験改変を含有する単一特異性抗体、およびアイソタイプが一致する対照抗体を1：3系列で希釈してウェルに添加することができる。細胞を、5%CO₂で3.5時間、37 °Cでインキュベーションすることができる。細胞を遠心沈殿し、それを、死細胞を染色する色素TO-PRO（登録商標）-3ヨウ化物（Molecular Probes, Inc. Corporation, Oregon, USA）を含む1×FACS緩衝液（0.5%ウシ胎児血清（FBS）を含有する1×リン酸緩衝食塩水（PBS））中に再懸濁し、その後、蛍光標示式細胞分取（FACS）によって分析することができる。次式を用いて細胞殺滅率を計算することができる：

（二重特異性の存在下での腫瘍細胞の溶解率 - 二重特異性の非存在下での腫瘍細胞の溶解率） / （総細胞溶解率 - 二重特異性の非存在下での腫瘍細胞の溶解率）

総細胞溶解は、エフェクター細胞および標識された標的細胞を含有する試料を二重特異性分子非存在下で80%冷メタノールを用いて溶解することによって決定される。ADCCを増強する例示的な改変には、Fc領域のAおよびB鎖中の以下の改変が含まれる：（a）A鎖がQ311MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、E294L、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（b）A鎖がE233L、Q311M、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、E294L、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（c）A鎖がL234I、Q311M、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、E294L、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（d）A鎖がS298TおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（e）A鎖がA330MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（f）A鎖がA330FおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；（g）A鎖がQ311M、A330M、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、E

294L、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(h) A鎖がQ311M、A330F、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、E294L、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(i) A鎖がS298T、A330M、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(j) A鎖がS298T、A330F、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(k) A鎖がS239D、A330M、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(l) A鎖がS239D、S298T、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(m) A鎖がK334V置換を含み、かつB鎖がY296WおよびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(n) A鎖がK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、Y296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(o) A鎖がL235S、S239D、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(p) A鎖がL235S、S239D、およびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、Y296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(q) A鎖がQ311MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、F243V、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(r) A鎖がQ311MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(s) A鎖がS239DおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(t) A鎖がS239DおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、Y296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(u) A鎖がF243VおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(v) A鎖がF243VおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、Y296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(w) A鎖がE294LおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、K290Y、およびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；(x) A鎖がE294LおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234Y、Y296W、およびS298C置換を含むか、もしくはその逆である；(y) A鎖がA330MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がL234YおよびY296W置換を含むか、もしくはその逆である；または(z) A鎖がA330MおよびK334V置換を含み、かつB鎖がK290YおよびY296W置換を含むか、もしくはその逆である。

【0037】

本明細書において意味される「IgG抗体」は、本質的に、2つの免疫グロブリンIgG重鎖、および または 軽鎖であり得る2つの免疫グロブリン軽鎖からなる抗体である。より具体的には、重鎖は、VH領域、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域を含有し、一方で軽鎖は、VL領域およびCL領域を含有する。そのような免疫グロブリン領域の多数の配列が、当技術分野において公知である。例えば、Kabat et al. in SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991を参照されたい。Kabatらにおいて開示されたIgG抗体由来領域の配列は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0038】

本明細書において意味される「免疫エフェクター細胞」は、例えば、T細胞、NK細胞、単球、マクロファージ、または好中球を含める、細胞溶解性免疫応答の媒介に関与する細胞である。本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞の表面に発現されるタンパク質の一部である抗原に結合する。そのようなタンパク質は、本明細書において「エフェクター細胞タンパク質」と呼ばれる。

【0039】

本明細書において意味される「免疫グロブリン重鎖」は、本質的に、VH領域、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域（この順序で）、およびいくつかのアイソタイプにおいて任意でCH3領域下流の領域からなる。公知または天然の免疫グロブリン重鎖アミノ酸配列に比べて、アミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸のアミノ酸置換、挿入、および/または欠失を含有する、免疫グロブリン重鎖の近縁変異体は、免疫グロブリン重鎖によって意味されるものに包含される。

【0040】

10

20

30

40

50

本明細書において意味される「免疫グロブリン軽鎖」は、本質的に、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常ドメイン（CL）からなる。公知または天然の免疫グロブリン軽鎖アミノ酸配列に比べて、アミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸のアミノ酸置換、挿入、および/または欠失を含有する、免疫グロブリン軽鎖の近縁変異体は、免疫グロブリン軽鎖によって意味されるものに包含される。

【0041】

本明細書において意味される「免疫グロブリン可変領域」は、VH領域、VL領域、またはそれらの変異体である。公知または天然の免疫グロブリン可変領域アミノ酸配列に比べて、アミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸のアミノ酸置換、挿入、および/または欠失を含有する、免疫グロブリン可変領域の近縁変異体は、免疫グロブリン可変領域によって意味されるものに包含される。例えばKabat et al. in SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991に開示されたもののよう

10

【0042】

免疫グロブリン可変領域は、相補性決定領域1（CDR1）、相補性決定領域2（CDR2）、および相補性決定領域3（CDR3）として公知の3つの超可変領域を含有する。これらの領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。CDRは、可変性がより小さなフレームワーク領域（FR1～FR4）内に埋め込まれている。免疫グロブリン可変領域内のこれらの小領域の順序は以下の通りである：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫グロブリン可変領域の多数の配列は、当技術分野において公知である。例えば、Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991を参照されたい。

20

【0043】

CDRは、以下の方法でVH領域配列中に位置づけることができる。CDR1は、成熟VH領域のおよそ残基31番から始まり、通常は約5～7アミノ酸長であり、CDR1には、ほぼ常にCys-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx（SEQ ID NO:77）[式中、「Xxx」は任意のアミノ酸である]が先行する。重鎖CDR1に続く残基は、ほぼ常にトリプトファンであり、多くの場合にTrp-Val、Trp-Ile、またはTrp-Alaである。ほぼ常にアミノ酸14個が、CDR1における最終残基とCDR2における最初の残基との間にあり、CDR2は、典型的にはアミノ酸16～19個を含有する。CDR2の直前にLeu-Glu-Trp-Ile-Gly（SEQ ID NO:78）がある場合があり、直後にLys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Alaがある場合がある。他のアミノ酸がCDR2に先行または後続し得る。ほぼ常に、CDR2中の最終残基とCDR3中の最初の残基との間にアミノ酸32個があり、CDR3は、約3～25残基長であることができる。Cys-Xxx-Xxxは、ほぼ常にCDR3の直前にあり、Trp-Gly-Xxx-Gly（SEQ ID NO:79）は、ほぼ常にCDR3に後続する。

30

【0044】

軽鎖CDRは、以下の方法でVL領域中に位置づけることができる。CDR1は、成熟抗体のおよそ残基24番から始まり、通常は約10～17アミノ酸長である。CDR1には、ほぼ常にCysが先行する。ほぼ常にアミノ酸15個が、CDR1の最終残基とCDR2の最初の残基との間にあり、CDR2は、ほぼ常に7残基長である。CDR2には、典型的にはIle-Tyr、Val-Tyr、Ile-Lys、またはIle-Pheが先行する。ほぼ常に、CDR2とCDR3との間に32残基があり、CDR3は通常、約7～10アミノ酸長である。CDR3には、ほぼ常にCysが先行し、通常はPhe-Gly-Xxx-Gly（SEQ ID NO:80）が後続する。

40

【0045】

本明細書において意味される「リンカー」は、ヘテロ二量体性二重特異性抗体に関連して2つの免疫グロブリン可変領域であり得る2つのポリペプチドを連結するペプチドである

50

。リンカーは、2～30アミノ酸長であることができる。いくつかの態様では、リンカーは、2～25、2～20、または3～18アミノ酸長であることができる。いくつかの態様では、リンカーは、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5アミノ酸長以下のペプチドであることができる。他の態様では、リンカーは、5～25、5～15、4～11、10～20、または20～30アミノ酸長であることができる。他の態様では、リンカーは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸長であることができる。例示的なリンカーには、例えば、数ある中でもとりわけ、アミノ酸配列

TVAAP (SEQ ID NO:66), ASTKGP (SEQ ID NO:67), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:68),
GGGGSAAA (SEQ ID NO:69), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:74), および AAA

が含まれる。

【0046】

本明細書記載の細胞の細胞溶解アッセイ物への0.001pM～20000pMの量のヘテロ二量体性二重特異性抗体の添加が、標的細胞の細胞溶解を効果的に誘発するとき、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、本明細書において意味されるように「免疫エフェクター細胞による標的細胞の細胞溶解を媒介する」。

【0047】

「非化学療法的抗腫瘍剤」は、化学療法剤以外の、がん細胞に対して細胞傷害効果または細胞増殖抑制性効果を有する化学薬剤、化合物、または分子である。しかし、非化学療法的抗腫瘍剤は、ホルモンまたは成長因子に対する受容体を含む細胞表面受容体のような、細胞分裂に間接的に影響する分子と直接相互作用することを標的とし得る。しかし、非化学療法的抗腫瘍剤は、例えばDNA複製、RNA合成、タンパク質合成、または紡錘体の機能、集合、もしくは分散などの、細胞分裂に密接に結び付いている過程を直接には妨害しない。非化学療法的抗腫瘍剤の例には、数ある可能な非化学療法的抗腫瘍剤の中でもとりわけ、Bcl2阻害剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤、抗アンドロゲン化合物、インターフェロン、ヒ素、レチノイン酸、レチノイン酸誘導体、腫瘍特異抗原を標的とした抗体、およびBcr-Ablチロシンキナーゼ阻害剤（例えば、Novartis (New York and New Jersey, USA and Basel, Switzerland) によって商品名GLEEVEC（商標）で販売されている小分子STI-571）が含まれる。

【0048】

「標的細胞」は、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体が結合し、かつ疾患の媒介に関与する細胞である。場合により、標的細胞は、通例、免疫応答の媒介に関与するが、疾患の媒介にも関与する細胞であることができる。例えばB細胞リンパ腫において、通例、免疫応答の媒介に関与するB細胞は、標的細胞であることができる。いくつかの態様では、標的細胞は、がん細胞、病原体に感染している細胞、または自己免疫疾患もしくは炎症性疾患の媒介に関与する細胞である。ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、標的細胞の表面上に提示されるタンパク質、おそらくは高発現タンパク質、または体内の他の種類の細胞もしくは組織に比べて標的細胞において豊富である制限的な発現パターンを有するタンパク質である、「標的細胞タンパク質」上の抗原への結合を介して標的細胞に結合することができる。

【0049】

「腫瘍量」は、がんを患う患者における生存がん細胞数、腫瘍部位数、および/または腫瘍サイズを表す。腫瘍量の減少は、例えば、患者の血液もしくは尿中の腫瘍関連抗原もしくはタンパク質の量における減少、腫瘍細胞数もしくは腫瘍部位数における減少、および/または1つもしくは複数の腫瘍のサイズにおける減少として観測することができる。

【0050】

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体の「治療有効量」は、例えば、がん患者の腫瘍量を減少もしくは除去する効果、または処置のためにそのタンパク質が使用される任意の病状の症状を減少もしくは除去する効果を有する量である。治療有効量は、その状

10

20

30

40

50

態の全ての症状を完全に除去する必要はなく、1つもしくは複数の症状の重症度を低下させるか、または状態が処置された後にいくらかの頻度で発症する可能性があるより重篤な症状もしくはより重篤な疾患の発症を遅らせ得る。

【0051】

本明細書において言及された任意の疾患の「処置」は、疾患の少なくとも1つの症状の軽減、疾患の重症度の低下、または場合によりその疾患に随伴し得るもしくは少なくとも1つの他の疾患に至り得る、より重篤な症状への疾患の進行の遅延もしくは予防を包含する。処置は、疾患が完全に治癒されることを意味しなくてもよい。有用な治療剤は、疾患の重症度を低下させるか、疾患もしくはその処置に関連する1つもしくは複数の症状の重症度を低下させるか、または状態が処置された後にいくらかの頻度で発症する可能性がある、より重篤な症状もしくはより重篤な疾患の発症を遅らせさえすればよい。

10

【0052】

指定された免疫グロブリン可変領域のVH/VL対が「IgG抗体またはscFv抗体の一部であるときに」、それらが標的細胞および/または免疫エフェクター細胞に結合できると言われた場合、両方の重鎖中に指定されたVH領域および両方の軽鎖中に指定されたVL領域を含有するIgG抗体、またはVH/VL対を含有するscFv抗体が、標的細胞または免疫エフェクター細胞に結合できることが意味される。結合アッセイは、実施例2に記載されている。当業者は、当技術分野における知識を考慮すれば、所望の配列を含有するIgGまたはscFv抗体を構築することもできる。

20

【0053】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体

最も一般的な意味において、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、一緒になって2つの異なる抗原に結合することができる、異なるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。加えて、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、半減期延長部分を含むので、任意で数時間から数日の間、または数日から1週間もしくは数週間の半減期を含む、調整可能な薬物動態特性を有する。一態様では、第1のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCH1領域を含み、それに半減期延長部分が続く、第2のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCL領域を含む。任意で、CL領域には、半減期延長部分が続くことができる。この構造を図1(1)に例示する。代替的な一態様では、第2のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCL領域および次に半減期延長部分を含み、第1のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCH1領域を含み、それに半減期延長部分が続く場合もあるし、または続かない場合もある。いくつかの態様では、半減期延長部分は、第1および第2のポリペプチド鎖の両方に、それぞれCH1領域およびCL領域の後に存在するFcポリペプチド鎖である。他の態様では、ポリペプチド鎖のどちらも、CH1領域もCL領域も含まず、少なくとも1つのポリペプチド鎖が、半減期延長部分を含む。いくつかのそのような態様では、両方のポリペプチド鎖は、Fcポリペプチド鎖を含む。

30

【0054】

より詳細な態様は、どの免疫グロブリン可変領域がVHまたはVL領域であるのか、どれが結合して、免疫エフェクター細胞または標的細胞の表面上に発現されたタンパク質の一部であり得る抗原に対する結合部位を形成できるかを詳述している。一般に、抗体の抗原結合部分は、VHおよびVL領域の両方を含むとはいえ、場合により、VHまたはVL領域は、パートナーなしに抗原に結合できる。例えば米国特許出願公開第2003/0114659号を参照されたい。図1(2)に、第1のポリペプチド鎖(CH1領域を含有する)と呼ばれるものにおける2つの可変領域が2つの異なるVH領域であり、第2のポリペプチド鎖(CL領域を含有する)と呼ばれるものにおける2つの可変領域が2つの異なるVL領域である態様を例示する。この態様では、第1および第2のポリペプチド鎖の両方における2つの可変領域の間のリンカーは、アミノ酸12個よりも短い。結果として、可変領域は、「平行に」対形成して抗原結合部位を形成することができる。すなわち、第1のポリペプチド鎖上の第1のVH領域(VH1)は、第2のポリペプチド鎖上の第1のVL領域(VL1)と対形成して、第1の抗原に対する結合部

40

50

位を形成することができる。さらに、第1のポリペプチド上の第2のVH領域（VH2）は、第2のポリペプチド鎖上の第2のVL領域（VL2）と「平行に」結合して、第2の抗原結合部位に対する結合部位を形成することができる。図1（3）に示された態様は、2つのVH領域および2つのVL領域の順序が逆向きである以外は同様である。可変領域は、平行に対形成して抗原結合部位を形成することができる。

