

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-523686

(P2018-523686A)

(43) 公表日 平成30年8月23日 (2018. 8. 23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/46 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
<b>C 0 7 K 16/28 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-508741 (P2018-508741)	(71) 出願人	504438727
(86) (22) 出願日	平成28年8月12日 (2016. 8. 12)		マクロジェニクス、インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月11日 (2018. 4. 11)		アメリカ合衆国 20850 メリーランド州、ロックヴィル、メディカル センター ドライブ 9704
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/046680	(74) 代理人	100123858
(87) 国際公開番号	W02017/030926		弁理士 磯田 志郎
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017. 2. 23)	(72) 発明者	ジョンソン レスリー エス.
(31) 優先権主張番号	62/280, 318		アメリカ合衆国 メリーランド州 20874, ダーネスタウン, ポプラー ヒル
(32) 優先日	平成28年1月19日 (2016. 1. 19)		ロード 14411
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ムーア ポール エー.
(31) 優先権主張番号	62/206, 051		アメリカ合衆国 メリーランド州 20878, ノース ポトマック, ターリー コート 10
(32) 優先日	平成27年8月17日 (2015. 8. 17)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 B 7 - H 3 及び C D 3 に結合できる二重特異性 1 価ダイアボディ並びにその使用

## (57) 【要約】

本発明は、B 7 H 3 及び C D 3 に同時に結合できる、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ、及び特に B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを対象とする。本発明はまた、このような二重特異性 1 価 F c ダイアボディを含有する医薬組成物も対象とする。本発明は更に、癌並びに他の疾患及び状態の治療における、このようなダイアボディの使用法を対象とする。

【選択図】 図 1 6 A

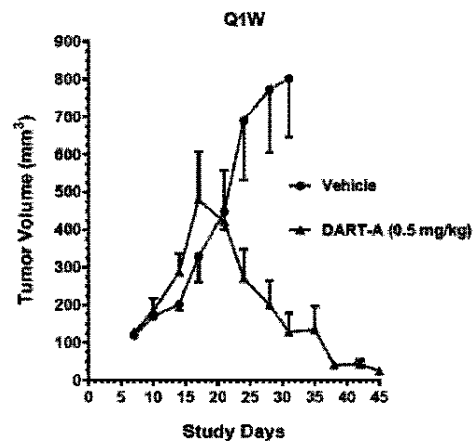


Figure 16A

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

B 7 H 3 及び C D 3 に特異的に結合できる、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディであって、

前記ダイアボディは、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、

前記ポリペプチド鎖は、共有結合複合体を形成し：

(A) 前記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有し；

(B) 前記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有し；

(C) 前記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

**【請求項 3】**

B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする疾患又は状態の治療における、請求項 1 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、又は請求項 2 に記載の医薬組成物の使用。

**【請求項 4】**

前記 B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする前記疾患又は状態は、癌である、請求項 3 に記載の使用。

20

**【請求項 5】**

前記癌は：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；A I D S 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌からなる群から選択される、請求項 4 に記載の使用。

30

**【請求項 6】**

前記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、及び頭頸部扁平上皮細胞癌 (S C C H N) からなる群から選択される、請求項 5 に記載の使用。

**【請求項 7】**

B 7 H 3 及び C D 3 に特異的に結合できる、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディであって、

40

前記ダイアボディは、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、

前記ポリペプチド鎖は、共有結合複合体を形成し：

(A) 前記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を有し；

(B) 前記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有し；

(C) 前記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

50

## 【請求項 9】

B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする疾患又は状態の治療における、請求項 7 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、又は請求項 8 に記載の医薬組成物の使用。

## 【請求項 10】

前記 B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする前記疾患又は状態は、癌である、請求項 9 に記載の使用。

## 【請求項 11】

前記癌は：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；A I D S 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌からなる群から選択される、請求項 10 に記載の使用。

10

20

## 【請求項 12】

前記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、及び頭頸部扁平上皮細胞癌（S C C H N）からなる群から選択される、請求項 11 に記載の使用。

## 【請求項 13】

B 7 H 3 及び C D 3 に特異的に結合できる、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディであって、

前記ダイアボディは、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、

前記ポリペプチド鎖は、共有結合複合体を形成し：

（A）前記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 61 のアミノ酸配列を有し；

（B）前記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 62 のアミノ酸配列を有し；

（C）前記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 57 のアミノ酸配列を有する、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

30

## 【請求項 14】

請求項 13 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

## 【請求項 15】

B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする疾患又は状態の治療における、請求項 13 に記載の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、又は請求項 14 に記載の医薬組成物の使用。

40

## 【請求項 16】

前記 B 7 H 3 の発現に関連する又は B 7 H 3 の発現を特徴とする前記疾患又は状態は、癌である、請求項 15 に記載の使用。

## 【請求項 17】

前記癌は：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；A I D S 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；

50

胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌からなる群から選択される、請求項 16 に記載の使用。

#### 【請求項 18】

前記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、及び頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN）からなる群から選択される、請求項 17 に記載の使用。

#### 【請求項 19】

B7 H3 及び CD3 に特異的に結合できる、B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディであって、

前記ダイアボディは、第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、

前記ポリペプチド鎖は、共有結合複合体を形成し：

（A）前記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 63 のアミノ酸配列を有し；

（B）前記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 64 のアミノ酸配列を有し；

（C）前記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 57 のアミノ酸配列を有する、B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ。

#### 【請求項 20】

請求項 19 に記載の B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

#### 【請求項 21】

B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする疾患又は状態の治療における、請求項 19 に記載の B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ、又は請求項 20 に記載の医薬組成物の使用。

#### 【請求項 22】

前記 B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする前記疾患又は状態は、癌である、請求項 21 に記載の使用。

#### 【請求項 23】

前記癌は：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；AIDS 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌からなる群から選択される、請求項 22 に記載の使用。

#### 【請求項 24】

前記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、及び頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN）からなる群から選択される、請求項 23 に記載の使用。

#### 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、米国特許出願第62/206,051号(2015年8月17日出願;係属中)及び米国特許出願第62/280,318号(2016年1月19日出願)に対する優先権を主張するものであり、これらの特許出願はそれぞれ、参照によりその全体が本出願に援用される。

## 【0002】

## 配列表の参照

本出願は、連邦規則法典第37巻第1.821節以下による1つ又は複数の配列表を含み、これらの配列表は、コンピュータ可読媒体(ファイル名:1301\_0123PCT\_ST25.txt、2016年8月10日作成、サイズ:70,481バイト)において開示されており、上記ファイルは、参照によりその全体が本出願に援用される。

10

## 【0003】

本発明は、B7 H3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有する、二重特異性1価ダイアボディ(即ち「B7 H3×CD3二重特異性1価ダイアボディ」)を対象とする。より好ましくは、このようなB7 H3×CD3二重特異性1価ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖で構成され、B7 H3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有し、更に免疫グロブリンFcドメインを含む(即ち「B7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」)。本発明の二重特異性1価Fcダイアボディは、B7 H3及びCD3に同時に結合できる。本発明は、このような二重特異性1価Fcダイアボディを含有する医薬組成物を対象とする。本発明は更に、癌並びに他の疾患及び状態の治療におけるこのようなダイアボディの使用法を対象とする。

20

## 【背景技術】

## 【0004】

## I. B7スーパーファミリー及びB7 H3

腫瘍の成長及び転移は、これらが宿主の免疫監視機構を回避して宿主の防御を克服する能力に大きく左右される。ほとんどの腫瘍は、宿主の免疫系によって程度が可変であると認識できる抗原を発現するが、多くの場合、エフェクター細胞の無効な活性化により、不十分な免疫応答が誘発される(非特許文献1)。

30

## 【0005】

B7 H3は、免疫グロブリン分子のB7スーパーファミリーのメンバーである。B7スーパーファミリーのメンバーは、免疫グロブリンV様ドメイン及び免疫グロブリンC様ドメイン(例えばそれぞれIgV及びIgC)を有する(非特許文献2)。B7スーパーファミリーメンバーのIgV及びIgCドメインはそれぞれ単一のエクソンによってコードされ、追加のエクソンがリーダ配列、膜貫通及び細胞質ドメインをコードする。細胞質ドメインは短く、アミノ酸残基19~62個の長さであり、複数のエクソンによってコードできる(非特許文献3)。B7スーパーファミリーのメンバーは、細胞表面において連続した非共有結合ホモ二量体を形成すると予測され、このような二量体はB7 1(CD80)及びB7 2(CD86)に関して発見されている。B7 1(CD80)及びB7 2(CD86)は、刺激性CD28受容体及び阻害性CTLA 4(CD152)受容体に対する二重特異性を呈する(非特許文献8)。

40

## 【0006】

B7 H3(CD276)は、主要なヒト型が2つの細胞外タンデムIgV-IgCドメイン(即ちIgV-IgC-IgV-IgC)を含有する点において独特である(非特許文献3)。4免疫グロブリン細胞外ドメイン変異体(「4Ig-B7 H3」)は、最初はIgドメイン(IgV-IgC)を2つだけ含むと考えられていた(非特許文献4、5)が、上記タンパク質のより一般的なヒト型であることが発見された(非特許文献2)し

50

かしながら、天然のマウス型は2 Igであり、これとヒト4 Ig型とは同様の機能を呈する（非特許文献6）。4 Ig B7 H3分子は、癌細胞のナチュラルキラー細胞媒介性溶解を阻害する（非特許文献7）。ヒトB7 H3の2 Ig型は、活性化されるT細胞上の推定受容体に結合することにより、T細胞の活性化及びIFN 産生を促進することが分かっている（非特許文献4、8）。B7 H4及びB7 H3の両方は、腫瘍細胞上に発現した場合、免疫機能の潜在的阻害因子となる（非特許文献9）。

#### 【0007】

B7 H3の作用の態様は複雑である。というのは、このタンパク質はT細胞共刺激及び共阻害の両方を仲介するためである（非特許文献6、10、11）。B7 H3はTREM様転写体2（TLT 2）に結合して、T細胞活性化を共刺激するが、まだ識別されて 10  
いない1つ又は複数の受容体に結合して、T細胞の共阻害を媒介する。更にB7 H3は、1つ又は複数の未知の受容体との相互作用により、ナチュラルキラー細胞及び骨芽細胞の阻害因子となる（非特許文献6）。上記阻害は、T細胞受容体（TCR）が遺伝子転写を制御するための主要な信号伝達経路のメンバー（例えばNFTA、NF B、又はAP 1因子）との相互作用によって作用し得る。

#### 【0008】

B7 H3はCD4+及びCD8+T細胞の増殖を共刺激する。B7 H3はまた、IFN 産生及びCD8+溶解活性を刺激する（非特許文献4、2）。しかしながらこのタンパク質はまた、NFAT（Nuclear Factor for Activated T cell：活性化されたT細胞のための核内因子）、NF B（核内因子カ 20  
ップB）、AP 1（アクティベータタンパク質 1）因子によって、T細胞活性化を阻害するよう作用する場合がある（非特許文献12）。B7 H3はまた、Th1、Th2、又はTh17をインビボで阻害するとも考えられている（非特許文献13、14、12）。いくつかの独立した研究は、ヒト悪性腫瘍細胞がB7 H3タンパク質の発現の著しい上昇を呈すること、この著しい発現が、疾患の重篤度の上昇に関連すること（非特許文献15）を示しており、これはB7 H3が腫瘍により、免疫回避経路として悪用されていることを示唆している（非特許文献6）。

#### 【0009】

B7分子がT細胞受容体（例えばCD28）に結合する能力をブロックする分子は、免疫系を阻害し、自己免疫疾患の治療法として提案されている（非特許文献16）。抗4 Ig 30  
B7 H3抗体で治療される、4 Ig B7 H3を発現する神経芽腫細胞は、NK細胞に対して感受性がより高かった。しかしながら、この活性が、4 Ig B7 H3型に対する抗体のみによるものとすることができるかどうかは不明である。というのは、4 Ig B7 H3に対して産生された、報告された抗体は全て、B7 H3の上記2つのIg形態にも結合したためである（非特許文献17、7）。

#### 【0010】

B7 H3は静置されたB若しくはT細胞、単球又は樹状細胞上では発現しないが、IFN によって樹状細胞上に、またGM-CSFによって単球上に誘発される（非特許文献2）。B7 H3と結合する1つ又は複数の受容体は、完全には特性決定されてい 40  
ない。以前の研究は、1つのこのような受容体が、活性化後にT細胞上で迅速かつ過渡的に上方制御される必要があることを示唆していた（非特許文献18）。最近、骨髄性細胞上で発現するTREM様転写体2（TLT 2、又はTREM L2）受容体（非特許文献19、20、12）は、B7 H3と結合でき、またこれによって特にCD8+T細胞の活性化を共刺激できることが分かっている（非特許文献21、22、6）。

#### 【0011】

ヒトB7 H3は、神経芽腫細胞上での発現に加えて、多様な他の癌細胞（例えば胃、卵巣及び非小細胞肺癌）上で発現することも知られている。B7 H3タンパク質発現は腫瘍細胞株において免疫組織学的に検出されている（非特許文献4、23、7、5）。mRNA発現は、心臓、腎臓、精巣、肺、肝臓、膵臓、前立腺、大腸、骨芽細胞で発見され 50  
ている（非特許文献10）。タンパク質レベルにおいて、B7 H3はヒト肝臓、肺、膀

膵、精巣、前立腺、乳房、胎盤、リンパ器官に見られる（非特許文献 18）。

【0012】

II. CD3

CD3 は、4つの異なる鎖で構成される T 細胞共受容体である（非特許文献 24、25、26）。

【0013】

哺乳類では、この複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、及び 2つの CD3 鎖を含有する。これらの鎖は、T 細胞受容体（TCR）として知られる分子と会合して、T リンパ球における活性化シグナルを生成する（非特許文献 27）。CD3 が存在しない場合、TCR は適切に集合せず、崩壊する（非特許文献 28）。CD3 は、全ての成熟 T 細胞の膜に結合し、実質的に他のどの細胞タイプにも結合しないことが分かっている（非特許文献 29、30、31を参照）。

【0014】

T 細胞上の T 細胞受容体（TCR）複合体の、不変 CD3 シグナリング成分は、T 細胞と腫瘍細胞との間の免疫学的シナプスの形成を強制的に行うための標的として使用されてきた。CD3 と腫瘍抗原との間の共役は T 細胞を活性化し、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞の溶解をトリガする（非特許文献 32）。このアプローチにより、二重特異性抗体を、腫瘍細胞に対する高い特異性を有する T 細胞区画と全体的に相互作用させることができ、またこのアプローチは、幅広い細胞表面腫瘍抗原に広く適用可能である。

【0015】

III. 抗体及び他の結合分子

「抗体」は、免疫グロブリン分子であって、当該免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも 1つのエピトープ結合部位によって、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等の分子の標的領域（「エピトープ」）に特異的に結合できる、免疫グロブリン分子である。本明細書において使用される場合、この用語は、完全なポリクローナル又はモノクローナル抗体だけでなく、その突然変異体、自然に発生する変異体、必要な特異性のエピトープ結合部位を有する抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体及びキメラ抗体、並びに必要な特異性のエピトープ結合部位を含む免疫グロブリン分子の他のいずれの修飾構成を包含する。

【0016】

完全な未修飾抗体（例えば IgG 抗体）の、抗原のエピトープに結合する能力は、免疫グロブリンの「軽（light）」及び「重（heavy）」ポリペプチド鎖上の可変ドメイン（即ちそれぞれ VL 及び VH ドメイン、これらをまとめて「可変領域（Variable Region）」と呼ぶ）の存在に左右される。VH 及び VL はそれぞれ、3つの相補性決定領域（Complementarity Determining Region: CDR）ドメインと、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序：FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4 で配列された FR ドメインとで構成される。CDR のアミノ酸配列は、ある抗体がある特定のエピトープに結合できるかどうかを決定する。抗体軽鎖と抗体重鎖との相互作用、特に、それぞれ別個のポリペプチド上に存在するこれらの VL ドメインと VH ドメインとの相互作用は、抗体のエピトープ結合部位のうちの 1つを形成する。対照的に、scFv 構成は、単一ポリペプチド鎖が含有する抗体の VL 及び VH ドメインを含み、これらのドメインは、2つのドメインの機能性エピトープ結合部位への自己集合を可能とするのに十分な長さのフレキシブルリンカーによって隔てられる。VL 及び VH ドメインの自己集合が、不十分な長さのリンカー（例えば約 12 個未満のアミノ酸残基のリンカー）のリンカーによって不可能となる場合、2つの scFv 分子が互いに相互作用して 2 価「ダイアボディ（diabody）」を形成でき、この分子において一方の鎖の VL が他方の鎖の VH と連結する（非特許文献 33 において概説されている）。

【0017】

天然抗体は、1つのエピトープ種のみ結合できる（即ち単一特異性である）が、当該種

10

20

30

40

50

の複数の複製に結合できる（即ち２価性又は多価性を示す）。幅広い組み換え二重特異性抗体フォーマットが開発されており（例えば特許文献１～７参照）、その殆どは、更なる結合度め員（例えばs c F v、V L、V H等）を抗体コア（I g A、I g D、I g E、I g G若しくはI g M）へ若しくは上記抗体コア内に融合させるため、又は複数の抗原結合部分（例えば２つのF a b断片若しくはs c F v）を互いに融合させるために、リンカーペプチドを使用する。代替的なフォーマットは、結合タンパク質（例えばs c F v、V L、V H等）を、C H 2 C H 3ドメイン又は代替となるポリペプチド等の二量体化ドメインに融合させるために、リンカーペプチドを使用する（特許文献８～１１）。典型的には、このようなアプローチは妥協及びトレードオフを伴う。例えば特許文献１２～１４は、リンカーの使用によって、治療的設定に問題が生じる場合があることを開示しており、２つ以上の抗原に結合できるように、C L及びC H 1ドメインがそれぞれの自然位置から切り替わり、かつV L及びV Hドメインが多様化されている、三重特異性抗体を教示している（特許文献１５、１６）。従って、これらの文書に開示されている分子は、結合特異性を、追加の抗原種に結合できる能力と交換している。特許文献１７、１８は、C H 2ドメインを修飾して、結合ドメインを備える融合タンパク付加物を含有させるステップを開示している。この文書は、C H 2が、エフェクタ機能の仲介において最低限の役割しか果たさないらしいことを記載している。特許文献１９～２１は、F c領域が追加のV L及びV Hドメインで置換されて、３価結合分子を形成している、組み換え抗体を開示している。特許文献２２、２３は、個々の鎖がs c F vドメインを含有する組み換えダイアボディを開示している。特許文献２４は、単一のポリペプチド鎖として合成された後、タンパク質分解に供されることによってヘテロ二量体構造が得られる、多価f a b分子を開示している。従って、これらの文書に開示されている分子は、エフェクタ機能を仲介する能力の全て又はある程度を、追加の抗原種に結合できる能力と交換している。特許文献２５～３５は、追加の結合ドメイン又は官能基を抗体又は抗体部分に付加するステップ（例えば抗体の軽鎖にダイアボディを付加するステップ、又は抗体の軽鎖及び重鎖に追加のV L及びV Hドメインを付加するステップ、又は異種融合タンパク質を互いに対して付加するステップ若しくは複数のF a bドメインを互いに対して連鎖させるステップ）を開示している。従って、これらの文書に開示されている分子は、ナীব抗体構造を、追加の抗原種に結合できる能力と交換している。

10

20

30

#### 【００１８】

本技術分野は更に、２つ以上の異なるエピトープ種と結合できる（即ち２価性又は多価性に加えて二重特異性又は多重特異性を呈することができる）という点でこのような天然抗体とは異なるダイアボディを産生できる可能性に注目している（例えば非特許文献３４、特許文献３６、３７、非特許文献３５、３６、特許文献３８、非特許文献３７～４１を参照）。

#### 【００１９】

特に、安定した共有結合ヘテロ二量体非単一特異性ダイアボディについて記載されている（例えば非特許文献４２～４５、特許文献３９～４２を参照）。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【００２０】

【特許文献１】国際公開第２００８／００３１１６号

【特許文献２】国際公開第２００９／１３２８７６号

【特許文献３】国際公開第２００８／００３１０３号

【特許文献４】国際公開第２００７／１４６９６８号

【特許文献５】国際公開第２００９／０１８３８６号

【特許文献６】国際公開第２０１２／００９５４４号

【特許文献７】国際公開第２０１３／０７０５６５号

【特許文献８】国際公開第２００５／０７０９６６号

【特許文献９】国際公開第２００６／１０７７８６Ａ号

40

50



【特許文献 10】	国際公開第 2006 / 107617 A 号	
【特許文献 11】	国際公開第 2007 / 046893 号	
【特許文献 12】	国際公開第 2013 / 174873 号	
【特許文献 13】	国際公開第 2011 / 133886 号	
【特許文献 14】	国際公開第 2010 / 136172 号	
【特許文献 15】	国際公開第 2008 / 027236 号	
【特許文献 16】	国際公開第 2010 / 108127 号	
【特許文献 17】	国際公開第 2013 / 163427 号	
【特許文献 18】	国際公開第 2013 / 119903 号	
【特許文献 19】	国際公開第 2010 / 028797 号	10
【特許文献 20】	国際公開第 2010 / 028796 号	
【特許文献 21】	国際公開第 2010 / 028795 号	
【特許文献 22】	国際公開第 2003 / 025018 号	
【特許文献 23】	国際公開第 2003 / 012069 号	
【特許文献 24】	国際公開第 2013 / 006544 号	
【特許文献 25】	国際公開第 2014 / 022540 号	
【特許文献 26】	国際公開第 2013 / 003652 号	
【特許文献 27】	国際公開第 2012 / 162583 号	
【特許文献 28】	国際公開第 2012 / 156430 号	
【特許文献 29】	国際公開第 2011 / 086091 号	20
【特許文献 30】	国際公開第 2008 / 024188 号	
【特許文献 31】	国際公開第 2007 / 024715 号	
【特許文献 32】	国際公開第 2007 / 075270 号	
【特許文献 33】	国際公開第 1998 / 002463 号	
【特許文献 34】	国際公開第 1992 / 022583 号	
【特許文献 35】	国際公開第 1991 / 003493 号	
【特許文献 36】	米国特許第 2004 / 0058400 号 (Hollinger et al.)	
【特許文献 37】	米国特許第 2004 / 0220388 号 (Mertens et al.)	
【特許文献 38】	国際公開第 02 / 02781 号 (Mertens et al.)	
【特許文献 39】	米国特許第 8, 044, 180 号	30
【特許文献 40】	米国特許第 8, 133, 982 号	
【特許文献 41】	米国特許第 8, 187, 593 号	
【特許文献 42】	米国特許第 8, 193, 318 号	
【特許文献 43】	米国特許第 8, 530, 627 号	
【特許文献 44】	米国特許第 8, 669, 349 号	
【特許文献 45】	米国特許第 8, 778, 339 号	
【特許文献 46】	米国特許第 8, 784, 808 号	
【特許文献 47】	米国特許第 8, 795, 667 号	
【特許文献 48】	米国特許第 8, 802, 091 号	
【特許文献 49】	米国特許第 8, 802, 093 号	40
【特許文献 50】	米国特許第 8, 946, 387 号	
【特許文献 51】	米国特許第 8, 968, 730 号	
【特許文献 52】	米国特許第 8, 993, 730 号	
【特許文献 53】	米国公開特許第 2009 / 0060910 号	
【特許文献 54】	米国公開特許第 2010 / 0174053 号	
【特許文献 55】	米国公開特許第 2011 / 0081347 号	
【特許文献 56】	米国公開特許第 2011 / 0097323 号	
【特許文献 57】	米国公開特許第 2011 / 0117089 号	
【特許文献 58】	米国公開特許第 2012 / 0009186 号	
【特許文献 59】	米国公開特許第 2012 / 0034221 号	50

- 【特許文献 60】米国公開特許第 2012/0141476 号
- 【特許文献 61】米国公開特許第 2012/0294796 号
- 【特許文献 62】米国公開特許第 2013/0149236 号
- 【特許文献 63】米国公開特許第 2013/0295121 号
- 【特許文献 64】米国公開特許第 2014/0017237 号
- 【特許文献 65】米国公開特許第 2014/0099318 号
- 【特許文献 66】欧州特許第 1868650 号
- 【特許文献 67】欧州特許第 2158221 号
- 【特許文献 68】欧州特許第 2247304 号
- 【特許文献 69】欧州特許第 2252631 号 10
- 【特許文献 70】欧州特許第 2282770 号
- 【特許文献 71】欧州特許第 2328934 号
- 【特許文献 72】欧州特許第 2376109 号
- 【特許文献 73】欧州特許第 2542256 号
- 【特許文献 74】欧州特許第 2601216 号
- 【特許文献 75】欧州特許第 2714079 号
- 【特許文献 76】欧州特許第 2714733 号
- 【特許文献 77】欧州特許第 2786762 号
- 【特許文献 78】欧州特許第 2839842 号
- 【特許文献 79】欧州特許第 2840091 号 20
- 【特許文献 80】国際公開第 2006/113665 号
- 【特許文献 81】国際公開第 2008/157379 号
- 【特許文献 82】国際公開第 2010/027797 号
- 【特許文献 83】国際公開第 2010/033279 号
- 【特許文献 84】国際公開第 2010/080538 号
- 【特許文献 85】国際公開第 2011/109400 号
- 【特許文献 86】国際公開第 2012/018687 号
- 【特許文献 87】国際公開第 2012/162067 号
- 【特許文献 88】国際公開第 2012/162068 号
- 【特許文献 89】国際公開第 2014/159940 号 30
- 【特許文献 90】国際公開第 2015/021089 号
- 【特許文献 91】国際公開第 2015/026892 号
- 【特許文献 92】国際公開第 2015/026894 号
- 【非特許文献】
- 【0021】
- 【非特許文献 1】Khawli, L.A. et al. (2008) "Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors," *Exper. Pharmacol.* 181:291-328
- 【非特許文献 2】Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126 40
- 【非特許文献 3】Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7
- 【非特許文献 4】Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production," *Nature Immunol.* 2:269-274
- 【非特許文献 5】Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," *J. Immunol.* 168:6294-6297
- 【非特許文献 6】Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278
- 【非特許文献 7】Castriconi, R. et al. (2004) "Identification Of 4lg-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-

Mediated Lysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34):12640-12645

【非特許文献 8】Xu, H. et al. (2009) "MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors," *Cancer Res.* 69(15):5275-6281

【非特許文献 9】Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260

【非特許文献 10】Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298

【非特許文献 11】Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition," *J. Mol. Med.* 83:193-202

【非特許文献 12】Yi, K.H. et al. (2009) "Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4," *Immunol. Rev.* 229:145-151

【非特許文献 13】Prasad, D.V. et al. (2004) "Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells," *J. Immunol.* 173:2500-2506

【非特許文献 14】Fukushima, A. et al. (2007) "B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice," *Immunol. Lett.* 113:52-57

【非特許文献 15】Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition," *Clin. Cancer Res.* 13:5271-5279

【非特許文献 16】Linsley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation," *Immunolog. Rev.* 229:307-321

【非特許文献 17】Steinberger, P. et al. (2004) "Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains," *J. Immunol.* 172(4): 2352-2359

【非特許文献 18】Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells." *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214

【非特許文献 19】King, R.G. et al. (2006) "Trem-Like Transcript 2 Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation," *J. Immunol.* 176:6012-6021

【非特許文献 20】Klesney-Tait, J. et al. (2006) "The TREM Receptor Family And Signal Integration," *Nat. Immunol.* 7:1266-1273

【非特許文献 21】Zang, X. et al. (2003) "B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 100:10388-10392

【非特許文献 22】Hashiguchi, M. et al. (2008) "Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2 (TLT-2) Is A Counter-Receptor For B7-H3 And Enhances T Cell Responses," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10495-10500

【非特許文献 23】Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation," *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287:L217-L225

【非特許文献 24】Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(4):a005140; pages 1-14

【非特許文献 25】Chetty, R. et al. (1994) "CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice," *J. Pathol.* 173(4):303-307

【非特許文献 26】Guy, C.S. et al. (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex," *Immunol. Rev.* 232(1):7-21

【非特許文献 27】Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) "T Cell Activation," *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619

【非特許文献 28】Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From T

10

20

30

40

50

herapeutic T cell Receptor Gene Transfer, " Immunology 129(2):170-177).

【非特許文献 29】Janeway, C.A. et al. (2005) In: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease, " 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216

【非特許文献 30】Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 : Heterodimer, " Cell 105(7):913-923

【非特許文献 31】Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex, " Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139).