【0055】

「平行」のVH/VL相互作用が必要とされる他の態様は、第1のポリペプチド鎖上に2つのVL領域および第2のポリペプチド鎖上に2つのVH領域を有することができる。「平行」の相互作用が必要とされる別の態様では、第1のポリペプチド鎖は、VH領域に続いてVL領域を含むことができ、第2のポリペプチド鎖は、VL領域に続いてVH領域を含むことができる。また同様に、第1のポリペプチド鎖は、VL領域に続いてVH領域を含むこともでき、第2のポリペプチド鎖は、VH領域に続いてVL領域を含むこともできる。

10

【0056】

図1（4）に、第1のポリペプチド鎖上の第1の可変領域がVH1領域であり、それにVL2領域が続く態様を示す。第2のポリペプチド鎖上では、VH2領域にVL1領域が続く。この構成では、第1のポリペプチド鎖上の第1の可変領域は、第2のポリペプチド鎖上の第2の可変領域と結合して、第1の抗原に対する結合部位を形成しなければならない。同様に、第1のポリペプチド鎖上の第2の可変領域は、第2のポリペプチド鎖上の第1の可変領域と結合して、第2の抗原に対する結合部位を形成しなければならない。この状況は、本明細書において「斜め（diagonal）」の相互作用と呼ばれる。態様1（5）および1（6）における第1および第2のポリペプチド鎖上の可変領域の順序は異なるが、これらの態様における可変領域も、斜めの相互作用で対形成して、抗原結合部位を形成しなければならない。

20

【0057】

各ポリペプチド鎖上の2つの免疫グロブリン可変領域の間はペプチドリンカーであり、そのリンカーは両方のポリペプチド鎖上で同じまたは異なることができる。リンカーは、抗体の構造に役割を果たすことができる。リンカーが十分に短いならば、すなわち14、13、12または10アミノ酸長未満または以下ならば、それは、単一のポリペプチド鎖上の2つの可変領域が相互作用して抗原結合部位を形成するために十分な柔軟性を与えない。したがって、短いリンカーは、可変領域が同じポリペプチド鎖上の可変領域と相互作用するのではなく、他のポリペプチド鎖上の可変領域と相互作用して、抗原結合部位を形成する可能性を高くする。リンカーが少なくとも15アミノ酸長ならば、それは、可変領域が同じポリペプチド鎖上の別の可変領域と相互作用して抗原結合部位を形成することを可能にする。

30

【0058】

第1のポリペプチド鎖上のCH1領域と、そのすぐ上流の可変領域との間にリンカーがある場合もあるし、またはリンカーがない場合もある。同様に、第2のポリペプチド鎖上のCL領域と、そのすぐ上流のリンカーとの間にリンカーがある場合もあるし、またはリンカーがない場合もある。これらのリンカーは、存在するならば、1～50、20～40、1～5、1～10、または10～20アミノ酸長であることができる。あるいは、これらのリンカーは、存在しなくてもよい。

40

【0059】

半減期延長部分は、例えば、Fcポリペプチド、アルブミン、アルブミン断片、アルブミンもしくは胎児性Fc受容体（FcRn）に結合する部分、アルブミンもしくはその断片に結合するように操作されたフィブロネクチン誘導体、ペプチド、単ドメインタンパク質断片、または血清中半減期を増大できる他のポリペプチドであることができる。代替の態様では、半減期延長部分は、例えばポリエチレングリコール（PEG）のような非ポリペプチド分子であることができる。使用することもできるヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4 Fcポリペプチドの配列は、SEQ ID NO:2～5に提供される。1つもしくは複数のヘテロ二量体化改変、半減期を延長する1つもしくは複数のFc改変、ADCCを増強する1つもしくは複数の改変、および/またはFc受容体（FcR）の結合を阻害する1つもしくは複数の改変を含

50

有するこれらの配列の変異体も、配列のアミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸の欠失、挿入、または置換を含有する他の近縁変異体として企図されている。

【0060】

アルブミンと結合するように操作されたヒトフィブロネクチンIII型(Fn3)誘導体の配列をSEQ ID NO:1に提供する。当技術分野において公知のように、ヒトフィブロネクチンII型(Fn3)ドメインのループは、他の標的に結合するように操作することができる。Koida (1998), J Mol Biol.: 284(4): 1141-51。半減期延長部分としてアルブミンに結合できる、操作されたフィブロネクチンIII型ドメインを含有するヘテロ二量体性二重特異性抗体を構成するアミノ酸配列の例示的な対には、以下: SEQ ID NO:6および7; SEQ ID NO:8および9; SEQ ID NO:10および11; SEQ ID NO:12および13、ならびにSEQ ID NO:14および15が含まれる。

10

【0061】

半減期延長部分は、抗体のFc領域であることができる。その場合、第1のポリペプチド鎖は、CH1領域の後にFcポリペプチド鎖を含有することができ、第2のポリペプチド鎖は、CL領域の後にFcポリペプチド鎖を含有することができ、あるいは、1つのポリペプチド鎖のみが、Fcポリペプチド鎖を含有することができ、CH1領域とFc領域との間、および/またはCL領域とFc領域との間にリンカーが存在することができるが、その必要性はない。上に説明されたように、Fcポリペプチド鎖は、ヒンジ領域の全部または一部に続いてCH2およびCH3領域を含む。Fcポリペプチド鎖は、哺乳類(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒトコブラクダ、または新世界もしくは旧世界ザル)、鳥類、またはサメ起源であることができる。加えて、上に説明されたように、Fcポリペプチド鎖は、限られた数の改変を含むことができる。例えば、Fcポリペプチド鎖は、1つもしくは複数のヘテロ二量体化改変、Fc Rへの結合を阻害もしくは増強する1つもしくは複数の改変、またはFcRnへの結合を増大させる1つまたは複数の改変を含むことができる。Fc領域を含有するヘテロ二量体性二重特異性抗体を構成するポリペプチド鎖対の例示的なアミノ酸配列には、以下の配列対が含まれる: SEQ ID NO:16および17; SEQ ID NO:18および19; SEQ ID NO:20および21; SEQ ID NO:84および86; ならびにSEQ ID NO:94および96。

20

【0062】

いくつかの態様では、Fcポリペプチドのアミノ酸配列は、哺乳類、例えばヒトのアミノ酸配列であることができる。Fcポリペプチドのアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4のようなIgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMであることができる。下の表2に、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4 Fcポリペプチド鎖のアミノ酸配列のアライメントを示す。

30

【0063】

(表2) ヒトIgG Fcポリペプチド鎖のアミノ酸配列

IgG1	-----					
IgG2	-----					
IgG3	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP					
IgG4	-----					
	225	235	245	255	265	275
	*	*	*	*	*	*
IgG1	EPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF					
IgG2	ERKCCVE---CPPCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF					
IgG3	EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF					
IgG4	ESKYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF					
	285	295	305	315	325	335
	*	*	*	*	*	*
IgG1	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT					
IgG2	NWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT					
IgG3	KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT					
IgG4	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT					
	345	355	365	375	385	395
	*	*	*	*	*	*
IgG1	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP					
IgG2	ISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP					
IgG3	ISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP					
IgG4	ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP					
	405	415	425	435	445	
	*	*	*	*	*	
IgG1	PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:2)					
IgG2	PMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:3)					
IgG3	PMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:4)					
IgG4	PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:5)					

【 0 0 6 4 】

表2に示されるナンバリングは、EUナンバリングシステムに従い、IgG1抗体の定常領域の連続ナンバリングに基づく。Edelman et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 78-85. したがって、このナンバリングは、IgG3ヒンジの追加的な長さには十分には対応していない。それでもなお、このナンバリングは、Fc領域中の位置を表すために当技術分野においてまだ一般に使用されているので、本明細書でFc領域中の位置を示すために使用される。IgG1 Fcポリペプチド、IgG2 Fcポリペプチド、およびIgG4 Fcポリペプチドのヒンジ領域は、位置約216から約230までに及ぶ。IgG2およびIgG4のヒンジ領域がIgG1のヒンジよりもそれぞれアミノ酸3個短いことがアライメントから明らかである。IgG3のヒンジはかなり長く、上流の追加的なアミノ酸47個に及ぶ。CH2領域は位置約231～340に及び、CH3領域は位置約341～447に及ぶ。

【 0 0 6 5 】

Fcポリペプチドの天然アミノ酸配列は、わずかに変異することができる。そのような変異は、天然Fcポリペプチド鎖の配列のアミノ酸100個あたり10個以下の単一アミノ酸の挿入、欠失または置換を含むことができる。置換がある場合、それらは、上記と同義の保存的アミノ酸置換であることができる。第1および第2のポリペプチド鎖上のFcポリペプチドは、アミノ酸配列が異なることができる。いくつかの態様では、それらは、ヘテロ二量体の形成を促進する「ヘテロ二量体化改変」、例えば上記と同義の電荷対置換を含むことができる。さらに、ヘテロ二量体性抗体のFcポリペプチド部分は、また、Fc Rの結合を阻害または増強する改変を含有することができる。そのような突然変異は、上記に、およびXu et al. (2000), Cell Immunol. 200(1): 16-26に記載されており、その関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる。Fcポリペプチド部分は、また、例えば、米国特許第7,037,784号、同第7,670,600号、同第7,371,827号、米国特許出願公開第2010/0234575号、および国際出願PCT/US2012/070146（これら全ての関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる）に記載されたものを含める、上記の「半減期を延長するFc改変」を含むことができる。さらに、Fcポリペプチドは、上記と同義の「ADCCを増強する改変」を含むことができる。

【 0 0 6 6 】

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、エフェクター細胞タンパク質の一部である抗原を介して免疫エフェクター細胞に結合することができ、標的細胞タンパク質の一部である抗原を介して標的細胞に結合することができる。いくつかのエフェクター細胞タンパク質が下に詳細に記載されている。同様に、いくつかの可能な標的細胞タンパク質も下に記載されている。ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、エフェクター細胞タンパク質と標的細胞タンパク質との任意の組み合わせに結合することができ、それらは、二重特異性ヘテロ二量体性抗体によって非共有結合的に連結することができる。

【 0 0 6 7 】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸

10

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸が提供される。VH、VL、ヒンジ、CH1、CH2、CH3、およびCH4領域を含める免疫グロブリン領域をコードする多数の核酸配列が、当技術分野において公知である。例えば、Kabat et al. in SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991を参照されたい。本明細書において提供された指針を用いて、当業者は、そのような核酸配列および/または当技術分野において公知の他の核酸配列を組み合わせ、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸配列を作製することもできる。ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする例示的な核酸の対には、以下：SEQ ID NO:32および33；SEQ ID NO:34および35；SEQ ID NO:36および37；SEQ ID NO:38および39、SEQ ID NO:85および87；ならびにSEQ ID NO:95および97が含まれる。

20

【 0 0 6 8 】

加えて、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸配列は、本明細書において提供されたアミノ酸配列および当技術分野における知識に基づき、当業者が決定することができる。特定のアミノ酸配列をコードするクローニングしたDNAセグメントを生産する、より伝統的な方法以外に、とりわけDNA2.0 (Menlo Park, CA, USA) およびBlueHeron (Bothell, WA, USA) のような企業が、現在、化学合成され、遺伝子サイズが調整された任意の所望の配列のDNAを注文に応じて日常的に生産することで、そのようなDNAの生産工程を能率化させている。

【 0 0 6 9 】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体を作製する方法

30

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、当技術分野において周知の方法を用いて作製することができる。例えば、ヘテロ二量体性二重特異性抗体の2つのポリペプチド鎖をコードする核酸は、例えばトランスフォーメーション、トランスフェクション、エレクトロポレーション、核酸をコーティングした微粒子を用いた微粒子銃などのような多様な公知の方法により培養宿主細胞に導入することができる。いくつかの態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入される前に、宿主細胞における発現に適切なベクター中に挿入することができる。典型的には、そのようなベクターは、挿入された核酸の発現をRNAおよびタンパク質レベルで可能にする配列エレメントを含有することができる。そのようなベクターは、当技術分野において周知であり、多くが市販されている。核酸を含有する宿主細胞は、細胞による核酸の発現を可能にするような条件下で培養することができ、結果として生じたヘテロ二量体性二重特異性抗体は、細胞集団または培地から収集することができる。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、インビボで、例えば植物の葉（例えばScheller et al. (2001), Nature Biotechnol. 19: 573-577およびその中に引用された参考文献参照）、鳥の卵（例えばZhu et al. (2005), Nature Biotechnol. 23: 1159-1169およびその中に引用された参考文献参照）、または哺乳類の乳汁（例えばLaible et al. (2012), Reprod. Fertil. Dev. 25(1): 315参照）の中で生成することができる。

40

【 0 0 7 0 】

例えば、数ある中でもとりわけ、大腸菌 (*Escherichia coli*) もしくはバチルス・ステオロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) のような細菌細胞、出芽酵母 (*Sacc*

50

haromyces cerevisiae) もしくはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) のような真菌細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞を含める鱗翅目昆虫細胞のような昆虫細胞、またはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎臓細胞、HeLa細胞、ヒト肝細胞癌細胞、もしくは293細胞のような哺乳類細胞を含む、多様な培養宿主細胞を使用することができる。

【0071】

免疫エフェクター細胞およびエフェクター細胞タンパク質

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞の表面上に発現された分子 (本明細書において「エフェクター細胞タンパク質」と呼ばれる) および標的細胞の表面上に発現された別の分子 (本明細書において「標的細胞タンパク質」と呼ばれる) に結合することができる。免疫エフェクター細胞は、T細胞、NK細胞、単球、マクロファージ、または好中球であることができる。いくつかの態様では、エフェクター細胞タンパク質は、T細胞受容体 (TCR) -CD3複合体中に含まれるタンパク質である。TCR-CD3複合体は、(1) TCR およびTCR または (2) TCR およびTCR のいずれかを含むヘテロ二量体に加えて、CD3ゼータ (CD3) 鎖、CD3イプシロン (CD3) 鎖、CD3ガンマ (CD3) 鎖、およびCD3デルタ (CD3) 鎖の中からの多様なCD3鎖を含む、ヘテロ多量体である。いくつかの態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、多量体性タンパク質の一部であり得るCD3 鎖 (その成熟アミノ酸配列はSEQ ID NO:40に開示される) に結合する。あるいは、エフェクター細胞タンパク質は、ヒトおよび/またはカニクイザルのTCR 、TCR 、TCR 、TCR 、CD3ベータ (CD3) 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、またはCD3 鎖であることができる。

10

20

【0072】

そのうえ、いくつかの態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、マウス、ラット、ウサギ、新世界ザル、および/または旧世界ザル種のような別の種由来のCD3 鎖にも結合することができる。そのような種には、非限定的に、以下の哺乳類種: ハツカネズミ (*Mus musculus*) ; クマネズミ (*Rattus rattus*) ; ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) ; カニクイザル、マカカ・ファスシクラリス (*Macaca fascicularis*) ; マントヒヒ、パピオ・ハマドリヤス (*Papio hamadryas*) ; ギニアヒヒ、パピオ・パピオ (*Papio papio*) ; アヌビスヒヒ、パピオ・アヌビス (*Papio anubis*) ; キイロヒヒ、パピオ・シノセファルス (*Papio cynocephalus*) ; チャクマヒヒ、パピオ・ウルシヌス (*Papio ursinus*) ; コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) ; ワタボウシタマリン (*Saguinus Oedipus*) ; およびリスザル (*Saimiri sciureus*) が含まれる。カニクイザルのCD3 鎖の成熟アミノ酸配列は、SEQ ID NO:41に提供される。タンパク質治療剤の開発の分野において公知のように、ヒトならびに前臨床試験のために通常使用されるマウスおよびサルのような種において同等の活性を有することができる治療剤を有することは、医薬品開発を簡略化し、促進することができる。薬物を市場に橋渡しする長く高価な工程において、そのような利点は重大であり得る。

30

【0073】

より具体的な態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、ヒトCD3 鎖であり得るまたは異なる種、特に上掲の哺乳類種のうちの1つに由来するCD3 鎖であり得るCD3 鎖の、最初の27個のアミノ酸内のエピトープに結合することができる。抗体が結合するエピトープは、SEQ ID NO:40およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるアミノ酸の一部であることができる。エピトープは、アミノ酸配列Gln-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO:81) を含有することができる。そのようなエピトープと結合する抗体の利点は、米国特許出願公開第2010/183615号に詳細に説明されており、その関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる。抗体が結合するエピトープは、アラニンスキヤニングによって決定することができ、それは、例えば米国特許出願公開第2010/183615号に記載されており、その関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0074】

T細胞が免疫エフェクター細胞である場合、ヘテロ二量体性二重特異性抗体が結合でき

50

るエフェクター細胞タンパク質には、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、TCR、TCR、TCR、およびTCRを非限定的に含む、TCR-CD3複合体の一部であるタンパク質が含まれる。NK細胞または細胞傷害性T細胞が免疫エフェクター細胞である場合、NKG2D、CD352、NKP46、またはCD16aは、エフェクター細胞タンパク質であることができる。CD8⁺T細胞が免疫エフェクター細胞である場合、4-1BB、OX40、GITR、CD28、CD27、またはICOSは、エフェクター細胞タンパク質であることができる。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、単球、または好中球上に発現された他のエフェクター細胞タンパク質に結合することもできる。

【0075】

標的細胞および標的細胞上に発現された標的細胞タンパク質

10

上に説明されたように、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、エフェクター細胞タンパク質および標的細胞タンパク質に結合する。標的細胞タンパク質は、例えば、がん細胞（すなわちがん細胞抗原）、病原体に感染している細胞、または炎症性もしくは自己免疫性状態を媒介する細胞の表面上に発現され得る。いくつかの態様では、標的細胞タンパク質は、標的細胞上に高発現され得るが、この必要はない。

【0076】

標的細胞ががん細胞である場合、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、上記のがん細胞抗原に結合することができる。がん細胞抗原は、ヒトタンパク質または別の種由来のタンパク質であることができる。例えば、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、数ある中でもとりわけ、マウス、ラット、ウサギ、新世界ザル、および/または旧世界ザル種由来の標的細胞タンパク質に結合し得る。そのような種には、非限定的に以下の種：ハツカネズミ；クマネズミ；ドブネズミ；カニクイザル、マカカ・ファスシクラリス；マン

20

【0077】

いくつかの例では、標的細胞タンパク質は、感染細胞上に選択的に発現されるタンパク質であることができる。例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）またはC型肝炎ウイルス（HCV）感染の場合、標的細胞タンパク質は、感染細胞の表面上に発現された、HBVまたはHCVのエンベロープタンパク質であることができる。他の態様では、標的細胞タンパク質は、ヒト

30

【0078】

がんまたは感染症などの、制御性T細胞を枯渇させることが望ましい状態では、制御性T細胞が標的細胞であることができる。その場合、CCR4は、標的細胞タンパク質であることができる。

【0079】

他の局面では、標的細胞は、自己免疫疾患または炎症性疾患を媒介する細胞であることができる。例えば、喘息におけるヒト好酸球は標的細胞であることができ、その場合、例えばEGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体（EMR1）が標的細胞タンパク質であることができる。あるいは、全身性エリテマトーデス患者における過剰なヒトB細胞が標的細胞であることができ、その場合、例えばCD19またはCD20が標的細胞タンパク質であることができる。他の自己免疫性状態では、過剰なヒトTh2 T細胞が標的細胞であることができる。その場合、例えばCCR4が標的細胞タンパク質であることができる。同様に、標的細胞は、アテローム動脈硬化症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肝硬変、強皮症、腎臓移植線維症、腎臓同種移植腎症、または特発性肺線維症および/もしくはイディオタイプ（idiotypic）肺高血圧症を含める肺線維症のような疾患を媒介する線維細胞であることができる。そのような線維性状態について、例えば線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）が標的細胞タンパク質であることができる。

40

【0080】

50

標的細胞の細胞溶解アッセイ

下の実施例において、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体がインビトロで免疫エフェクター細胞による標的細胞の細胞溶解を誘導できるかどうかを決定するためのアッセイが記載される。このアッセイでは、免疫エフェクター細胞はT細胞である。免疫エフェクター細胞がNK細胞である場合、以下の非常に類似のアッセイを使用することができる。

【0081】

関心対象の標的細胞タンパク質を発現している標的細胞系を、2 μ Mカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) を用いて37 $^{\circ}$ Cで15分間標識し、次に洗浄することができる。次に適切な数の標識標的細胞を、1つまたは複数の96ウェル平底培養プレートに入れて様々な濃度の二重特異性タンパク質、対照タンパク質の存在下または非存在下、またはタンパク質不添加において4 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベーションすることができる。健康なヒトドナーから単離されたNK細胞を、Miltenyi NK Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて単離し、次に標的細胞にエフェクター：標的比10：1で添加することができる。他のエフェクター：標的比も適切であることができる。このアッセイにおける免疫エフェクター細胞であるNK細胞は、単離直後にまたは37 $^{\circ}$ Cで一晩培養後に使用することができる。腫瘍標的細胞、二重特異性タンパク質、および免疫エフェクター細胞を含有するプレートを、5%CO₂で18～24時間、37 $^{\circ}$ Cで培養することができる。適切な対照ウェルも準備することができる。アッセイ時間18～24時間の後に、全ての細胞をウェルから取り出すことができる。ウェルの内容物の体積に等しい体積の7-AAD溶液を各試料に添加することができる。次に、下の実施例に記載のフローサイトメトリーによって試料をアッセイして、死滅した標的細胞に対する生存細胞の割合を決定することができる。

【0082】

治療法および組成物

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、例えば様々な形態のがん、感染、線維性疾患、および/または自己免疫性もしくは炎症性状態を含む、多種多様な状態を処置するために使用することができる。

【0083】

本明細書において、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む薬学的組成物が提供される。そのような薬学的組成物は、治療有効量の本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体に加えて、生理学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤などの1種または複数種の追加的な成分を含む。そのような追加的な成分には、多数の可能なものの中でも、緩衝剤、炭水化物、ポリオール、アミノ酸、キレート剤、安定剤、および/または防腐剤を含むことができる。

【0084】

いくつかの態様では、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、新しい領域にがん細胞を浸潤、すなわち転移させることができる隣接組織の破壊および新生血管の成長がしばしば付随する、上方制御されたおよび/または不適切な細胞増殖を伴う、がんを含む細胞増殖疾患を処置するために使用することができる。これらの状態には、血液悪性腫瘍および固形悪性腫瘍が含まれる。本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体で処置可能な状態に含まれるのは、結腸直腸ポリープ、脳虚血、肉眼的嚢胞性疾患、多発性嚢胞腎疾患、良性前立腺肥大症、および子宮内膜症を含める、不適切な細胞成長を伴う非悪性状態である。本発明のヘテロ二量体性二重特異性抗体を使用して処置できる他の細胞増殖疾患は、例えば、中皮腫、扁平上皮細胞癌、骨髄腫、骨肉腫、膠芽腫、神経膠腫、癌腫、腺癌、メラノーマ、肉腫、急性および慢性白血病、リンパ腫、ならびに髄膜腫、ホジキン病、セザリー症候群、多発性骨髄腫、ならびに肺がん、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、咽頭がん、乳がん、頭頸部がん、膀胱がん、卵巣がん、皮膚がん、前立腺がん、子宮頸がん、膣がん、胃がん、腎細胞がん、腎臓がん、脾臓がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、および食道がん、肝胆道がん、骨がん、皮膚がん、および血液がんを含めるがん、ならび

に鼻腔および副鼻腔、鼻咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下喉頭、唾液腺、縦隔、胃、小腸、結腸、直腸および肛門領域、尿管、尿道、陰茎、精巣、外陰部、内分泌系、中枢神経系、および形質細胞のがんである。

【 0 0 8 5 】

Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita et al., Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993)は、がん治療のための指針を提供している教科書の中に含まれる。適切な治療アプローチは、がんの特定の型、および関連分野において認知されている、患者の全身状態などの他の要因に応じて選択される。本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、がん患者の処置において他の抗腫瘍剤および/または処置を使用する治療レジメンに追加され得る。

10

【 0 0 8 6 】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、例えば化学療法剤、非化学療法的抗腫瘍剤、および/または放射線のようながん処置に広く採用されている多様な薬物および処置と同時に、その前に、またはその後に投与することができる。例えば、化学療法および/または放射線は、本明細書記載の任意の処置の前、処置の途中、および/または処置の後に行うことができる。化学療法剤の例は上に論じられており、それらには、非限定的にシスプラチン、タキソール、エトポシド、ミトキサントロン (Novantrone (登録商標))、アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、カンプトテシン (またはその水溶性誘導体)、メトトレキサート、マイトマイシン (例えばマイトマイシンC)、ダカルバジン (DTIC)、アドリアマイシン (ドキシソルビシン) およびダウノマイシンのような抗腫瘍性抗生物質、ならびに上に言及された全ての化学療法剤が含まれる。

20

【 0 0 8 7 】

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、また、数ある中でもとりわけ、感染症、例えば慢性B型肝炎ウイルス (HBV) 感染、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染、エプスタイン-バーウイルス (EBV) 感染、またはサイトメガロウイルス (CMV) 感染を処置するために使用することができる。

【 0 0 8 8 】

本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、ある細胞型を枯渇させることが有益な、他の種類の状態においてさらに利用することができる。例えば、喘息におけるヒト好酸球、全身性エリテマトーデスにおける過剰なヒトB細胞、自己免疫性状態における過剰なヒトTh2 T細胞、または感染症における病原体感染細胞の枯渇が有益であり得る。特発性肺線維症 (IPF) のような肺線維症、または腎臓もしくは肝臓線維症のような線維性状態における筋線維芽細胞または他の病的細胞の枯渇が、ヘテロ二量体性二重特異性抗体のさらなる用途である。

30

【 0 0 8 9 】

治療有効用量の本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体を投与することができる。治療用量を構成する抗体の量は、処置される適応症、患者の体重、患者の計算された皮膚表面積に応じて変動し得る。本明細書記載の二重特異性タンパク質の投薬は、所望の効果を達成するように調整することができる。多くの場合に、反復投薬が必要となり得る。例えば、本明細書記載のヘテロ二量体性二重特異性抗体は、1週間に3回、1週間に2回、1週間に1回、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10週間に1回、または2、3、4、5、もしくは6ヶ月に1回投薬することができる。毎日投与されるヘテロ二量体性二重特異性抗体の量は、約0.0036mg ~ 約450mgであることができる。あるいは、患者の推定皮膚表面積に応じて用量を較正することができ、各用量は、約0.002mg/m² ~ 約250mg/m²であることができる。別の選択肢において、患者の体重に応じて用量を較正することができ、各用量は、約0.00051mg/kg ~ 約6.4mg/kgであることができる。

40

【 0 0 9 0 】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体またはこれらの分子を含有する薬学的組成物は、任意の実現可能な方法によって投与することができる。経口投与は、ある特別な製剤または状況の非存在下では、胃の酸性環境中でタンパク質加水分解をもたらすため、タンパク質治療

50

剤は、通常、非経口経路によって、例えば注射によって投与される。皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、病巣内、または腹腔注射が、可能な投与経路である。ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、また、注入、例えば静脈内または皮下注入を介して投与することができる。特に皮膚に影響を与えている疾患に関して、局所投与も可能である。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、粘膜との接触により、例えば鼻腔内、舌下、膺、もしくは直腸投与によって、または吸入剤としての投与によって投与することができる。あるいは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含む特定の適切な薬学的組成物を経口投与することができる。

【0091】

本発明を上にな一般的用語で説明したが、以下の実施例を限定ではなく例示として提供する。

【実施例】

【0092】

実施例1：ヘテロ二量体性二重特異性抗体の設計、構築、および産生

DNA発現ベクターを構築して、図1(2~6)に示される4つの異なるサブタイプのヘテロ二量体性二重特異性抗体、および2つの単鎖二重特異性分子(1つが抗HER2/CD3、1つが抗FOLR1/CD3である)を産生した。単鎖二重特異性分子は、リンカーによって隔てられた2つのVH領域および2つのVL領域を含有した。各ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、2つのポリペプチド鎖を含有した。各構築物の第1のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCH1領域、およびアルブミンと結合するように作られたFn3ドメインを含み、第2のポリペプチド鎖は、2つの免疫グロブリン可変領域に続いてCL領域を含んでいた。図1(1)。

【0093】

フォワードおよびリバースプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってDNAテンプレートから、免疫グロブリン可変領域および定常ドメインのコード配列を増幅し、続いて共通のオーバーハング配列を使用して一緒にスプライシングした。例えば、一致するオーバーハングを含有する断片を合体させるようにPCRを行う方法を説明している部分が参照により本明細書に組み入れられるHorton et al. (1989), Gene 77: 61-68を参照されたい。アルブミン結合性フィブロネクチン3(Fn3)ドメイン(SEQ ID NO:1)およびFLAG(登録商標)-ポリヒスチジンタグ(FLAG-hisタグ)タグをコードする配列をすでに含有していた哺乳類発現ベクターにPCR産物をサブクローニングした。安定な血清タンパク質であるアルブミンに結合するので、Fn3ドメインは、これらの構築物における半減期延長部分である。FLAG-hisタグは、検出および精製を容易にする。

【0094】

単鎖二重特異性分子をコードするDNAを類似の方法によって作製した。抗HER2/CD3単鎖二重特異性分子(P136629.3)および抗FOLR1/CD3単鎖二重特異性分子(P136637.3)のアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO:75および76に示す。

【0095】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体および単鎖二重特異性分子をコードするDNAベクターをHEK293-6E細胞中に同時トランスフェクションし、6日後に培地を採集し、濃縮し、IMACローディング緩衝液に緩衝液交換した。単鎖抗HER2/CD3分子および単鎖抗FOLR1/CD3分子をニッケルHISTRAP(登録商標)(GE Healthcare Bio-Sciences, L.L.C., Uppsala, Sweden)カラムクロマトグラフィーによって精製し、25~300mMイミジゾール(imidazole)勾配をかけて溶出させた。分取SUPERDEX(登録商標)200(GE Healthcare Bio-Sciences, L.L.C., Uppsala, Sweden)カラムを使用して溶出プールをサイズ交換クロマトグラフィー(SEC)によってさらに精製し、>1mg/mLに濃縮し、-70℃で保存した。ヘテロ二量体性二重特異性抗体をニッケルHISTRAP(登録商標)(GE Healthcare Bio-Sciences, L.L.C., Uppsala, Sweden)カラムクロマトグラフィーに供し、25~300mMイミジゾール勾配をかけて溶出させた。分取SUPERDEX(登録商標)200(GE Healthcare Bio-Sciences, L.L.C., Uppsala, Sweden)カラムを使用して溶出プールをサイズ交換クロマトグラフィー(SEC