【非特許文献 32】Baeuerle et al. (2011) "Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy, " In: Bispecific Antibodies, Kontermann, R.E. (Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287 10

【非特許文献 33】Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies, " Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658

【非特許文献 34】Holliger et al. (1993) " 'Diabodies' : Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments, " Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448;

【非特許文献 35】Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94;

【非特許文献 36】Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity, " J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 20

【非特許文献 37】Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications, " Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27;

【非特許文献 38】Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange, " Protein Engineering 14(2):1025-1033;

【非特許文献 39】Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain, " Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992;

【非特許文献 40】Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System, " Protein Eng. 13(8):583-588; 30

【非特許文献 41】Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy, " Cancer Res. 69(12):4941-4944

【非特許文献 42】Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates, " Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82

【非特許文献 43】Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion, " J. Molec. Biol. 399(3):436-449 40

【非特許文献 44】Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold, " Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943

【非特許文献 45】Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma, " Blood 117(17):4542-4551

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

このような成功にもかかわらず、治療用途に最適化された、安定した官能性ヘテロ二量 50

体非単一特異性ダイアボディを、ポリペプチド鎖内に採用されるドメインの入念な考察及び配置によって、更に改善できる。従って本発明は、B 7 H 3 及びC D 3 に同時に結合できる、安定した、治療に有用なヘテロ二量体ダイアボディ及びヘテロ二量体F c ダイアボディを、共有結合によって形成するように特に設計された、特異的なポリペプチドの提供を対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明は、B 7 H 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びC D 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有する、二重特異性1価ダイアボディ（即ち「B 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ」）を対象とする。より好ましくは、このようなB 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖で構成され、B 7 H 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びC D 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有し、更に免疫グロブリンF c ドメインを含む（即ち「B 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディ」）。本発明の二重特異性1価F c ダイアボディは、B 7 H 3 及びC D 3 に同時に結合できる。本発明は、このような二重特異性1価F c ダイアボディを含有する医薬組成物を対象とする。本発明は更に、癌並びに他の疾患及び状態の治療におけるこのようなダイアボディの使用法を対象とする。

10

【0024】

本発明は特に、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディを対象とする。本発明のB 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディは、ヘテロ二量体として互いに会合して、B 7 H 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びC D 3 のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を形成する、ポリペプチド鎖を含む。従って本発明のB 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディは、B 7 H 3 のエピトープの1つの複製のみ、及びC D 3 のエピトープの1つの複製のみに結合できるという点で1価であるが、単一のダイアボディがB 7 H 3 のエピトープ及びC D 3 のエピトープに同時に結合できるという点で二重特異性である。

20

【0025】

本発明の好ましいB 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖（「第1の（first）」、「第2の（second）」及び「第3の（third）」ポリペプチド鎖）を含み、上記第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、上記第1の及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合する。

30

【0026】

詳細には、本発明はB 7 H 3 × C D 3 二重特異性1価F c ダイアボディを提供し、上記二重特異性1価F c ダイアボディは、B 7 H 3 のエピトープ及びC D 3 のエピトープに特異的に結合でき、I g G F c ドメインを含み、ここで上記二重特異性1価F c ダイアボディは、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖及び第3のポリペプチド鎖を含み、上記第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、上記第1及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合し：

I . 上記第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ方向に：

40

A . ドメインI A であって：

(1) B 7 H 3 (V L<sub>B7-H3</sub>) 又はC D 3 (V L<sub>CD3</sub>) に結合できるV L ドメインを含む、サブドメイン(I A 1)；及び

(2) B 7 H 3 (V H<sub>B7-H3</sub>) 又はC D 3 (V H<sub>CD3</sub>) に結合できるV H ドメインを含む、サブドメイン(I A 2)

を含み、

上記サブドメインI A 1 及びI A 2 は、12アミノ酸残基以下のポリペプチドリinkerによって互いから隔てられ、また：

(a) 上記サブドメインI A 1 が、B 7 H 3 (V L<sub>B7-H3</sub>) に結合できる上記V L ドメインを含む場合、上記サブドメインI A 2 は、C D 3 (V H<sub>CD3</sub>) に結合できる上

50

記 V H ドメインを含むよう選択され；又は

( b ) 上記サブドメイン I A 1 が、C D 3 ( V L<sub>CD3</sub> ) に結合できる上記 V L ドメインを含む場合、上記サブドメイン I A 2 は、B 7 H 3 ( V H<sub>B7-H3</sub> ) に結合できる上記 V H ドメインを含むよう選択される

ように、協調的に選択される、ドメイン I A；並びに

B．ヘテロ二量体促進ドメインに連結されたポリペプチドリinkerを含む、任意に存在するドメイン I B；

C．抗体の C H 2 C H 3 ドメインに連結されたポリペプチドリinkerを含む、ドメイン I C

を含み；

10

I I．上記第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に；

A．ドメイン I I A であって；

( 1 ) B 7 H 3 ( V L<sub>B7-H3</sub> ) 又は C D 3 ( V L<sub>CD3</sub> ) に結合できる V L ドメインを含む、サブドメイン ( I I A 1 )；及び

( 2 ) B 7 H 3 ( V H<sub>B7-H3</sub> ) 又は C D 3 ( V H<sub>CD3</sub> ) に結合できる V H ドメインを含む、サブドメイン ( I I A 2 )

を含み、

上記サブドメイン I I A 1 及び I I A 2 は、12 アミノ酸残基以下のポリペプチドリinkerによって互いから隔てられ、また；

( a ) 上記サブドメイン I A 1 が、B 7 H 3 ( V L<sub>B7-H3</sub> ) に結合できる上記 V L ドメインを含む場合、上記サブドメイン I I A 1 は、C D 3 ( V L<sub>CD3</sub> ) に結合できる上記 V L ドメインを含むよう選択され、上記サブドメイン I I A 2 は、B 7 H 3 ( V H<sub>B7-H3</sub> ) に結合できる上記 V H ドメインを含むよう選択され；及び

20

( b ) 上記サブドメイン I A 1 が、C D 3 ( V L<sub>CD3</sub> ) に結合できる上記 V L ドメインを含む場合、上記サブドメイン I I A 1 は、B 7 H 3 ( V L<sub>B7-H3</sub> ) に結合できる上記 V L ドメインを含むよう選択され、上記サブドメイン I I A 2 は、C D 3 ( V H<sub>CD3</sub> ) に結合できる上記 V H ドメインを含むよう選択される

ように、協調的に選択される、ドメイン I I A；並びに

B．ヘテロ二量体促進ドメインに連結されたポリペプチドリinkerを含む、任意に存在するドメイン I I B

30

を含み；

I I I．上記第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に、抗体の C H 2 C H 3 ドメインに連結されたポリペプチドリinkerを含むドメイン I I I C を含み；

ここで；

( A ) ( 1 ) 上記任意に存在するドメイン I B 及び上記任意に存在するドメイン I I B のうちの少なくとも一方が存在し、存在する上記ドメイン I B 若しくは I I B は、正若しくは負の電荷を有し；又は

( 2 ) 上記任意に存在するドメイン I B 及び上記任意に存在するドメイン I I B の両方が存在し；

40

( i ) 上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちの一方は、正の電荷を有するヘテロ二量体促進ドメインを有し、上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちのもう一方は、負の電荷を有するヘテロ二量体促進ドメインを有し；又は

( i i ) 上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちの一方は、アミノ酸配列 GVEPKSC ( 配列番号 6 ) 若しくは VEPKSC ( 配列番号 7 ) を含むヘテロ二量体促進ドメインを有し、上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちのもう一方は、アミノ酸配列 GFNRGEC ( 配列番号 8 ) 若しくは FNRGEC ( 配列番号 9 ) を含むヘテロ二量体促進ドメインを有し；

( B ) 上記 V L<sub>B7-H3</sub> 及び上記 V H<sub>B7-H3</sub> は相互作用して、B 7 H 3 のエピトープに結合できるエピトープ結合ドメインを形成し、上記 V L<sub>CD3</sub> 及び上記 V H<sub>CD3</sub> は、C D 3 のエピトープに結合できるエピトープ結合ドメインを形成し；並びに

50

(C) 上記第1及び第3のポリペプチド鎖の上記CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>ドメインは、Fc受容体に結合できるFcドメインを形成する。

【0027】

本発明は更に、ヒト及び霊長類両方のB7 H3及びCD3と交差反応できる、上述のようなB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの実施形態に関する。

【0028】

本発明は特に：

(A) 上記第1のポリペプチド鎖は、配列番号53のアミノ酸配列を有し、上記第2のポリペプチド鎖は、配列番号55のアミノ酸配列を有し、上記第3のポリペプチド鎖は、配列番号57のアミノ酸配列を有するか；又は

(B) 上記第1のポリペプチド鎖は、配列番号59のアミノ酸配列を有し、上記第2のポリペプチド鎖は、配列番号60のアミノ酸配列を有し、上記第3のポリペプチド鎖は、配列番号57のアミノ酸配列をするか；又は

(C) 上記第1のポリペプチド鎖は、配列番号61のアミノ酸配列を有し、上記第2のポリペプチド鎖は、配列番号62のアミノ酸配列を有し、上記第3のポリペプチド鎖は、配列番号57のアミノ酸配列を有するか；又は

(D) 上記第1のポリペプチド鎖は、配列番号63のアミノ酸配列を有し、上記第2のポリペプチド鎖は、配列番号64のアミノ酸配列を有し、上記第3のポリペプチド鎖は、配列番号57のアミノ酸配列を有する、上述のようなB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの実施形態に関する。

【0029】

好ましくは、本発明のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、A498 (腎臓癌)、JIMT-1/Luc (乳癌)、A375 (黒色腫)；22Rv1 (前立腺癌)、Detroit562 (咽頭癌)、DU145 (前立腺癌)；BxPC3 (膵臓癌)、SKMES-1 (肺癌) 及びU87 (神経膠芽細胞腫) からなる群から選択された標的ヒト腫瘍細胞を採用し、またエフェクタ細胞として精製ヒト一次T細胞を、1：1、5：1又は10：1のエフェクタ細胞：T細胞比で用いるアッセイにおいて、ヒトT細胞を用いて、標的腫瘍細胞の標的転換殺滅を仲介できる。このようなアッセイでは、標的腫瘍細胞の殺滅は、細胞死の際に細胞から放出されたLDHの酵素活性を定量的に測定する乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出アッセイを用いて、又はルシフェラーゼ相対光単位 (RLU) が、標的細胞 (これは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 及びルシフェラーゼレポータ遺伝子の両方を発現するように操作されている) の相対生存率を示す読み取り値となる、ルシフェラーゼアッセイによって、測定される。このような標的転換殺滅の、観察されたEC<sub>50</sub>は、約1.5 µg/mL以下、約1.0 µg/mL以下、約500 ng/mL以下、約300 ng/mL以下、約200 ng/mL以下、約100 ng/mL以下、約50 ng/mL以下である。

【0030】

好ましくは、本発明のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、共混合異種移植片中でのヒト腫瘍の成長の阻害を仲介でき、この共混合異種移植片では、上記分子を、22Rv1 (ヒト前立腺癌) 又はA498 (ヒト腎臓癌) 腫瘍細胞及び活性化ヒトT細胞 (5：1の比) と共に、NOD/SCIDマウスに導入する。更に、又はあるいは、本発明のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは：

(A) 1日目に腹腔内 (IP) 注射によってヒトPBMC (1×10<sup>7</sup>) を、及び0日目に皮内 (ID) にDetroit (ヒト咽頭癌腫瘍細胞 (5×10<sup>6</sup>)) を埋入され、20、22、23、26、28、30、33、35及び37日目にダイアボディを投与される；又は

(B) 0日目に皮内 (ID) にA498 (ヒト腎臓癌腫瘍細胞 (5×10<sup>6</sup>)) を、及び13日目に腹腔内 (IP) 注射によってヒトPBMC (1×10<sup>7</sup>) を埋入され、33、35、36、39、41、43、46、48及び50日目にダイアボディを投与される、

、

10

20

30

40

50

メスのNSG B2m / マウスにおいて、ヒト腫瘍成長の阻害の仲介、及び／又は異種移植片モデルにおける抗腫瘍活性の呈示が可能である。

【0031】

好ましくは、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、約1.0 mg / kg 超の濃度、約1 mg / kg の濃度、約0.5 mg / kg の濃度、約0.25 mg / kg の濃度、約0.1 mg / kg の濃度、約0.05 mg / kg の濃度、約0.02 mg / kg の濃度、約0.01 mg / kg の濃度、若しくは約0.005 mg / kg の濃度、又は約0.005 mg / kg 未満の濃度で提供した場合に、上述の異種移植片モデルにおいて腫瘍成長を阻害できる。

【0032】

本発明は更に、上述のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディのうちのいずれを、医薬品としての使用のために提供する。

【0033】

本発明は更に、上述のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディのうちのいずれを、B7 H3の発現に関連する若しくはB7 H3の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療における、又はB7 H3の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療方法における使用のために提供し、詳細には、上記B7 H3の発現に関連する又はB7 H3の発現を特徴とする上記疾患又は状態は、癌であり、更に詳細には、上記癌は、以下からなる群から選択される：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；AIDS関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髓芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、2つのポリペプチド鎖で構成され、Fc領域を含まない、共有結合二重特異性1価ダイアボディの構造を示す。上記ポリペプチド鎖は、システイン（「C」）残基間に形成されるジスルフィド結合によって互いに共有結合される。

【図2A - 2B】図2A及び2Bは、本発明の3鎖二重特異性1価Fcダイアボディの第1、第2及び第3のポリペプチド鎖の2つのバージョンの構造を示す（バージョン1、図2A；バージョン2、図2B）。上記ポリペプチド鎖は、システイン（「C」）残基間に形成されるジスルフィド結合によって互いに共有結合される。

【図3A - 3J】図3A～3Jは、A498（腎臓癌）（図3A）、JIMT-1 / Luc（乳癌）（図3B）、A375（黒色腫）（図3C）、22Rv1（前立腺癌）（図1D）、Detroit562（咽頭癌）（図1E）、DU145（前立腺癌）（図3F）、BxPC-3（膵臓癌）（図3G）、SKMES-1（肺癌）（図3H）、U87（神経膠芽細胞腫）（図3I）、及びRaji（Bリンパ腫）（図3J）細胞株のFACSヒストグラムを示す。破線は、アイソタイプ対照PE標識抗体で染色された細胞を表し、実線は、抗B7 H3 PE抗体で染色された細胞を表す。

【図4A - 4E】図4A～4Eは、B7 H3発現標的癌細胞株（図4A～4D）又はヒト一次T細胞（図4E）における抗EKコイル抗体の蛍光のFACSヒストグラムを示す。濃度10 µg / mLのDART-Aを、B7 H3発現癌細胞株（A498（図4A）

10

20

30

40

50



、J I M T 1 / L u c ( 図 4 B )、D e t r o i t 5 6 2 ( 図 4 C ) 若しくは 2 2 R v 1 ( 図 4 D ) ) 又はヒト一次 T 細胞 ( 図 4 E ) に添加し、30 分間インキュベートした。A P C ストレプトアビジンと混合したビオチンコンジュゲート抗 E K コイル抗体を用いた更なるインキュベーションの後、細胞を、D A R T A 細胞表面結合に関して、F A C S によって分析した。実線は、細胞に対する D A R T A 結合プロファイルを表す。ビオチンコンジュゲート抗 E K コイル抗体からの細胞の非特異的な染色は、破線で示されている。

【図 5 A - 5 L】図 5 A ~ 5 L は、B 7 H 3 発現細胞株 ( A 4 9 8 ( 図 5 A )、J I M T 1 / L u c ( 図 5 B 5 C )、A 3 7 5 ( 図 5 D )、U 8 7 ( 図 5 E )、D U 1 4 5 ( 図 5 F )、B x P C 3 ( 図 5 G )、S K M E S 1 ( 図 5 H )、D e t r o i t 5 6 2 ( 図 5 I ) 及び 2 2 R v 1 ( 図 5 J ) )、並びに B 7 H 3 陰性細胞株 ( C H O ( 図 5 K ) 及び R a j i ( 図 5 L ) ) に対する D A R T A 仲介細胞毒性に関する、用量応答曲線を示す。D A R T A 又は対照 D A R T を、様々な腫瘍細胞株及び一次ヒト T 細胞を、5 : 1 のエフェクタ細胞 : 標的細胞 ( E : T ) 比で用いて、約 24 時間インキュベートした。 % 細胞毒性を、全ての細胞株に関して L D H 放出アッセイを用いて評価した ( 図 5 A ~ 5 B 及び 5 D ~ 5 L )。更に、J I M T 1 / L u c 細胞株 ( 図 5 C ) に関して、L U M アッセイを用いて細胞毒性を測定した。複数のドナーからの T 細胞を用いた複数の実験からの代表的なデータを示す。D A R T A : ; 対照 D A R T : である。

【図 6 A - 6 F】図 6 A ~ 6 F は、E : T 比 10 : 1 ( 図 6 A 及び 6 B )、5 : 1 ( 図 6 C 及び 6 D ) 並びに 1 : 1 ( 図 6 E 及び 6 F ) における、A 4 9 8 細胞 ( 図 6 A、6 C 及び 6 E ) 並びに A 3 7 5 細胞 ( 図 6 B、6 D 及び 6 F ) の D A R T A 仲介標的転換殺滅を示す。細胞毒性は、L D H アッセイによって決定した。D A R T A : ; 対照 D A R T : である。

【図 7 A - 7 E】図 7 A ~ 7 E は、エフェクタ細胞としての精製 T 細胞と、A 4 9 8 標的細胞とを、E : T 細胞比 10 : 1 で用いた、24 時間のインキュベーション後の、D A R T A 仲介標的転換標的細胞殺滅 ( 図 7 A )、並びに C D 4 + ( 図 7 B 及び 7 D ) 並びに C D 8 + ( 図 7 C 及び 7 E ) T 細胞に対する T 細胞活性化マーカー C D 2 5 ( 図 7 B 及び 7 C ) 並びに C D 6 9 ( 図 7 D 及び 7 E ) の導入の、用量応答曲線を示す。D A R T A : ; 対照 D A R T : ; T 細胞 + A 4 9 8 細胞 : 黒の ; T 細胞単独 : 黒の である。

【図 8 A - 8 B】図 8 A ~ 8 B は、B 7 H 3 陽性標的細胞の存在下での、D A R T A 仲介 T 細胞増殖を示す。ヒト一次 T 細胞の増殖は、10  $\mu$  g / m L の D A R T A ( 太線 ) 又は対照 D A R T ( 塗りつぶされた細線 ) の存在下での、C F S E 標識ヒト一次 T 細胞と A 4 9 8 標的細胞 ( E : T 比 10 : 1 ) との 72 時間 ( 図 8 A ) 又は 96 時間 ( 図 8 B ) に亘る共培養後に、F A C S 分析によって評価した。

【図 9 A - 9 D】図 9 A ~ 9 D は、D A R T A が、( 図 9 A ) 及びカニクイザル ( 図 9 B ) B 7 H 3 発現 C H O 細胞に効率的に結合し、エフェクタ細胞としての精製ヒト一次 T 細胞と、B 7 H 3 発現 C H O 標的細胞とを、E : T 細胞比 5 : 1 で用いた 24 時間のインキュベーションの後、ヒト ( 図 9 C ) 及びカニクイザル ( 図 9 D ) B 7 H 3 発現 C H O 細胞の標的転換殺滅を仲介することを示す。細胞毒性は、L D H アッセイを用いて決定した。D A R T A : ; 対照 D A R T : である。

【図 10 A - 10 B】図 10 A ~ 10 B は、D A R T A が、カニクイザル及びヒト一次 T 細胞に結合できることを示す。10  $\mu$  g / m L の D A R T A をカニクイザル ( 図 10 A ) 又はヒト ( 図 10 B ) P B M C に添加し、4 で 30 分間インキュベートした後、A P C ストレプトアビジンと混合したビオチンコンジュゲート抗 E K コイル抗体を用いた第 2 のインキュベーションを行った。細胞を、ゲートされ完全に組み合わせられた C D 4 + 及び C D 8 + 細胞に対する D A R T A T 細胞表面結合 ( 太線 ) に関して、F A C S で分析した。ビオチンコンジュゲート抗 E K コイル二次抗体からの細胞に対する非特異的な染色は、細線 / 影付きの細線で示されている。

【図 11 A - 11 C】図 11 A ~ 11 C は、カニクイザル P B M C を E : T 比 30 : 1 で用いた、B 7 H 3 陽性標的細胞株 J I M T 1 / L u c ( 図 11 A 及び 11 B ) 並びに

10

20

30

40

50

A 4 9 8 ( 図 1 1 C ) の D A R T A 仲介標的転換殺滅を示す。細胞毒性は、L U M アッセイ ( 図 1 1 A ) 又は L D H アッセイ ( 図 1 1 B 及び 1 1 C ) を用いて測定した。D A R T A : ; 対照 D A R T : である。

【図 1 2】図 1 2 は、活性化ヒト T 細胞の存在下で 2 2 R v 1 腫瘍細胞を埋入されたマウスにおける、D A R T A による腫瘍成長の阻害を示す。0 日目に、メスの N O D / S C I D マウス (  $n = 8$  / 群 ) に、活性化ヒト T 細胞 (  $1 \times 10^6$  ) と共混合した 2 2 R v 1 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  ) を S C 埋入し、続いて、合計 4 用量を I V 投与するために 0 日目、1 日目、2 日目及び 3 日目に、ビヒクル対照 ( )、対照 D A R T ( )、又は  $0.5 \text{ mg / kg}$  ( )、 $0.1 \text{ mg / kg}$  ( 黒の )、 $0.02 \text{ mg / kg}$  ( 黒の ) 若しくは  $0.004 \text{ mg / kg}$  ( ) の D A R T A で処置を行った。腫瘍体積は、群平均  $\pm$  S E M として示されている。

【図 1 3】図 1 3 は、活性化ヒト T 細胞の存在下で A 4 9 8 腫瘍細胞を埋入されたマウスにおける、D A R T A による腫瘍成長の阻害を示す。0 日目に、メスの N O D / S C I D マウス (  $n = 8$  / 群 ) に、活性化ヒト T 細胞 (  $1 \times 10^6$  ) と共混合した A 4 9 8 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  ) を S C 埋入し、続いて、合計 4 用量を I V 投与するために、0 日目、1 日目、2 日目及び 3 日目に、ビヒクル対照 ( )、 $0.5 \text{ mg / kg}$  の対照 D A R T ( )、又は  $0.5 \text{ mg / kg}$  ( )、 $0.1 \text{ mg / kg}$  ( 黒の )、 $0.02 \text{ mg / kg}$  ( 黒の ) 若しくは  $0.004 \text{ mg / kg}$  ( ) の D A R T A で処置を行った。腫瘍体積は、群平均  $\pm$  S E M として示されている。

【図 1 4】図 1 4 は、A 4 9 8 腫瘍細胞を埋入され、ヒトエフェクタ細胞で再構成された N S G B 2 m / マウスにおける、D A R T A の抗腫瘍活性を示す。0 日目に、メスの N S G B 2 m / マウス (  $n = 7$  / 群 ) に A 4 9 8 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  細胞 ) を I D 埋入し、続いて 1 3 日目に、ヒト P B M C (  $1 \times 10^7$  ) を I P 埋入した。その後、この群を、3 3、3 5、3 6、3 9、4 1、4 3、4 6、4 8 及び 5 0 日目に、ビヒクル対照 ( )、 $0.5 \text{ mg / kg}$  の対照 D A R T ( )、又は  $1 \text{ mg / kg}$  ( )、 $0.1 \text{ mg / kg}$  ( 黒の )、 $0.01 \text{ mg / kg}$  ( 黒の ) 若しくは  $0.001 \text{ mg / kg}$  ( ) の D A R T A で処置した。腫瘍体積は、群平均  $\pm$  S E M として示されている。

【図 1 5】図 1 5 は、D e t r o i t 5 6 2 腫瘍細胞を埋入され、ヒトエフェクタ細胞で再構成された N S G B 2 m / マウスにおける、D A R T A の抗腫瘍活性を示す。0 日目に、メスの N S G B 2 m / マウス (  $n = 8$  / 群 ) に D e t r o i t 5 6 2 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  ) 細胞を I D 埋入し、一方、1 日目に、ヒト P B M C (  $1 \times 10^7$  ) を I P 埋入した。続いて合計 9 用量を I V 投与するために、2 0、2 2、2 3、2 6、2 8、3 0、3 3、3 5 及び 3 7 日目に、これらの群を、ビヒクル対照 ( )、 $0.5 \text{ mg / kg}$  の対照 D A R T ( )、又は  $1 \text{ mg / kg}$  ( )、 $0.5 \text{ mg / kg}$  ( 黒の )、 $0.25 \text{ mg / kg}$  ( 黒の ) 若しくは  $0.1 \text{ mg / kg}$  ( ) の D A R T A で処置した。腫瘍体積は、群平均  $\pm$  S E M として示されている。

【図 1 6 A - 1 6 B】図 1 6 A ~ 1 6 B は、D e t r o i t 5 6 2 腫瘍細胞を埋入され、ヒトエフェクタ細胞で再構成された N S G M H C 1 1 / マウスにおける、D A R T A の抗腫瘍活性を示す。0 日目に、M H C 1 1 / マウス (  $n = 7$  / ビヒクル対照 ; 7 / 群 I ; 及び 5 / 群 I I ) に、D e t r o i t 5 6 2 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  細胞 ) を I D 埋入し、ヒト P B M C (  $1 \times 10^7$  細胞 ) を I P 埋入した。続いてこれらの群を、ビヒクル対照 ( ) 又は  $0.5 \text{ mg / kg}$  の D A R T A ( 黒の ) で処置した。群 I ( 図 1 6 A ) は、1 5、2 2、2 9、3 6 及び 4 3 日目に I V 投与された 5 用量を受けた。群 I I ( 図 1 6 B ) は、1 5、2 9 及び 4 3 日目に I V 投与された 3 用量を受けた。腫瘍体積は、群平均  $\pm$  S E M として示されている。

【図 1 7】図 1 7 は、カニクイザルにおける D A R T A 及び D A R T B の薬物動態プロファイルを示す。カニクイザルの複数の群 (  $n = 2$  / 群 ; 1 M / 1 F ) に、D A R T A 又は D A R T B を 1 用量  $0.5 \text{ mg / kg}$  を投与した後、週 1 回 1 用量  $1.0 \text{ mg / kg}$  を 3 週間投与し、合計 4 用量を I V 投与した。研究の経過全体に亘って、4 体の試験動物それぞれに関する、D A R T A ( 実線 ) 及び D A R T B ( 破線 ) の血清濃度をブ

10

20

30

40

50

ロットしている。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明は、B7 H3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有する、二重特異性1価ダイアボディ（即ち「B7 H3×CD3二重特異性1価ダイアボディ」）を対象とする。より好ましくは、このようなB7 H3×CD3二重特異性1価ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖で構成され、B7 H3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を有し、更に免疫グロブリンFcドメインを含む（即ち「B7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」）。本発明の二重特異性1価Fcダイアボディは、B7 H3及びCD3に同時に結合できる。本発明は、このような二重特異性1価Fcダイアボディを含有する医薬組成物を対象とする。本発明は更に、癌並びに他の疾患及び状態の治療におけるこのようなダイアボディの使用法を対象とする。

10

【0036】

I. 抗体及び他の結合分子

A. 抗体

本明細書中で使用される場合、用語「抗体 (antibody)」は、エピトープに免疫特異的に結合できる免疫グロブリン可変ドメイン（「エピトープ結合部位 (epitope binding site)」）を有するいずれの分子を包含する。従ってこの用語は、完全なポリクローナル又はモノクローナル抗体だけでなく、その突然変異体、自然に発生する変異体、このようなエピトープ結合部位を含む融合タンパク質、ヒト化抗体及びキメラ抗体、並びに免疫グロブリン分子の他のいずれの修飾構成を包含する。本出願全体を通して、抗体の軽鎖及び重鎖の定常領域のアミノ酸残基の番号付与は、Kabat et al. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest、National Institutes of Health Publication No. 91 3242におけるようなEUIンデックスに従う。本明細書中で使用される場合、「抗体のエピトープ結合断片 (epitope binding fragment of an antibody)」は、あるエピトープに免疫特異的に結合できる抗体の一部分を指すことを意図している。本明細書中で使用される場合、この用語は、ダイアボディの断片（例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>Fv）及び単鎖 (scFv)、並びにエピトープ結合ドメインを包含する。

20

30

【0037】

用語「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」は、あるエピトープに免疫特異的に結合できる均質な抗体集団を指す。用語「モノクローナル抗体」は、上記抗体のソース、又は上記抗体が作製される方法（例えばハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、遺伝子組み換え動物における産生等）に関する限定を意図したものではない。モノクローナル抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。採用してよい1つの方法は、Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495 497の方法又はその修正例である。典型的には、モノクローナル抗体はマウス、ラット又はウサギにおいて発現する。上記抗体は、動物を、所望のエピトープを含有する免疫原性量の細胞、細胞抽出物又はタンパク製剤で免疫化することによって産生される。免疫原は、一次細胞、培養された細胞株、癌細胞、タンパク質、ペプチド、核酸又は組織とすることができるが、これらに限定されない。免疫化に使用してよい細胞は、これらを免疫原として使用するよりもある期間（例えば少なくとも24時間）だけ前に、培養してよい。細胞は単独で、又はRibí等の非変性アジュバントと組み合わせて、免疫原として使用してよい。一般に細胞は、免疫原として使用される際、完全な状態、及び好ましくは生存できる状態に維持しなければならない。完全な細胞は、破裂した細胞よりも、免疫性を与えられた動物が抗原をより良好に検出できるようにすることができる。変性又は強いアジュバント、例えばフロイントアジュバントの使用は、細胞を破裂させる場合があり、従って推奨されない。

40

50

免疫原は、2週間に1回若しくは1週間に1回等、周期的な間隔で複数回投与してよく、又は動物中（例えば組織組み換え中）に生存能力を維持できるように投与してよい。あるいは、所望の病原性エピトープに対する免疫特異性を有する既存のモノクローナル抗体及び他の同等の抗体は、当該技術分野で公知のいずれの手段によって、組み換え配列及び産生できる。一実施形態では、このような抗体を配列し、続いてポリヌクレオチド配列を発現又は繁殖のためのベクターにクローン化する。関心対象の抗体をエンコードする配列は、宿主細胞中のベクター中に保持され、続いて上記宿主細胞を、将来使用するために膨張させて冷凍できる。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、本発明の二重特異性分子及びキメラ抗体、ヒト化抗体若しくはイヌ化抗体を生成するため、又は抗体の親和性若しくは他の特徴を改善するための、遺伝子操作のために使用してよい。抗体をヒト化する場合の一般原理は、抗体のエピトープ結合部分の塩基配列を保持しながら、抗体の非ヒト残部をヒト抗体配列と交換するステップを伴う。モノクローナル抗体をヒト化するためには、4つの一般的なステップが存在する。上記ステップは以下の通りである：（1）開始抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインのヌクレオチド及び／又は予測されるアミノ酸配列を決定するステップ；（2）ヒト化抗体又はイヌ化抗体を設計するステップ、即ちヒト化又はイヌ化プロセス中に使用される抗体フレームワーク領域を決定するステップ；（3）実際のヒト化又はイヌ化法／技術を適用するステップ；並びに（4）ヒト化抗体のトランスフェクション及び発現ステップ（例えば米国特許第4,816,567号；米国特許第5,807,715号；米国特許第5,866,692号；及び米国特許第6,331,415号を参照）。

10

20

#### 【0038】

本明細書中で使用される場合、抗体又はそのエピトープ結合断片は、代替的なエピトープに比べて、より頻繁に、より迅速に、より長期間、及び／又はより高い親和性若しくは結合活性で当該エピトープと反応又は連結する場合、別の分子のある領域（即ちエピトープ）に「免疫特異的に（*immunospecifically*）」結合する、と言い表される。この定義を読めば、例えば第1の標的に免疫特異的に結合する抗体又はそのエピトープ結合断片は、第2の標的に特異的又は優先的に結合してもしなくてもよいことも理解される。

#### 【0039】

B．二重特異性抗体、多重特異性ダイアボディ、及びDART（登録商標）ダイアボディ

30

非単一特異性「ダイアボディ（*diabody*）」の提供は、異なるエピトープを発現する細胞を共連結（*coligate*）して共存させることができる能力という、抗体を上回る有意な利点を提供する。従って二重特異性ダイアボディは、療法及び免疫診断を含む広範な用途を有する。二重特異性は、様々な用途におけるダイアボディの設計及び加工の大幅な柔軟性を可能とし、これにより、多量体抗原の結合活性の上昇、異なる複数の抗原の架橋、及び両標的抗原の存在に基づく特定の細胞タイプに対する指向性標的化を提供する。当該技術分野において公知のダイアボディ分子は、（～50kDa以下の小さいサイズのダイアボディに関して）その2価性、低い解離率及び循環からの迅速な排除により、腫瘍撮像の分野での特定の使用も示している（Fitzgerald et al. (1997) “Improve