）によってさらに精製し、>1mg/mLに濃縮し、-70 で保存した。

【0096】

図1(2)に示されるような一態様(P57216.9と称する)では、第1のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:6)は、ヒトMSLNに特異的なVH領域(SEQ ID NO:46)から始まり、これにリンカー、ヒトCD3 に特異的なVH領域(SEQ ID NO:42)、CH1領域(SEQ ID NO:70)、ヒトアルブミンに結合するように作られたFn3ドメイン(SEQ ID NO:1)、およびFLAG-hisタグが続く。第2のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:7)は、ヒトMSLNに特異的なVL領域(SEQ ID NO:48)から始まり、それにリンカー、ヒトCD3 に特異的なVL領域(SEQ ID NO:43)、およびCL領域(SEQ ID NO:71)が続く。同様に、SEQ ID NO:8および9は、図1(3)に示されるような別の態様(P56019.5と称する)の、第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列を提供する。P56019.5は、P57216.9に使用されたものと異なる可変領域を有する。

10

【0097】

図1(3)に示されるような一態様(H71362.2と称する)は、それが異なる抗CD3 可変領域および異なるFN3ドメインを有することを除いて、P56019.5と同様である。H71362.2における抗CD3 VH領域およびVL領域は、それぞれアミノ酸配列SEQ ID NO:42およびSEQ ID NO:47を有し、H71362.2の第1および第2のポリペプチド鎖は、それぞれSEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する。

【0098】

図1(4)に示されるような一態様(P69058.3と称する)では、第1のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:12)は、ヒトMSLNに特異的なVH領域(SEQ ID NO:46)から始まり、これにリンカー、ヒトCD3 に特異的なVL領域(SEQ ID NO:43)、CH1領域、Fn3ドメイン(SEQ ID NO:1)、およびFLAG-hisタグが続く。第2のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:13)は、ヒトCD3 に特異的なVH領域(SEQ ID NO:42)から始まり、それにリンカー、ヒトMSLNに特異的なVL領域(SEQ ID NO:48)、およびCL領域(SEQ ID NO:73)が続く。

20

【0099】

図1(5)に示されるような一態様(P69059.3と称する)では、第1のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:14)は、ヒトCD3 に特異的なVL領域(SEQ ID NO:43)から始まり、これにリンカー、ヒトMSLNに特異的なVH領域(SEQ ID NO:49)、CH1領域(SEQ ID NO:70)、Fn3ドメイン(SEQ ID NO:1)、およびFLAG-hisタグが続く。第2のポリペプチド鎖(SEQ ID NO:15)は、ヒトMSLNに特異的なVL領域(SEQ ID NO:48)から始まり、それにリンカー、ヒトCD3 に特異的なVH領域(SEQ ID NO:42)、およびCL領域(SEQ ID NO:73)が続く。

30

【0100】

2種の抗原のそれぞれに対する完全なVH/VL抗原結合対を生み出すために免疫グロブリン可変領域間の鎖間相互作用が必要とされるように、上記の全ての構築物を設計した。各ポリペプチド鎖上の2つの免疫グロブリン可変領域間のリンカーは、同じポリペプチド鎖上の可変領域の相互作用が高度に不利益を被るのに十分なほど短く、すなわちアミノ酸5~10個であった。場合により、各ポリペプチド鎖上の第1の免疫グロブリン可変領域は、完全なVH/VL抗原結合対を形成することができ、各ポリペプチド鎖上の第2の免疫グロブリン可変領域は、別のVH/VL抗原結合対を形成することができた。図1(2)および1(3)ならびに上記構築物P56019.5、P57216.9、およびH71362.2の説明を参照されたい。この種の相互作用を、本明細書において「平行」の相互作用と呼ぶ。他の場合では、第1のポリペプチド鎖上の第1の免疫グロブリン可変領域は、第2のポリペプチド鎖上の第2の免疫グロブリン可変領域と相互作用してVH/VL抗原結合対を形成することができ、第1のポリペプチド鎖上の第2の免疫グロブリン可変領域は、第2のポリペプチド鎖上の第1の免疫グロブリン可変領域と相互作用してVH/VL抗原結合対を形成することができた。図1(4)、1(5)、1(6)ならびに上記の構築物P69058.3およびP69059.3の説明を参照されたい。この種の相互作用は、本明細書において「斜め」の相互作用と呼ばれる。

40

【0101】

実施例2: MSLNおよびCD3 に結合するヘテロ二量体性二重特異性抗体によるがん細胞のT細胞依存性殺滅

50

実施例1に記載されたヘテロ二量体性二重特異性抗体をHEK293細胞において産生させ、CD3 を発現するT細胞およびメソテリンを発現するヒト卵巣がん細胞系Ovcar-8に対する結合性について蛍光標示細胞分取（FACS）によってアッセイした。簡潔には、ヘテロ二量体性二重特異性抗体を、Ovcar-8細胞または単離されたヒトもしくはカニクイザルT細胞約50,000個と共に4 で1時間インキュベーションした。次に、細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）コンジュゲーション型抗ヒト軽鎖二次抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。蛍光強度の幾何平均によって相対的な結合性を表した。下の表3から明らかなように、試験された全ての構築物は、ヒトT細胞上のCD3 およびOvcar-8細胞上のMSLNと結合することができた。

【0102】

実施例1に記載された抗MSLN、抗CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体をアッセイして、ヒトT細胞の存在下でMSLNを発現しているがん細胞に対するそれらの細胞溶解活性を決定した。このアッセイを、本明細書においてヒトT細胞依存性細胞媒介性細胞溶解アッセイ（ヒトTDCC）と呼ぶ。免疫エフェクター細胞としてNK細胞を使用する類似のアッセイを上に記載する。簡潔には、MSLNを発現しているヒト卵巣がん系（Ovcar-8）をカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）で標識し、96ウェルV底マイクロタイタープレートのウェル1個あたり細胞約20,000個を蒔いた。単離されたヒトT細胞を予備凍結したものを解凍し、洗浄し、ウェル1個あたり細胞約200,000個でマイクロタイタープレートに添加した。抗体を系列希釈して10 µg/mLから0.01pg/mLの範囲の最終ウェル濃度を調製し、マイクロタイタープレートに添加した。抗体を有さない、T細胞単独、または腫瘍細胞単独の対照ウェルを含めた。プレートを37 の加湿環境中で40時間インキュベーションした。アッセイの終わりに、各ウェルから全ての細胞を収集し（トリプシン-EDTAを使用して接着している腫瘍細胞を剥がした）、0.01 µM TO-PRO（登録商標）-3（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）を使用して染色して生存率を評価した。フローサイトメトリーを用いて腫瘍細胞の生存率を読み出した。次式に従って特異的溶解率を計算した：特異的溶解% = [二重特異性の存在下での腫瘍細胞溶解% - 二重特異性の非存在下での腫瘍細胞溶解% / 総細胞溶解% - 二重特異性の非存在下での腫瘍細胞溶解%] × 100

総細胞溶解率を決定するために（この計算をするために必要）、二重特異性の非存在下でエフェクター細胞および標識された標的細胞を含有する試料を80%冷メタノールで溶解させた。これらのアッセイの結果を下の表3にまとめる。

【0103】

（表3）異なるサブタイプの結合性および細胞溶解活性

構築物のID番号	図1に示される構成	第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列	FACSによる結合性（幾何平均）		ヒト TDCC	
			ヒトT細胞	Ovcar-8細胞	EC ₅₀ (pM)	最大殺滅 (%)
P56019.5	図 1(3)	SEQ ID NO:8 SEQ ID NO:9	220	285	0.12	53
P57216.9	図 1(2)	SEQ ID NO:6 SEQ ID NO:7	103	439	3.50	49
P69058.3	図 1(4)	SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:13	290	588	<0.1	68
P69059.3	図 1(5)	SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:15	179	526	<0.1	68
H71362.2	図 1(3)	SEQ ID NO:10 SEQ ID NO:11	354	575	0.33	54

【0104】

表3に示されるように、試験された全てのヘテロ二量体性二重特異性抗体は、ヒトT細胞およびOvcar-8細胞に結合することができた。それらは、また、T細胞の存在下で腫瘍細胞に対して細胞溶解活性を示した。表3および図2。しかし、斜めの鎖間可変領域相互作用に

より完全な抗原結合部位が生成された2つ、すなわちP69058.3およびP69059.3は、他の3つの構築物で観測されなかった低いEC₅₀と高い最大殺滅率との両方の組み合わせを有した。これらの他の3つの構築物は、可変領域間の平行の鎖間相互作用によって抗原結合部位を形成できるように設計された。これらのデータから、可変領域の「斜め」の相互作用を必要とする構築物が、平行の相互作用を必要とする構築物よりも良好な生物学的活性を有し得ることが示唆される。

【0105】

上記の大部分の構築物に使用されたものと同じ対の抗MSLN VH領域およびVL領域、すなわちSEQ ID NO:46および48、ならびに上記の大部分の構築物に使用されたものと異なる対の抗CD3 VH領域およびVL領域を使用して、上記で使用された方法に類似の方法によって、別の構築物セットを作製した。使用された抗CD3 VH領域およびVL領域は、ヒトおよびカニクイザルCD3 の両方に結合することができた。P56019.5は、カニクイザルではなくヒトCD3 に結合する特定の抗CD3 VH/VL対を使用している、本明細書記載の唯一の構築物である。H69070.4は、P56019.5と同じ配置の可変領域（すなわち図1（3）に示される構成）および同じ抗MSLN VH/VL対を有するが、異なる抗CD3 VH/VL対を有し、これは、H69071.4、H69072.4、およびH71365.2にも存在する。H69070.4の第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:24およびSEQ ID NO:25に提供される。H69071.4、H69072.4、およびH71365.2は、全て同じ抗CD3 VH/VL対および同じ抗MSLN VH/VL対を含有するが、これらの構築物中の可変領域は、異なる方法で配置される。表4を参照されたい。これらの構築物の第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、それぞれ以下の通りである：H69071.4、SEQ ID NO:26およびSEQ ID NO:27；H69072.4、SEQ ID NO:28およびSEQ ID NO:29；ならびにH71364.2、SEQ ID NO:30およびSEQ ID NO:31。上記のアッセイ、および下記のカニクイザルT細胞依存性細胞性細胞溶解（「cyno TDCC」と呼ばれる）アッセイを用いてこれらの構築物を試験した。

【0106】

cyno TDCCアッセイを行うために、カニクイザルの血液から以下のようにT細胞を精製した。最初に、塩化アンモニウムで赤血球を溶解させた。その後、大部分の培養細胞がT細胞となるまで、残りの細胞を培養した。マウス抗ヒトCD3でコーティングされたマイクロタイタープレート中で、これらの精製カニクイザルT細胞をマウス抗ヒトCD28の存在下で48時間インキュベーションすることによって、これらの細胞を刺激した。その後、10ng/mL ヒトIL-2を含有する培地中で細胞を7日間培養した。アッセイのために、MSLNを発現しているヒト卵巣がん系（Ovcar-8）をCFSEで標識し、96ウェルV底マイクロタイタープレート中にウェル1個あたり細胞10,000個を蒔いた。刺激されたカニクイザルT細胞を洗浄し、ウェル1個あたり細胞100,000個でマイクロタイタープレートに添加した。抗体を1：10系列で希釈して、10 μg/mLから0.01pg/mLまでの範囲の最終ウェル濃度を調製し、マイクロタイタープレートに添加した。抗体なし、T細胞単独、または腫瘍細胞単独のいずれかの対照ウェルを含めた。マイクロタイタープレートを37 °Cの加湿環境中で20時間インキュベーションした。アッセイの終わりに、各ウェルから全ての細胞を収集し（トリプシン-EDTAを使用して接着している腫瘍細胞を剥がした）、0.01 μM TO-PRO（登録商標）-3（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）を使用し染色して生存率を評価した。フローサイトメトリーを用いて腫瘍細胞の生存率を読み出し、特異的細胞溶解率は、上記のように決定した。このアッセイおよび上記の結果を下の表4にまとめる。

【0107】

（表4）異なるサブタイプの結合性および細胞溶解活性

構築物のID番号	図1に示される構成	第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列	FACSによる結合性 (幾何平均)			ヒト TDCC		Cyno TDCC	
			ヒト T 細胞	Ovcar-8 細胞	カニクイザル T細胞	EC ₅₀ (pM)	最大殺滅 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大殺滅 (%)
P56019.5	図 1(3)	SEQ ID NO:8 SEQ ID NO:9	220	285	NA*	0.12	53	NA	NA
H69070.4	図 1(3)	SEQ ID NO:24 SEQ ID NO:25	9	592	127	580	17	3.0	88
H69071.4	図 1(4)	SEQ ID NO:26 SEQ ID NO:27	16	494	121	6500	35	3.20	88
H69072.4	図 1(5)	SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:29	11	534	110	44	37	18.80	91
H71365.2	図 1(3)	SEQ ID NO:30 SEQ ID NO:31	66	558	276	NA*	NA*	8.10	86

* 「NA」は、アッセイにおける活性が最小であったことから、「適用せず」を示す。

【 0 1 0 8 】

表4中のデータは、H69070.4、H69071.2、H69072.4、およびH71364.2と称される抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体中に使用されたCD3 結合性VH/VL対が、カニクイザルCD3 だけでなく、ヒトCD3 にも幾分程度が低く結合することを示している。興味深いことに、構築物H69072.4は、ヒトTDCCアッセイにおいてH69071.4およびH71365.2（それらの全ては同じVH/VL対を含有する）よりもずっと強力であったが、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は全て、cyno TDCCアッセイにおいて、ほぼ匹敵する活性を示した。表4ならびに図3および4。これらのデータは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体における特定の配置の可変領域が、おそらく特に可変領域の結合がとりたてて強固でない状況で、その生物学的活性に影響できることを示唆している。例えば、表4中のデータは、試験された大部分の構築物がカニクイザルT細胞に対するものと同じ大きさの結合活性をヒトT細胞に対して示さなかったことを示している。構築物H69072.4およびH69071.4において、抗原結合性VH/VL対を生じる鎖間相互作用が斜めの相互作用であるように可変領域を配置した。H71365.2における適正なVH/VL対形成のためには平行の相互作用が必要であった。したがって、これらのデータは、可変領域の斜めの相互作用が平行の相互作用よりも好都合であるという考えと一致する。

【 0 1 0 9 】

実施例3：Fc領域を含有するヘテロ二量体性二重特異性抗体の構築および特徴づけ

構築物P69058.3（図1（4）に示されたような抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体）を、その第2のポリペプチド鎖（CL領域を含有する）にFcポリペプチド鎖を付加し、第1のポリペプチド鎖（CH1領域を含有する）中のFn3ドメインをFcポリペプチド鎖で置換することによって改変した。この構築物（P73356.3と称される）の第1および第2のポリペプチドのアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO:16およびSEQ ID NO:17に提供する。これらの構築物中のFc領域は、ヘテロ二量体化改変を含有するヒトIgG1 Fc領域である。具体的には、第1のポリペプチド鎖は、正に荷電した2つの突然変異（D356K/D399K、表2に示されるEUナンバリング使用）を含有し、第2のポリペプチド鎖は、負に荷電した2つの突然変異（K409D/K392D）を含有する。これらの変化は、2つのポリペプチド鎖が同じ細胞において一緒に発現されたとき、ホモ二量体に比べて、ヘテロ二量体の優先的形成を生じる。国際公開公報第2009/089004号を参照されたい。別の構築物（P73352.3）では、P73356.3の第1および第2のポリペプチド鎖中にそれぞれ存在するCH1およびCL領域を除去した。P73352.3の第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:19に提供する。

【 0 1 1 0 】

P73352.3およびP73356.3構築物をHEK293細胞において産生させ、上記のヒトTDCCアッセイにおいてP69058.3と一緒に試験した。図5に示されるように、P73352.3およびP73356.3の両方は、Fc領域を含有しないP69058.3と同じ範囲であるピコモル濃度以下の範囲の半値

10

20

30

40

50

有効濃度 (EC_{50}) で、Ovcar-8細胞の殺滅の媒介に強力な活性を示した。これらのデータから、CHおよびCL領域を有してまたは有さずに、Fc領域を含有し、かつ強力なT細胞媒介性細胞溶解活性を保持する、生物学的に強力なヘテロ二量体性二重特異性抗体を作製する実現可能性が実証された。

【0111】

実施例4：ヘテロ二量体性抗HER2/CD3 二重特異性抗体はHER2発現腫瘍細胞系の溶解を誘導する

抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体73356.3 (図1(4)の構成であり、第1および第2のポリペプチド鎖の両方のC末端にFcポリペプチド鎖を有する)と類似の構成を使用して、抗HER2抗体由来のVH/VL対および別の抗CD3 抗体由来のVH/VL対を使用して、P136797.3を構築した。P136797.3の構成を図1(6)に示す。P136797.3のFc領域は、Fc Rの結合を防止するための追加的な突然変異 (L234A/L235A、表2に示されるEUナンバリングスキームによる) を含有する。P136797.3の第1および第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列をそれぞれSEQ ID NO:20およびSEQ ID NO:21に提供する。抗HER2/CD3 単鎖二重特異性分子 (SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を有するP136629.3) も以下のアッセイに使用した。

【0112】

精製されたヒト汎T細胞およびHER2発現腫瘍細胞 (JIMT-1) 細胞に対する抗HER2/CD3 二重特異性ヘテロ二量体性抗体P136797.3および単鎖二重特異性分子P136629.3の結合性を評価した。各細胞型を、これらの二重特異性のそれぞれの存在下および非存在下 (陰性対照として) で、4 で16時間インキュベーションした。二重特異性ヘテロ二量体性抗体の結合を、アロフィコシアニン (APC) 標識二次抗体で検出した。マウス抗FLAG抗体に続いて、APC標識マウス特異抗体を使用して、FLAGタグを有する単鎖二重特異性の結合を検出した。蛍光シグナルのレベルを蛍光標示式細胞分取 (FACS) によって評価した。両方の二重特異性抗体を用いて検出された、ヒト汎T細胞およびJIMT-1腫瘍細胞の両方に対する結合レベルは、陰性対照で検出されたレベルと明らかに識別可能であった。データは示さず。したがって、両方の二重特異性は、T細胞およびJIMT-1細胞の両方に結合する。

【0113】

Pan T Cell Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用して健康なヒトドナーから汎Tエフェクター細胞を単離し、様々な濃度のP136797.3の存在下または非存在下でCFSE標識細胞と共に10:1 (T細胞: 標的細胞) の比でインキュベーションした。標的細胞は、JIMT-1細胞 (細胞表面に細胞1個あたり約181,000分子のHER2を発現している)、T47D細胞 (細胞表面に細胞1個あたり約61,000分子のHER2を発現している)、またはSHP77細胞 (細胞表面に検出可能なHER2を発現していない) のいずれかであった。39~48時間インキュベーション後に、細胞を採集し、フローサイトメトリーを用いて7AADの取り込みにより腫瘍細胞の溶解をモニターした。上の実施例2に記載のように特異的溶解率を決定した。

【0114】

適切な濃度のP136797.3または単鎖抗HER2/CD3 二重特異性分子の存在下で、JIMT-1およびT47D細胞の両方の特異的溶解が観測された。P136797.3についての半値溶解濃度 (EC_{50}) は、JIMT-1およびT47D細胞において、それぞれ19.05pMおよび7.75pMであった。単鎖抗HER2/CD3 二重特異性について、 EC_{50} は、JIMT-1およびT47D細胞において、それぞれ1.12pMおよび0.12であった。HER2陰性細胞系SHP77の特異的溶解は観測されなかった。図6。加えて、ヘテロ二量体性抗HER2/CD3 二重特異性抗体の存在下のJIMT-1およびT47D細胞の溶解は、T細胞の非存在下で起こらなかった。図7参照; 残りのデータは示さず。これらの観察は、ヘテロ二量体性抗HER2/CD3 二重特異性抗体および単鎖抗HER2/CD3 二重特異性の両方が、T細胞による腫瘍細胞の溶解を誘導する能力のある、高度に特異的で強力な試薬であることを示唆している。

【0115】

以下の対照実験も行った。すぐ上に説明された方法を用いて、汎Tエフェクター細胞の存在下または非存在下および抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下または

10

20

30

40

50

非存在下で、JIMT-1細胞を含有する試料をアッセイして、JIMT-1細胞の特異的溶解率を決定した。結果を図7に示す。これらのデータは、二重特異性およびT細胞の両方が存在しないと、JIMT-1細胞の溶解が本質的に起こらなかったことを示している。T細胞および二重特異性の両方の存在下で、JIMT-1細胞の溶解が起こった。

【0116】

実施例5：標的細胞が存在しないと、PBMCおよびヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下でCD3⁺末梢血T細胞は活性化されない

末梢血由来T細胞が、HER2発現JIMT-1細胞の存在下または非存在下で、ヘテロ二量体性抗HER2/CD3 二重特異性抗体（P136797.3）または上記の抗HER2/CD3 単鎖二重特異性分子（P136629.3）の存在下でCD25およびCD69のエキスピボ発現を上方制御できるかどうかを判定するために、以下の実験を行った。CD25およびCD69を、T細胞活性化のためのマーカーと見なす。

【0117】

健康なドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）を、Biological Specialty Corporation（Colmar, Pennsylvania）から購入されたヒト白血球からFICOLL（商標）勾配をかけて精製した。これらのPBMCを、HER2発現JIMT-1腫瘍細胞系の非存在下および存在下で、様々な濃度のP136797.3または単鎖二重特異性分子と共にインキュベーションした。JIMT-1細胞を含有する各試料において、PBMC：JIMT-1細胞の比は10：1であった。48時間インキュベーション後に、非接着細胞をウェルから取り出し、2つの等しい試料に分けた。フローサイトメトリー染色を行って、CD25またはCD69を発現しているCD3⁺T細胞のパーセントを検出した。フルオレセインイソチオシアネート（FITC）コンジュゲーション型抗ヒトCD3抗体を用いて全ての試料を染色した。ヒトCD25およびCD69に対する抗体は、アロフィコシアニン（APC）コンジュゲーション型であった。染色された試料をFACSによって分析した。

【0118】

図8に示されるように、CD3⁺末梢T細胞におけるCD25およびCD69の上方制御が、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136797.3および単鎖二重特異性分子により観測された。これは、HER2発現JIMT-1腫瘍細胞の非存在下ではなく、存在下で起こった。図8。これらのデータは、T細胞以外のFc受容体担持細胞がPBMC中に存在するにもかかわらず、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136797.3または単鎖二重特異性分子によるT細胞活性化が、HER2を発現している腫瘍標的細胞の存在に依存することを示している。

【0119】

実施例6：抗FOLR1×抗CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の構築および試験

CD3 および葉酸受容体1（FOLR1）と結合できるヘテロ二量体性二重特異性抗体を、P136797.3に類似した設計で、本質的に実施例1に記載のように構築した。それをP136795.3と称した。P136797.3と同様に、P136795.3のFc領域は、電荷対置換とFc Rの結合を遮断する突然変異との両方を含有する。P136795.3の第1および第2のポリペプチド鎖の配列をそれぞれSEQ ID NO:22およびSEQ ID NO:23に提供する。実施例1記載の抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性分子（SEQ ID NO:76のアミノ酸配列を有する）も本実験に含めた。

【0120】

上記の健康なドナーから単離されたヒトT細胞を、CFSE標識腫瘍標的細胞と共に10：1の比で、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136795.3の存在下および非存在下でインキュベーションした。標的細胞は、Cal-51細胞（細胞1個あたりFOLR1部位約148,000個を発現している）、T47D細胞（細胞1個あたりFOLR1部位約101,000個を発現している）、または検出可能な量のFOLR1を発現しないBT474細胞のいずれかであった。39～48時間後に細胞を採集し、フローサイトメトリーを用いて、生存細胞ではなく、死細胞または瀕死細胞を染色する7AADの取り込みにより、腫瘍細胞の溶解をモニターした。特異的溶解率を上記のように決定した。

【0121】

抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136795.3および抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性分子の両方でCal-51細胞およびT47D細胞の特異的溶解が観測された。図9。P136795

.3についてのEC₅₀は、CaI-61細胞およびT47D細胞において、それぞれ1.208pMおよび1.26pMであった。抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性分子についてのEC₅₀は、CaI-51細胞およびT47D細胞において、それぞれ0.087pMおよび0.19pMであった。検出不能なレベルのFOLR1を有する細胞系であるBT474の溶解は最小であり（図9）、この溶解は、試験されたP136795.3の最高濃度でのみ観測された。P136795.3は存在するがT細胞は存在しないときの腫瘍標的細胞は、7AADの取り込みを生じなかった（データは示さず）。これらの観測は、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136795.3および抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性分子の両方が、T細胞による腫瘍細胞溶解を誘導する能力のある、高度に特異的で強力な試薬であることを示唆している。

【 0 1 2 2 】

FOLR1を発現している腫瘍細胞系（T47D）の存在下、または検出可能なFOLR1を発現しない細胞系（BT474）の存在下で、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体P136795.3が、T細胞による多様なサイトカインの放出を刺激できるかどうかを判定するために該抗体を試験した。このアッセイでは、陽性対照として単鎖抗FOLR1/CD3 二重特異性分子も試験した。上記のように単離されたT細胞を、T47D細胞またはBT474細胞のいずれかの存在下および様々な濃度のP136795.3または単鎖二重特異性分子の存在下で約24時間培地中でインキュベーションした。結果を図10Aおよび10Bに示す。T47D細胞の存在下で、最高のサイトカイン濃度が、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10およびIL-2（1000pg/mLを超える）で見られた。中等度のレベルのIL-13も観測された。FOLR1陰性細胞系BT474の存在下でもサイトカインが観測されたが、それは、ヘテロ二量体性二重特異性抗FOLR1/CD3 抗体P136795.3が、試験された最高濃度（1000pM）の場合のみであった。T47D細胞存在下のサイトカイン放出についてのEC₅₀を下の表5に示す。

【 0 1 2 3 】

（表5）サイトカイン放出についてのEC₅₀

	T47D細胞存在下の ヘテロ二量体性抗FOLR1/CD3 ϵ についてのEC ₅₀ (pM)	T47D細胞存在下の 単鎖抗FOLR1/CD3 ϵ についてのEC ₅₀ (pM)
IFN- γ	27.1	7.5
TNF- α	12.5	8.8
IL-10	28.3	18.4
IL-2	20.3	12.9
IL-13	27.8	28.1

【 0 1 2 4 】

これらの結果は、T細胞が、FOLR1を発現している標的細胞の存在下でのみ、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体または単鎖二重特異性分子の存在に対してサイトカインを分泌することによって応答することを示唆している。

【 0 1 2 5 】

実施例7：T細胞によるHER2発現がん細胞誘導型サイトカイン分泌

24時間インキュベーション後に採取された、実施例4記載のTDCCアッセイからの細胞培養上清を、細胞表面上にHER2を発現している腫瘍細胞（JIMT-1細胞）または標的細胞タンパク質を発現しない対照細胞（SHP77細胞）の存在下での、様々なサイトカインの産生についてアッセイした。T細胞によるサイトカイン産生を、抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体（P136797.3）または単鎖二重特異性分子（SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を有する）に加えてJIMT-1細胞またはSHP77細胞の存在下で測定した。インターフェロン（IFN- γ ）、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、インターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-2（IL-2）、およびインターロイキン-13（IL-13）の産生を、Human TH1/TH2 (7-Plex) Ultra-Sensitive Kit（カタログ番号K15011C-4, Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, MD）およびHuman Proinflammatory I (4-Plex) Ultra-Sensitive Kit（カタログ番号K15009C-4, Meso Scale Diagnostics, LLC., Rockville, MD）を使用して、製造業者の指示に従って測定した。HER2発現JIMT-1細胞の存在下で、P136797.3または単鎖二重特

異性分子で処理されたT細胞はサイトカインを放出した。下の表6に、アッセイされた5つのサイトカインについてのEC₅₀を示す。

【 0 1 2 6 】

(表6) JIMT-1細胞および抗HER2/CD3 二重特異性抗体の存在下でのT細胞によるサイトカイン放出

サイトカイン	EC ₅₀	
	JIMT-1 細胞	
	ヘテロ二量体性 抗HER2/CD3ε	単鎖抗HER2/CD3ε
IFN-γ	45.5	2.1
TNF-α	36.3	1.8
IL-10	11.1	0.9
IL-2	21.5	1.2
IL-13	19.0	1.8

10

【 0 1 2 7 】

図11Aおよび11Bに、HER2発現JIMT-1細胞またはSHP77細胞（これは、HER2を発現しない）のいずれか、および様々な濃度のP136797.3または単鎖二重特異性分子の存在下でのT細胞によるサイトカイン産生についての滴定曲線を示す。これらのデータは、抗HER2/CD3ヘテロ二量体性二重特異性抗体および抗HER2/CD3 単鎖二重特異性分子の両方が、SHP77細胞の存在下ではなく、JIMT-1細胞の存在下でサイトカイン産生を誘導できることを示している。

20

【 0 1 2 8 】

観測されたサイトカイン分泌が、両方の細胞型に加えて二重特異性の存在に依存したことを立証するために、追加的な実験を行った。試料が、抗HER2/CD3ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下または非存在下で、(1) T細胞単独、(2) JIMT-1細胞単独、または(3) T細胞およびJIMT-1細胞の両方のいずれかを含有したことを除き、方法は上記と同様であった。図12に示されるように、両方の細胞型および二重特異性抗体の存在下でのみ、サイトカインが分泌された。

【 0 1 2 9 】

実施例8：ヘテロ二量体性二重特異性抗体のインビボ活性

下記実験は、がんのインビボモデル系においてヘテロ二量体性二重特異性抗体の活性を実証するものである。ヒト化マウスを以下のように作製した。gamma cell照射器を使用して、生後1～4日のNOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJマウス（NSGマウスと呼ぶ）に線量113センチグレイ（cGY）を照射し、予備凍結したヒトCD34⁺臍帯細胞約50,000個を肝臓に注射した。5週齢から開始して、動物に組み換えヒトIL-7 9 μgおよびマウス抗ヒトIL-7（非中和性半減期延長抗体）15 μgの腹腔内注射を3週間受けさせた。11週齢時にフローサイトメトリーを使用して各マウスについてヒトT細胞の血液レベルを分析した。下記試験に使用された動物は、0.1%～40%（生存白血球の総数に対して）の範囲のヒトT細胞レベルを有した。年齢が一致する非ヒト化動物（「対照マウス」と呼ぶ）の追加的な群を対照群として試験に含めた。これらの動物（「NSG対照マウス」）に、下記のようにP56019.5（抗MSLN/抗CD3ヘテロ二量体性二重特異性抗体）を投与した。