40

#### 【0040】

このようなダイアボディを、T細胞に結合するよう標的化する代わりに、ダイアボディエピトープ結合ドメインを、CD19、CD20、CD22、CD30、CD37、CD

50

40及びCD74といったB細胞の表面決定因子に対して配向させてよい(Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Cheson, B.D. et al. (2008) "Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma," N. Engl. J. Med. 359(6):613-626; Castillo, J. et al. (2008) "Newer Monoclonal Antibodies For Hematological Malignancies," Exp. Hematol. 36(7):755-768)。多くの研究において、エフェクタ細胞決定因子、例えばFc受容体(FcR)に結合するダイアボディは、エフェクタ細胞を活性化させることも分かった(Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," Cancer Res. 59:2909-2916; 国際公開第2006/113665号; 国際公開第2008/157379号; 国際公開第2010/080538号; 国際公開第2012/018687号; 国際公開第2012/162068号)。通常、エフェクタ細胞の活性化は、Fcドメイン-FcR相互作用によるエフェクタ細胞への抗原結合抗体の結合によってトリガされる。従ってこれに関して、ダイアボディ分子は、Fcドメインを含むかどうかとは無関係に、(例えば当該技術分野において公知の、又は本明細書に例示されているいずれのエフェクタ機能アッセイ(例えばADCCアッセイ)においてアッセイされるように)Ig様官能性を示し得る。腫瘍とエフェクタ細胞とを架橋させることによって、ダイアボディは腫瘍細胞近傍にエフェクタ細胞を移動させるだけでなく、効果的な腫瘍殺滅をもたらす(例えばCao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197を参照)。

10

20

30

40

50

#### 【0041】

しかしながら、上述の利点は顕著なコストにつながる。このような非単一特異性ダイアボディの形成は、2つ以上の別個の異なるポリペプチドの良好な集合を必要とする(即ち上記形成は、ダイアボディが、異なるポリペプチド鎖種のヘテロ二量体形成によって形成されることを必要とする)。この事実は、同一のポリペプチド鎖のホモ二量体形成によって形成される単一特異性ダイアボディとは対照的である。非単一特異性ダイアボディを形成するために少なくとも2つの異なるポリペプチド(即ち2つのポリペプチド種)を提供しなければならないため、及びこのようなポリペプチドのホモ二量体形成は不活性分子をもたらす(Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588)ため、このようなポリペプチドの産生は、同一種のポリペプチド間での共有結合に対処できる(即ちこれらのホモ二量体化を最小化できる)ような方法で達成しなければならない(Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588)。

#### 【0042】

従って本技術分野は、このようなポリペプチドの非共有結合的連結を教示している(例えばOlafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672参照)。しかしながら、本技術分野は、非共有結合的に連結したポリペプチドで構成される二重特異性ダイアボディが不安定であり、非官能性単一ポリペプチド鎖

モノマーへと容易に分解することを認識している（例えばLu, D. et al. (2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672参照）。

#### 【0043】

しかしながら、この課題をものともせず、本技術分野は、DART（登録商標）（Dual Affinity Retargeting Reagents）ダイアボディと呼ばれる、安定した共有結合ヘテロ二量体性非単一特異性ダイアボディの開発に成功した。例えばChichili, G.R. et al. (2015) “A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,” Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Johnson, S. et al. (2010) “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion,” J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIB (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” Blood 117(17):4542-4551; 米国特許第 8, 044, 180 号; 米国特許第 8, 133, 982 号; 米国特許第 8, 187, 593 号; 米国特許第 8, 193, 318 号; 米国特許第 8, 530, 627 号; 米国特許第 8, 669, 349 号; 米国特許第 8, 778, 339 号; 米国特許第 8, 784, 808 号; 米国特許第 8, 795, 667 号; 米国特許第 8, 802, 091 号; 米国特許第 8, 802, 093 号; 米国特許第 8, 946, 387 号; 米国特許第 8, 968, 730 号; 及び米国特許第 8, 993, 730 号; 米国公開特許第 2009/0060910 号; 米国公開特許第 2010/0174053 号; 米国公開特許第 2011/0081347 号; 米国公開特許第 2011/0097323 号; 米国公開特許第 2011/0117089 号; 米国公開特許第 2012/0009186 号; 米国公開特許第 2012/0034221 号; 米国公開特許第 2012/0141476 号; 米国公開特許第 2012/0294796 号; 米国公開特許第 2013/0149236 号; 米国公開特許第 2013/0295121 号; 米国公開特許第 2014/0017237 号; 及び米国公開特許第 2014/0099318 号; 欧州特許第 1868650 号; 欧州特許第 2158221 号; 欧州特許第 2247304 号; 欧州特許第 2252631 号; 欧州特許第 2282770 号; 欧州特許第 2328934 号; 欧州特許第 2376109 号; 欧州特許第 2542256 号; 欧州特許第 2601216 号; 欧州特許第 2714079 号; 欧州特許第 2714733 号; 欧州特許第 2786762 号; 欧州特許第 2839842 号; 欧州特許第 2840091 号; 並びに PCT 公開番号第 2006/113665 号; PCT 公開番号第 2008/157379 号; PCT 公開番号第 2010/027797 号; PCT 公開番号第 2010/033279 号; PCT 公開番号第 2010/080538 号; PCT 公開番号第 2011/109400 号; PCT 公開番号第 2012/018687 号; PCT 公開番号第 2012/162067 号; PCT 公開番号第 2012/162068 号; PCT 公開番号第 2014/159940 号; PCT 公開番号第 2015/021089 号; PCT 公開番号第 2015/026892 号; 及び PCT 公開番号第 2015/026894 号を参照。このようなダイアボディは、2 つ以上の共有結合的に複合体化したポリペプチドを含み、1 つ又は複数のシステイン残基を、ジスルフィド結合を形成でき、これによって2つのポリペプチド鎖を共有結合させる、採用したポリペプチド種それぞれの中へと加工するステップを伴う。例えば、このような構造のC末端へのシステイン残基の追加は、ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を可能とすることが分かっており、これは、2 価分子の結合特性に干渉することなく、得られるヘテロ二量体を安定化させる。

#### 【0044】

最も単純なDART（登録商標）は、2つのポリペプチド鎖を含み、これらはそれぞれ3つのドメインを含む（図1）。第1のポリペプチド鎖は：（i）第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン（VL1）の結合領域を含むドメイン；（ii）第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン（VH2）の結合領域を含む、第2のドメイン；並びに（iii）上記第2のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化を促進する役割、及びダイアボディの第2のポリペプチド鎖に対する第1のポリペプチド鎖の共有結合を促進する役割を果たす、第3のドメイン（「ヘテロ二量体促進ドメイン（Heterodimer Promoting Domain）」を含む。第2のポリペプチド鎖は：相補的な第1のドメイン（VL2ドメイン）；相補的な第2のドメイン（VH1ドメイン）；並びに第1のポリペプチド鎖の第3のドメインと複合体化して、第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化及び共有結合を促進する、第3のドメイン（「ヘテロ二量体促進ドメイン」）を含有する。このような分子は、安定かつ強力であり、2つ以上の抗原を同時に結合する能力を有する。これらは、標的抗原を発現する細胞の、T細胞仲介殺滅を促進できる。一実施形態では、第1及び第2のポリペプチド鎖の第3のドメインはそれぞれ、システイン（「C」）残基を含有し、このシステイン残基は、ジスルフィド結合を介してポリペプチドを一体に結合させる役割を果たす。上記ポリペプチド鎖のうちの一方又は両方の第3のドメインは更に、CH2 CH3ドメインの配列を有してよく、これにより、ダイアボディポリペプチドの複合体化によって、細胞（Bリンパ球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球及び肥満細胞等）のFc受容体に結合できるFcドメインが形成される）。このような分子の多数の変形例が記載されている（例えば米国特許公開第2013 0295121号；米国特許公開第2010 0174053号；及び米国特許公開第2009 0060910号；欧州特許公開第2714079号；欧州特許公開第2601216号；欧州特許公開第2376109号；欧州特許公開第2158221号；及び国際公開第2012/162068号；国際公開第2012/018687号；国際公開第2010/080538号参照）。

#### 【0045】

本発明の好ましいFc担持DART（登録商標）ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖を含み、図2A～2Bに図示されている。このようなダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、4つのドメイン：（i）VL1含有ドメイン；（ii）VH2含有ドメイン；（iii）ダイアボディの第2のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化及び共有結合を促進する、ドメイン（「ヘテロ二量体促進ドメイン」）；及び（iv）CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する。このようなDART（登録商標）ダイアボディの第2のポリペプチドは：（i）VL2含有ドメイン；（ii）VH1含有ドメイン；並びに（iii）ダイアボディの第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化及び共有結合を促進するドメイン（「ヘテロ二量体促進ドメイン」）を含有する。このようなDART（登録商標）の第3のポリペプチドは、CH2 CH3配列を含む。従って、このようなDART（登録商標）の第1及び第2のポリペプチド鎖は、一体として複合体化して、エпитープに結合可能なVL1/VH1結合部位、及び第2のエピトープに結合可能なVL2/VH2結合部位を形成する。本発明の好ましいFc担持DART（登録商標）ダイアボディは、CD3又はB7 H3であってよい「第1のエピトープ」と、第1のエピトープがCD3である場合にはB7 H3であり、第1のエピトープがB7 H3である場合にはCD3である「第2のエピトープ」とに結合できる、B7 H3×CD3二重特異性1価ダイアボディである。第1及び第2のポリペプチドは、それぞれのリンカー及び/又は第3のドメイン内のシステイン残基が関与する1つ又は複数のジスルフィド結合を介して、互いに結合される。特に、第1及び第3のポリペプチド鎖は互いと複合体化して、ジスルフィド結合によって安定化されたFcドメインを形成する。このようなダイアボディは、増強された強度を有する。本発明の好ましいFc担持DART（登録商標）ダイアボディは、2つの配向（表1）のうちのいずれを有してよい：

#### 【0046】

【表 1】

表 1		
第 1 の 配向	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - ヘテロ二量体促進ドメイン - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - ヘテロ二量体促進ドメイン - COOH
第 2 の 配向	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - VL1 - VH2 - ヘテロ二量体促進ドメイン - COOH
	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - ヘテロ二量体促進ドメイン - COOH

10

## 【 0 0 4 7 】

II . 本発明の好ましい B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ

本発明は特に、B 7 H 3 及び C D 3 に同時に結合できる、従って B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 D A R T (登録商標) ダイアボディである、上述のような F c 担持 D A R T (登録商標) ダイアボディ、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療におけるこのような分子の使用を対象とする。コドン最適化による遺伝子発現において得られる改善と同様、最適化されていない B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディは完全な官能性を有する (例えば Grosjean, H. et al. (1982) "Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes" Gene 18(3):199-209 を参照) が、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの配列を修飾又は洗練することにより、その安定性及び / 又は機能を更に増強できる。

20

## 【 0 0 4 8 】

好ましくは、図 2 A に示すように、上記 3 つのポリペプチド鎖のうち第 1 のものは、N 末端から C 末端へ方向に : N 末端 ; 「第 1 の」抗原のエピトープ (C D 3 又は B 7 H 3 ) に結合できる軽鎖可変ドメイン (V L ) (V L 1 ) ; 「第 2 の」抗原のエピトープ (第 1 の抗原が C D 3 である場合には B 7 H 3 ; 第 1 の抗原が B 7 H 3 である場合には C D 3 ) に結合できる重鎖可変ドメイン (V H ) (V H 2 ) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; 及び C 末端を含有する。介在リンカーペプチド (リンカー 1 ) は、軽鎖可変ドメイン (V L 1 ) を重鎖可変ドメイン (V H 2 ) から隔てる。好ましくは、重鎖可変ドメイン (V L 2 ) は、介在リンカーペプチド (リンカー 2 ) によってヘテロ二量体促進ドメインに連結される。ある好ましい B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの実施形態では、ヘテロ二量体促進ドメインの C 末端は、介在リンカーペプチド (リンカー 3 ) によって、又は介在スパーサリンカーペプチド (スパーサリンカー 3 ) によって、F c 領域の C H 2 C H 3 ドメインに連結される。従って最も好ましくは、上記 3 つのポリペプチド鎖のうち第 1 のものは、N 末端から C 末端へ方向に : V L 1 リンカー 1 V H 2 リンカー 2 ヘテロ二量体促進ドメイン スパーサリンカー 3 F c ドメインを含有する。

30

40

## 【 0 0 4 9 】

あるいは図 2 B に示すように、上記 3 つのポリペプチド鎖のうち第 1 のものは、N 末端から C 末端へ方向に : N 末端 ; リンカー 3 ; F c 領域の C H 2 C H 3 ドメイン (「F c ドメイン」) ; 例えばアミノ酸配列 : A P S S S (配列番号 5 1) 又はアミノ酸配列 A P S S S P M E (配列番号 5 2) を有する、介在スパーサペプチド (リンカー 4) ; 「第 1 の」抗原のエピトープ (C D 3 又は B 7 H 3 ) に結合できる (V L 1) 軽鎖可変ドメイン (V L) ; 「第 2 の」抗原のエピトープ (第 1 の抗原が C D 3 である場合には B 7 H 3 ; 第 1 の抗原が B 7 H 3 である場合には C D 3) に結合できる重鎖可変ドメイン (V H ) (V H 2) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; 及び C 末端を含有する。介在リンカーペプチド (リン

50



カー１）は、軽鎖可変ドメイン（V L １）を重鎖可変ドメイン（V H ２）から隔てる。好ましくは、重鎖可変ドメイン（V H ２）は、介在リンカーペプチド（リンカー２）によってヘテロ二量体促進促進ドメインに連結される。従って最も好ましくは、このような代替的な配向において、上記３つのポリペプチド鎖のうち第１のものは、N末端からC末端へ  
 の方向に：リンカー３ F cドメイン リンカー４ V L １ リンカー１ V H ２ リン  
 カー２ ヘテロ二量体促進ドメインを含有する。

#### 【 0 0 5 0 】

好ましくは、上記２つの好ましい配向に関して、上記３つのポリペプチド鎖のうち第２のものは、N末端からC末端へ  
 の方向に：N末端；「第２の」抗原のエピトープに結合できる軽鎖可変ドメイン（V L ）（V L ２）；「第１の」抗原のエピトープに結合できる重  
 鎖可変ドメイン（V H ）（V H １）；ヘテロ二量体促進ドメイン；及びC末端を含有する。介在リンカーペプチド（リンカー１）は、軽鎖可変ドメイン（V L ２）を重鎖可変ド  
 メイン（V H １）から隔てる。好ましくは、重鎖可変ドメイン（V H １）は、介在リンカー  
 ペプチド（リンカー２）によってヘテロ二量体促進に連結される。従って最も好ましくは、  
 上記３つのポリペプチド鎖のうち第２のものは、N末端からC末端へ  
 の方向に：V L １  
 リンカー１ V H ２ リンカー２ ヘテロ二量体促進ドメインを含有する。

10

#### 【 0 0 5 1 】

好ましくは、上記２つの好ましい配向のいずれに関して、上記３つのポリペプチド鎖の  
 うち第３のものは、リンカーペプチド（リンカー３）、及びF c領域のC H ２ C H ３ド  
 メイン（「F cドメイン」）を含有する。第３のポリペプチド鎖はV L ドメイン又はV H  
 ドメインを含んでいないため、第３のポリペプチド鎖は、２つ以上の本発明のB 7 H 3  
 × C D 3 二重特異性１価F cダイアボディの間で同一となり得る。

20

#### 【 0 0 5 2 】

第１のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメイン（V L １）は、第２のポリペプチド鎖の重鎖  
 可変ドメイン（V H １）と相互作用することによって、第１の抗原のエピトープ（即ちB  
 7 H 3 又はC D 3）に免疫特異的に結合できる官能性エピトープ結合部位を形成できる  
 よう、協調的に選択される。同様に、第２のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメイン（V L ２）  
 は、第１のポリペプチド鎖の重鎖可変ドメイン（V H ２）と相互作用することによって  
 、第２の抗原のエピトープ（即ちB 7 H 3 又はC D 3）に免疫特異的に結合できる官能  
 性エピトープ結合部位を形成できるよう、協調的に選択される。従って、軽鎖可変ドメ  
 イン及び重鎖可変ドメインの選択は、これら２つのポリペプチド鎖が合わせて、B 7 H 3  
 及びC D 3に結合できるエピトープ結合部位を含むよう、協調される。

30

#### 【 0 0 5 3 】

##### A．好ましいリンカー

より好ましくは、ポリペプチド鎖の上記V L ドメインと上記V H ドメインとを隔てるリ  
 ンカー１の長さは、上記V L 及びV H ドメインが互いに対して結合するのを実質的に又は  
 完全に防止するよう選択される（例えば１２アミノ酸残基以下の長さ）。従って、第１の  
 ポリペプチド鎖のV L １及びV H ２ドメインは、互いに対して結合することが実質的に又  
 は完全に不可能であり、第１又は第２の抗原に実質的に結合できるエピトープ結合部位を  
 形成しない。同様に、第２のポリペプチド鎖のV L ２及びV H １ドメインは、互いに対  
 して結合することが実質的に又は完全に不可能であり、第１又は第２の抗原に実質的に結合  
 できるエピトープ結合部位を形成しない。好ましい介在スペーサペプチド（リンカー１）  
 は、配列（配列番号１）：GGGSGGGGを有する。

40

#### 【 0 0 5 4 】

リンカー２の目的は、ポリペプチド鎖のV H ドメインを、当該ポリペプチド鎖の、任意  
 に存在するヘテロ二量体促進ドメインから隔てることである。様々なリンカーのうちのい  
 ずれを、リンカー２の目的のために使用できる。このようなリンカー２の好ましい配列は  
 、ジスルフィド結合によって第１及び第２のポリペプチド鎖を互いに対して共有結合させ  
 るために使用できるアミノ酸配列：GGCGGG（配列番号２）、又はI g G C H １ドメイン  
 に由来するASTKG（配列番号３）を有する。リンカー２：ASTKG（配列番号３）は、上述の

50

ようなシステインを有しないため、このようなリンカー 2 の使用は好ましくは、配列番号 1 2 の E コイル又は配列番号 1 3 の K コイル等の、システイン含有ヘテロ二量体促進ドメインと関連する（以下を参照）。

#### 【 0 0 5 5 】

リンカー 3 の目的は、ポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインを、当該ポリペプチド鎖の F c ドメインから隔てることである。様々なリンカーのうちのいずれを、リンカー 3 の目的のために使用できる。このようなリンカー 3 の好ましい配列は、アミノ酸配列：DKHTCPCPCP（配列番号 4）を有する。スパーサリンカー 3 に関する好ましい配列は、アミノ酸配列：GGGDKHTCPCPCP（配列番号 5）を有する。

#### 【 0 0 5 6 】

##### B．好ましいヘテロ二量体促進ドメイン

第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖のヘテロ二量体の形成は、「ヘテロ二量体促進ドメイン」を含めることによって推進できる。このようなドメインは、一方のポリペプチド鎖に G V E P K S C（配列番号 6）又はVEPKSC（配列番号 7）を、そしてもう一方のポリペプチド鎖にGFNRGEC（配列番号 8）又はFNRGEC（配列番号 9）を含む（米国特許第 2 0 0 7 / 0 0 4 9 0 9 号）。

#### 【 0 0 5 7 】

しかしながらより好ましくは、本発明のヘテロ二量体促進ドメインは、少なくとも 6 つ、少なくとも 7 つ又は少なくとも 8 つの荷電アミノ酸残基を含む、反対の極の 1 つ、2 つ、3 つ又は 4 つのタンデム反復コイルドメインから形成される（Apostolovic, B. et al. (2008) “pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil,” *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) “Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain,” *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) “Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils,” *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) “Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions,” *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) “Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy,” *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) “Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding,” *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012) “Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag,” *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) “End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures,” *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) “Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions,” *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) “Designing Heterodimeric Two-Stranded -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity,” *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) “The d -d-d Vertical Triad is Less Discriminating Than the a -a-a Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif,” *J. Amer. Chem. Soc.* 134(5): 2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) “Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface,” *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) “Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance,” *J. Molec. Biol.* 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) “The Des

10

20

30

40

50

ign Of Coiled-Coil Structures And Assemblies,” Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) “A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,” J. Gene Med. 10:355-367)。

【 0 0 5 8 】

このような反復コイルドメインは、完全な反復であってよく、又は置換を有してよい。例えば、一方のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインは、負荷電アミノ酸残基の配列を含んでよく、もう一方のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインは、負荷電アミノ酸残基の配列を含んでよい。特定の実施形態では、コイルドメインは、8つの負荷電アミノ酸残基又は8つの正荷電アミノ酸残基を含んでよい。反対の電荷のコイルを他方のポリペプチド鎖に使用する場合、第1又は第2のポリペプチド鎖にどのコイルが設けられるかは重要ではない。しかしながら、好ましい本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、負荷電コイルを有する第1のポリペプチド鎖を有する。正荷電コイルドメインの正荷電アミノ酸は、リシン、アルギニン、ヒスチジン等であってよく、好ましくはリシンである。負荷電コイルの負荷電アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸等であってよく、好ましくはグルタミン酸である。

10

【 0 0 5 9 】

本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 D A R T (登録商標)ダイアボディは、ヘテロ二量体促進ドメインを1つだけ有してよい(即ち第1のポリペプチド鎖又は第2のポリペプチド鎖のうちの両方ではなくいずれかが、ヘテロ二量体促進ドメインを含有する)。このような単一のヘテロ二量体促進ドメインの存在により、ホモ二量体であるダイアボディ(いずれのヘテロ二量体促進ドメインを有しない、又は2つの反発する(同様に荷電された)ヘテロ二量体促進ドメインを有する分子)の形成を阻止することによって、ヘテロ二量体化が促進される。しかしながら、本発明の第1及び第2のポリペプチド鎖の両方が、ヘテロ二量体促進ドメインを含有することが好ましい。

20

【 0 0 6 0 】

好ましい実施形態では、ヘテロ二量体促進ドメインのうちの1つは、4つのタンデム「E コイル」螺旋ドメイン(配列番号 1 0 : EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)を含み、そのグルタミン酸残基は、p H 7 において負の電荷を形成し、またその一方で、ヘテロ二量体促進ドメインのうちのもう一方は、4つのタンデム「K コイル」ドメイン(配列番号 1 1 : KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK)を含み、そのリジン残基は、p H 7 において正の電荷を形成する。このような荷電ドメインの存在により、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の連結が促進され、従ってヘテロ二量体化が促進される。別の好ましい実施形態では、配列番号 1 0 の上記4つのタンデム「E コイル」螺旋ドメインのうちの1つが、システイン残基：EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(配列番号 1 2)を含有するように修飾されている、ヘテロ二量体促進ドメインが利用される。同様に、別の好ましい実施形態では、配列番号 1 1 の上記4つのタンデム「K コイル」螺旋ドメインのうちの1つが、システイン残基：KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK(配列番号 1 3)を含有するように修飾されている、ヘテロ二量体促進ドメインが利用される。

30

【 0 0 6 1 】

C . ポリペプチド鎖の共有結合

本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、その第1及び第2のポリペプチド鎖が、その長さに沿って位置決めされた1つ又は複数のシステイン残基によって、互いに対して共有結合するよう、操作される。このようなシステイン残基は、上記ポリペプチドの V L ドメインと V H ドメインとを隔てる介在リンカーに導入できる。あるいは、リンカー 2 がシステイン残基を含有してよい。更に、又はあるいは、配列番号 4 又は配列番号 5 のように、リンカー 3 がシステイン残基を含有してよい。最も好ましくは、ヘテロ二量体促進ドメインの1つ又は複数のコイルドメインを、配列番号 1 2 又は配列番号 1 3 のようにシステイン残基を含有するよう、置換する。

40

【 0 0 6 2 】

50

## D. 好ましいFcドメイン

本発明の本発明のB7 H3 x CD3二重特異性1価FcダイアボディのFcドメインは、完全なFc領域（例えば完全IgG Fc領域）であっても、又は完全なFc領域の断片のみであってもよい。本発明の二重特異性1価FcダイアボディのFcドメインは、1つ又は複数のFc受容体（例えば1つ又は複数のFc R）に結合できる能力を有してよいが、より好ましくは、上記Fcドメインは、（野生型Fc領域が呈する結合に対して）Fc RIA（CD64）、Fc RIIA（CD32A）、Fc RIIB（CD32B）、Fc RIIIA（CD16a）若しくはFc RIIIB（CD16b）への結合が低下するよう修飾されているか、又は1つ若しくは複数のこのような受容体に結合する上記Fcドメインの能力を実質的に排除するよう修飾されている。従って、本発明の二重特異性1価FcダイアボディのFcドメインは、完全Fc領域のCH2ドメインのうちのある程度若しくは全体及び／若しくはCH3ドメインのうちのある程度若しくは全体を含んでよく、又は（例えば完全Fc領域のCH2若しくはCH3ドメインに対する1つ若しくは複数の挿入及び／若しくは1つ若しくは複数の欠失を含んでよい）変異型CH2及び／若しくは変異型CH3配列を含んでよい。本発明の二重特異性1価FcダイアボディのFcドメインは、非Fcポリペプチド部分を含んでよく、又は自然に発生しない完全Fc領域の部分を含んでよく、又はCH2及び／若しくはCH3ドメインの自然に発生しない配向を含んでよい（例えば2つのCH2ドメイン若しくは2つのCH3領域、若しくはN末端からC末端へ方向において、CH3ドメインと、これが連結したCH2ドメイン、等）。

10

20

## 【0063】

ある好ましい実施形態では、本発明のB7 H3 x CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1及び第3のポリペプチド鎖はそれぞれ、複合体化して免疫グロブリン（IgG）Fcドメインを形成するCH2 CH3ドメインを含む。ヒトIgG1のある例示的なCH2 CH3ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号14）：

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
      340      350      360      370      380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
      440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

30

である。

## 【0064】

IgG重鎖の定常領域の残基の番号付与は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991)（これは参照により本出願に明示的に援用される）におけるようなEUIンデックスの番号付与である。「KabatにおけるようなEUIンデックス（EUI index as in Kabat）」は、ヒトIgG1 EU抗体の番号付与を指す。抗体定常領域の多数の異なる位置（例えば270位、272位、312位、315位、356位及び358位を含むがこれらに限定されないFc位置）において多形性が観察されており、従って、従来技術において提示されている配列間にはわずかな差異が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多形体は、十分に特性決定されている。現時点で、18のGmアロタイプが公知である：G1m（1、2、3、17）又はG1m（a、x、f、z）、G2m（23）又はG2m（n）、G3m（5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28）又はG3m（b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5）（Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of S

40

50

tructure, Function And Regulation.” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。具体的には、本発明の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディは、いずれの免疫グロブリン遺伝子のいずれのアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプを組み込んでよく、本明細書において提供されている配列のアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプに限定されないと考えられる。更に、いくつかの発現系では、C H3 ドメインの C 末端アミノ酸残基（上記太字部分）は、翻訳後に除去できる。従って、C H3 ドメインの C 末端は、本発明の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディにおいて任意のアミノ酸残基である。配列番号 14 の C 末端残基を含む例示的な B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディを、以下に提供する。また本発明には、配列番号 14 の C 末端リシン残基を有しない構造も包含される。

【0065】

第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の C H2 及び / 又は C H3 ドメインは、いずれも配列番号 14 又はその変異型で構成され得る。

【0066】

特に、本発明の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディの第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の C H2 C H3 ドメインに関して、Fc R I A ( C D 6 4 )、Fc R I I A ( C D 3 2 A )、Fc R I I B ( C D 3 2 B )、Fc R I I I A ( C D 1 6 a ) 又は Fc R I I I B ( C D 1 6 b ) への結合が（野生型 Fc 領域（配列番号 14）が示す結合よりも）低減される（又は略結合しない）ことが好ましい。このような変化した結合を仲介できる Fc 変異型及び突然変異形態は、当該技術分野において公知であり、234 位及び 235 位のアミノ酸置換、265 位の置換、又は 297 位の置換を含み、これらの番号付与は、K a b a t におけるような E U インデックスの番号付与である（例えば、参照により本出願に援用される米国特許第 5,624,821 号を参照）。ある好ましい実施形態では、本発明の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディの第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の C H2 C H3 ドメインは、アラニンによる 234 位の置換、及びアラニンによる 235 位の置換を含み、これらの番号付与は、K a b a t におけるような E U インデックスの番号付与である。

【0067】

第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の C H2 及び / 又は C H3 ドメインは、配列において同一である必要はなく、有利には 2 つのポリペプチド鎖間の複合体形成を促進するために修飾される。例えば、C H2 又は C H3 ドメインにアミノ酸置換（好ましくは「ノブ（knob）」を形成する嵩高な側鎖基、例えばトリプトファンを含むアミノ酸による置換）を導入して、立体障害により、同様に変異させたドメインとの相互作用を防止し、上記変化したドメインを、相補的な又は適応した変異（例えばグリシンによる置換）を施されたドメイン、即ち「ホール（hole）」対合させることができる。このような一連の突然変異は、上記二重特異性 1 価 Fc ダイアボディを含むポリペプチドのいずれのペアに施すことができ、更に上記ペアのポリペプチド鎖のいずれの部分に施すことができる。ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進するためのタンパク質加工の方法は、特に免疫グロブリン様分子の加工に関して当該技術分野で公知であり、本明細書に包含される（例えば Ridgway et al. (1996) “ ‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621; Atwell et al. (1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35; 及び Xie et al. (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101 を参照（これらの文書はそれぞれ参照によりその全体が本明細書に援用される））。好ましくは、ノブは第 1 のポリペプチド鎖の C H2 C H3 ドメインに加工され、ホールは、第 3 のポリペプチド鎖の C H2 C H3 ドメインに加工される。従ってノブは、第 1 のポリペプチド鎖の 2 つの分子がその C H2 及び / 又は C H3 ドメインを介してホモ二量体化するのを防止する役

割を果たすことになる。第3のポリペプチド鎖は好ましくは「ホール」置換基を含有するため、これは、第1のポリペプチド鎖とヘテロ二量体化し、かつそれ自体とホモ二量体化する能力を有することになる（しかしながらこのような二量体化は、エピトープ結合部位を有する分子を形成しない）。好ましいノブは、天然IgG Fcドメインを修飾して修飾基T366Wを含有させることによって生成される。好ましいホールは、天然IgG Fcドメインを修飾して修飾基T366S、L368A及びY407Vを含有させることによって生成される。第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を、第1、第2及び第3のポリペプチド鎖を含む最終的な二重特異性1価Fcダイアボディから精製するのを補助するために、好ましくは、第3のポリペプチド鎖のCH2及びCH3ドメインのタンパク質A結合部位を、位置435（H435R）におけるアミノ酸置換によって変異させる。このようにして、第3のポリペプチド鎖ホモ二量体はタンパク質Aに結合せず、その一方で二重特異性1価Fcダイアボディは、第1のポリペプチド鎖のタンパク質A結合部位を介してタンパク質Aに結合する能力を有したままとなる。

10

## 【0068】

本発明のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1のポリペプチド鎖のCH2及びCH3ドメインに関する好ましい配列は、「ノブ担持（knob bearing）」配列（配列番号15）：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGK

20

を有する。

## 【0069】

本発明のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第3のポリペプチド鎖のCH2及びCH3ドメインに関する好ましい配列は、「ホール担持（hole bearing）」配列（配列番号16）：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNRYTQKS LSLSPGK