30

40

【 0 1 3 0 】

腫瘍試験のために、メソセリアン（mesothelium）発現ヒト膵臓腫瘍細胞系Capan-2からの細胞約1000万個を各マウスに皮下移植した。処置を腫瘍細胞の移植の9日後から開始して、静脈内に施した。動物は、(1) 100 μg/マウスのP56019.5（抗MSLN/抗CD3ヘテロ二量体性二重特異性抗体）、対照二重特異性抗体（抗ヒトEGFRviii/抗ヒトCD3）、もしくはダルベッコリン酸緩衝食塩水（DPBS）を9日目から開始して毎日の注射を5回、または(2) P56019.5中に存在するのと同じVHおよびVL領域を有する抗ヒトMSLN IgG1抗体を100 μg/マウスで9日目に開始して4日間隔で注射を2回、受けた。腫瘍体積を測定し、腫瘍が2000

50

mm³に到達したとき、または試験の終了時（33日目）に動物を安楽死させた。試験の完了後のデータ解析から、腫瘍退縮とヒトT細胞数との間の直接相関関係が示され、みかけの最小値3%の血中ヒトT細胞が活性に必要であった。したがって、全てのヒト化マウス群についての最終解析から、3%未満を有する動物を排除し、処置群あたりマウス4匹という最終動物数にした。

【0131】

図13に示されるように、移植されたCapan-2細胞は、「NSG対照マウス」（これらは、ヒト化されていない）において、P56019.5で処置されたにもかかわらず、腫瘍を形成した。同様に、抗ヒトMSLN IgG1抗体で処置されたマウスにおいて腫瘍が形成した。対照である抗EGFRvIII/CD3 二重特異性抗体も腫瘍成長を阻害することができなかった。対照的に、P56019.5（抗MSLN/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体）で処置されたヒト化マウスでは腫瘍成長が有意に抑制された。したがって、これらのデータは、腫瘍成長の阻害が、ヒトT細胞の存在、ならびに腫瘍細胞およびT細胞の両方と二重特異性分子との結合に依存したことを示唆している。さらに、これらのデータは、腫瘍成長のT細胞依存性抑制が、Capan-2細胞上のメソテリンの結合によって媒介されることを示唆している。この試験から、二重特異性ヘテロ二量体性抗体は標的細胞のT細胞媒介殺滅をインビボで誘導できることが実証された。

【0132】

実施例9：ヘテロ二量体性二重特異性抗体の薬物動態特性

下記実験において、ヘテロ二量体性二重特異性抗体の単回投与薬物動態特性を単鎖二重特異性分子と比較した。抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体（これは、P136797.3と称する）の第1および第2のポリペプチド鎖は、それぞれSEQ ID NO:20およびSEQ ID NO:21のアミノ酸配列を有した。抗HER2/CD3 単鎖二重特異性抗体は、リンカーによって連結された2つのVH/VL対を含有し、その抗体は、SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を有した。

【0133】

2つの被験抗体を、一部のNOD.SCIDマウス（Harlan Laboratories, Livermore, CAから入手）では外側尾静脈を介して静脈内に、または他のマウスでは肩甲を覆う皮膚の下に皮下に、濃度1mg/kgで注射した。各時点で後眼窩静脈叢穿刺により全血約0.1mLを採血した。全血が凝固したら、試料を処理して血清を得た（1試料あたり約0.040mL）。Gyros AB（Warren, NJ）の技術を用いたイムノアッセイによって血清試料を分析し、単鎖二重特異性抗体およびヘテロ二量体性二重特異性抗体の血清中濃度を決定した。このアッセイは、ヘテロ二量体性二重特異性抗体（これは、Fc領域を含有した）を捕捉および検出するために抗ヒトFc抗体を、単鎖ヘテロ二量体性分子を捕捉するためにCD3模倣ペプチドを採用し、該分子を、抗HIS抗体を用いて検出した。注射の0、0.5、2、8、24、72、120、168、240、312、384、および480時間後に血清試料を収集し、分析の前に-70（±10）に維持した。Phoenix（登録商標）6.3ソフトウェア（Pharsight, Sunnyvale, CA）を使用するノンコンパートメント解析によって、血清中濃度から薬物動態パラメーターを推定した。

【0134】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、皮下または静脈内のいずれかに注射された場合、単鎖二重特異性抗体の血清半減期（5時間）に比べて延長した血清半減期（223時間）を示した。図14および15。単鎖二重特異性分子への暴露は、19hr*μg/mLという曲線下面積（AUC）によって特徴付けられ、一方で、ヘテロ二量体性二重特異性抗体のAUCは、2541hr*μg/mLであった。したがって、ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、好都合な薬物動態特性を有した。

【0135】

実施例10：抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体による腫瘍成長のインビボ阻害

下記実験は、FOLR1発現NCI-N87ヒト胃癌細胞を使用するがんのインビボモデル系においてヘテロ二量体性二重特異性抗体の活性を実証するものである。この実験に使用される抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体（PL-30056）は、図1（4）に示される一般設計を有し、かつSEQ ID NO:84および86のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含

む。これらのポリペプチド鎖をコードするDNA構築物を、本質的に実施例1に記載されるように作製したが、これを合成的に作製することもできる。本実験に使用された単鎖抗FOLR1/CD3 単鎖二重特異性 (PL-30055) のアミノ酸配列をSEQ ID NO:88に提供する。

【0136】

この実験に使用するために、Miltenyi T cell activation/expansion kitを製造業者の指示に従って使用して、18日の培養期間の0日目および14日目に抗CD3/CD28/CD2抗体を添加することによってヒト汎T細胞を予備活性化し、培養して増大させた。ヒト腫瘍をマウスに移植するために、50%MATRIGEL (商標) (BD Biosciences、カタログ番号356237) 中の、FOLR1を発現する胃癌細胞系 (NCI-N87) からの細胞約 3×10^6 個を、8週齢雌性NSGマウス (0日目) に皮下移植した。10日目に、活性化ヒト汎T細胞 20×10^6 個を各マウスに腹腔内 (IP) 注射により投与した。11および18日目に、10mg/匹のGAMMAGARD [免疫グロブリン輸液 (ヒト)] 10% (Baxter) に加えて0.2mg/匹の抗 μ Fc RII/III (クローン2.4G2) からなるFc RブロックをIP投与した。11日目のFc Rブロックの1時間後に、動物 (N=10/群) に、(1) 0.05mg/kgの単鎖抗FOLR1/抗CD3 二重特異性分子 (SEQ ID NO:88のアミノ酸配列を有する) のIP注射を毎日、または(2) 1mg/kgの抗FOLR1/抗CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (SEQ ID NO:84および86のアミノ酸配列を有する) もしくは0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0 (ビヒクル対照) のIP注射を5日間隔で2回、受けさせた。腫瘍体積を測定し、腫瘍が2000mm³に達したとき、または試験の終了時 (27日目) に動物を安楽死させた。

【0137】

図16に示されるように、腫瘍は、試験全体にわたりビヒクル処置動物において成長した。対照的に、ビヒクル処置マウスに比べて、単鎖抗FOLR1/CD3 二重特異性分子または抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性分子で処置されたマウスにおいて、腫瘍成長は有意に阻害された ($p < 0.0001$)。実験全体にわたり、処置されたマウスまたは未処置マウスの体重に有意な変化はなかった (データは示さず)。これらのデータは、抗FOLR1/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体がこのインビボ系において標的腫瘍細胞のT細胞性殺滅を誘導できることを示唆している。

【0138】

実施例11: 抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体のインビトロおよびインビボ活性
下記実験は、CD33発現白血病細胞系MoIm-13またはルシフェラーゼ遺伝子を含有するその派生株MoIm-13-ルシフェラーゼ (MoIm-13-luc) を使用して、インビトロで、およびがんのインビボモデル系において、ヘテロ二量体性二重特異性抗体の活性を実証するものである。この実験に使用される様々な単鎖二重特異性抗体およびヘテロ二量体性二重特異性抗体のアミノ酸配列は、以下の通りである: SEQ ID NO:90のアミノ酸配列を有する抗MEC/CD3 単鎖二重特異性 (P137424.7; 陰性対照として使用); SEQ ID NO:92のアミノ酸配列を有する抗CD33/CD3 単鎖二重特異性 (P138241.3); ならびにSEQ ID NO:94および96のアミノ酸配列を含む抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体 (図1(6)に示される構成を有するPL-144537.6)。

【0139】

抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体がMoIm-13細胞を特異的に溶解できたかどうかを判定するために、標的細胞としてMoIm-13細胞およびエフェクター細胞として汎T細胞を使用して、実施例2記載の細胞溶解アッセイを行った。試料は、二重特異性の存在下もしくは非存在下でMoIm-13細胞単独、または二重特異性の存在下もしくは非存在下でMoIm-13細胞および汎T細胞の両方を含有した。図17に示されるように、MoIm-13および汎T細胞の両方に加えて二重特異性を含有する試料において特異的溶解が観測された。したがって、二重特異性は、エフェクターT細胞の非存在下でなく存在下でMoIm-13細胞を特異的に溶解することができる。

【0140】

D-ルシフェリンの存在下でルミネセンスを示すMoIm-13-luc細胞 (1×10^6 個) を、10週齢雌性NSGマウスの右側腹部に皮下注射 (SC) した (0日目)。腫瘍細胞の接種から3日目

10

20

30

40

50

に、活性化ヒト汎T細胞（実施例10に説明したように活性化） 20×10^6 個を各マウスにIP注射によって投与した。4および11日目に、実施例10に記載のFc RブロックをIP注射によって投与した。4日目のFc Rブロックの1時間後に、マウス（N=8/群）に以下の処置の1つを受けさせた：（1）0.05mg/kgの抗CD33/CD3 単鎖二重特異性、0.05mg/kgの抗MEC/CD3 単鎖二重特異性（SEQ ID NO:90；陰性対照）、もしくは0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0（ピヒクル対照）のいずれかの毎日の腹腔内注射を10日間；または（2）1mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体のIP注射を5日間隔で2回。

【0141】

投薬開始後、IVIS（登録商標）-200 In Vivo Imaging System（Perkin Elmer）を用いたバイオルミネセンスイメージングを2週間にわたり月曜、水曜、金曜に行った。イメージングの9分前に、マウスに150mg/kg D-ルシフェリンをIP注射により与えた。画像を集め、LIVING IMAGE（登録商標）ソフトウェア2.5（Caliper Life Sciences）を使用して解析した。ベースラインのバイオルミネセンスを測定するために、ナイーブな動物（Molm-13-lucもヒト汎T細胞も接種されていない動物）を使用した。

【0142】

図18に示されるように、ピヒクルまたは陰性対照二重特異性（抗MEC/CD3 単鎖二重特異性）で処置され、Molm-13-luc細胞に続いて、活性化/増大させたヒト汎T細胞を接種されたマウスにおいて、腫瘍量は、試験の経過全体にわたり増加した。対照的に、ピヒクル対照の投与を受けたマウスにおける腫瘍成長に比べて、抗CD33/CD3 単鎖二重特異性で処置されたマウス（ $p < 0.0001$ ）または抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体で処置されたマウス（ $p < 0.0001$ ）において、腫瘍細胞は有意に抑制された。実験全体にわたり、処置されたマウスまたは未処置マウスの体重に実質的な変化はなかった（データは示さず）。これらのデータは、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、この系において腫瘍標的細胞のインビボ殺滅を誘導できることを示している。

【0143】

ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、ヒトT細胞の増殖をインビボで誘導する能力があるかを判定するために、処置の最終投与の24時間後に、すなわち単鎖二重特異性抗体について11日目およびヘテロ二量体性二重特異性抗体について14日目に、フローサイトメトリーを使用してヒトT細胞の血中レベルを分析した。抗ヒトCD4および抗ヒトCD8で血液試料を染色して、生存白血球（マウスおよびヒト）に対する陽性細胞率を決定した。結果を図19に示す。

【0144】

ヒトCD4⁺T細胞のレベルは全ての処置（ピヒクル、単鎖二重特異性、およびヘテロ二量体性二重特異性抗体）にわたり一定のままであり、CD8⁺T細胞は、ピヒクル処置動物および対照単鎖二重特異性処置動物で低いままであった。対照的に、抗CD33/CD3 単鎖またはヘテロ二量体性二重特異性抗体で処置された動物においてCD8⁺T細胞は増大したが、これは、CD8⁺T細胞が、抗CD33/CD3 単鎖二重特異性抗体またはヘテロ二量体性二重特異性抗体に応答してインビボ増殖することを示している。

【0145】

実施例12：CD33発現腫瘍細胞を使用するがんのインビボモデル系におけるヘテロ二量体性二重特異性抗体の用量反応

がんのインビボモデル系においてヘテロ二量体性二重特異性抗体による腫瘍阻害の程度が抗体の用量に関係するかどうかを判定するために、下記実験を計画した。CD33発現がん細胞系Molm-13-lucは、D-ルシフェリンが添加されるとルミネセンスシグナルを提供することでインビボ腫瘍成長の定量化を容易にするので、この細胞系を使用した。

【0146】

本質的に実施例11に記載のように実験を行った。実施例11におけるように、0日目にMolm-13-luc細胞を注射し、3日目に活性化ヒト汎T細胞を注射した。同じく実施例11に説明したように、4および11日目にFc Rブロックを投与した。4日目のFc Rブロックの1時間後に、マウス（N=8/群）に0.9%NaCl中の25mMリシン塩酸塩、0.002%Tween 80、pH7.0（ピヒ

10

20

30

40

50

クル対照)、または1mg/kg、0.1mg/kg、0.03mg/kg、0.01mg/kg、もしくは0.001mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体のいずれかのIP注射を5日間隔で2回受けさせた。抗CD33/CD3ヘテロ二量体性二重特異性抗体は、実施例11で使用されたものと同じであった。バイオルミネセンスイメージングを実施例11記載のように行った。

【0147】

図20に示されるように、ビヒクル処置NSGマウスでは、試験全体にわたり腫瘍が成長した(破線で結ばれた白丸)。対照的に、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体で処置されたマウスにおいて腫瘍成長抑制の用量反応が示された。バイオルミネセンスによって測定された腫瘍成長の阻害は、1mg/kgの抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体で99.99%(実線で結ばれた黒丸)、0.1mg/kgで99.88%(破線で結ばれた下向き白三角)、0.03mg/kgで85.5%(実線で結ばれた上向き白三角)、0.01mg/kgで69.37%(破線で結ばれた白四角)、および0.001mg/kgで約11.88%であった(実線で結ばれた上向き黒三角)。抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体についてのEC₅₀およびEC₉₀は、それぞれ0.0012mg/kgおよび0.0463mg/kgであった。ビヒクル対照とヘテロ二量体性二重特異性抗体との間の差は、用量1mg/kg、0.1mg/kg、0.03mg/kg、および0.01mg/kgについて有意であった($p < 0.0001$)。実験全体にわたり、処置されたマウスまたは未処置マウスの体重に有意差はなかった(データは示さず)。これらのデータは、抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体が、標的細胞のインビボ殺滅を用量依存的に強力に誘導できることを示している。

【0148】

実施例13: カニクイザルにおける抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の薬物動態SEQ ID NO:94および96のアミノ酸配列を含む抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の単回投与の薬物動態パラメーターを、3つの異なる用量レベル10、100および200 μg/kgで評価するために、試験を計画した。1つの用量レベルあたり動物2匹を処置した。それらの用量を静脈内ボラス注射によって投与した。Meso Scale Discovery (Rockville, Maryland)製のイムノアッセイを製造業者の指示に従って使用して、血清中薬物動態を決定した。注射後最大168時間までの様々な時点で血液試料を採取し、試料を処理して血清を得た。これらの結果から計算された薬物動態パラメーターを下の表7に示す。

【0149】

(表7) カニクイザルにおける抗CD33/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の薬物動態パラメーター

用量 (μg/kg)	β相での 半減期 (T _{1/2β}) (時間)	曲線下面積 (AUC) (時間・pg/mL)	全身 クリアランス (Cl) (mL/時間/kg)	定常状態での 分布容積 (V _{ss}) (mL/kg)	最大薬物濃度 (C _{max})(pg/mL)
10	47.9	2,166,766	4.6	129	122,483
100	89.1	27,155,721	3.7	58	2,466,330
200*	99.1	21,839,428	9.2	309	947,684

* 単一動物から推定されたPKパラメーター

【0150】

表7に示されるように、用量10、100および200 μg/kgで決定された半減期は、それぞれ47.9、89.1および99.1時間であった。したがって、半減期は用量依存性であった。一般に分布容積は、Fc含有タンパク質について予想されるように低く、58~309mL/kgであった。すべての用量にわたって、クリアランスは、3.7~9.2mL/hr/kgの範囲であった。

【0151】

用量10および100 μg/kgは、認容性良好に見え、投薬後に臨床徴候も症状も示さなかった。6日目までに、用量100 μg/kgの動物1匹が、ベースラインを上回るアスパラギン酸ア

ミノトランスフェラーゼ（AST）レベル（組織損傷または疾患の指標である）を有し、追加的な異常所見を有さなかった。用量200 µg/kgの投与を受けた動物1匹はその用量に耐容性を示さず、投薬の12時間後に死んだ。

【 0 1 5 2 】

実施例14：抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下での細胞溶解性シナプス形成

SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を有する抗HER2/CD3 単鎖二重特異性ならびにSEQ ID NO:20および21のアミノ酸配列を含む抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体をアッセイして、それらがT細胞とHER2を発現するJIMT-1腫瘍細胞との間の細胞溶解性シナプス形成を誘導する能力を判定した。JIMT-1細胞を、ポリ-L-リシンがコーティングされた24ウェルガラス底培養プレートに蒔いた（1%FCSおよび2g/Lグルコースを含むRPMI培地中に細胞 0.5×10^6 個/ウェル）。37 °Cで1時間インキュベーション後に、ガラスウェルに接着しているJIMT-1細胞を温DPBSで優しく洗浄した。濃度1nMの抗HER2/CD3 単鎖または抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体の存在下または非存在下で、新鮮単離されたCD8⁺T細胞（健康ドナーからの細胞 1×10^6 個）をJIMT-1細胞に添加し、37 °Cで追加的に20分間インキュベーションさせて細胞溶解シナプスを生成させた。

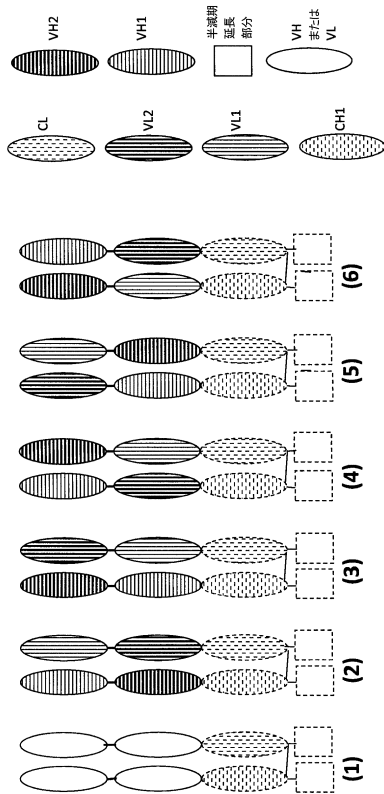
【 0 1 5 3 】

プレート上の細胞を、予備加温されたDPBSで洗浄し、直ちに3.7%パラホルムアルデヒドで10分間固定した。次に細胞をDPBSで洗浄し、0.1%TRITON（商標）X-100を用いて室温で5分間透過処理した。一次抗体の混合物（5 µg/mL抗PKC および0.4 µg/mL抗CD45）を細胞と共に4 °Cで一晩インキュベーションし、次に3回洗浄した。PKC は免疫シナプスに局在することが公知であり、一方でCD45はT細胞表面上に発現され、典型的には免疫シナプスの中心には存在しない。8 µg/mL二次抗体の混合物（抗CD45について緑色（Alexa-Fluor-488）および抗PKC について赤色（Alexa-Fluor-647））を室温で3時間添加し、次にDPBSで2回洗浄した。SlowFade（登録商標）Goldアンチフェード試薬をDAPI（核染料）（Life Technologies #536939）と共にガラスウェルに直接添加し、プレートを遮光して-70 °Cで保存した。

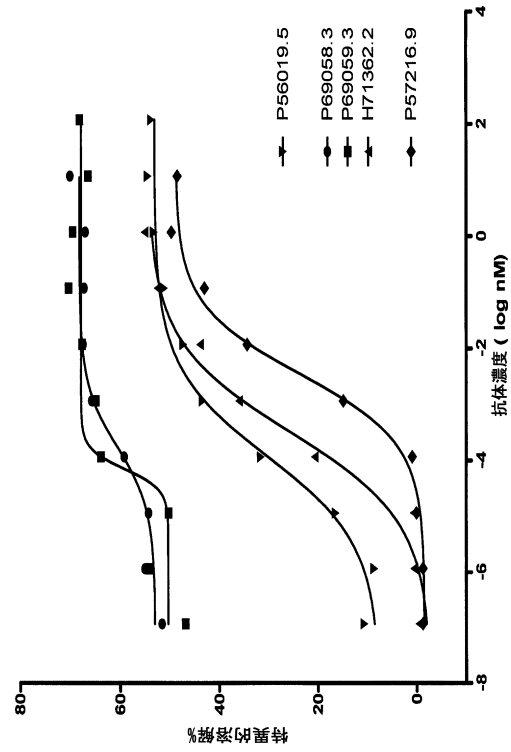
【 0 1 5 4 】

免疫蛍光共焦点顕微鏡観察から、CD45はT細胞表面上に存在し（CD45の緑色染色を有する、より小さな細胞型として同定される）、一方でPKC （赤色染色）は、JIMT-1腫瘍細胞（より大きな細胞型として同定される）とT細胞との間のシナプス形成部位で集中的なシグナルを与えたことが示された。T細胞とJIMT-1細胞との間の細胞溶解性シナプスが、抗HER2/CD3 単鎖二重特異性または抗HER2/CD3 ヘテロ二量体性二重特異性抗体を含有する試料において観測されたが、二重特異性を含有しない試料では観測されなかった（データは示さず）。これらの観測は、観測された細胞溶解性シナプス形成が、抗HER2/CD3 二重特異性の存在に依存すること、ならびに単鎖二重特異性およびヘテロ二量体性二重特異性抗体の両方が免疫シナプス形成を媒介できることを示唆している。