30

を有する。

## 【0070】

上述のように、配列番号15及び配列番号16のCH2 CH3ドメインは、アラニンによる234位の置換及びアラニンによる235位の置換を含み、従って、（野生型Fc領域（配列番号14）が示す結合と比べて）Fc RIA（CD64）、Fc RIIA（CD32A）、Fc RIIIB（CD32B）、Fc RIIIA（CD16a）又はFc RIIIB（CD16b）への結合が低下した（又は結合を実質的に示さない）Fcドメインを形成する。更に、本発明は具体的には、配列番号14、配列番号15及び/又は配列番号16のC末端リシン残基を有しない、B7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ構造を包含する。

40

## 【0071】

第1のポリペプチド鎖が、配列番号15のもの等の「ノブ担持」CH2 CH3配列を有することが好ましい。しかしながら、理解されるように、第1のポリペプチド鎖中に「ホール担持」CH2 CH3ドメイン（例えば配列番号16）を採用でき、この場合「ノブ担持」CH2 CH3ドメイン（例えば配列番号15）は、第3のポリペプチド鎖中に採用される。

## 【0072】

E．好ましいB7 H3可変ドメイン

50

いずれの抗 B 7 H 3 抗体の抗体結合ドメインを、本発明に従って使用してよい。ヒト B 7 H 7 に対して免疫特異的である例示的な抗体（「B 7 H 3 m A b A」、「B 7 H 3 m A b B」及び「B 7 H 3 m A b C」と呼ばれる）を、以下に提供する。

# 【 0 0 7 3 】

1 . B 7 H 3 m A b A

B 7 H 3 m A b A の V L ドメインのアミノ酸置換（配列番号 1 7 ）を以下に示す（C D R<sub>L</sub> 残基は下線を付して示す）：

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ  
GTKLEIK

10

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 1 : （配列番号 1 8 ）KASQNVDTNVA

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 2 : （配列番号 1 9 ）SASYRYS

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 3 : （配列番号 2 0 ）QQYNNYPFT

# 【 0 0 7 4 】

B 7 H 3 m A b A の V H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 1 ）を以下に示す（C D R<sub>H</sub> 残基は下線を付して示す）：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFSSFGMHWRQA PGKGLEWVAY  
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR  
ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

20

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 1 : （配列番号 2 2 ）SFGMH

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 2 : （配列番号 2 3 ）YISSDSSAIYYADTVKG

B 7 H 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 3 : （配列番号 2 4 ）GRENIYYGSRLDY

# 【 0 0 7 5 】

2 . B 7 H 3 m A b B

B 7 H 3 m A b B の V L ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 5 ）を以下に示す（C D R<sub>H</sub> 残基は下線を付して示す）：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
GTKLEIK

30

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>L</sub> 1 （配列番号 2 6 ）RASQDISNYLN

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>L</sub> 2 （配列番号 2 7 ）YTSRLHS

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>L</sub> 3 （配列番号 2 8 ）QQGNTLPPT

# 【 0 0 7 6 】

B 7 H 3 m A b B の V H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 9 ）を以下に示す（C D R<sub>H</sub> 残基は下線を付して示す）：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWMQWVRQA PGQGLEWMGT  
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG  
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

40

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>H</sub> 1 : （配列番号 3 0 ）SYWMQ

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>H</sub> 2 : （配列番号 3 1 ）TIYPGDGDTRYTQKFKG

B 7 H 3 m A b B の C D R<sub>H</sub> 3 : （配列番号 3 2 ）RGIPRLWYFDV

# 【 0 0 7 7 】

3 . B 7 H 3 m A b C

B 7 H 3 m A b C の V L ドメインのアミノ酸配列（配列番号 3 3 ）を以下に示す（C D R<sub>L</sub> 残基は下線を付して示す）：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
GTKLEIK

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>L</sub> 1 : （配列番号 3 4 ）R A S Q S I S S Y L N

50

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>L</sub> 2 : ( 配列番号 3 5 ) Y T S R L Q S

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>L</sub> 3 : ( 配列番号 3 6 ) Q Q G N T L P P T

【 0 0 7 8 】

B 7 H 3 m A b C の V H ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 3 7 ) を以下に示す ( C D R<sub>H</sub> 残基は下線を付して示す ) :

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT  
IYPGGGDRY TQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG  
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>H</sub> 1 : ( 配列番号 3 8 ) SYWMQ

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>H</sub> 2 : ( 配列番号 3 9 ) TIYPGGGDRYTQKFQG

B 7 H 3 m A b C の C D R<sub>H</sub> 3 : ( 配列番号 4 0 ) RGIPRLWYFDV

【 0 0 7 9 】

F . 好ましい C D 3 可変ドメイン

いずれの抗 C D 3 抗体の抗原結合ドメインを、本発明に従って使用してよい。ヒト C D 3 に対して免疫特異的である例示的な抗体 ( 「 C D 3 m A b A 」 と呼ばれる ) を、以下に提供する。

【 0 0 8 0 】

C D 3 m A b A の V L ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 4 1 ) を以下に示す ( C D R<sub>L</sub> 残基は下線を付して示す ) :

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGTKLTVLG

C D 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 1 : ( 配列番号 4 2 ) RSSTGAVTTSNYAN

C D 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 2 : ( 配列番号 4 3 ) GTNKRAP

C D 3 m A b A の C D R<sub>L</sub> 3 : ( 配列番号 4 4 ) ALWYSNLWV

【 0 0 8 1 】

C D 3 m A b A の V H ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 4 5 ) を以下に示す ( C D R<sub>H</sub> 残基は下線を付して示す ) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAIWGQGTL VTVSS

C D 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 1 : ( 配列番号 4 6 ) TYAMN

C D 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 2 : ( 配列番号 4 7 ) RIRSKYNNYATYYADSVKD

C D 3 m A b A の C D R<sub>H</sub> 3 : ( 配列番号 4 8 ) HGNFGNSYVSWFAY

【 0 0 8 2 】

特定の実施形態では、C D 3 m A b A の V H ドメインは、K a b a t 位置 6 5 におけるアスパラギン酸からグリシンへの置換 ( D 6 5 G 置換、配列番号 4 5 の残基 6 8 に対応 ) を含み、従って C D R<sub>H</sub> 2 のアミノ酸配列は : RIRSKYNNYATYYADSVKG ( 配列番号 4 9 ) となる。D 6 5 G 置換を有する C D 3 m A b A の V H ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 5 0 ) を以下に示す ( 置換された残基は下線を付して示す ) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAIWGQGTL VTVSS

【 0 0 8 3 】

I I I . 例示的な B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ

本発明は、B 7 H 3 及び C D 3 に同時に特異的に結合できる、B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを提供する。上述のように、本発明の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、3 つのポリペプチド鎖を含む。B 7 H 3 及び C D 3 に結合できる 4 つの例示的な B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ ( 「 D A R T A 」 、 「 D A R T B 」 、 「 D A R T C 」 及び 「 D A R T D 」 ) のポリペ

10

20

30

40

50



プチド鎖を、以下に提供する。

【 0 0 8 4 】

A . D A R T A

D A R T A の第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；B 7 H 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン（V L<sub>B7-H3</sub> B 7 H 3 m A b A）（配列番号 1 7）；介在リンカーペプチド（リンカー 1；GGGSGGGG（配列番号 1））；C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン（V H<sub>CD3</sub> C D 3 m A b A）（配列番号 4 5）；介在リンカーペプチド（リンカー 2；GGCGGG（配列番号 2））；ヘテロ二量体促進（E コイル）ドメイン（EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK（配列番号 1 0））；介在リンカーペプチド（スペーサリンカー 3；GGGDKHTCPCPCP（配列番号 5））；「ノブ担持」F c ドメイン（配列番号 1 5）；及び C 末端を含む。

10

【 0 0 8 5 】

よって D A R T A の第 1 のポリペプチド鎖は：配列番号 1 7 配列番号 1 配列番号 4 5 配列番号 2 配列番号 1 0 配列番号 5 配列番号 1 5 で構成される。

【 0 0 8 6 】

D A R T A の第 1 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、（配列番号 5 3）：

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
ASYRYSQVPS RFGSGSGSTD FTLTISLQPF EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
WVRQAPGKGL EWWGRIIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM  
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLLVTVSS GCGGGGEVAA  
LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPCAPE AAGGPSVFLF  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE  
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
SPGK

20

である。

【 0 0 8 7 】

このようなポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチドは、（配列番号 5 4）：

30

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
cctgggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc  
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttgc  
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag  
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgggc gaggcgaggt  
gcagctggtg gagtctgggg gaggcttggg ccagcctgga gggtccttga  
gactctcctg tgcagcctct ggattcacct tcagcacata cgctatgaat  
tgggtccgcc aggtccagg gaaggggctg gagtgggttg gaaggatcag  
gtccaagtac aacaattatg caacctacta tgccgactct gtgaaggata  
gattcacctat ctcaagagat gattcaaaga actcactgta tctgcaaatg  
aacagcctga aaaccgagga cacggccgtg tattactgtg tgagacacgg  
taacttcggc aattcttacg tgtcttgggt tgcttatagg ggacagggga  
cactggtgac tgtgtcttcc ggaggatgtg gcggtggaga agtggccgca  
ctggagaaaag aggttgcctg ttgggagaag gaggtcgctg cacttgaaaa  
ggaggtcgca gccctggaga aaggcgggcg ggacaaaact cacacatgcc  
caccgtgccc agcacctgaa gcccgggggg gaccgtcagt ctctctcttc  
cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgagggtcac

40

50

atgctgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact  
 ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag  
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca  
 ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag  
 cccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc  
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa  
 gaaccaggtc agcctgtggt gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca  
 tgcgctgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc  
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc tcttctctct acagcaagct  
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg  
 tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg  
 tctccgggta aa

10

である。

#### 【 0 0 8 8 】

D A R T A の第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン（V L<sub>CD3</sub> C D 3 m A b A）（配列番号 4 1）；介在リンカーペプチド（リンカー 1；GGSGGGG（配列番号 1））；B 7 H 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン（V H<sub>B7-H3</sub> B 7 H 3 m A b A）（配列番号 2 1）；介在リンカーペプチド（リンカー 2；GGCGGG（配列番号 2））；ヘテロ二量体促進（K コイル）ドメイン（KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE（配列番号 1 1））；及び C 末端を含む。

20

#### 【 0 0 8 9 】

よって D A R T A の第 2 のポリペプチド鎖は：配列番号 4 1 配列番号 1 配列番号 2 1 配列番号 2 配列番号 1 1 で構成される。

#### 【 0 0 9 0 】

D A R T A の第 2 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、（配列番号 5 5）：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF  
 GMHWRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ  
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS GCGGGGKVAA  
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

30

である。

#### 【 0 0 9 1 】

このようなポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチドは、配列（配列番号 5 6）：

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgacctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact  
 acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc  
 gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc  
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggcgg  
 aggcgagggtg cagctgggtcg agtctggcgg aggactgggtg cagcctggcg  
 gctccctgag actgtcttgc gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc  
 ggcatgcact ggggtccgcca ggctccaggc aagggactgg aatgggtggc  
 ctacatctcc tccgactcct ccgcatcta ctacgccgac accgtgaagg  
 gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag  
 atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg  
 ccgggagaat atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca

40

50

ccaccgtgac cgtgtcctcc ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca  
ctgaaggaga aagtgtctgc ttigaaagag aaggtcgccg cacttaagga  
aaaggtcgca gccctgaaag ag

を有する。

【 0 0 9 2 】

D A R T A の第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；ペプチド（リンカー 3；DKHTCPCP（配列番号 4））；「ホール担持」Fc ドメイン（配列番号 16）；及び C 末端を含む。

【 0 0 9 3 】

よって D A R T A の第 3 のポリペプチドは：配列番号 4 配列番号 16 で構成される。

10

【 0 0 9 4 】

D A R T A の第 3 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、（配列番号 57）：

DKHTCPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
CKVSNKALPA PIEKISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK

である。

【 0 0 9 5 】

20

このようなポリペプチドをコードする好ましいポリヌクレオチドは、配列（配列番号 58）：

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcggggggg  
accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct  
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac  
cctgaggta agttcaactg gtacgtggac ggcggtggagg tgcataatgc  
caagacaaaag ccgcgggagg agcagtaaca cagcacgtac cgtgtggtca  
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
tgcaaggctc ccaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc  
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat  
cccgggagga gatgaccaag aaccaggta gcctgagttg cgcagtcaaa  
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc  
ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct  
tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg  
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac  
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a

30

を有する。

【 0 0 9 6 】

B . D A R T B

D A R T B の第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；B 7 H 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン（V L<sub>B7-H3</sub> B 7 H 3 m A b B）（配列番号 25）；介在リンカーペプチド（リンカー 1；GGGSGGGG（配列番号 1））；C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン（V H<sub>CD3</sub> C D 3 m A b A）（配列番号 45）；介在リンカーペプチド（リンカー 2；GGCGGG（配列番号 2））；ヘテロ二量体促進（E コイル）ドメイン（EVAAL<sub>E</sub>K-EVAAL<sub>E</sub>K-EVAAL<sub>E</sub>K-EVAAL<sub>E</sub>K（配列番号 10））；介在リンカーペプチド（スペーサリンカー 3；GGGDKHTCPCP（配列番号 5））；「ノブ担持」Fc ドメイン（配列番号 15）；及び C 末端を含む。

40

【 0 0 9 7 】

よって D A R T B の第 1 のポリペプチド鎖は：配列番号 25 配列番号 1 配列番号 45 配列番号 2 配列番号 10 配列番号 5 配列番号 15 で構成される。

50

## 【 0 0 9 8 】

D A R T B の第 1 のポリペプチドのアミノ酸配列は、( 配列番号 5 9 ) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
 TSR LHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISRD DSKNSLYLQM  
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTTLVTVSS GCGGGGEVAA  
 LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPCAPE AAGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE  
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
 SPGK

10

である。

## 【 0 0 9 9 】

D A R T B の第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に : N 末端 ; C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン ( V L <sub>CD3</sub> C D 3 m A b A ) ( 配列番号 4 1 ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 1 ; GGGSGGGG ( 配列番号 1 ) ) ; B 7 H 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン ( V H <sub>B7-H3</sub> B 7 H 3 m A b B ) ( 配列番号 2 9 ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 2 ; GCGGG ( 配列番号 2 ) ) ; ヘテロ二量体促進 ( K コイル ) ドメイン ( KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE ( 配列番号 1 1 ) ; 及び C 末端を含む。

20

## 【 0 1 0 0 】

よって D A R T B の第 2 のポリペプチドは : 配列番号 4 1 配列番号 1 配列番号 2 9 配列番号 2 配列番号 1 1 で構成される。

## 【 0 1 0 1 】

D A R T B の第 2 のポリペプチドのアミノ酸配列は、( 配列番号 6 0 ) :

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY  
 WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME  
 LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK  
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

30

である。

## 【 0 1 0 2 】

D A R T B の第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に : N 末端 ; ペプチド ( リンカー 3 ; DKHTCPPCP ( 配列番号 4 ) ) ; 「ホール担持」F c ドメイン ( 配列番号 1 6 ) ; 及び C 末端を含む。

## 【 0 1 0 3 】

よって D A R T B の第 3 のポリペプチドは : 配列番号 4 配列番号 1 6 で構成され、上述の D A R T A の第 3 のポリペプチド鎖 ( 配列番号 5 7 ) と同一のアミノ酸配列を有する。

40

## 【 0 1 0 4 】

C . D A R T C

D A R T C の第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に : N 末端 ; B 7 H 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン ( V L <sub>B7-H3</sub> B 7 H 3 m A b C ) ( 配列番号 3 3 ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 1 ; GGGSGGGG ( 配列番号 1 ) ) ; C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン ( D 6 5 G 置換を有する V H <sub>CD3</sub> C D 3 m A b A ) ( 配列番号 5 0 ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 2 ; GCGGG ( 配列番号 2 ) ) ; ヘテロ二量体促進 ( E コイル ) ドメイン ( EVAAEK-EVAAEK-EVAA

50

ALEK-EVAALEK (配列番号 10) ; 介在リンカーペプチド (スパーサリンカー 3 ; GGGDKTHTCPPCP (配列番号 5) ; 「ノブ担持」Fcドメイン (配列番号 15) ; 及びC末端を含む。

#### 【0105】

よってDART Cの第1のポリペプチド鎖は：配列番号 33 配列番号 1 配列番号 50 配列番号 2 配列番号 10 配列番号 5 配列番号 15 で構成される。

#### 【0106】

DART Cの第1のポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号 61) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQSIS SYLNWYQQKPKAPKLLIYY  
TSRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM  
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLLVTVSS GGCGGGEVAA  
LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLF  
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP  
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT  
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL  
SPGK

10

である。

20

#### 【0107】

DART Cの第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ方向に：N末端；CD3に結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン (VL<sub>CD3</sub> CD3 mAb C) (配列番号 41) ; 介在リンカーペプチド (リンカー 1 ; GGGSGGGG (配列番号 1) ) ; B7H3に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン (VH<sub>B7-H3</sub> B7 H3 mAb B) (配列番号 37) ; 介在リンカーペプチド (リンカー 2 ; GGCGGG (配列番号 2) ) ; ヘテロ二量体促進 (Kコイル) ドメイン (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (配列番号 11) ; 及びC末端を含む。

#### 【0108】

よってDART Cの第2のポリペプチドは：配列番号 41 配列番号 1 配列番号 37 配列番号 2 配列番号 11 で構成される。

30

#### 【0109】

DART Cの第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、(配列番号 62) :

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY  
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGGGDTRYTQ KFQGRVTITA DKSTSTAYME  
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGKVAALK  
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

である。

40

#### 【0110】

DART Cの第3のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ方向に：N末端；ペプチド (リンカー 3 ; DKHTCPPCP (配列番号 4) ) ; 「ホール担持」Fcドメイン (配列番号 16) ; 及びC末端を含む。

#### 【0111】

よってDART Cの第3のポリペプチドは：配列番号 4 配列番号 16 で構成され、上で提供されたDART Aの第3のポリペプチド (配列番号 57) と同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0112】

D . DART D

50

例示的な DART D の第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の一般構造は、DART D がシステイン残基を含まない代替的なリンカー 2 を含み、またシステイン含有ヘテロ二量体促進ドメインを含む点を除いて、DART A、DART B 及び DART C と同一である。DART D の第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；B7 H3 に結合できるモノクローナル抗体の VL ドメイン (VL<sub>B7-H3</sub> B7 H3 mAb C) (配列番号 33)；介在リンカーペプチド (リンカー 1；GGSGGGG (配列番号 1))；CD3 に結合できるモノクローナル抗体の VH ドメイン (D65G 置換を有する VH<sub>CD3</sub> CD3 mAb A) (配列番号 50)；介在リンカーペプチド (リンカー 2；ASTKG (配列番号 3))；ヘテロ二量体促進 (E コイル) ドメイン (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (配列番号 12))；介在リンカーペプチド (スペーサリンカー 3；GGDKTHTCPPCP (配列番号 5))；「ノブ担持」Fc ドメイン (配列番号 15)；及び C 末端を含む。

10

## 【0113】

よって DART D の第 1 のポリペプチド鎖は：配列番号 33 配列番号 1 配列番号 50 配列番号 3 配列番号 12 配列番号 5 配列番号 15 で構成される。

## 【0114】

DART D の第 1 のポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号 63)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM  
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC  
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS  
PGK

20

である。

## 【0115】

30

DART D の第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；CD3 に結合できるモノクローナル抗体の VL ドメイン (VL<sub>CD3</sub> CD3 mAb C) (配列番号 41)；介在リンカーペプチド (リンカー 1；GGSGGGG (配列番号 1))；B7 H3 に結合できるモノクローナル抗体の VH ドメイン (VH<sub>B7-H3</sub> B7 H3 mAb B) (配列番号 37)；介在リンカーペプチド (リンカー 2；ASTKG (配列番号 3))；ヘテロ二量体促進 (K コイル) ドメイン (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (配列番号 13))；及び C 末端を含む。

## 【0116】

よって DART D の第 2 のポリペプチドは：配列番号 41 配列番号 1 配列番号 37 配列番号 3 配列番号 13 で構成される。

40

## 【0117】

DART D の第 2 のポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号 64)：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDADYYC ALWYSNLWVF  
GGGKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY  
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGGGDTRYTQ KFQGRVTITA DKSTSTAYME  
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGG GTTVTVSSAS TKGKVAACEK  
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

である。

## 【0118】

50

第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、異なるリンカー及びヘテロ二量体促進ドメインを組み込んでいるが、DART D の第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；ペプチド（リンカー 3；DKHTCPCP（配列番号 4））；「ホール担持」Fc ドメイン（配列番号 16）；及び C 末端を含む。

【0119】

よって DART D の第 3 のポリペプチドは：配列番号 4 配列番号 16 で構成され、上述の DART A の第 3 のポリペプチド（配列番号 57）と同一のアミノ酸配列を有する。

【0120】

IV. 対照 DART（登録商標）ダイアボディ

本発明の B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディの特性をより意義深く実証するために、フルオレセイン及び CD3 に結合できる対照二重特異性 1 価 Fc ダイアボディを構成した（「対照 DART」と呼ばれる）。

【0121】

対照 DART（登録商標）ダイアボディを形成するために使用される抗フルオレセイン抗体は、抗体 4 4 20 であった（Gruber, M. et al. (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli," J. Immunol. 152(11):5368-5374; Bedzyk, W.D. et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotypic Family," J. Biol. Chem. 264(3): 1565-1569）。抗フルオレセイン抗体 4 4 20 の可変軽鎖及び可変重鎖ドメインのアミノ酸配列は、以下の通りである。

【0122】

抗フルオレセイン抗体 4 4 20 の VL ドメインのアミノ酸配列（配列番号 65）を以下に示す（CDRL 残基は下線を付して示す）：

DVVMQTTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK  
VLIYKVS<sup>N</sup>RF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
WTFGGGTKLE IK

【0123】

抗フルオレセイン抗体 4 4 20 の VH ドメインのアミノ酸配列（配列番号 66）を以下に示す（CDRH 残基は下線を付して示す）：

EVKLD<sup>E</sup>TGGG LVQPGRP<sup>M</sup>KL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ  
IRNKPYN<sup>E</sup>YET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG  
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

【0124】

対照 DART の第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；フルオレセインに結合できるモノクローナル抗体の VL ドメイン（VL<sub>Fluor</sub> 4 4 20）（配列番号 65）；介在リンカーペプチド（リンカー 1；GGSGGGG（配列番号 1））；CD3 に結合できるモノクローナル抗体の VH ドメイン（D65G 置換を有する VH<sub>CD3</sub> CD3 mAb A）（配列番号 50）；介在リンカーペプチド（リンカー 2；GGCGGG（配列番号 2））；ヘテロ二量体促進（E コイル）ドメイン（EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK（配列番号 10））；介在リンカーペプチド（スペーサリンカー 3；GGGDKHTCPCP（配列番号 5））；「ノブ担持」Fc ドメイン（配列番号 15）；及び C 末端を含む。

【0125】

よって対照 DART の第 1 のポリペプチド鎖は：配列番号 65 配列番号 1 配列番号 50 配列番号 2 配列番号 10 配列番号 5 配列番号 15 で構成される。

【0126】

対照 DART の第 1 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、（配列番号 67）：

DVVMQTTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK  
VLIYKVS<sup>N</sup>RF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
WTFGGGTKLE IKGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS

10

20

30

40

50

TYAMNWRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS  
 LYLMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGT VTVSSGGCGG  
 GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHCTPP CPAPEAAGGP  
 SVFLFPKPK DTLMSRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK  
 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK  
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK

である。

【 0 1 2 7 】

10

対照 D A R T の第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン（V L<sub>CD3</sub> C D 3 m A b A）（配列番号 3 7）；介在リンカーペプチド（リンカー 1；GGSGGGG（配列番号 1））；フルオレセインに結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン（V H<sub>fluor</sub> 4 4 2 0）（配列番号 6 5）；介在リンカーペプチド（リンカー 2；GGCGGG（配列番号 2））；ヘテロ二量体促進（K コイル）ドメイン（KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE（配列番号 1 1））；及び C 末端を含む。

【 0 1 2 8 】

よって対照 D A R T の第 2 のポリペプチド鎖は：配列番号 3 7 配列番号 1 配列番号 6 5 配列番号 2 配列番号 1 1 で構成される。

20

【 0 1 2 9 】

対照 D A R T の第 2 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、（配列番号 6 8）：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLDGTGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY  
 WMNWRQSPE KGLEWVAQIR NKPYNYYETYY SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY  
 LQMNLRVED MGIIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCG GGKVAALKEK  
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

である。

【 0 1 3 0 】

30

対照 D A R T の第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；ペプチド（リンカー 3；DKTHCTPPCP（配列番号 4））；「ホール担持」F c ドメイン（配列番号 1 6）；及び C 末端を含む。

【 0 1 3 1 】

よって対照 D A R T の第 3 のポリペプチド鎖は：配列番号 4 配列番号 1 6 で構成され、上述の D A R T A の第 3 のポリペプチド鎖（配列番号 5 7）と同一のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 3 2 】

V . 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に使用できるバルク薬剤組成物（例えば不純又は非滅菌組成物）、及び単位剤形の調製に使用できる医薬組成物（即ち被験体又は患者への投与に好適な組成物）を含む。これらの組成物は、本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、又はこのような作用剤と薬学的に許容可能なキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディと、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

40

【 0 1 3 3 】

本発明はまた、本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディと；免疫応答の刺激に有効な 1 つ若しくは複数の分子（例えば免疫チェックポイント阻害因子）、及び / 又は少なくとも 1 つの特定の癌抗原に対して特異的である、癌抗原に特異的に結合

50



する 1 つ若しくは複数の追加の分子と組み合わせられた、1 つ又は複数の追加の分子（例えば腫瘍特異性モノクローナル抗体若しくはダイアボディ）と；薬学的に許容可能なキャリアとを含む、医薬組成物も包含する。本明細書中で使用される場合、用語「癌抗原（cancer antigen）」は、腫瘍細胞の表面上に特徴的に発現する抗原を指す。癌抗原の例としては：A 3 3（結腸直腸癌抗原；Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998）；B 1（Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9）；B A G E（Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84）；カテニン（Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9）；C A 1 2 5（Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81）；C D 5（Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73）；C D 1 9（Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48）；C D 2 0（Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36）；C D 2 2（Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51）；C D 2 3（Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107）；C D 2 5（Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48）；C D 2 7（Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40）；C D 2 8（Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40）；C D 3 6（Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7）；C D 4 0 / C D 1 5 4（Messmer, D. et al. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60）；C D 4 5（Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46）；C D 5 6（Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40）；C D 7 9 a / C D 7 9 b（Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48；Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106）；C D 1 0 3（Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48）；C D K 4（Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4）；C E A（癌胎児性抗原；Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46；Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9）；C T L A 4（Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13）；E G F - R（表皮成長因子受容体；Adenis, A. et al. 2003 BullCancer. 90 Spec No:S228-32）；E r b（E r b B 1；E r b B 3；E r b B 4；Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-40；Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38）；GAGE（GAGE-1；GAGE-2；Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1):123-8）；GD2/GD3/GM2（Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25）；g p 1 0 0（Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27）；H E R - 2 / n e u（Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91）；ヒトパピローマウイルス-E 6 / ヒトパピローマウイルス-E 7（DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59）；K S A（1 7 - 1 A）（Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80）；M A G E（MAGE-1；MAGE-3；Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84）；M A R T（Kounalakis, N. et al. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82）；M U C - 1（Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46）；M U M - 1（Castelli, C. et al. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31）；N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6;1473(1):21-34）；p 1 5（Gil, J. et al. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77）；P S A（前立腺特異性抗原；Cracco, C.M. et al. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11）；P S M A（Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80）；s T n（Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91）；T N F 受容体（T N F - 受容体，T N F - 受容体；又は T N F - 受容体；van Horssen, R. et al. 2006 Oncologist. 11(4):397-408；Gardnerova, M. et al. 2000 Curr Drug Targets. 1(4):327-64）；V E G F 受容体（O' Dwyer, P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-8）；A D A M - 9（米国公開特許第 2 0 0 6 / 0 1 7 2 3 5 0 号；P C T 公開番号第 0 6 / 0 8 4 0 7 5 号）；A L C A M（P C T 公開番号第 0 3 / 0 9 3 4 4 3 号）；カルボキシペプチダーゼ M（米国公開特許第 2 0 0 6 / 0 1 6 6 2 9 1 号）；C D 4 6（米国特許第 7 , 1 4 8 , 0 3 8 号；P C T 公開番号第 0 3 / 0 3 2 8 1 4 号）；サイトケラチン 8（P C T 公開番号第 0 3 / 0 2 4 1 9 1 号）；エフリン受容体（及び特に E p h A 2）（米国特許第 7 , 5 6 9 , 6 7

2号；PCT公開番号第06/084226号）；インテグリン-V-6（PCT公開番号第03/087340号）；JAM-3（PCT公開番号第06/084078号）；KID3（PCT公開番号第05/028498号）；KID31（PCT公開番号第06/076584号）；LUC-A-2（米国公開特許第2006/0172349号；PCT公開番号第06/083852号）；オンコスタチンM（オンコスタチン受容体）（米国特許第7,572,896号；PCT公開番号第06/084092号）；PIPA（米国特許第7,405,061号；PCT公開番号第04/043239号）；ROR1（米国特許第5,843,749号）；並びにトランスフェリン受容体（米国特許第7,572,895号；PCT公開番号第05/121179号）が挙げられる。

#### 【0134】

ある具体的実施形態では、用語「薬学的に許容可能な（pharmaceutically acceptable）」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して、連邦規制当局若しくは州政府によって承認されている、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「キャリア（carrier）」は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイントアジュバント（完全及び不完全））、賦形剤、又は治療薬の投与に用いられるビヒクルを指す。これらの薬学的キャリアは、水及び石油、動物油、植物油若しくは合成油を含む油（例えば落花生油、大豆油、鉱物油、胡麻油等）等の、無菌液体とすることができる。医薬組成物を静脈投与する場合、生理食塩水、水性デキストロース及びグリセロール溶液といった水性キャリアが好ましい。好適な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。必要な場合は、上記組成物は、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含有することもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、ピル、カプセル、粉体、徐放性製剤等の形態を取ることができる。

#### 【0135】

一般に、本発明の組成物の成分は、例えば活性作用剤の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ中の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別個に、又は単位剤形にまとめて混合された状態で供給される。組成物を点滴によって投与する場合、組成物は、滅菌された薬学的グレードの水又は食塩水を内包する点滴ボトルを用いて吐出できる。組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射用無菌水又は食塩水のアンプルを提供できる。

#### 【0136】

本発明の組成物は、中性又は塩形態として処方できる。薬学的に許容可能な塩としては：塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来の陰イオンを有して形成されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来の陽イオンを有して形成されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0137】