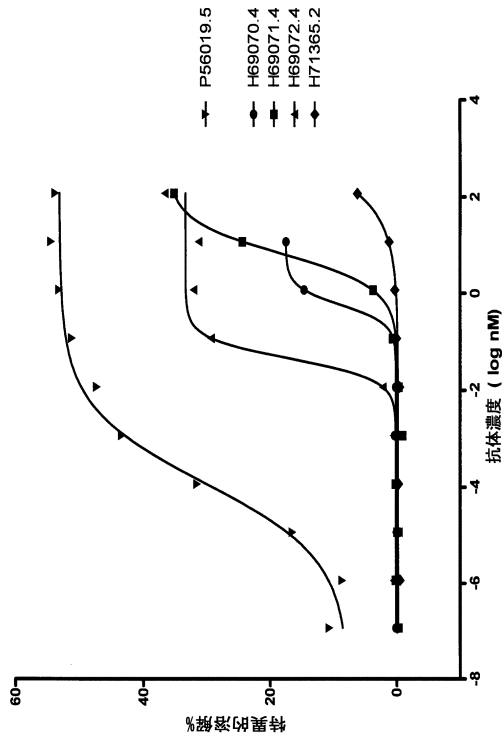
【図 1】



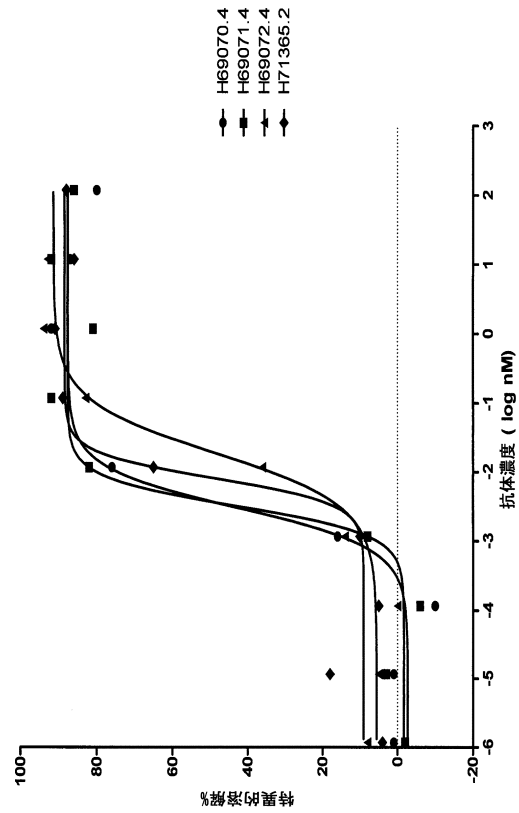
【図 2】



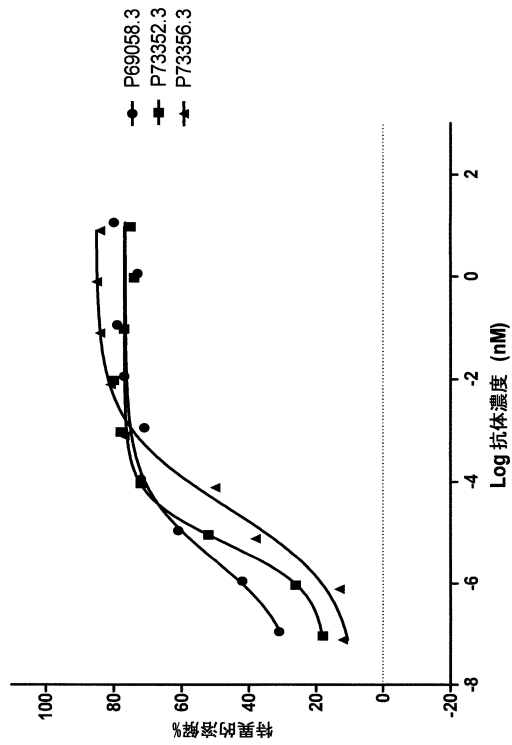
【図 3】



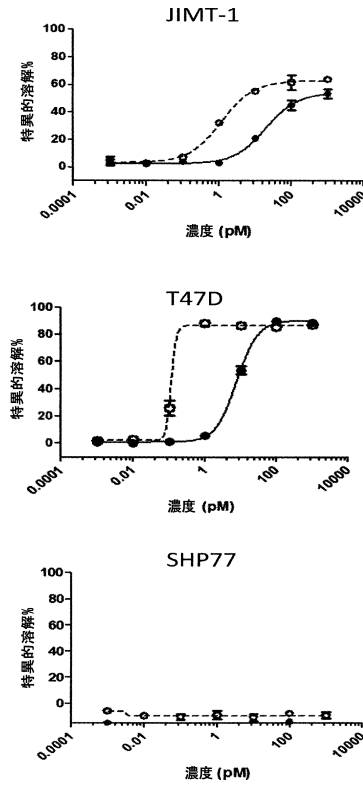
【図 4】



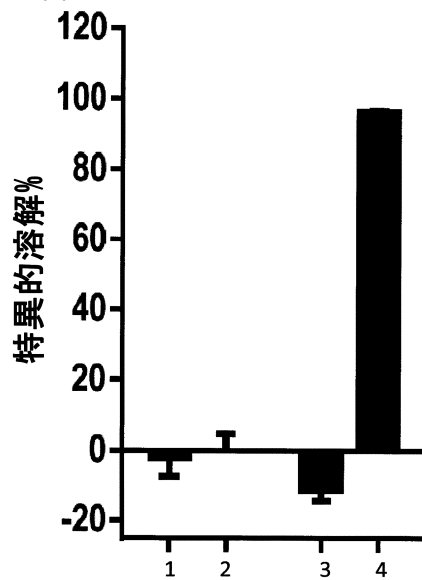
【図5】



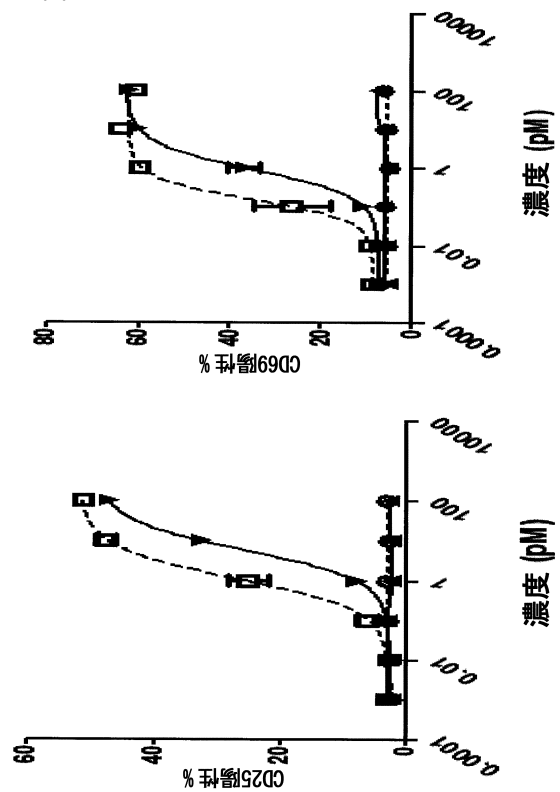
【図6】



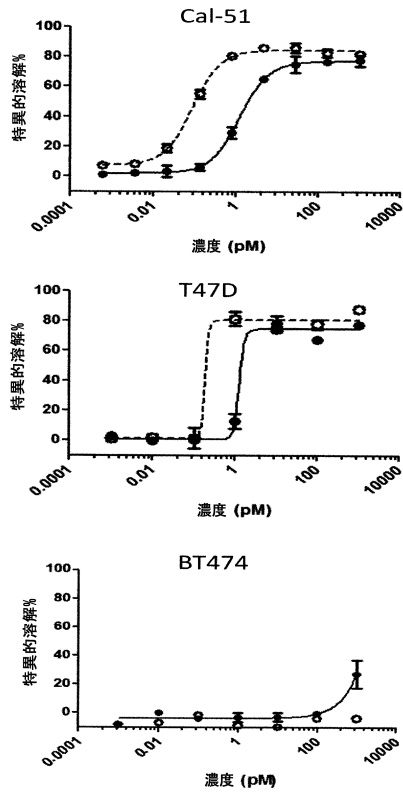
【図7】



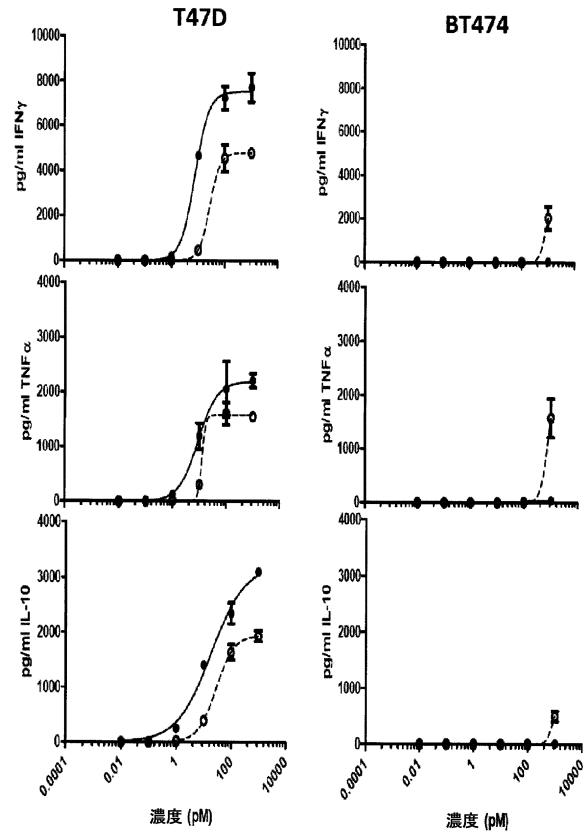
【図8】



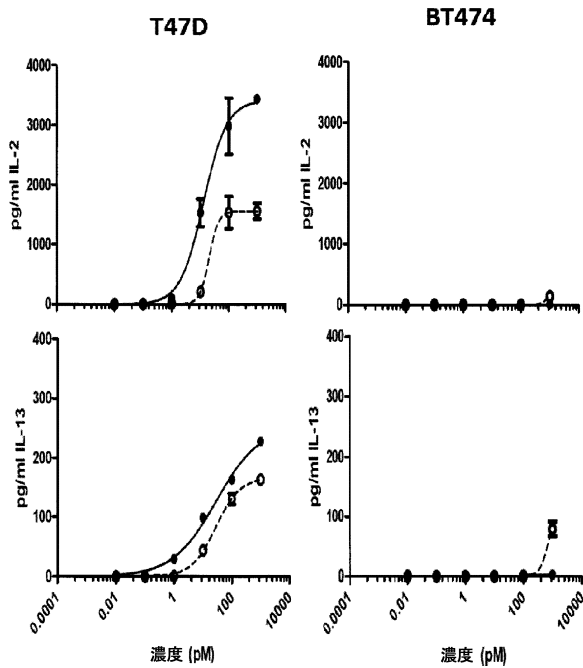
【図 9】



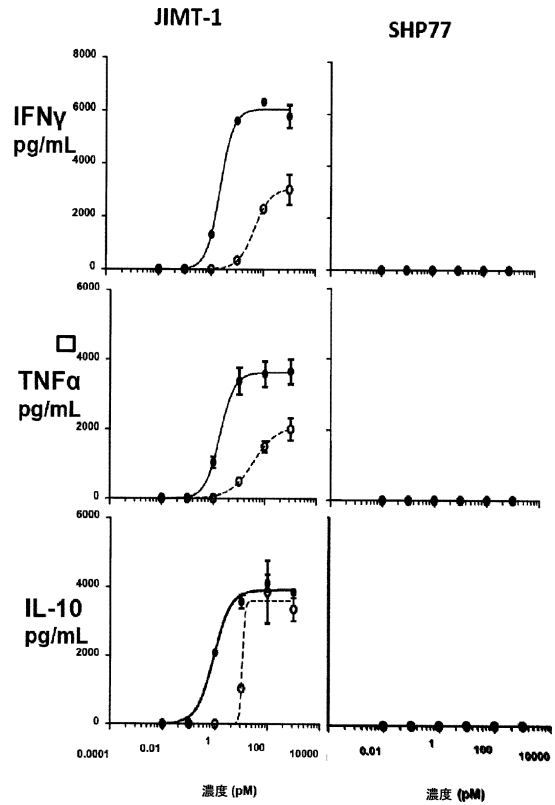
【図 10 A】



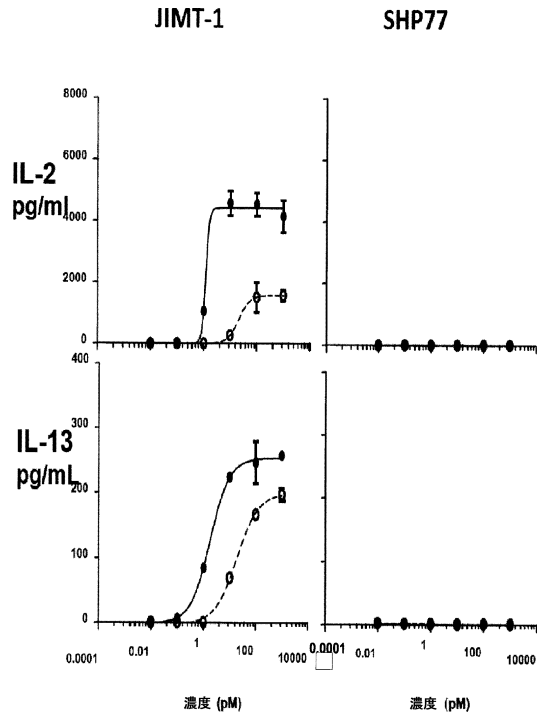
【図 10 B】



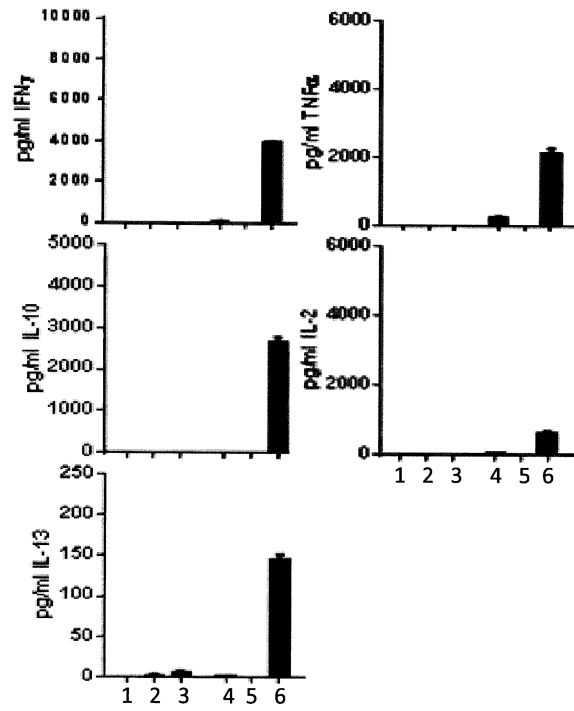
【図 11 A】



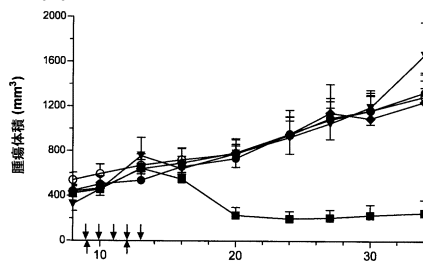
【図 1 1 B】



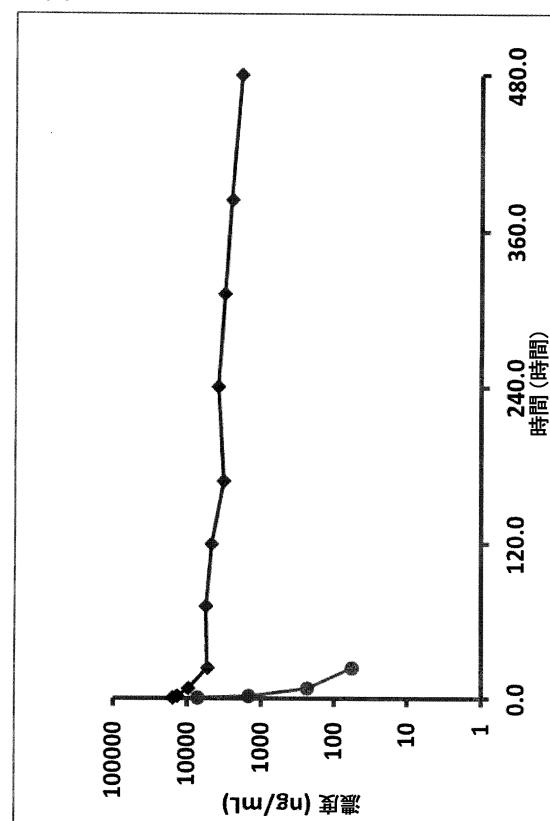
【図 1 2】



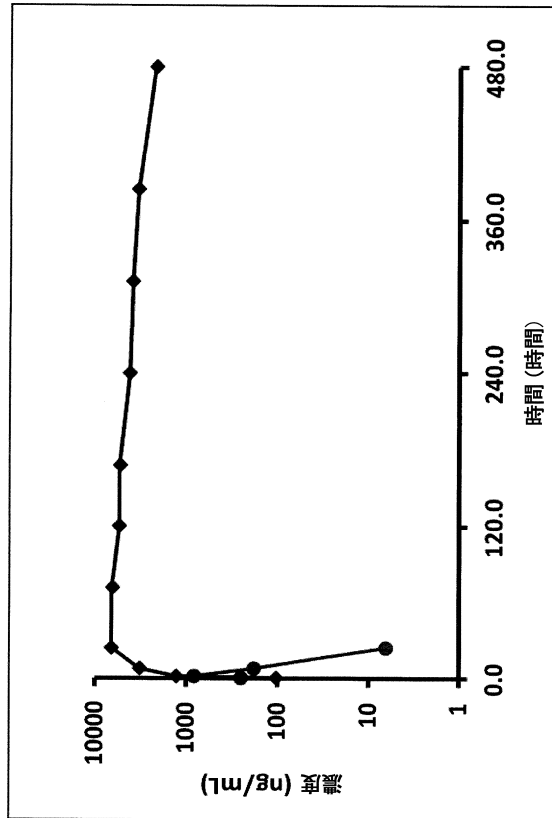
【図 1 3】



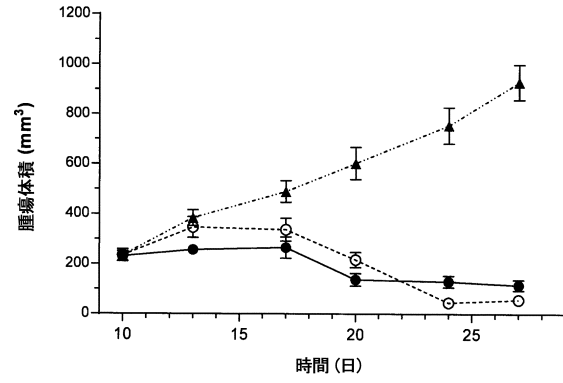
【図 1 4】



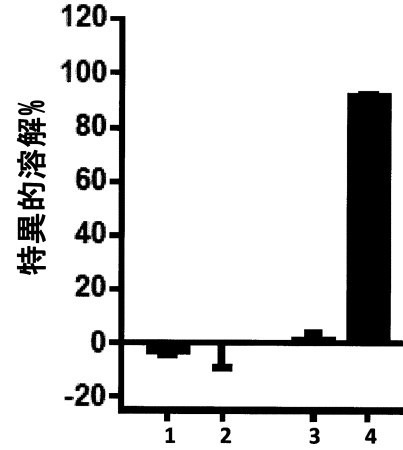
【図 15】



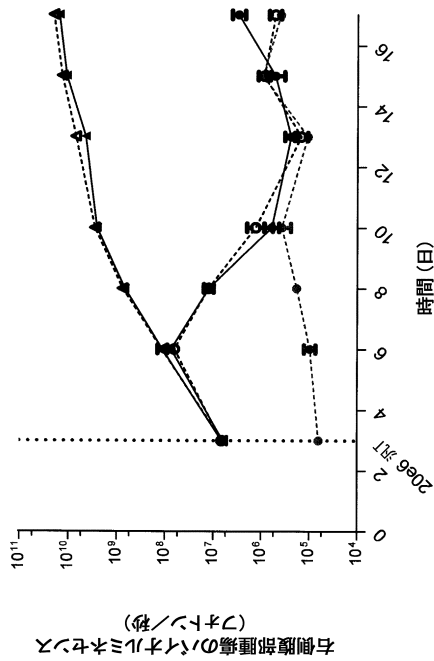
【図 16】



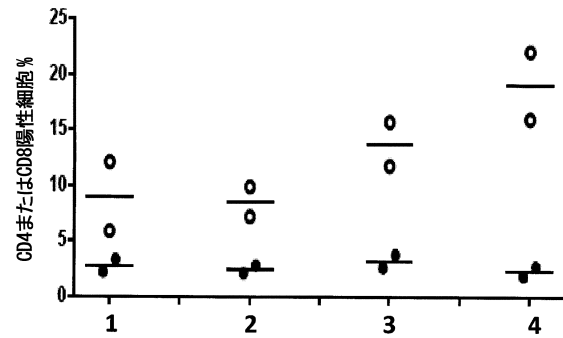
【図 17】

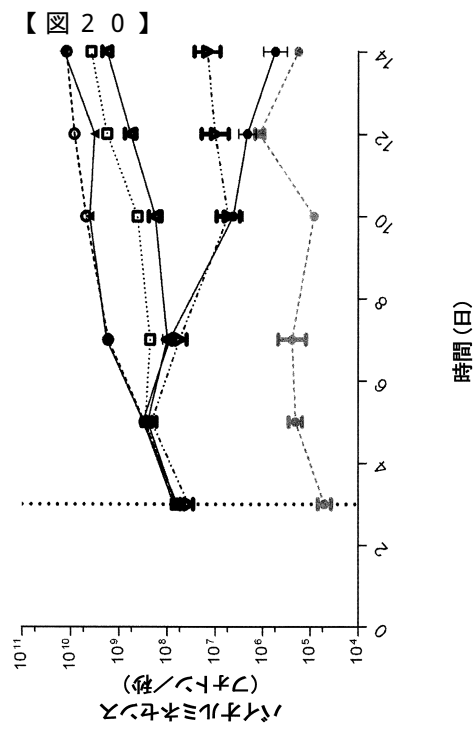


【図 18】



【図 19】





【配列表】

0006404313000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K 16/30
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 R
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
			A 6 1 P 11/00
			A 6 1 P 13/12
			A 6 1 P 1/16

(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 ヤン ウェイ

アメリカ合衆国 ワシントン州 サマミシュ トゥーハンドレッド アンド セブンティ フォース プレイス サウスイースト 1 1 1 6

(72)発明者 ペントニー マーチン ジェイ.

アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル カリフォルニア アベニュー サウスウエスト 1 0 2 0 8

(72)発明者 ボルヘス ルイス ジー.

アメリカ合衆国 ワシントン州 ベインブリッジ アイランド ノースイースト ビーチ クレスト ドライブ 9 7 0 5

(72)発明者 マイケルズ マーク エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エンシーノ テクソーマ アベニュー 5 0 0 7

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特表2012-512894(JP,A)

特表2012-504403(JP,A)

特表2011-508604(JP,A)

国際公開第2008/024188(WO,A1)

国際公開第2012/135345(WO,A1)

CHRISTIAN KLEIN, MABS, 2 0 1 2 年 1 1 月 1 日, V4 N6, P653-663

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0