本発明はまた、本発明のB7-H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディを単独で、又は他の作用剤、特に薬学的に許容可能なキャリアと共に内包する1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供する。更に、疾患の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤又は治療剤も、上記医薬パック又はキットに含めることができる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つ又は複数で充填された1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供する。任意に、このような1つ又は複数のコンテナは、医薬製品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知と関連するものとして、上記通知は、ヒトへの投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映したものである。

#### 【0138】

キットは、本発明のB7-H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディを含むことが

10

20

30

40

50

できる。このキットは更に、癌の治療に有用な1つ若しくは複数の他の予防剤及び/若しくは治療剤を、1つ若しくは複数のコンテナ内に含むことができ；並びに/又はこのキットは更に、1つ若しくは複数の癌抗原に結合する1つ若しくは複数の細胞毒性抗体を含むことができる。特定の実施形態では、他の予防剤又は治療剤は、化学療法剤である。他の実施形態では、予防剤又は治療剤は生物学的治療剤又はホルモン療法剤である。

#### 【0139】

##### VI. 投与方法

本発明の組成物は、有効量の本発明の分子又は本発明の分子を含む医薬組成物を被験体に投与することによる、癌又は他の疾患若しくは障害に関連する1つ又は複数の症状の治療、予防及び改善のために提供できる。好ましい態様では、上記組成物は実質的に精製される（即ち上記組成物の効果を制限する、又は望ましくない副作用を生成する物質を実質的に含まない）。ある具体的実施形態では、被験体は動物、好ましくは非霊長類（例えばウシ属、ウマ科、ネコ科、イヌ科、げっ歯類等）又は霊長類（例えばカニクイザル等のサル、ヒト等）といった哺乳類である。ある好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

#### 【0140】

例えば抗体又は融合タンパク質を発現できるリボソーム、微粒子マイクロカプセル、組み換え細胞内へのカプセル化；受容体媒介性エンドサイトーシス（例えばWu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）；レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築等、様々な送達系が公知であり、本発明の分子及び組成物の投与に使用できる。

#### 【0141】

本発明の分子を投与する方法としては：非経口投与（例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）；硬膜外；並びに粘膜（例えば鼻腔内及び経口経路）が挙げられるがこれらに限定されない。ある具体的実施形態では、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、筋肉内、静脈内又は皮下投与される。組成物は、いずれの便利な経路によって、例えば点滴又はボーラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚層（例えば口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通した吸収によって投与してよく、他の生物学的活性作用剤と共に投与してよい。投与は全身性又は局所性とすることができる。更に、例えば吸入器又は噴霧器の使用及びエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与を採用することもできる。例えば米国特許第6,019,968号；米国特許第5,985,320号；米国特許第5,985,309号；米国特許第5,934,272号；米国特許第5,874,064号；米国特許第5,855,913号；米国特許第5,290,540号；米国特許第4,880,078号；国際公開第92/19244号；国際公開第97/32572号；国際公開第97/44013号；国際公開第98/31346号；国際公開第99/66903を参照（これらはそれぞれ、参照により本出願に援用される）。

#### 【0142】

本発明はまた、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディを、この分子の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ内に包装することも提供する。一実施形態では、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、例えば水又は食塩水を用いて、被験体への投与に適切な濃度へと再構成できる。好ましくは、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末として供給される。

#### 【0143】

凍結乾燥された本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、その元々のコンテナ内において2 ~ 8 で保管するべきであり、またこの分子は、再構成後12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内又は1時間以内に投与するべきである。ある代替実施形態では、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、この分子、融合タンパク質又はコンジュゲート分子の量及び濃度を示す

気密性コンテナ内に、液体形態で供給される。好ましくは、本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの液体形態を、気密性コンテナ内に入れて供給する。

【 0 1 4 4 】

障害に関連する 1 つ又は複数の症状の治療、予防及び改善に効果的な本発明の組成物の量は、標準的な臨床技術によって決定できる。処方において採用すべき正確な用量は、投与経路及び状態の重篤度にも左右され、施術者の判断及び各患者の状況に従って決定すべきである。効果的な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られた用量 応答曲線から外挿できる。

【 0 1 4 5 】

本明細書において使用される場合、医薬組成物の「有効量 ( e f f e c t i v e a m o u n t ) 」は、一実施形態において：疾患によってもたらされる症状の低減；疾患の症状（例えば癌細胞の増殖、腫瘍の存在、腫瘍転移等）を減弱させる疾患に起因する症状の減弱；これによる、疾患に罹患したヒトの Q O L の上昇；疾患を治療するために必要な他の投薬量の低減；標的化及び / 若しくは内在化等による別の投薬の効果の増強；疾患の進行の遅延；並びに / 又は個体の生存期間の延長を含むがこれらに限定されない、有益な又は所望の結果を得るために十分な量である。

10

【 0 1 4 6 】

上述のような有効量は、1 回又は複数回の投与で投与できる。本発明の目的のために、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、直接的又は間接的な、ウイルスの存在（又はその影響）の増殖の低減、並びに疾患（例えば癌）の進展の低減及び / 又は遅延に十分な量である。いくつかの実施形態では、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、別の薬剤、化合物又は医薬組成物と組み合わせて達成してもしなくてもよい。従って「有効量」は、1 つ又は複数の化学療法剤を投与する文脈で考えることができ、また単一の作用剤が、1 つ又は複数の他の作用剤と組み合わせて所望の結果を達成できる又は所望の結果を達成する場合に、有効量で与えられているものと考えることができる。個別の必要量は異なるが、各成分の有効量の最適な範囲の決定は当業者の能力の範囲内である。

20

【 0 1 4 7 】

本発明に包含される B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディに関して、患者に投与される投薬量は好ましくは、レシピエント被験者の体重 ( k g ) に基づいて決定される。投与される投薬量は典型的には、被験者の体重の少なくとも 0 . 0 1 μ g / k g 、少なくとも約 0 . 0 5 μ g / k g 、少なくとも約 0 . 1 μ g / k g 、少なくとも約 0 . 2 μ g / k g 、少なくとも約 0 . 5 μ g / k g 、少なくとも約 1 μ g / k g 、少なくとも約 2 μ g / k g 、少なくとも約 3 μ g / k g 、少なくとも約 5 μ g / k g 、少なくとも約 1 0 μ g / k g 、少なくとも約 2 0 μ g / k g 、少なくとも約 3 0 μ g / k g 、少なくとも約 5 0 μ g / k g 、少なくとも約 0 . 1 m g / k g 、少なくとも約 0 . 1 5 m g / k g 、少なくとも約 0 . 2 m g / k g 、少なくとも約 0 . 5 m g / k g 、少なくとも約 1 . 0 m g / k g 又はそれ以上である。

30

【 0 1 4 8 】

治療的又は予防的有効量の本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを用いた被験者の治療は、単回治療、又は好ましくは、同一の若しくは異なる投薬量を伴い得る複数回の一連の治療を含むことができる。例えば被験者は、本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを用いて、約 2 ~ 約 1 2 0 週間、又は 1 2 0 週間超に亘って、週 1 回又は 2 週間に 1 回の治療を受けることができる。治療に使用される B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの有効投薬量は、特定の治療の経過に亘って増減し得ることが理解されるだろう。

40

【 0 1 4 9 】

好ましくは、B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを、1 つ又は複数の投薬（これは変化させないままであってよく、又は治療に対する被験者の応答に応じて増減させてよい）を含む連続治療レジメンを用いて投与し、この治療レジメンは、2 週間、3 週間、4 週間、6 週間、8 週間又は 8 週間超に亘って投与される。典型的には、1、2

50

、3、4、5又は6コース以上の治療を行う。各治療コースは、それ以前のいずれのレジメンと同一であっても異なってもよい。

【0150】

特定の実施形態、投薬レジメンは、第1の6週間サイクルを含み、ここではB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディを2週間に1回（即ち1週間おきに）投与し、これに、B7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディを2週間に1回投与する1つ又は複数の8週間サイクルが続く。特定の実施形態では、第1の6週間サイクルに、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15回以上の8週間サイクルが続く。

【0151】

特定の実施形態では、被験者に投与されるB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディの投薬量は、被験者の体重の少なくとも約0.1 µg/kg、0.3 µg/kg、1.3 µg/kg、3 µg/kg、10 µg/kg、30 µg/kg又は100 µg/kgである。算出された用量は、ベースラインにおける患者の体重に基づいて投与される。しかしながら、ベースライン又は確立された安定体重からの体重の有意な（10%の）変化は、投与される用量の再計算を喚起するものとする。

【0152】

本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディの投与の用量及び頻度は、例えば脂質化等の改質によってB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディの取り込み及び組織貫通を増強することによって低減又は変更できる。

【0153】

患者に投与される本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディの投薬量は、単一作用剤による治療としての使用のために計算してよい。あるいは、本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディは他の治療用組成物と併用され、従って患者に投与される投薬量は、上記分子を単一作用剤による治療として使用する場合よりも小さくなる。

【0154】

本発明の医薬組成物は、治療が必要な領域に局所的に投与してよく、これは、以下に限定されるものではないが、例えば局所的点滴によって、注射によって、又はインプラントを用いて達成してよく、上記インプラントは多孔性、非多孔性又はゼラチン材料性であり、シラスティック膜等の膜又は繊維を含む。好ましくは、本発明の分子を投与する際、この分子が吸収されない材料を使用するよう注意しなければならない。

【0155】

本発明の組成物は、小嚢、特にリボソーム中で送達できる（Langer (1990) “New Methods Of Drug Delivery,” Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同上、pp.317-327参照）。

【0156】

本発明の組成物は、放出制御系又は徐放系中で送達できる。本発明のB7 H3 × CD3二重特異性1価Fcダイアボディを含む徐放性処方を製造するために、当業者に公知のいずれの技術を使用できる。例えば：米国特許第4,526,938号；国際公開第91/05548号；国際公開第96/20698号；Ning et al.(1996) “Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,” Radiotherapy & Oncology39:179-189;Song et al.(1995) “Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,” PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397;Cleek et al.(1997) “Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,” Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854;及びLam et al. (1997) “Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,” Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照（これらはそれぞれ参照によりそ

10

20

30

40

50

の全体が本明細書に援用される)。一実施形態では、放出制御系においてポンプを使用してよい(Langer, supra; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; 及び Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579 参照)。別の実施形態では、分子の放出制御を達成するためにポリマー材料を使用できる(例えば Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1):105-112); 米国特許第 5, 679, 377 号; 米国特許第 5, 916, 597 号; 米国特許第 5, 912, 015 号; 米国特許第 5, 989, 463 号; 米国特許第 5, 128, 326 号; 国際公開第 99/15154 号; 及び 国際公開第 99/20253 号 参照)。徐放性処方において使用されるポリマーの例としては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン コ 酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物類、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド類(PLA)、ポリ(ラクチド コ グリコリド)類(PLGA) 及び ポリオルトエステル類が挙げられるが、これらに限定されない。放出制御系は、治療標的(例えば肺)の近傍に配置でき、従って全身用量の一部しか必要としない(例えば Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol.2, pp.115-138 (1984) 参照)。放出制御インプラントとして有用なポリマー組成物は、Dunn et al. に従って使用できる(米国特許第 5,945,155 号 参照)。この特定の方法は、ポリマー系からの生物活性材料のインサイチュ放出制御の治療効果に基づく。埋入は一般に、治療的処置を必要とする患者の身体内のいずれの部位において実施できる。非ポリマー徐放系を使用でき、この場合、被験体の身体内の非ポリマーインプラントを、薬剤送達系として使用する。身体内への埋入後、インプラントの有機溶媒が組成物から周辺の組織液中へと放散、分散又は浸出し、非ポリマー材料は徐々に凝集又は沈殿して、固体の微小細孔性マトリクスを形成する(米国特許第 5, 888, 533 号 参照)。

#### 【0157】

放出制御系については、Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533) による報告中で議論されている。1つ又は複数の本発明の治療剤を含む徐放性処方を製造するために、当業者に公知のいずれの技術を使用できる。例えば：米国特許第 4, 526, 938 号; 国際公開第 91/05548 号 及び 第 96/20698 号; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; 並びに Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 参照(これらの文献はそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に援用される)。

#### 【0158】

本発明の組成物が、本発明の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディをエ

ンコードする核酸である場合、この核酸は、この核酸がエンコードする B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの発現を促進するために、この核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築して、例えばレトロウイルスベクターの使用によって（米国特許第 4, 980, 286 号参照）、又は直接注射によって、又は微粒子衝撃（例えば遺伝子銃；Biolistic、DuPont）の使用によって、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくは遺伝子導入剤を用いてコーティングすることによって、又は細胞核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドと連鎖させて上記核酸を投与すること（例えば Joliot et al. (1991) “Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868 を参照）等によって、上記核酸を投与することにより、インビボ投与できる。あるいは核酸を細胞内に導入して、相同遺伝子組み換えによる発現のための宿主細胞 DNA 内に組み込むことができる。

10

#### 【0159】

治療的又は予防的有効量の本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを用いた被験体の治療は、単回治療を含むことができ、又は好ましくは一連の複数回の治療を含むことができる。ある好ましい例では、被験体は、上述のようなダイアボディを用いて、約 1 ~ 52 週間に亘って、週 1 回、2 週間に 1 回（即ち 1 週間おきに）、又は 3 週間に 1 回処置される。本発明の医薬組成物は、1 日 1 回、1 日 2 回又は 1 日 3 回投与できる。あるいはこの医薬組成物は、1 週間に 1 回、1 週間に 2 回、2 週間に 1 回、1 ヶ月に 1 回、6 週間に 1 回、2 ヶ月に 1 回、1 年に 2 回又は 1 年に 1 回投与できる。治療に使用される上記分子の有効な用量設定は、特定の治療の期間に亘って増減させてよいことも理解されるだろう。

20

#### 【0160】

##### VII. 本発明の組成物の使用

本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、T 細胞を B 7 H 3 発現細胞と共存させる能力を有し、従って、B 7 H 3 の発現に関連する、又は B 7 H 3 の発現を特徴とする、いずれの疾患又は状態の治療に使用できる。よってこのような分子を含む医薬組成物は、限定するものではないが、以下を含むがこれらに限定されない癌細胞の存在を特徴とする癌の診断又は治療に採用できる：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；AIDS 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌の細胞。

30

40

#### 【0161】

特に、本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、それぞれ B 7 H 3 を高発現する、頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN）、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）を含む肺癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、並びに神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む小児期のメルケル細胞癌の治療に有用である。

#### 【0162】

本発明の B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは更に、上述の状態の治療のための医薬品の製造に使用できる。

#### 【0163】

50

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施形態を参照することにより、本発明は更に容易に理解されるだろう。これらの実施形態は例示として提供されており、そうでないことが明記されていない限り本発明を制限することを意図したものではない。

#### 【0164】

本発明の実施形態

これより、本発明の特定の実施形態の非限定的な例を提供する。

#### 【0165】

実施形態 1 :

B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディであって、上記二重特異性 1 価 Fc ダイアボディは、B7 H3 のエピトープ及び CD3 のエピトープに特異的に結合でき、IgG Fc ドメインを備え、ここで上記二重特異性 1 価 Fc ダイアボディは、第 1 のポリペプチド鎖、第 2 のポリペプチド鎖及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、上記第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、上記第 1 の及び第 3 のポリペプチド鎖は互いに共有結合し :

I . 上記第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に :

A . ドメイン IA であって :

(1) B7 H3 (VL<sub>B7-H3</sub>) 又は CD3 (VL<sub>CD3</sub>) に結合できる VL ドメインを含む、サブドメイン (IA1) ; 及び

(2) B7 H3 (VH<sub>B7-H3</sub>) 又は CD3 (VH<sub>CD3</sub>) に結合できる VH ドメインを含む、サブドメイン (IA2)

を含み、

上記サブドメイン IA1 及び IA2 は、12 アミノ酸残基以下のポリペプチドリンカーによって互いから隔てられ、また :

(a) 上記サブドメイン IA1 が、B7 H3 (VL<sub>B7-H3</sub>) に結合できる上記 VL ドメインを含む場合、上記サブドメイン IA2 が、CD3 (VH<sub>CD3</sub>) に結合できる上記 VH ドメインを含むよう選択され ; 又は

(b) 上記サブドメイン IA1 が、CD3 (VL<sub>CD3</sub>) に結合できる上記 VL ドメインを含む場合、上記サブドメイン IA2 が、B7 H3 (VH<sub>B7-H3</sub>) に結合できる上記 VH ドメインを含むよう選択される

ように、協調的に選択される、ドメイン IA ; 並びに

B . ヘテロ二量体促進ドメインに連結されたポリペプチドリンカーを含む、任意に存在するドメイン IB ;

C . 抗体の CH2 CH3 ドメインに連結されたポリペプチドリンカーを含む、ドメイン IC

II . 上記第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に :

A . ドメイン IIA であって :

(1) B7 H3 (VL<sub>B7-H3</sub>) 又は CD3 (VL<sub>CD3</sub>) に結合できる VL ドメインを含む、サブドメイン (IIA1) ; 及び

(2) B7 H3 (VH<sub>B7-H3</sub>) 又は CD3 (VH<sub>CD3</sub>) に結合できる VH ドメインを含む、サブドメイン (IIA2)

を含み、

上記サブドメイン IIA1 及び IIA2 は、12 アミノ酸残基以下のポリペプチドリンカーによって互いから隔てられ、また :

(a) 上記サブドメイン IA1 が、B7 H3 (VL<sub>B7-H3</sub>) に結合できる上記 VL ドメインを含む場合、上記サブドメイン IIA1 は、CD3 (VL<sub>CD3</sub>) に結合できる上記 VL ドメインを含むよう選択され、上記サブドメイン IIA2 は、B7 H3 (VH<sub>B7-H3</sub>) に結合できる上記 VH ドメインを含むよう選択され ; 及び

(b) 上記サブドメイン IA1 が、CD3 (VL<sub>CD3</sub>) に結合できる上記 VL ドメインを含む場合、上記サブドメイン IIA1 は、B7 H3 (VL<sub>B7-H3</sub>) に結合できる

10

20

30

40

50



上記 V L ドメインを含むよう選択され、上記サブドメイン I I A 2 は、C D 3 ( V H<sub>CD3</sub>) に結合できる上記 V H ドメインを含むよう選択される

ように、協調的に選択される、ドメイン I I A ; 並びに

B . ヘテロ二量体促進ドメインに連結されたポリペプチドリンカーを含む、任意に存在するドメイン I I B

を含み ;

I I I . 上記第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に、抗体の C H 2 C H 3 ドメインに連結されたポリペプチドリンカーを含むドメイン I I I C を含み ;

ここで :

( A ) ( 1 ) 上記任意に存在するドメイン I B 及び上記任意に存在するドメイン I I B のうちの少なくとも一方が存在し、存在する上記ドメイン I B 若しくは I I B は、正若しくは負の電荷を有し ; 又は

( 2 ) 上記任意に存在するドメイン I B 及び上記任意に存在するドメイン I I B の両方が存在し :

( i ) 上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちの一方は、正の電荷を有するヘテロ二量体促進ドメインを有し、上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちのもう一方は、負の電荷を有するヘテロ二量体促進ドメインを有し ; 又は

( i i ) 上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちの一方は、アミノ酸配列 GVEPKSC ( 配列番号 6 ) 若しくは VEPKSC ( 配列番号 7 ) を含むヘテロ二量体促進ドメインを有し、上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B のうちのもう一方は、アミノ酸配列 GFNRGEC ( 配列番号 8 ) 若しくは FNRGEC ( 配列番号 9 ) を含むヘテロ二量体促進ドメインを有し ;

( B ) 上記 V L<sub>B7-H3</sub> 及び上記 V H<sub>B7-H3</sub> は相互作用して、B 7 H 3 のエピトープに結合できるエピトープ結合ドメインを形成し、上記 V L<sub>CD3</sub> 及び上記 V H<sub>CD3</sub> は、C D 3 のエピトープに結合できるエピトープ結合ドメインを形成し ; 並びに

( C ) 上記第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の上記 C H 2 C H 3 ドメインは、F c 受容体に結合できる F c ドメインを形成する、B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

#### 【 0 1 6 6 】

実施形態 2 :

ヒト及び霊長類両方の B 7 H 3 及び C D 3 と交差反応できる、実施形態 1 に記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの実施形態に関する。

#### 【 0 1 6 7 】

実施形態 3 :

( A ) ( 1 ) 上記ドメイン I B 及び上記ドメイン I I B はそれぞれ、ジスルフィド結合によって上記第 1 のポリペプチド鎖を上記第 2 のポリペプチド鎖と共有結合させるシステイン残基を含み ; かつ

( 2 ) 上記ドメイン I C 及び上記ドメイン I I I C はそれぞれ、ジスルフィド結合によって上記第 1 のポリペプチド鎖を上記第 3 のポリペプチド鎖と共有結合させるシステイン残基を含むか ; 又は

( B ) ( 1 ) 上記ドメイン I A 2 と上記ドメイン I B とを隔てる上記ポリペプチドリンカー、及び上記ドメイン I I A 2 と上記ドメイン I I B とを隔てる上記ポリペプチドリンカーはそれぞれ、ジスルフィド結合によって上記第 1 のポリペプチド鎖を上記第 2 のポリペプチド鎖と共有結合させるシステイン残基を含み ; かつ

( 2 ) 上記ドメイン I C 及び上記ドメイン I I I C はそれぞれ、ジスルフィド結合によって上記第 1 のポリペプチド鎖を上記第 3 のポリペプチド鎖と共有結合させるシステイン残基を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

#### 【 0 1 6 8 】

実施形態 4 :

(A) 上記 V L<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 17 のアミノ酸配列を有し、上記 V H<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 21 のアミノ酸配列を有するか；又は

(B) 上記 V L<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 25 のアミノ酸配列を有し、上記 V H<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 29 のアミノ酸配列を有するか；又は

(C) 上記 V L<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 33 のアミノ酸配列を有し、上記 V H<sub>B7-H3</sub> は、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

【0169】

実施形態 5：

上記 V L<sub>CD3</sub> は、配列番号 41 のアミノ酸配列を有し、上記 V H<sub>CD3</sub> は、配列番号 45 又は 50 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～4 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

10

【0170】

実施形態 6：

(A) 上記ドメイン I C の上記 C H2 C H3 ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I I C の上記 C H2 C H3 ドメインは、配列番号 16 のアミノ酸配列を有するか；又は

(B) 上記ドメイン I C の上記 C H2 C H3 ドメインは、配列番号 16 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I I C の上記 C H2 C H3 ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～5 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

20

【0171】

実施形態 7：

(A) 上記サブドメイン I A 1 と上記サブドメイン I A 2 とを隔てる上記ポリペプチドリンカーは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有し；及び / 又は

(B) 上記サブドメイン I I A 1 と上記サブドメイン I I A 2 とを隔てる上記ポリペプチドリンカーは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

【0172】

実施形態 8：

(A) 上記ドメイン I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 10 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 11 のアミノ酸配列を有するか；又は

(B) 上記ドメイン I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 11 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 10 のアミノ酸配列を有するか；又は

(C) 上記ドメイン I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸配列を有するか；又は

(D) 上記ドメイン I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸配列を有し、上記ドメイン I I B の上記ヘテロ二量体促進ドメインは、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～7 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

30

40

【0173】

実施形態 9：

(A) 上記ドメイン I B と上記ドメイン I A とを隔てる上記ポリペプチドリンカーは、配列番号 2 若しくは配列番号 3 のアミノ酸配列を有し；及び / 又は

(B) 上記サブドメイン I I B と上記サブドメイン I I A とを隔てる上記ポリペプチドリンカーは、配列番号 2 若しくは配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1～8 のいずれか 1 つに記載の B7 H3 × C D3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

50

## 【 0 1 7 4 】

## 実施形態 1 0 :

上記ドメイン I C は更に、上記 C H 2 C H 3 ドメインを上記ドメイン I B から隔てるポリペプチドリンカーを含み、

上記ドメイン I I I C は更に、上記 C H 2 C H 3 ドメインに対する N 末端であるポリペプチドリンカーを含む、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

## 【 0 1 7 5 】

## 実施形態 1 1 :

上記ドメイン I C と上記ドメイン I I C との間の上記ポリペプチドリンカーは、配列番号 4 又は 5 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 0 に記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

10

## 【 0 1 7 6 】

## 実施形態 1 2 :

( A ) 上記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を有し、上記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を有し、上記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有するか；又は

( B ) 上記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を有し、上記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有し、上記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列をするか；又は

20

( C ) 上記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を有し、上記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 2 のアミノ酸配列を有し、上記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有するか；又は

( D ) 上記第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有し、上記第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 6 4 のアミノ酸配列を有し、上記第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する、実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つに記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

## 【 0 1 7 7 】

## 実施形態 1 3

A 4 9 8 ( 腎臓癌 )、J I M T 1 / L u c ( 乳癌 )、A 3 7 5 ( 黒色腫 )；2 2 R v 1 ( 前立腺癌 )、D e t r o i t 5 6 2 ( 咽頭癌 )、D U 1 4 5 ( 前立腺癌 )；B x P C 3 ( 膵臓癌 )、S K M E S 1 ( 肺癌 ) 及び U 8 7 ( 神経膠芽細胞腫 ) からなる群から選択された標的ヒト腫瘍細胞を採用し、またエフェクタ細胞として精製ヒト一次 T 細胞を、1 : 1、5 : 1 又は 1 0 : 1 のエフェクタ細胞 : T 細胞比で用いるアッセイにおいて、ヒト T 細胞を用いて、標的腫瘍細胞の標的転換殺滅を仲介でき、

30

ここで、上記標的転換殺滅の、観察された E C 5 0 は、約 1 . 5  $\mu$  g / m L 以下、約 1 . 0  $\mu$  g / m L 以下、約 5 0 0 n g / m L 以下、約 3 0 0 n g / m L 以下、約 2 0 0 n g / m L 以下、約 1 0 0 n g / m L 以下、約 5 0 n g / m L 以下である、実施形態 1 ~ 1 2 に記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

## 【 0 1 7 8 】

40

## 実施形態 1 4

標的腫瘍細胞の殺滅は、細胞死の際に細胞から放出された L D H の酵素活性を定量的に測定する乳酸デヒドロゲナーゼ ( L D H ) 放出アッセイを用いて、又はルシフェラーゼ相対光単位 ( R L U ) が、R a j i / G F 標的細胞 ( これは、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) 及びルシフェラーゼレポータ遺伝子の両方を発現するように操作されている ) の相対生存率を示す読み取り値となる、ルシフェラーゼアッセイによって、測定される、実施形態 1 3 に記載の B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ。

## 【 0 1 7 9 】

## 実施形態 1 5

共混合異種移植片中でのヒト腫瘍の成長の阻害を仲介でき、

50

上記共混合異種移植片では、上記分子を、22Rv1（ヒト前立腺癌）又はA498（ヒト腎臓癌）腫瘍細胞及び活性化ヒトT細胞（5：1の比）と共に、NOD/SCIDマウスに導入する、実施形態1～14のいずれか1つに記載のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ。

#### 【0180】

##### 実施形態16

（A）1日目に腹腔内（IP）注射によってヒトPBMC（ $1 \times 10^7$ ）を、及び0日目に皮内（ID）にDetroit（ヒト咽頭癌腫瘍細胞（ $5 \times 10^6$ ））を埋入され、20、22、23、26、28、30、33、35及び37日目にダイアボディを投与される；又は

（B）0日目に皮内（ID）にA498（ヒト腎臓癌腫瘍細胞（ $5 \times 10^6$ ））を、及び13日目に腹腔内（IP）注射によってヒトPBMC（ $1 \times 10^7$ ）を埋入され、33、35、36、39、41、43、46、48及び50日目にダイアボディを投与される、メスのNSG B2m / マウスにおいて、ヒト腫瘍成長の阻害の仲介、及び／又は異種移植片モデルにおける抗腫瘍活性の呈示が可能である、実施形態1～15のいずれか1つに記載のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ。

#### 【0181】

##### 実施形態17

上記B7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、約0.5mg/kg超の濃度、約0.5mg/kgの濃度、約0.2mg/kgの濃度、約0.1mg/kgの濃度、約0.05mg/kgの濃度、約0.02mg/kgの濃度、約0.01mg/kgの濃度、若しくは約0.005mg/kgの濃度、又は約0.005mg/kg未満の濃度で提供した場合に、上述の異種移植片モデルにおいて腫瘍成長を阻害する、実施形態15又は16に記載のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ。

#### 【0182】

##### 実施形態18

医薬品としての使用のための、実施形態1～17のいずれか1つに記載のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ。

#### 【0183】

##### 実施形態19

実施形態1～17のいずれか1つに記載のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

#### 【0184】

##### 実施形態20

B7 H3の発現に関連する又はB7 H3の発現を特徴とする疾患又は状態の治療における、実施形態19に記載の医薬組成物の使用。

#### 【0185】

##### 実施形態21

上記B7 H3の発現に関連する又はB7 H3の発現を特徴とする上記疾患又は状態は、癌である、実施形態20に記載の使用。

#### 【0186】

##### 実施形態22

上記癌は：急性骨髄性白血病；副腎腫瘍；AIDS関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；胃癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；脾臓細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病；脂肪腫／良性脂肪腫；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌；髓芽腫；黒色

10

20

30

40

50

腫；髄膜腫；多発性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；希少な血液学的障害；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移癌；並びに子宮癌の細胞からなる群から選択される癌細胞の存在を特徴とする、実施形態 2 1 に記載の使用。

#### 【0187】

実施形態 2 3：

上記癌は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠芽細胞腫、腎臓癌、肺癌、黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、膵臓癌、咽頭癌、前立腺癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、及び頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN）からなる群から選択される、実施形態 2 2 に記載の使用。

10

#### 【0188】

実施形態 2 4：

上記 B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、2 週間に 1 回（即ち 1 週おきに）被験者に投与される、実施形態 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

#### 【0189】

実施形態 2 5：

上記 B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、ベースラインの被験者の体重の  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  又は  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  の投薬量で投与される、実施形態 2 4 に記載の使用。

20

#### 【0190】

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施例を参照することにより、本発明は更に容易に理解されるだろう。これらの実施例は例示として提供されており、そうでないことが明記されていない限り本発明を制限することを意図したものではない。

#### 【実施例】

#### 【0191】

以下の実施例は、本発明の診断又は治療方法の構成に関する様々な方法を例示する。これらの実施例は、本発明の範囲を例示することを意図したものであり、限定を意図するものではない。

30

#### 【0192】

実施例 1 結合親和性

複数の例示的な B 7 H 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ（DART A、DART B 及び DART C）の、ヒト又はカニクイザル B 7 H 3 に対する結合親和性を、B I A C O R E（商標）分析によって評価した。B I A C O R E（商標）分析は、解離オフレート  $k_d$  を測定する。抗体とその標的との間の結合親和性（KD）は、式  $KD = [k_d] / [k_a]$  に従った、会合（オンレート、 $k_a$ ）及び解離（オフレート、 $k_d$ ）に関する動力学定数の関数である。B I A C O R E（商標）分析は、表面プラズモン共鳴を用いて、これらの動力学パラメータを直接測定する。

40

#### 【0193】

表面プラズモン共鳴（SPR）技術（B I A c o r e）によって分析された、ヒト及びカニクイザル B 7 H 3 に対する DART A、DART B 及び DART C の結合の結果を、表 2 に示す。

#### 【0194】

【表 2】

表 2				
DART	抗原	ka (± SD) (M-1s-1)	kd (± SD) (s-1)	KD (± SD) (nM)
DART-A	ヒト B7-H3	$2.3 \times 10^5$	$5.6 \times 10^{-3}$	24.6
DART-A	カニクイザル B7-H3	$1.7 \times 10^5$	$5.1 \times 10^{-3}$	30.2
DART-B	ヒト B7-H3	$2.4 \times 10^6$	$7.6 \times 10^{-3}$	3.2
DART-B	カニクイザル B7-H3	$21.5 \times 10^6$	$13.3 \times 10^{-3}$	8.9
DART-C	ヒト B7-H3	$4.6 \times 10^6$	$7.2 \times 10^{-3}$	1.6
DART-C	カニクイザル B7-H3	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - B I A c o r e 分析が実施されていない

## 【0195】

DART A の結合親和性は、ヒト及びカニクイザル B7 H3 に関して同様である（それぞれ  $KD = 24.6 \text{ nM}$  及び  $30.2 \text{ nM}$ ）。DART B の、B7 H3 に関する結合親和性は、カニクイザル B7 H3 に関する親和性の 3 倍以内である（それぞれ  $KD = 3.2 \text{ nM}$  及び  $8.9 \text{ nM}$ ）。しかしながら DART B は、DART A に比べておよそ 8 倍高い、ヒト B7 H3 に対する親和性を有する（それぞれ  $KD = 3.2 \text{ nM}$  及び  $24.6 \text{ nM}$ ）。同様に、DART C は、DART A に比べておよそ 15 倍高い、ヒト B7 H3 に対する親和性を有する。DART D は、DART C と同一の B7 H3 結合ドメインを含み、B7 H3 に関する同一の結合親和性を有すると予想される。他の研究において、DART C 及び DART D の B7 H3 結合ドメインは、カニクイザル B7 H3 に結合することが示された。ヒト及びカニクイザル CD3 に関する結合親和性（KD）は、略同一（ $\sim 14 \text{ nM}$ ）である。ヒト及びカニクイザル B7 H3 に関する結合親和性が同様であることから、カニクイザルは、毒物学的評価に関して適切な種である。

## 【0196】

## 実施例 2 腫瘍細胞株上での B7 H3 発現の FACS 分析

例示的な B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディの生物活性を評価するために好適な標的細胞株を同定するために、異なるヒト組織腫瘍タイプに由来する複数の腫瘍細胞株のパネルに亘って、B7 H3 発現を評価した。図 3 は、様々な癌細胞株上で検出された抗 B7 H3 PE 抗体結合の FACS ヒストグラムを示す。9 個の細胞株が B7 H3 発現に関して陽性であると確認され、また抗 B7 H3 PE 抗体結合の蛍光強度に基づく、B7 H3 発現レベルの範囲を示す。最高の B7 H3 発現を伴う細胞株は：A498（腎臓癌）（図 3 A）、JIMT 1 / Luc（乳癌）（図 3 B）及び A375（黒色腫）（図 3 C）であり；中程度の B7 H3 発現は：22Rv1（前立腺癌）（図 3 D）、Detroit 562（咽頭癌）（図 3 E）及び DU145（前立腺癌）（図 3 F）であり；低 B7 H3 発現は：BxPC3（膵臓癌）（図 1 G）、SKMES 1（肺癌）（図 3 H）及び U87（神経膠芽細胞腫）（図 3 I）であった。B7 H3 発現に関して陰性であることが知られている B リンパ腫細胞株である Raji 細胞は、使用した抗 B7 H3 PE 抗体によっていずれの蛍光も示さなかった（図 3 J）。評価された細胞株のパネルにおける B7 H3 発現の範囲は、様々なレベルの標的密度を有しかつ異なるヒト組織に由来する複数の腫瘍細胞株に対する B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ（例えば DART A）の生物活性を特性決定するための基礎を提供する。

## 【0197】

## 実施例 3 B7 H3 陽性癌細胞株及び CD3 発現 T 細胞に対する結合

例示的な B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディを、二重特異性結合性能に関して検査した。4 つの B7 H3 発現腫瘍細胞株 (A948、JIMT 1 / Luc、Detroit 562 及び 22Rv1) 並びにヒト一次 T 細胞を、FACS 分析によって、DART A 細胞表面結合に関して評価した。DART A は CD3 と結合するため、T 細胞に関するマーカーとして CD3 を使用する代わりに、CD4 及び CD8 を、T 細胞マーカーとして使用した。従ってこの研究では、一次ヒト白血球を使用した場合、複合 CD4 + プラス CD8 + ゲートイベントは、T 細胞集団を表す。

#### 【0198】

DART A の 10 µg / mL を用いたインキュベーション後、癌細胞株及び T 細胞上の細胞結合済み DART A を、DART A タンパク質の E コイル / K コイル (EK) ヘテロ二量体促進ドメインを認識する、抗 EK コイル抗体を用いて検出した。DART A は、ヒト B7 H3 発現腫瘍細胞 (図 4A ~ 4D) 及び CD3 発現 T 細胞 (図 4E) の両方に対する結合を示した。同様の研究において、DART B、DART C 及び DART D もまた、二重特異性結合能力を有することが分かった。

#### 【0199】

実施例 4 エフェクタ細胞として精製ヒト T 細胞を用いた、複数の標的癌細胞株に対する CTL 活性

CD3 発現 T 細胞及び B7 H3 発現腫瘍細胞両方に対する結合の確認後 (実施例 3 参照)、B7 H3 発現標的細胞の、B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ仲介標的転換 T 細胞殺滅を、標的細胞としての 9 個のヒト腫瘍細胞株 (A498、JIMT 1 / Luc、A375、U87、DU145、BxPC 3、SKMES 1、Detroit 562 及び 22Rv1) 並びにエフェクタ細胞としての正常ヒト T 細胞を使用して、インビトロで評価した。細胞毒性は、細胞死の際に細胞から放出される安定した細胞質ゾル酵素である LDH の酵素活性を定量的に測定する LDH 放出アッセイを用いて決定した。LDH アッセイは、標的及びエフェクタ細胞両方を内包するウェルからの上清における LDH 活性を測定するため、エフェクタ細胞の死による干渉の可能性がある。従って、LDH 放出アッセイで測定される細胞毒性が、標的細胞の B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ仲介標的細胞殺滅に対して特異的であることを確認するために、細胞毒性を、ルミネッセンス (LUM) アッセイも用いて評価した。このアッセイフォーマットでは、ルシフェラーゼ遺伝子を安定して発現するようトランスフェクト及び選択された標的細胞 (JIMT 1 / Luc 細胞) のルシフェラーゼ活性を測定し、これを用いて、アッセイの終了時に残っている生存標的細胞を計数する。これらの研究では、FITC x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ (「対照 DART」と呼ばれる) を対照タンパク質として使用した。FITC x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディは、抗 CD3 結合成分が B7 H3 x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ中のものと同一である、抗フルオレセイン (FITC) x 抗 CD3 ダイアボディタンパク質であるが、抗 FITC 成分は無関係の結合標的を示す。従って、FITC x CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディは T 細胞上の CD3 に係合するものの、標的細胞との係合は予想されない。GraphPad Prism 6 ソフトウェアを用いて、3 パラメータシグモイド用量 応答関数に対してデータを曲線フィッティングさせることにより、EC50 値を決定した。

#### 【0200】

DART A は、ヒト T 細胞をエフェクタ細胞として用いて (E : T 細胞比 = 5 : 1) を用いて、強力かつ特異的な、B7 H3 発現標的細胞の標的転換殺滅を仲介した。代表的なドナーの T 細胞を用いた、標的細胞の DART A 用量依存性殺滅を、図 5A ~ 5J に示し、また EC50 値及び最大 % 細胞毒性 (Emax) を表 3 に示す。47 ~ 1275 ng / mL の DART A EC50 濃度が、評価された 9 個の標的細胞株に亘って観察され、JIMT 1 / Luc が最も感受性の高い細胞株であった (EC50 = 47 ng / mL)。生存している JIMT 1 / Luc 標的細胞を特異的に測定する LUM アッセイを用いて、ほとんど完全な腫瘍細胞殺滅が観察された (図 5C を参照)。DART A 活性は B7 H3 発現と概ね相関していた。というのは、より高い B7 H3 発現を伴う標

10

20

30

40

50

的細胞株に関して、より低いEC<sub>50</sub>値が観察されたためである。評価した最高の濃度（10,000 ng/mL）では、対照DARTを用いた場合、活性は最小限しか又は全く観察されなかった。B7-H3陰性CHO細胞（図5K）又はRaji細胞（図5L）では、DART-Aの存在下において細胞毒性は観察されず、これにより、B7-H3発現標的細胞に対するDART-A活性の特異性が確認された。

【0201】

【表3】

表3 E:T細胞比 5:1における標的細胞株の標的転換殺滅に関する、 代表的な E <sub>max</sub> 及び DART-A の EC <sub>50</sub> 濃度				
標的細胞株	腫瘍タイプ	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (ng/mL)	B7-H3 発現
JIMT-1/Luc	乳癌	78	47	高
A498	腎臓癌	80	64	高
DU145	前立腺癌	57	84	中
A375	黒色腫	49	97	高
U87	神経膠芽細胞腫	79	99	低
BxPC-3	膵臓癌	54	196	低
22Rv1	前立腺癌	34	212	中
SKMES-1	肺癌	73	319	低
Detroit562	咽頭癌	31	1275	中
Raji	Bリンパ腫	活性なし		陰性
CHO	正常なチャイニーズ ハムスター卵巣	活性なし		陰性

10

20

30

【0202】

A498及びJIMT-1を含む多数の異なる標的細胞株を用いて、DART-C及びDART-Dによって実施された同様の研究は、これら2つの分子が同様の最大溶解レベル（E<sub>max</sub>）を有するものの、標的転換細胞殺滅の仲介においてDART-Aより平均20倍強力であることを実証した。DART-Bもまた、A498、THP-1、及びDU145を含む多数の異なる標的細胞株を用いて試験され、DART-Aより平均6倍強力であった。

【0203】

実施例5 異なる複数のエフェクタ細胞：標的細胞（E：T）比におけるDART-AのCTL活性

40

E：T細胞比と、B7-H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ仲介標的転換殺滅との関係を実証するために、A498（図6A、6C及び6E）並びにA375（図6B、6D及び6F）標的細胞、並びにエフェクタ細胞としての精製ヒトT細胞を用いたLDHアッセイで、10：1（図6A及び6B）、5：1（図6C及び6D）、並びに1：1（図6E及び6F）のE：T細胞比において、DART-AのCTL活性を更に評価した。DART-Aは、E：T細胞比10：1（図6A及び6B）において、最高の強度（EC<sub>50</sub>）及び最大%細胞毒性（E<sub>max</sub>）を示し、この強度及び最大細胞毒性は、E：T細胞比の低下と共に低下した（図6A～6F及び表4）。しかしながら、評価した最低のE：T細胞比（1：1）においてさえ、より低い程度ではあるものの、特異的活性が観察された（図6E及び6F並びに表4）。

50



【表 4】

表 4 異なる複数の E:T 細胞比における標的細胞株の標的転換殺滅に関する、 $E_{\max}$ 及び DART-A の $EC_{50}$ 濃度						
標的細胞株	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 1:1	
	$E_{\max}$ (%)	$EC_{50}$ (ng/mL)	$E_{\max}$ (%)	$EC_{50}$ (ng/mL)	$E_{\max}$ (%)	$EC_{50}$ (ng/mL)
A498	83.91	27.2	73.56	42.51	36.3	128.5
A375	41.5	165.6	38.1	242.7	11.01	352.5

10

## 【0204】

実施例 6 B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ 仲介 T 細胞活性化は、標的細胞係合に依存する

B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディによって誘発される T 細胞活性化のレベルを、ヒト T 細胞単独で、又は E:T 細胞比 10:1 での B7 H3 発現標的細胞 (A498) の存在下で、評価した。DART A を用いたこれらの研究の結果を図 7 に示す。フローサイトメトリー分析は、B7 H3 発現標的細胞 (図 7 B ~ 7 D) の存在下での DART A による、CD4+ (図 7 B 及び 7 D) 並びに CD8+ (図 7 C 及び 7 E) T 細胞サブセットにおける CD25 (図 7 B 及び 7 C) 並びに CD69 (図 7 D 及び 7 E)、T 細胞活性化マーカーの用量依存性上方制御が明らかになった。DART A 仲介 T 細胞活性化は、標的細胞の細胞毒性に相関していた (図 7 A)。

20

## 【0205】

DART A 又は対照 DART を用いて評価された全ての濃度において、T 細胞の活性化は、B7 H3 発現標的細胞の不在下の T 細胞単独では観察されなかった (図 7 B ~ 7 E)。これらのデータは、DART A 等の B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディによって仲介される T 細胞活性化が、エフェクタ細胞 標的細胞の共係合に依存することを示唆している。更に、CTL アッセイにおいて、T 細胞を単独で、DART A (図 7 B ~ 7 E) 又は対照 DART を用いてインキュベートした場合、細胞毒性は観察されなかった。対照的に、標的細胞の存在下では有意な DART A 仲介細胞毒性が観察された (図 7 A)。DART B、DART C 又は DART D を用いて実施された同様の研究でも、同等の結果が見られた。

30

## 【0206】

実施例 7 標的細胞の共係合時の、B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ 仲介 T 細胞増殖

二重特異性抗体によって誘発される CTL 活性に関連する T 細胞の膨張が、過去に報告されている (Klinger M et al. (2012) "Immunopharmacologic Response Of Patients With B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia To Continuous Infusion Of T Cell-Engaging CD19/CD3-Bispecific BiTE Antibody Blinatumomab," Blood 119(26):6226-6233)。従って、B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディを用いた治療によって、T 細胞活性化マーカーの増大を伴う標的細胞の用量依存性欠失がもたらされるのが観察された後、標的細胞及び B7 H3 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディと共に培養した T 細胞の膨張を評価した。これを実施するために、ヒト PBMC を CFSE で標識し、濃度 10 µg/mL の DART A 又は対照 DART の存在下で、72 又は 96 時間に亘って、E:T 細胞比 10:1 の A498 標的細胞と共に共培養した。細胞分裂のたびに、娘細胞に含有される染料のレベルは半減するため、CFSE 標識 T 細胞の増殖を、FACS 分析によって CFSE のレベルを経時的に測定することにより、監視した。図 8 A (72 時間) 及び図 8 B (96 時間) は、DART A 又は対照 DART 及び標的細胞の存在下での共培養の開始後のインキュベーションに続く、CFSE 染色プロファイルを示す。DA

40

50

R T Aの存在は、72時間(図8A)のインキュベーション後に約45%、96時間(図8B)のインキュベーション後に73%の増殖パーセンテージでの、CFSE標識T細胞の増殖をもたらした。対照的に、CFSE標識T細胞の増殖は、対照DARTの存在下では観察されなかった(図8A及び8B)。

#### 【0207】

実施例8 ヒト及びカニクイザルB7 H3発現CHO細胞に対する結合及び標的転換殺滅の特性決定

カニクイザルB7 H3と交差反応するDART Aの能力を確認するために、ヒトB7 H3(huB7 H3 CHO)(図9A)又はカニクイザルB7 H3(cynoB7 H3 CHO)(図9B)でトランスフェクトされたCHO細胞に対する、DART Aの結合を、フローサイトメトリーで評価した。細胞を、10 µg/mLから開始して濃度を5倍低下させたDART A又は対照DARTタンパク質で処置し、細胞結合済みのDART Aを、抗EKコイル抗体を用いて検出した。図9A及び9Bはそれぞれ、ヒトB7 H3発現及びカニクイザルB7 H3発現CHO細胞両方に対する、DART Aの濃度依存性結合を示す。

#### 【0208】

ヒトB7 H3又はカニクイザルB7 H3を発現するCHO細胞を用いて、B7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ仲介標的転換殺滅を評価するために、E:T細胞比5:1でのヒトT細胞の存在下で、DART Aの濃度を変化させながら細胞をインキュベートした。図9C及び9Dに示すように、カニクイザル(図9C)及びヒト(図9D)B7 H3発現CHO細胞の両方に関して、効率的なDART A仲介殺滅が観察された。

#### 【0209】

実施例9 エフェクタ細胞としてカニクイザルPBMCを用いた、標的細胞のB7 H3×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ仲介標的転換殺滅

カニクイザルT細胞に対するDART Aの結合を、フローサイトメトリーで評価した。ここでDART Aの結合は、ゲートCD4+及びCD8+T細胞集団においてプロファイリングした。カニクイザルT細胞(図10A)に対するDART Aの結合は、ヒトT細胞(図10B)と同様であった。

#### 【0210】

DART Aの、カニクイザルT細胞との交差反応性を確認した後、DART A仲介エキスピボCTL活性を、カニクイザルPBMCを用いて評価した。B7 H3発現標的細胞(JIMT 1/Luc(図11A及び11B)又はA498(図11C))とE:T細胞比30:1で混合し、24時間インキュベートしたカニクイザルPBMCに、DART A又は対照DARTを添加した。図11A~11Cに示すように、ヒトB7 H3発現標的細胞株に対するエフェクタ細胞としてカニクイザルPBMCを用いて、用量依存性DART A 仲介エキスピボ細胞毒性を観察した。

#### 【0211】

実施例10 22Rv1ヒト前立腺癌の共混合異種移植片モデル

RosetteSep T細胞単離キット(STEMCELL Technologies(カナダ、バンクーバー))で提供されている製造元のプロトコルに従って、ヘパリン化された全血からヒトT細胞を単離した。続いて、精製されたT細胞を、抗CD3(OKT 3; 1 µg/mL)及び抗CD28(66 µg/mL)抗体又は抗CD3/CD28 Dynabeads(1:1の比)に対して48時間曝露することにより、活性化した。この刺激後、細胞を、IL2(7.6 ng/mL)の存在下で、10%のFBS及び1%のペニシリン/ストربتアビジンを含むRPMI 1640培地中で、最大3週間成長させた。

#### 【0212】

ヒトT細胞( $1 \times 10^6$ )と22Rv1腫瘍細胞( $5 \times 10^6$ )とを組み合わせ、200 µLのHam's F12培地中に再懸濁させた後、0日目に皮下(SC)注入した。2

10

20

30

40

50

2 R v 1 腫瘍細胞及び T 細胞の埋入後、マウスを、ビヒクル対照 ( )、対照 D A R T ( 0 . 5 m g / k g ) ( )、又は 4 つの異なる用量レベル ( 0 . 0 0 4 ( )、0 . 0 2 ( 黒の )、0 . 1 ( 黒の ) 若しくは 0 . 5 ( ) m g / k g ) の D A R T A で、腫瘍細胞埋入の日から開始して 4 日間 ( 0、1、2 及び 3 日目)、1 日 1 回 I V 処置した。

#### 【 0 2 1 3 】

図 1 2 に示すように、2 2 R v 1 腫瘍細胞の成長は、用量レベル 0 . 1 ( 黒の ) 又は 0 . 5 ( ) m g / k g での 0 ~ 3 日目の 1 日 1 回の D A R T A による I V 処置の後、遅延及び阻害された。0 . 0 2 m g / k g ( 黒の ) の D A R T A 用量レベルでは、腫瘍成長の部分的阻害があったが、有意な程度には届かなかった。0 . 0 0 4 m g / k g ( ) の D A R T A 用量レベルでは、腫瘍成長の阻害は認められなかった。

10

#### 【 0 2 1 4 】

##### 実施例 1 1 A 4 9 8 ヒト前立腺癌の共混合異種移植片モデル

上述のようにして、ヒト T 細胞を単離及び調製した。ヒト T 細胞 (  $1 \times 10^6$  ) と A 4 9 8 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  ) とを組み合わせ、2 0 0  $\mu$  L の H a m ' s F 1 2 培地中に再懸濁させた後、0 日目に S C 注入した。A 4 9 8 腫瘍細胞及び T 細胞の埋入後、マウスを、ビヒクル対照 ( )、対照 D A R T ( 0 . 5 m g / k g ) ( )、又は 4 つの異なる用量レベル ( 0 . 0 0 4 ( )、0 . 0 2 ( 黒の )、0 . 1 ( 黒の ) 若しくは 0 . 5 ( ) m g / k g ) の D A R T A で、腫瘍細胞埋入の日から開始して 4 日間 ( 0、1、2 及び 3 日目)、1 日 1 回 I V 処置した。

20

#### 【 0 2 1 5 】

図 1 3 に示すように、0 日目に活性化されたヒト T 細胞の存在下で注入された A 4 9 8 腫瘍細胞は、対照動物においてさえも、インビボ環境に対する腫瘍の適合の結果である、ある程度の初期腫瘍収縮を示した。しかしながら、ビヒクル対照 ( ) 及び対照 D A R T ( ) を受けた動物、並びに 0 . 0 0 4 ( ) 又は 0 . 0 2 ( 黒の ) m g / k g の D A R T A で 0、1、2 及び 3 日目に 1 日 1 回処置した動物においては、後の時点で活発な腫瘍成長が認められ、対照動物と比較して腫瘍成長の阻害はなかった。用量レベル 0 . 1 ( 黒の ) 又は 0 . 5 ( ) m g / k g の D A R T A での I V 処置後、腫瘍成長は遅延及び阻害された。

#### 【 0 2 1 6 】

実施例 1 2 ヒト P B M C 再構成マウスにおける、確立された A 4 9 8 ヒト腎臓癌モデル

30

N S G B 2 m / マウスにおける確立された腫瘍異種移植片に対する D A R T A の活性を評価するために、ヒトエフェクタ細胞再構成モデルを採用した。このモデルはまた、抗腫瘍活性が、D A R T A による、上記確立された腫瘍に対する、移植されるヒト T 細胞の動員に左右される環境を提供する。

#### 【 0 2 1 7 】

メスの N S G B 2 m / マウス ( J a c k s o n L a b o r a t o r y ) を、確立された腫瘍に関する研究に使用した (  $n = 7 \sim 8$  / 群 )。ヒト末梢血単核細胞 ( P B M C ) の移植に関連する移植片対宿主病 ( G V H D ) の発生を遅延するため、及び重篤度を最小化するために、M H C クラス I の発現が弱い 2 ミクログロブリン ( B 2 m ) ノックアウトマウスを採用した。しかしながら、これらのマウスにおける B 2 m 発現の欠如は、F c R n の発現の弱さにも関連することに留意されたい ( I s r a e l , E . J . e t a l . ( 1996 ) "Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn," Immunology 89: 573-578 )。従って、これらのマウスにおける D A R T A の半減期は、野生型マウス又は霊長類に比べて短いと予想された。これらの研究における十分な曝露を保証するために、ヒト F c 領域を含む分子を有するこのマウスの系統における過去の研究に基づき、2 ~ 4 日に 1 回の投薬頻度を採用した。

40

#### 【 0 2 1 8 】

製造元のプロトコルに従って、F i c o l l P a q u e を用いて、ヘパリン化された全血からヒト P B M C を単離した。A 4 9 8 腫瘍細胞 (  $5 \times 10^6$  生存細胞 ) を、1 0 0

50

$\mu\text{L}$ のHam's F12中に再懸濁し、0日目に皮内(ID)注入した後、13日目に、ヒトPBMC ( $1 \times 10^7$ 生存細胞)の腹腔内(IP)注入 ( $200 \mu\text{L}$ 、生理食塩水)を行った。腫瘍細胞の埋入に対するPBMC接種のタイミングは、腫瘍細胞の成長速度に関連しており、ランダム化及び処置開始時点においておよそ  $150 \sim 300 \text{ mm}^3$ の腫瘍サイズの、最適なヒトエフェクタ細胞の再構成が得られるよう、経験的に決定された。処置期間は、ビヒクル対照、対照DART ( $1 \text{ mg/kg}$ )、又は4つの異なる用量レベル ( $0.001$ 、 $0.01$ 、 $0.1$ 若しくは  $1 \text{ mg/kg}$ )のDART Aを含む合計9用量を、33、35、36、39、41、43、46、48及び50日目にIV投与するものであった。

#### 【0219】

A498腫瘍は、治療開始前の32日目に、平均体積およそ  $250 \text{ mm}^3$ に達した(図14)。  $1 \text{ mg/kg}$  ( )のDART Aを受けた群では、腫瘍体積は、32日目の  $242 \pm 19 \text{ mm}^3$ から、39日目の  $106 \pm 35 \text{ mm}^3$ まで退行した。 $0.1 \text{ mg/kg}$  (黒の )のDART Aを受けた群では、腫瘍体積の減少はより小さかった ( $249 \pm 25$ から  $181 \pm 87 \text{ mm}^3$ ) が、 $0.01 \text{ mg/kg}$  (黒の )の群では、同一の間隔 (32日目～39日目)の間に細胞分裂停止期間が存在した。 $1 \text{ mg/kg}$  ( )のDART Aの群では、腫瘍成長は7体中5体の動物において退行を続けたが、残りの2体の動物では、研究の終了(53日目)までに再成長した。研究の終了までに、 $0.1$  (黒の )及び  $0.01$  (黒の )  $\text{mg/kg}$ の群では、腫瘍成長は、それぞれ7体中5体及び7体中4体で退行したままであった。腫瘍成長の進行は、 $0.001$  ( )  $\text{mg/kg}$ のDART Aで処置した全ての動物に関して明らかであった。ビヒクル対照 ( )又は対照DART ( )については、腫瘍の成長に対する影響は認められなかった。

#### 【0220】

ヒトPBMC再構成マウスにおけるA498ヒト腎臓癌モデルを用いて、 $0.02$ 、 $0.1$ 若しくは  $0.5 \text{ mg/kg}$ で投薬されたDART B、対照DART ( $0.5 \text{ mg/kg}$ )、又はビヒクル対照の活性も評価した。DART Bで処置された動物は、全ての用量において腫瘍成長の有意な阻害を示したが、ビヒクル対照又は対照DARTについては、腫瘍の成長に対する影響は認められなかった。

#### 【0221】

実施例13 ヒトPBMC再構成マウスにおける確立されたDetroit562ヒト咽頭癌モデル

上述のようにして、ヒトPBMCを調製した。Detroit562腫瘍細胞 ( $5 \times 10^6$ 生存細胞)を、 $100 \mu\text{L}$ のHam's F12中に再懸濁し、0日目にID注入した。腫瘍細胞埋入の1日前である1日目に、ヒトPBMC ( $1 \times 10^7$ 生存細胞)をIP注入 ( $200 \mu\text{L}$ 、生理食塩水)によってNSG B2m / マウスに埋入した。処置期間は、ビヒクル対照、対照DART ( $0.5 \text{ mg/kg}$ )、又は4つの異なる用量レベル ( $0.1$ 、 $0.25$ 、 $0.5$ 若しくは  $1 \text{ mg/kg}$ )のDART Aを含む合計9用量を、20、22、23、26、28、30、33、35及び37日目にIV投与するものであった。

#### 【0222】

Detroit562腫瘍は、治療開始前の19日目に、およそ  $150 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積に達した(図15)。 $1$  ( )、 $0.5$  (黒の )及び  $0.25$  (黒の )  $\text{mg/kg}$ の用量レベルでDART Aを受けた群の腫瘍は、処置期間中にサイズが減少し、 $0.25$  (黒の )  $\text{mg/kg}$ の群については27日目に最小値 ( $106 \pm 21 \text{ mm}^3$ )に達した(図15)。 $1$  ( )及び  $0.5$  (黒の )  $\text{mg/kg}$ の群に関しては、最大の腫瘍減少は研究の最終日である37日目に観察され、平均腫瘍体積はそれぞれ  $32 \pm 6$ 及び  $47 \pm 7 \text{ mm}^3$ であった(図15)。 $0.1$  ( )  $\text{mg/kg}$ のDART Aの群では、腫瘍成長の低下が観察され、研究の終了時(37日目)において、対照DART ( ) ( $347 \pm 36 \text{ mm}^3$ )及びビヒクル ( $390 \pm 42 \text{ mm}^3$ )群のものと比べて減少した最大腫瘍体積 ( $258 \pm 37 \text{ mm}^3$ )を有していた(図15)。

## 【0223】

実施例14 ヒトPBMC再構成マウス投薬研究における確立されたDetroit 562ヒト咽頭癌モデル

MHC11 / マウスにおける確立された腫瘍異種移植片に対するDART Aの活性を評価するために、ヒトエフェクタ細胞再構成モデルを採用した。このモデルはまた、抗腫瘍活性が、DART Aによる、上記確立された腫瘍に対する、移植されるヒトT細胞の動員に左右される環境を提供する。これらの研究では、週1回及び2週間に1回（即ち1週間おき）の投薬レジメンを検査した。

## 【0224】

上述のようにして、ヒトPBMCを調製した。Detroit 562腫瘍細胞（ $5 \times 10^6$ 生存細胞）を、 $50 \mu\text{L}$ のHam's F12培地中に再懸濁し、 $50 \mu\text{L}$ のMatrigelと組み合わせた後、0日目に皮内（ID）注入した。0日目に、ヒトPBMC（ $1 \times 10^7$ 生存細胞）をIP注入（ $200 \mu\text{L}$ 、Ham's F12培地）によってMHC11 / マウスに埋入した。処置期間は15日目を開始された。群Iのマウスは、週1回（Q1W）、15、22、29、36及び43日目に、DART A（ $0.5 \text{ mg/kg}$ ）を合計5用量IV投与された。群IIのマウスは、2週間に1回（Q2W）、15、29及び43日目に、DART A（ $0.5 \text{ mg/kg}$ ）を合計3用量IV投与された。ビヒクル対照動物は、週1回投薬された。

## 【0225】

処置開始前の14日目には、Detroit 562腫瘍は、 $200.49 \pm 15.58 \text{ mm}^3 \sim 287.5 \pm 48.79 \text{ mm}^3$ であった。群I及びII（黒の）両方のDART A処置済みの動物の腫瘍は、ビヒクル処置済みの動物（）に比べて、処置期間中にサイズが減少した（図16A及び16B）。群IのDART A処置済みの動物では、腫瘍成長の低下が観察され、45日目において、31日目におけるビヒクルで処置した動物のもの（ $801.9 \pm 155.5 \text{ mm}^3$ ）と比べて減少した[最大]腫瘍体積（ $24.3 \pm 9.5 \text{ mm}^3$ ）を有していた（図16A）。群IIのDART A処置済みの動物では、腫瘍成長の低下が観察され、31日目におけるビヒクルで処置した動物のもの（ $801.9 \pm 155.5 \text{ mm}^3$ ）と比べて減少した[最大]腫瘍体積（ $47.6 \pm 28.5 \text{ mm}^3$ ）を有していた（図16B）。

## 【0226】

実施例15 カニクイザルにおける毒物動態学的研究

DART A、DART B、DART C又はDART Dの、3つの非GLPパイロット探査投薬研究を、カニクイザルにおいて実施した。1つの用量増大研究では、2群のカニクイザル（ $n = 2$ /群；オス1体/メス1体）に、 $0.5 \text{ mg/kg}$ のDART A又はDART Bを1回投与した後、 $1.0 \text{ mg/kg}$ を週1回、3週間投与した。いずれの群についても有意な知見は得られなかったが、注入後、IL-6レベルの一時的な上昇が観察された。サイトカインレベルの上昇に関連する明白な臨床的観察結果は存在しなかった。DART A及びDART Bの血清濃度を、研究の経過中に検査した（図17）。図17に示すように、両方の分子は、許容可能な薬物動態プロファイルを示した。DART Aの血清レベルは、研究の経過全体を通して、比較的小さい変動しか示さなかった。

## 【0227】

単一用量研究では、2群のカニクイザル（ $n = 2$ /群；オス1体/メス1体）に、 $0.5 \text{ mg/kg}$ のDART Dを1回投与するか、又は $0.5 \text{ mg/kg}$ の対照DARTを1回投与した後、 $1.0 \text{ mg/kg}$ を週1回、3週間投与した。 $0.5 \text{ mg/kg}$ のDART Dで処置された動物はいずれも、異常な臨床的兆候を示した。更なる研究では、4群のカニクイザル（ $n = 2$ /群；オス1体/メス1体）に、 $0.075$ 、 $0.15$ 若しくは $0.3 \text{ mg/kg}$ のDART Dを週1回、4週間、又は $0.5 \text{ mg/kg}$ のDART Cを週1回、4週間投与した。これらの研究では、全ての用量が耐受性を示した。しかしながら、 $0.15$ 及び $0.3 \text{ mg/kg}$ のDART D、並びに $0.5 \text{ mg/kg}$ のD

A R T Cにおいて、血小板レベルに対する明白な一時的影響が存在した。

【 0 2 2 8 】

本明細書において言及されている全ての公刊物及び特許は、個々の公刊物又は特許出願それぞれの全体が参照により本明細書に援用されていることが具体的かつ独立に指示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用されている。本発明をその具体的実施形態に関して説明したが、更なる修正形態が可能であり、本出願は、本発明が属する分野の公知の方法又は慣例の範囲内であるような、及びこれまでに挙げた必須の特徴に適用できるような、本開示からの逸脱を含む、本発明の原理に概ね従う本発明のいずれの変形、使用又は改変を包含することを意図していることを理解されたい。

【 配列表フリーテキスト 】

10

【 0 2 2 9 】

配列表の数字見出し < 2 2 3 > の記載は以下のとおりである。

配列番号 1 : リンカー 1

配列番号 2 : リンカー 2

配列番号 3 : 代替的なリンカー 2

配列番号 4 : リンカー 3

配列番号 5 : スペースリンカー 3

配列番号 6 ~ 9 : ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 10 : 「 E コイル 」 ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 11 : 「 K コイル 」 ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 12 : システイン含有「 E コイル 」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 13 : システイン含有「 K コイル 」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 14 : ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン

配列番号 15 : 「 ノブ担持 」 ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン

配列番号 16 : 「 ホール担持 」 ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン

配列番号 17 : B 7 H 3 m A b A の軽鎖可変ドメイン

配列番号 18 : B 7 H 3 m A b A の軽鎖 C D R 1

配列番号 19 : B 7 H 3 m A b A の軽鎖 C D R 2

配列番号 20 : B 7 H 3 m A b A の軽鎖 C D R 3

配列番号 21 : B 7 H 3 m A b A の重鎖可変ドメイン

配列番号 22 : B 7 H 3 m A b A の重鎖 C D R 1

配列番号 23 : B 7 H 3 m A b A の重鎖 C D R 2

配列番号 24 : B 7 H 3 m A b A の重鎖 C D R 3

配列番号 25 : B 7 H 3 m A b B の軽鎖可変ドメイン

配列番号 26 : B 7 H 3 m A b B の軽鎖 C D R 1

配列番号 27 : B 7 H 3 m A b B の軽鎖 C D R 2

配列番号 28 : B 7 H 3 m A b B の軽鎖 C D R 3

配列番号 29 : B 7 H 3 m A b B の重鎖可変ドメイン

配列番号 30 : B 7 H 3 m A b B の重鎖 C D R 1

配列番号 31 : B 7 H 3 m A b B の重鎖 C D R 2

配列番号 32 : B 7 H 3 m A b B の重鎖 C D R 3

配列番号 33 : B 7 H 3 m A b C の軽鎖可変ドメイン

配列番号 34 : B 7 H 3 m A b C の軽鎖 C D R 1

配列番号 35 : B 7 H 3 m A b C の軽鎖 C D R 2

配列番号 36 : B 7 H 3 m A b C の軽鎖 C D R 3

配列番号 37 : B 7 H 3 m A b C の重鎖可変ドメイン

配列番号 38 : B 7 H 3 m A b C の重鎖 C D R 1

配列番号 39 : B 7 H 3 m A b C の重鎖 C D R 2

配列番号 40 : B 7 H 3 m A b C の重鎖 C D R 3

配列番号 41 : C D 3 m A b A の軽鎖可変ドメイン

20

30

40

50

配列番号 42 : C D 3	m A b	A の軽鎖 C D R 1	
配列番号 43 : C D 3	m A b	A の軽鎖 C D R 2	
配列番号 44 : C D 3	m A b	A の軽鎖 C D R 3	
配列番号 45 : C D 3	m A b	A の重鎖可変ドメイン	
配列番号 46 : C D 3	m A b	A の重鎖 C D R 1	
配列番号 47 : C D 3	m A b	A の重鎖 C D R 2	
配列番号 48 : C D 3	m A b	A の重鎖 C D R 3	
配列番号 49 : K a b a t 位置 6 5 におけるアスパラギン酸からグリシンへの置換を含む C D 3	m A b	A の重鎖 C D R 3	
配列番号 50 : K a b a t 位置 6 5 におけるアスパラギン酸からグリシンへの置換を含む C D 3	m A b	A の重鎖可変ドメイン	10
配列番号 51 : リンカー 4			
配列番号 52 : 代替的なリンカー 4			
配列番号 53 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖	
配列番号 54 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド	
配列番号 55 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 56 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド	20
配列番号 57 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖	
配列番号 58 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	A ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド	
配列番号 59 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	B ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖	
配列番号 60 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	B ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 61 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	C ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖	30
配列番号 62 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	C ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 63 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	D ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖	
配列番号 64 : B 7	H 3 x C D 3 二重特異性 D A R T	D ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 65 : 抗フルオレセイン抗体 4	4	20 の軽鎖可変ドメイン	
配列番号 66 : 抗フルオレセイン抗体 4	4	20 の重鎖可変ドメイン	
配列番号 67 : 抗フルオレセイン抗体 (対照 D A R T) の第 1 のポリペプチド			40
配列番号 68 : 抗フルオレセイン抗体 (対照 D A R T) の第 2 のポリペプチド			

【図 1】

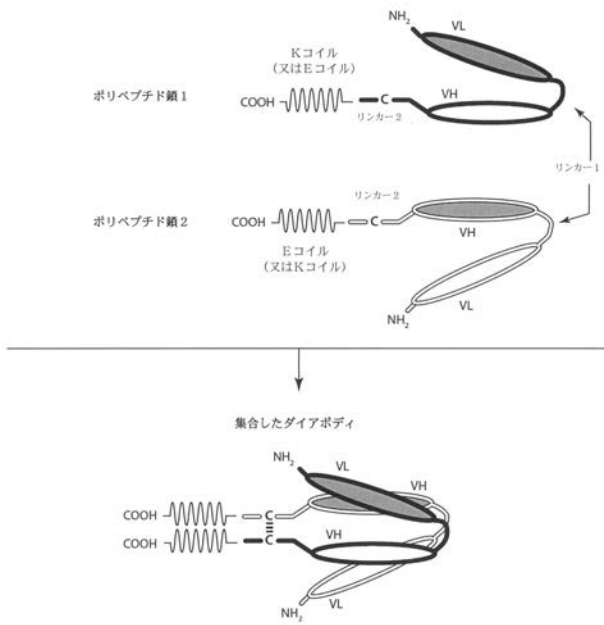


Figure 1

【図 2 A】

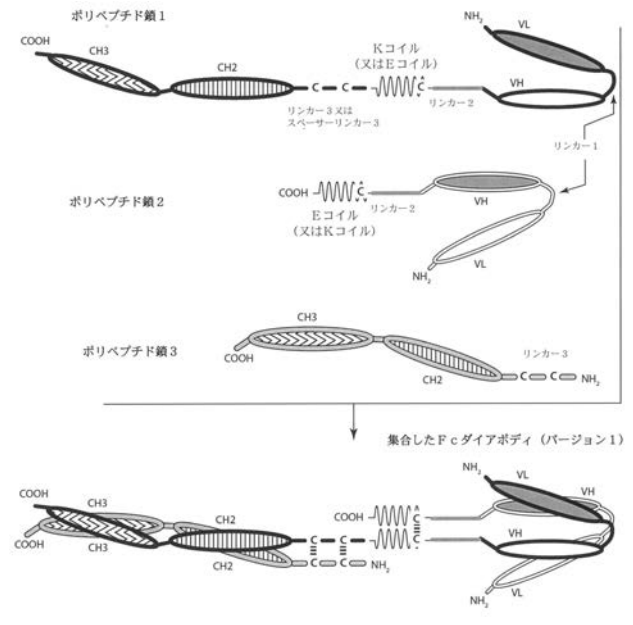


Figure 2A

【図 2 B】

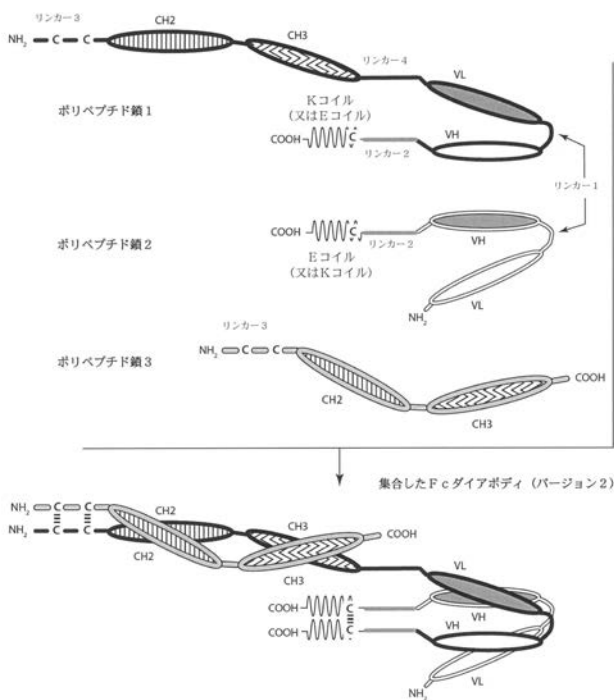


Figure 2B

【図 3 A】

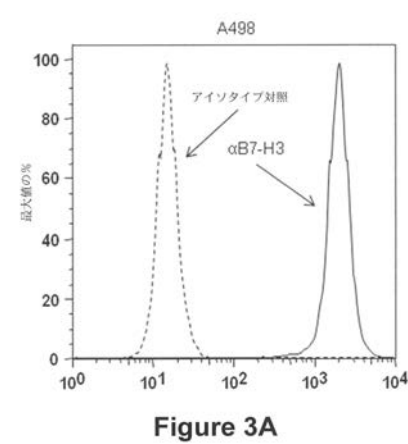


Figure 3A



【図 3 B】

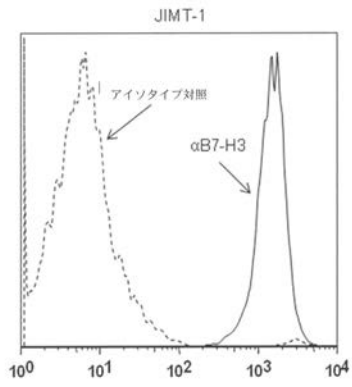


Figure 3B

【図 3 C】

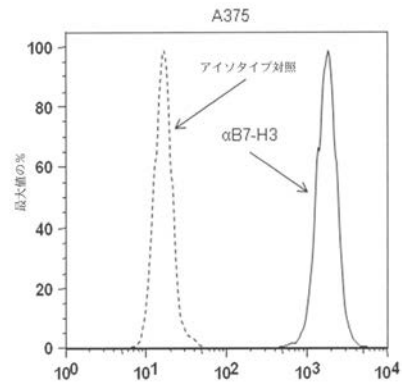


Figure 3C

【図 3 D】

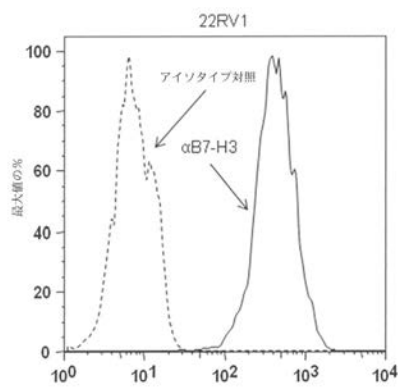


Figure 3D

【図 3 E】

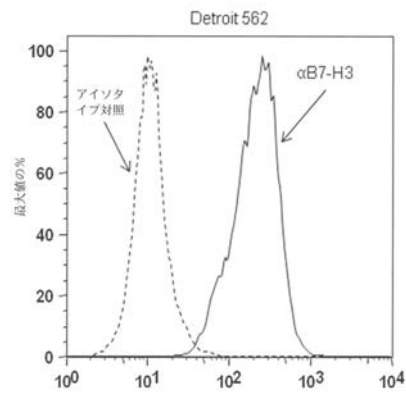
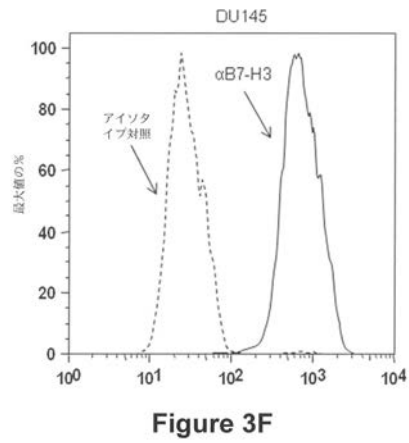
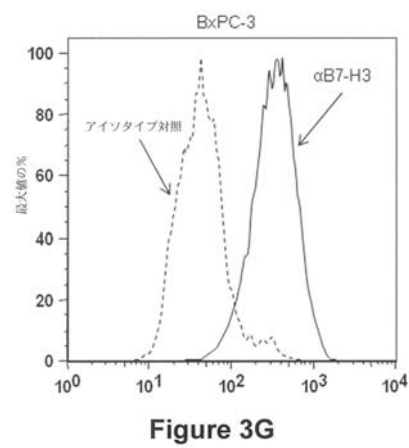


Figure 3E

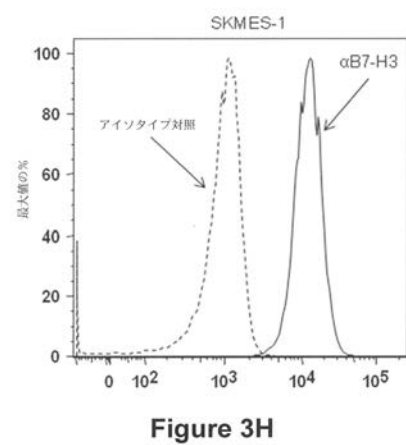
【図 3 F】



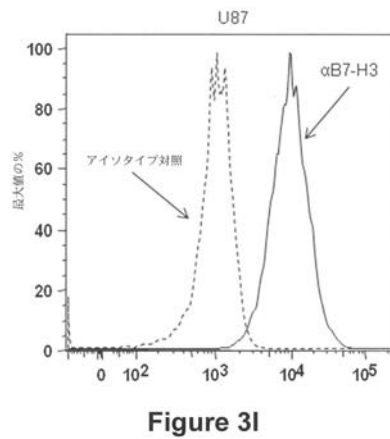
【図 3 G】



【図 3 H】



【図 3 I】



【図 3 J】

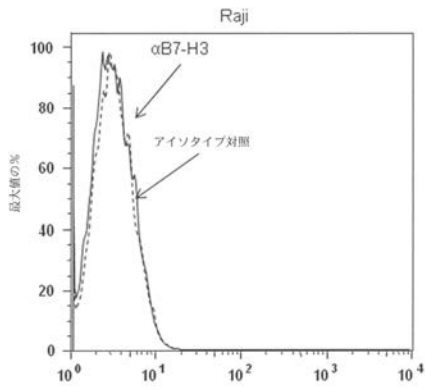


Figure 3J

【図 4 A】

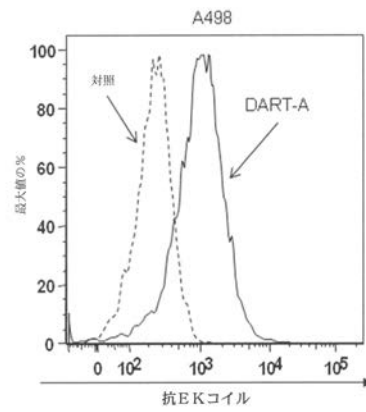


Figure 4A

【図 4 B】

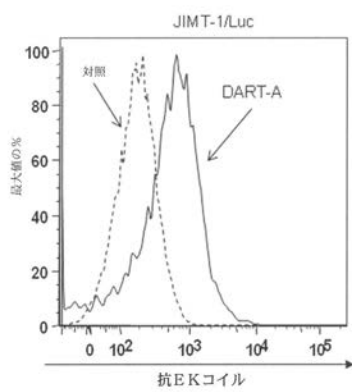


Figure 4B

【図 4 C】

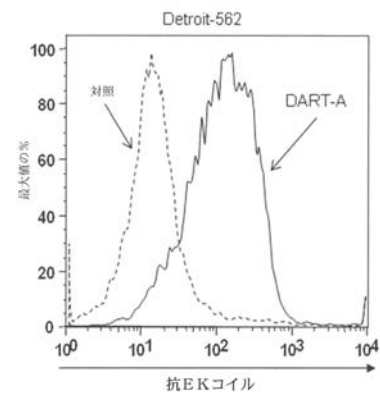


Figure 4C

【図 4 D】

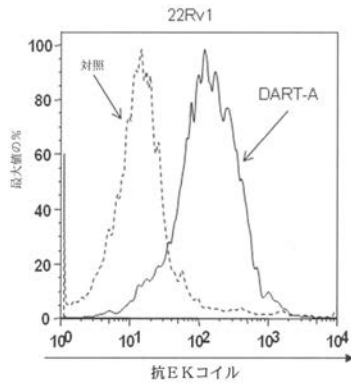


Figure 4D

【図 4 E】

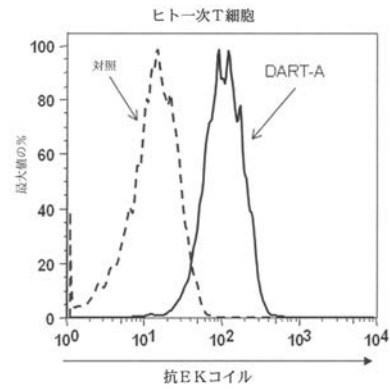


Figure 4E

【図 5 A】

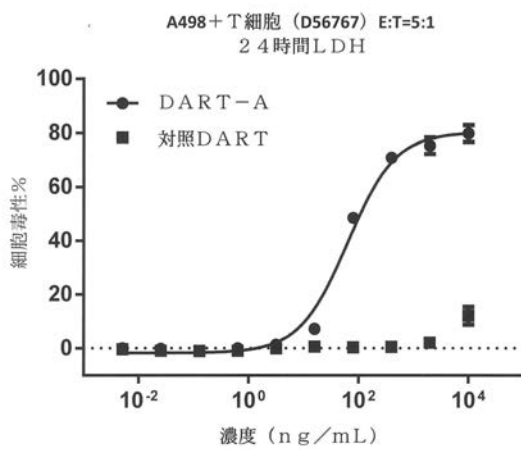


Figure 5A

【図 5 B】

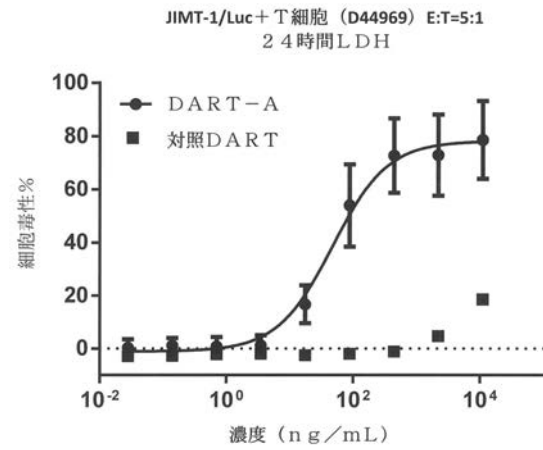


Figure 5B

【図 5 C】

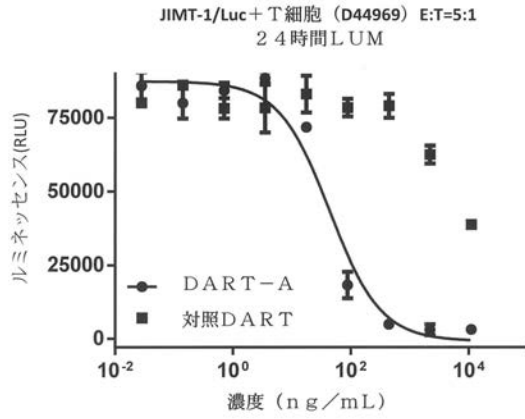


Figure 5C

【図 5 D】

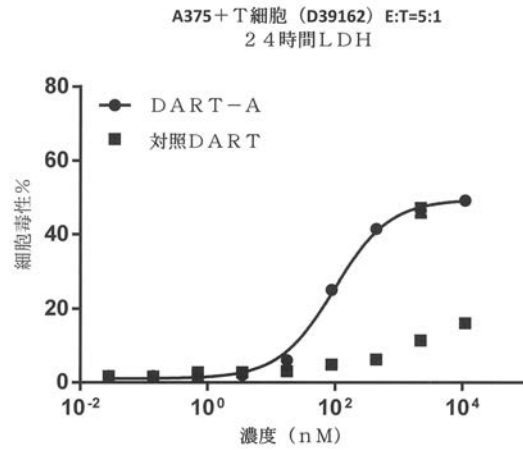


Figure 5D

【図 5 E】

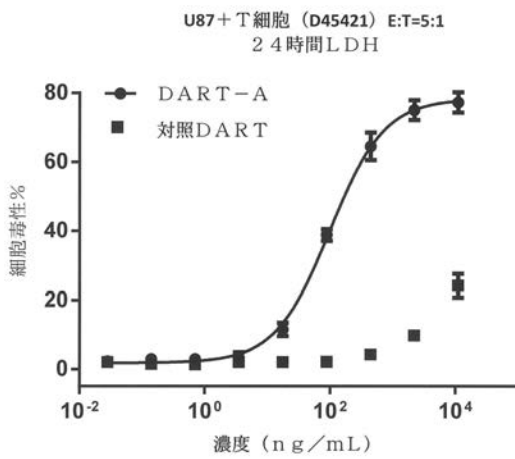


Figure 5E

【図 5 F】

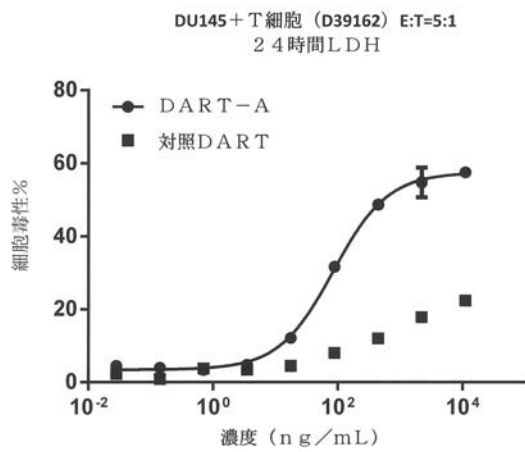


Figure 5F

【図 5 G】

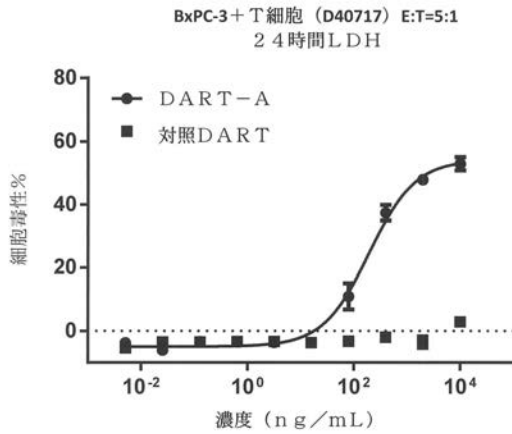


Figure 5G

【図 5 H】

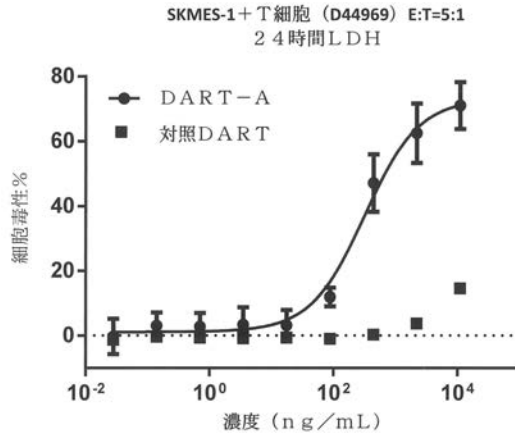


Figure 5H

【図 5 I】

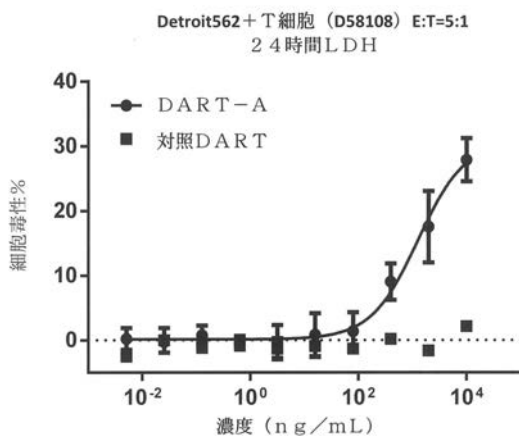


Figure 5I

【図 5 J】

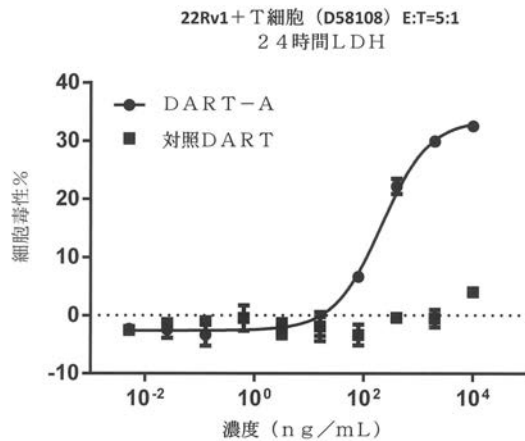


Figure 5J

【図 5 K】

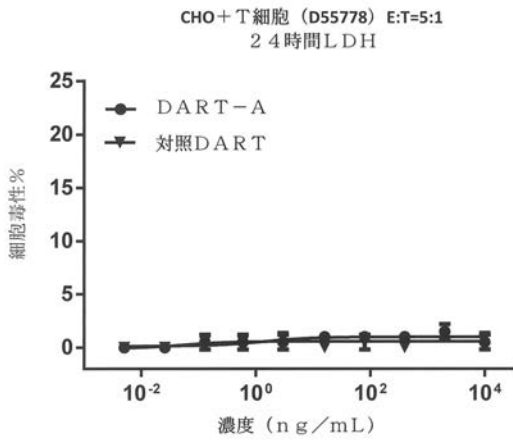


Figure 5K

【図 5 L】

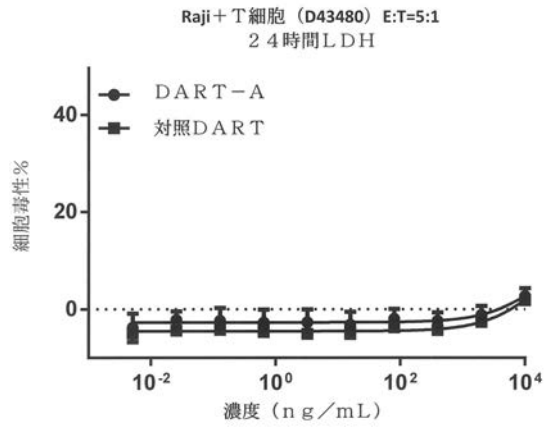


Figure 5L

【図 6 A】

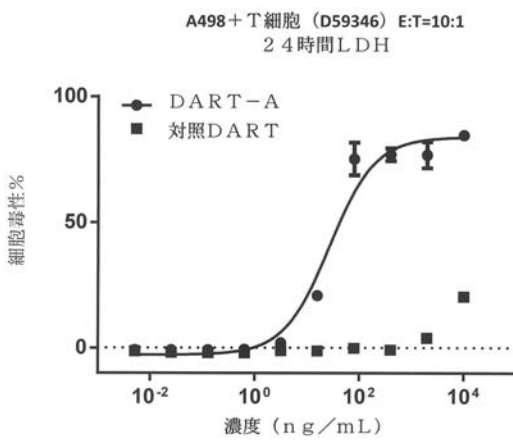


Figure 6A

【図 6 B】

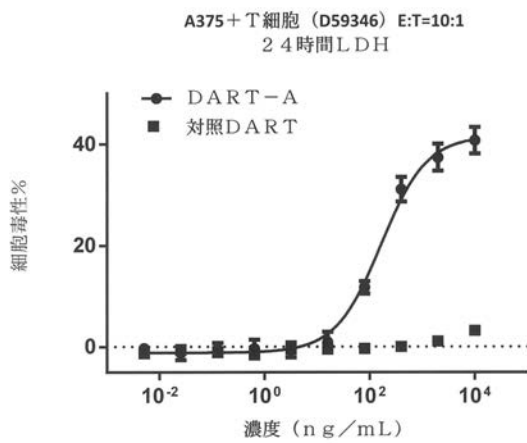


Figure 6B

【図 6 C】

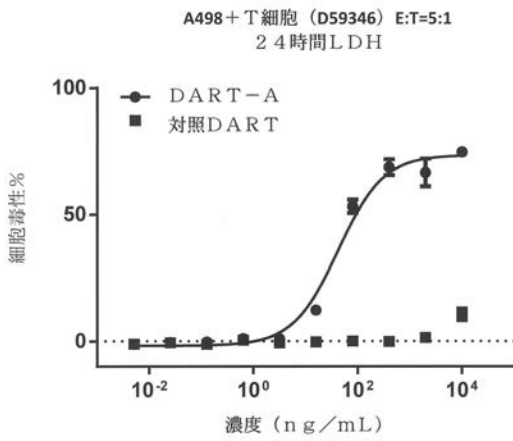


Figure 6C

【図 6 D】

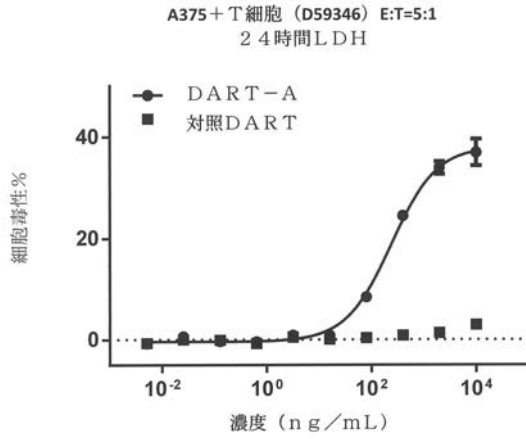


Figure 6D

【図 6 E】

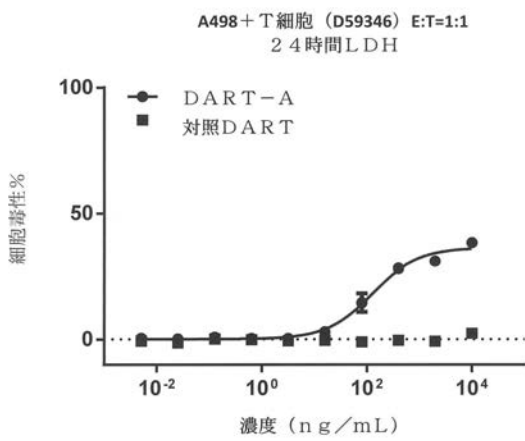


Figure 6E

【図 6 F】

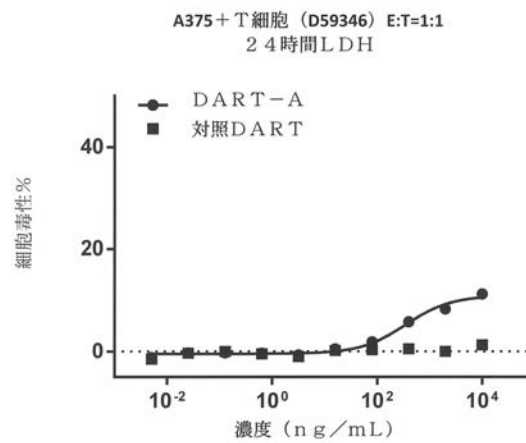


Figure 6F



【 図 7 A 】

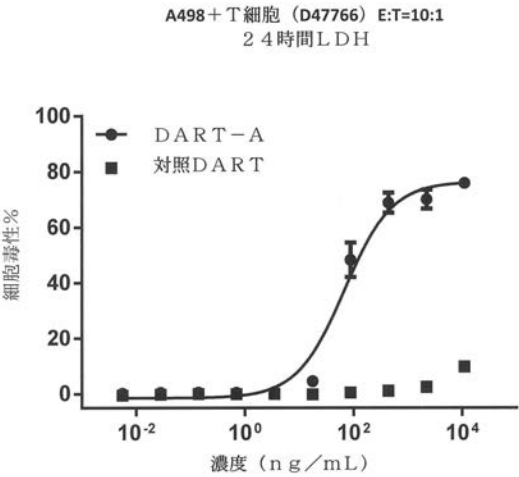


Figure 7A

【 図 7 B 】

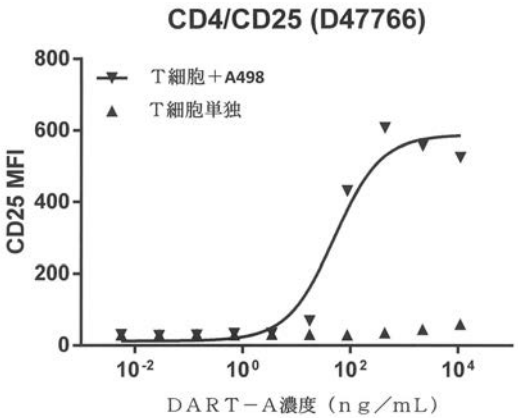


Figure 7B

【 図 7 C 】

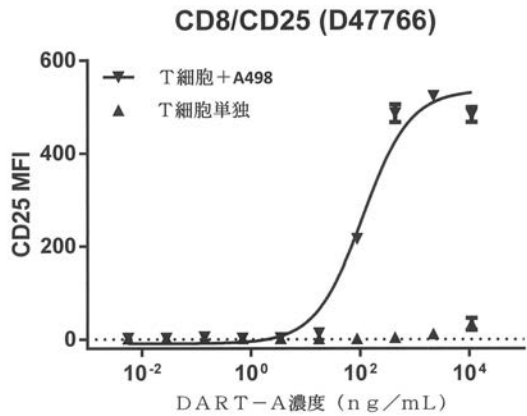


Figure 7C

【 図 7 D 】

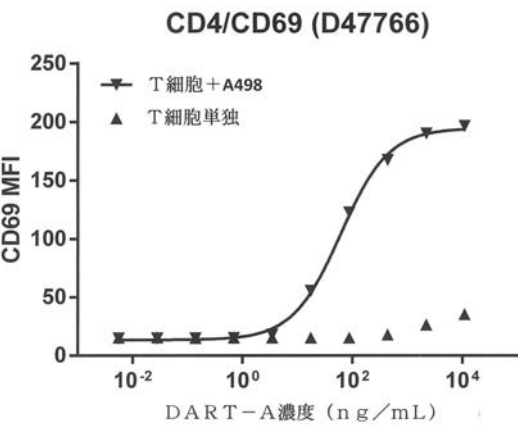


Figure 7D

【図 7 E】

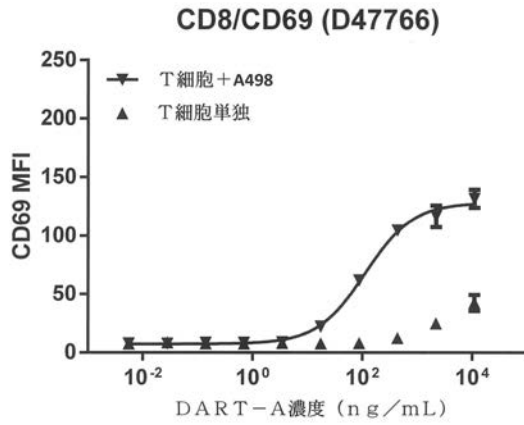


Figure 7E

【図 8 A】

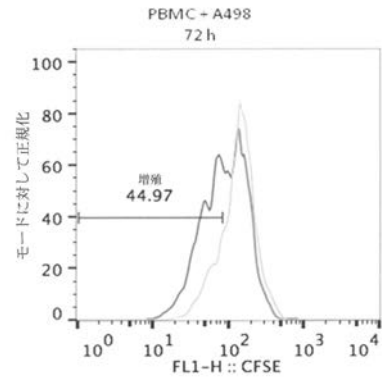


Figure 8A

【図 8 B】

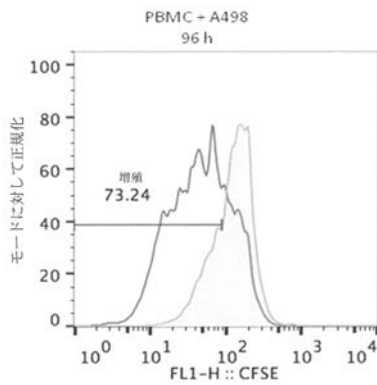


Figure 8B

【図 9 A】

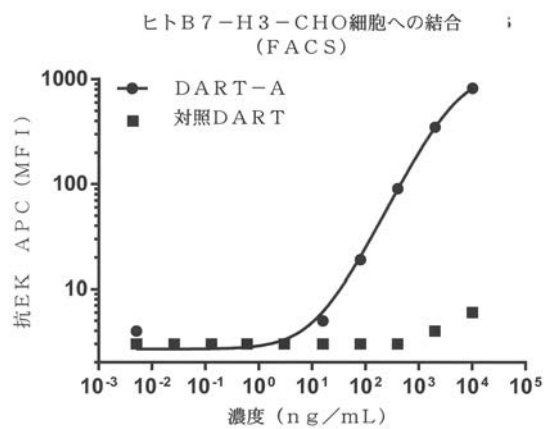


Figure 9A

【図 9 B】

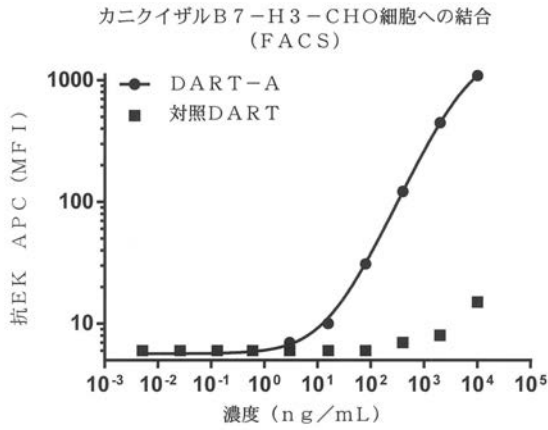


Figure 9B

【図 9 C】

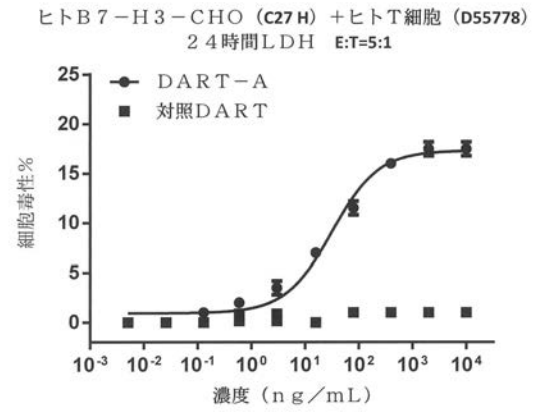


Figure 9C

【図 9 D】

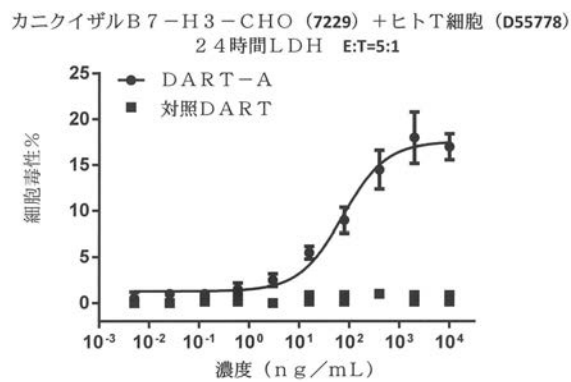


Figure 9D

【図 10 A】

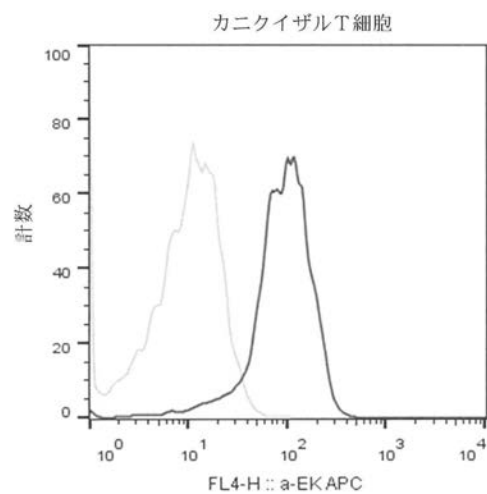


Figure 10A

【図 10 B】

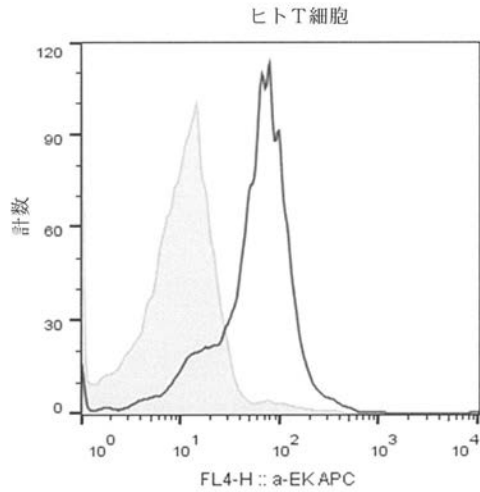


Figure 10B

【図 11 A】

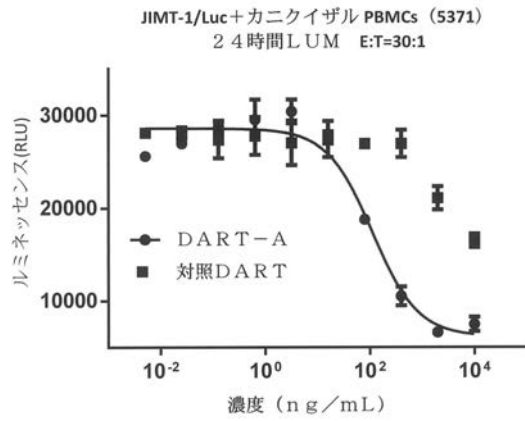


Figure 11A

【図 11 B】

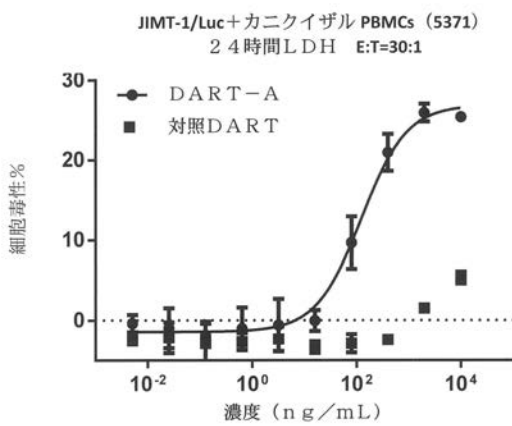


Figure 11B

【図 11 C】

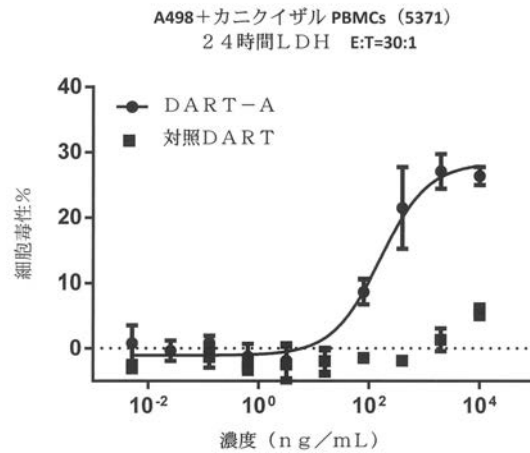


Figure 11C

【図 1 2】

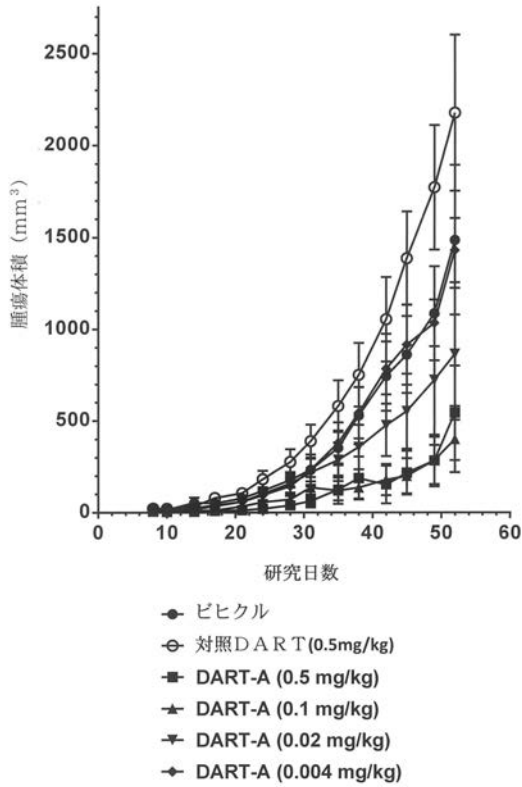


Figure 12

【図 1 3】

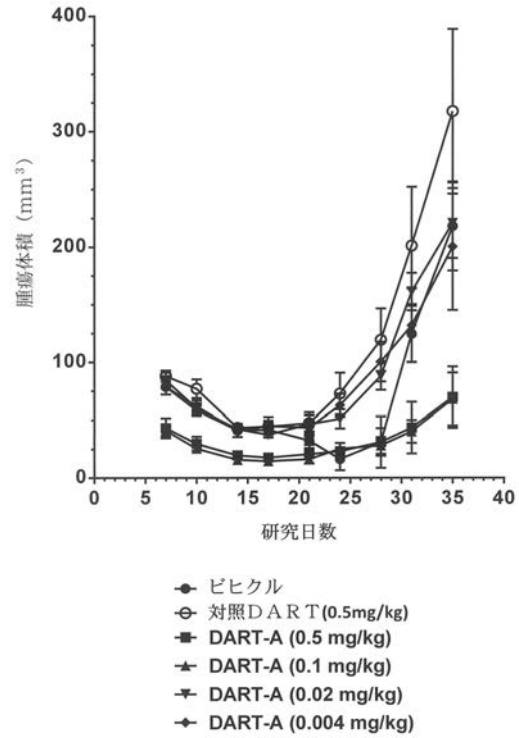


Figure 13

【図 1 4】

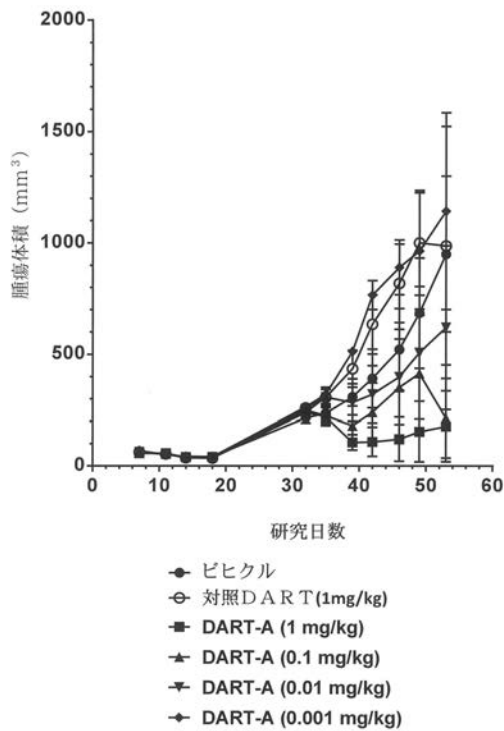


Figure 14

【図 1 5】

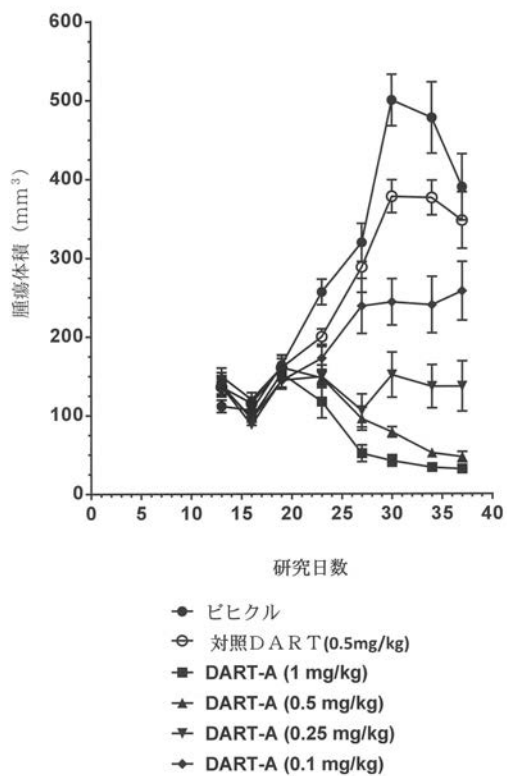


Figure 15

【 図 1 6 A 】

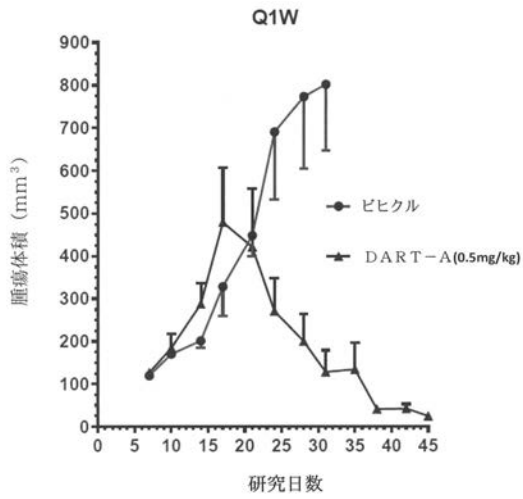


Figure 16A

【 図 1 6 B 】

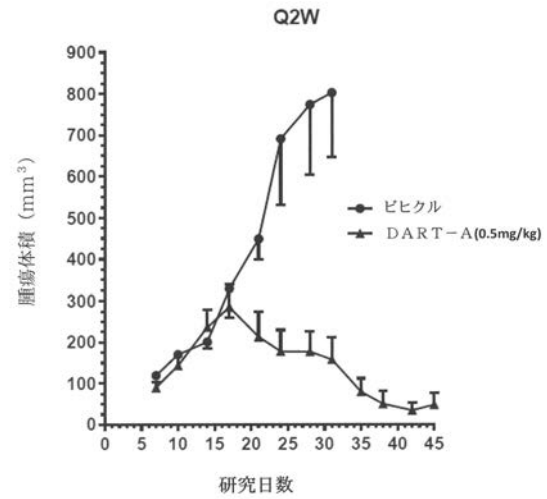


Figure 16B

【 図 1 7 】

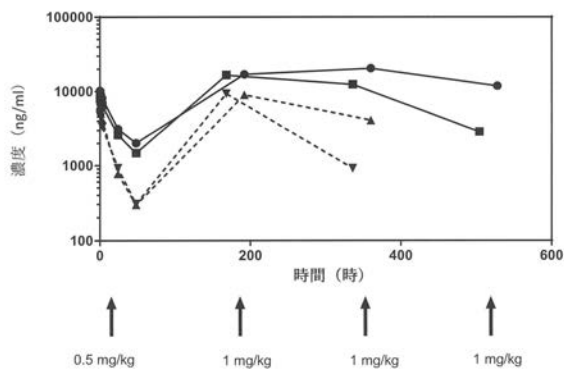


Figure 17

【配列表】

2018523686000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 16/46680		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/28, C07K 16/30 (2016.01) CPC - A61K 39/395, C07K 2317/626, C07K 16/2809, C07K 16/2827, C07K 16/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/28, C07K 16/30 (2016.01) CPC - A61K 39/395, C07K 2317/626, C07K 16/2809, C07K 16/2827, C07K 16/30 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C07K 16/466, C07K 2317/31, A61K 2039/505 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: diabody, Fc, monovalent, bispecific, B7-H3, B7H3, CD276, CD3, cancer, tumor, malignancy				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	WO 2015/026892 A1 (MACROGENICS INC.) 26 February 2015 (26.02.2015) para [0024], [0055], [00111], [00139], [00140], [00145], [00146]; SEQ ID NOs: 20 and 54	1-6		
A	US 2014/0255407 A1 (MACROGENICS INC.) 11 September 2014 (11.09.2014) para [0027], [0032], [0034], [0076]	1-6		
A	WO 2015/021089 A1 (MACROGENICS INC.) 12 February 2015 (12.02.2015) SEQ ID NO: 103	1-6		
A	US 2013/0171095 A1 (XENCOR INC.) 4 July 2013 (04.07.2013) SEQ ID NO: 108	1-6		
A	US 2014/0302037 A1 (AMGEN INC.) 9 October 2014 (09.10.2014) SEQ ID NO: 10	1-6		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 15 December 2016		Date of mailing of the international search report <div style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">06 JAN 2017</div>		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774		



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46680

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-----please see extra sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-6, limited to SEQ ID NOs: 53, 55, 57

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46680

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

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

Group I+: Claims 1-24, drawn to a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody capable of specific binding to B7-H3 and to CD3, wherein the diabody comprises a first, a second and a third polypeptide chain. The B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody will be searched to the extent that the first polypeptide chain sequence encompasses SEQ ID NO: 53, and the second polypeptide chain sequence encompasses SEQ ID NO: 55. It is believed that claims 1-6 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody comprising a first polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:53; a second polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:55; and a third polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:57. Additional first and second polypeptide chain sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected first polypeptide chain sequence(s) and second polypeptide chain sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody comprising a first polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:53; a second polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:50; and a third polypeptide chain sequence of SEQ ID NO:57, i.e. claims 7-12.

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific first and second polypeptide chain sequences recited therein. Each invention requires a first polypeptide chain sequence and second polypeptide chain sequence, not required by any of the other inventions.

## Common Technical Features

The feature shared by Group I+ is a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody capable of specific binding to B7-H3 and to CD3. The feature shared by Group I+ is a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody capable of specific binding to B7-H3 and to CD3, wherein the diabody comprises a first, a second and a third polypeptide chain, wherein said polypeptide chains form a covalently bonded complex, and wherein: (C) said third polypeptide chain has the amino acid sequence of SEQ ID NO:57 (claims 1, 7, 13, 19).

Another feature shared by Group I+ is a pharmaceutical composition comprising the B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody and a physiologically acceptable carrier (claims 2, 8, 14, 20).

Another feature shared by Group I+ is use of the B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody or the pharmaceutical composition in the treatment of a disease or condition associated with or characterized by the expression of B7-H3 (claims 3, 9, 15, 21).

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by WO 2015/026892 A1 to MacroGenics Inc. (hereinafter 'MacroGenics '892') in view of US 2014/0255407 A1 to MacroGenics Inc. (hereinafter 'MacroGenics '407').

MacroGenics '892 discloses a CD3 bispecific monovalent Fc diabody capable of specific binding to CD3 (para [0024] "the invention also provides a sequence-optimized CD 123 x CD3 bi-specific monovalent diabody capable of specific binding to an epitope of CD 123 and to an epitope of CD3"; para [0023] "In particular embodiments, the diabodies of the present invention further have an immunoglobulin Fc Domain or an Albumin-Binding Domain to extend half-life in vivo"; para [0055] "Figures 3A and 3B illustrate the structures of two versions of the first, second and third polypeptide chains of a three chain CD 123 x CD3 bi-specific monovalent Fc diabody of the present invention"), wherein the diabody comprises a first, a second and a third polypeptide chain, wherein said polypeptide chains form a covalently bonded complex (para [0024] "wherein the diabody comprises a first polypeptide chain and a second polypeptide chain, covalently bonded to one another"), and wherein: (C) said third polypeptide chain has the amino acid sequence of SEQ ID NO:57 (para [00145] "The third polypeptide chain will comprise the CH2 and CH3 Domains of an IgG Fc Domain. A preferred polypeptide is composed of Peptide 1 (SEQ ID NO:55) and the CH2 and CH3 Domains of an Fc Domain (SEQ ID NO: 11) and has the sequence of SEQ ID NO:54."; SEQ ID NO: 54, aa 1-227, exhibits 100% identity to claimed SEQ ID NO: 57).

MacroGenics '892 does not teach wherein the bispecific monovalent Fc diabody is a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody that further specifically binds to B7-H3. However, MacroGenics '407 teaches a bispecific diabody that binds to B7-H3 and to CD3 (para [0027] "The invention particularly concerns bispecific diabody molecules that bind to (1) an epitope of an activating receptor of a companion animal immune effector cell and (2) an epitope of B7-H3 expressed by a cancer cell of such companion animal"; para [0032] "The invention further concerns any of the above-described bispecific molecules, wherein the activating receptor is CD3"). MacroGenics '407 further teaches that the B7-H3 bispecific diabody can be a bispecific monovalent Fc diabody that can be used to treat cancer (para [0034] "The invention further concerns any of the above-described bispecific molecules, wherein the bispecific molecule further comprises a wild-type Fc region or an Fc receptor"; para [0076] "Diabodies may be monospecific"; para [0027] "The present invention relates to bispecific molecules that are capable of localizing an immune effector cell that expresses an activating receptor to a B7-H3-expressing cancer cell, so as to thereby facilitate the killing of the cancer cell"). Given that MacroGenics '892 teaches that its CD3 bispecific monovalent Fc diabody is used to target and kill cancer cells (para [00111] "As discussed below, the sequence-optimized CD 123 x CD3 bi-specific diabody (DART -A) was found to have the ability to simultaneously bind CD 123 and CD3 ... Provision of DART- A was found ... to cause the redirected killing of target cancer cells"), and MacroGenics '407 teaches that a bispecific monovalent Fc diabody can target both B7-H3 and CD3 for treatment of cancer, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the bispecific monovalent Fc diabody of MacroGenics '892 can be a B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody.

—please see next extra sheet-----

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/46680

Continuation of: Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Macrogenics '892 in view of Macrogenics '407 teaches the B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody, and Macrogenics '892 further teaches a pharmaceutical composition comprising the bispecific monovalent Fc diabody and a physiologically acceptable carrier (para [0048] "The invention additionally provides a pharmaceutical composition comprising any of the above-described diabodies and a physiologically acceptable carrier").

Macrogenics '892 in view of Macrogenics '407 teaches the B7-H3 x CD3 bispecific monovalent Fc diabody and pharmaceutical composition, and Macrogenics '407 further teaches use of the bispecific monovalent Fc diabody or the pharmaceutical composition in the treatment of a disease or condition associated with or characterized by the expression of B7-H3 (para [0027] "The present invention relates to bispecific molecules that are capable of localizing an immune effector cell that expresses an activating receptor to a B7-H3-expressing cancer cell, so as to thereby facilitate the killing of the cancer cell. In a preferred embodiment, such localization is accomplished using bispecific molecules that are immunoreactive both to an activating receptor of a companion animal immune effector cell and to B7-H3 expressed by a cancer cell.").

The inventions listed as Group I+ therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13		
		C 1 2 N 15/13	Z N A	

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

(72)発明者 ボンビニ エツィオ  
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 4 , ポトマック , パウダー ホーン ドライブ 1 1  
1 3 6

(72)発明者 ホアン リン  
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 1 7 , ベセスダ , ムーアランド レーン 8 2 1 0

(72)発明者 シャー カルパナ  
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 4 1 , ボイズ , エセル ローズ ウェイ 1 3 0 1 3

(72)発明者 アルダーソン ラルフ  
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 8 , ノース ポトマック , クエリ ミル ロード 1  
3 6 0 1

(72)発明者 チチリ グルナド レディ  
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 4 , ジャーマンタウン , ララビー ロード 1 3 9 2  
6

F ターム(参考) 4C085 AA14 AA16 CC23 EE01  
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74