

(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2016-500059

(P2016-500059A)

(43) 公表日 平成28年1月7日(2016.1.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C084
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 101	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 181 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-542186 (P2015-542186)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月12日 (2013.11.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年7月13日 (2015.7.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/003399
 (87) 国際公開番号 W02014/075788
 (87) 国際公開日 平成26年5月22日 (2014.5.22)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/004712
 (32) 優先日 平成24年11月13日 (2012.11.13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2013/002270
 (32) 優先日 平成25年7月30日 (2013.7.30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509146023
 バイオエヌテック アーゲー
 BioNTech AG
 ドイツ連邦共和国 55131 マインツ
 アンデル ゴールドグルーベ 12
 An der Goldgrube 12
 55131 Mainz German
 y

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クローディンを発現するガン疾患を処置するための剤

(57) 【要約】

本発明は、T細胞に結合することを可能にするCD3に対して特異的である結合ドメインと、腫瘍に伴うクロージン分子に対して特異的である結合ドメインとを含有する結合剤、および、該結合剤または該結合剤をコードする核酸を、ガンを処置するために使用する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの結合ドメインを含み、第 1 の結合ドメインがクローディング (CLDN) に結合し、かつ、第 2 の結合ドメインが CD 3 に結合する結合剤。

【請求項 2】

二重特異性分子である請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 3】

前記二重特異性分子が二重特異性抗体である、請求項 2 に記載の結合剤。

【請求項 4】

前記二重特異性抗体が二重特異性単鎖抗体である、請求項 3 に記載の結合剤。

10

【請求項 5】

前記クローディングがガン細胞において発現される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 6】

前記クローディングがガン細胞の表面に発現される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 7】

前記クローディングが、クローディング 18.2 およびクローディング 6 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 8】

前記第 1 の結合ドメインが前記クローディングの細胞外ドメインに結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の結合剤。

20

【請求項 9】

前記第 2 の結合ドメインが CD 3 のイプシロン鎖に結合する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 10】

前記 CD 3 が T 細胞の表面に発現される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 11】

当該結合剤が T 細胞上の CD 3 に結合することにより、前記 T 細胞の増殖および / または活性化が引き起こされ、ただし、前記活性化された T 細胞により、細胞傷害性因子 (例えば、パーフォリンおよびグランザイム) が好ましくは放出され、かつ、ガン細胞の細胞溶解およびアポトーシスが開始される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の結合剤。

30

【請求項 12】

クローディングに対する前記結合および / または CD 3 に対する前記結合が特異的な結合である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 13】

全長型抗体または抗体フラグメントの形式である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 14】

少なくとも 2 つの結合ドメインを伴う一組の抗体可変ドメイン (好ましくは 4 つの抗体可変ドメイン) を含み、ただし、少なくとも 1 つの結合ドメインがクローディングに結合し、かつ、少なくとも 1 つの結合ドメインが CD 3 に結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の結合剤。

40

【請求項 15】

免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン (VH) で、クローディング抗原に対する特異性を有する可変ドメイン (VH (CLDN))、免疫グロブリンの軽鎖の可変ドメイン (VL) で、クローディング抗原に対する特異性を有する可変ドメイン (VL (CLDN))、免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン (VH) で、CD 3 に対する特異性を有する可変ドメイン (VH (CD 3))、および、免疫グロブリンの軽鎖の可変ドメイン (VL) で、C

50

D 3 に対する特異性を有する可変ドメイン (V L (C D 3)) を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 1 6】

同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメインにつながる重鎖可変ドメインを含むジアボディーの形式であり、その結果、これら 2 つのドメインが対形成しないようにされる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 1 7】

前記ジアボディーが 2 つのポリペプチド鎖を含み、ただし、一方のポリペプチドが V H (C L D N) および V L (C D 3) を含み、他方のポリペプチド鎖が V H (C D 3) および V L (C L D N) を含む、請求項 1 6 に記載の結合剤。

10

【請求項 1 8】

リンカーペプチドを介してつながれる 2 つの s c F v 分子からなる二重特異性単鎖抗体の形式である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 1 9】

前記重鎖可変領域 (V H) およびその対応する軽鎖可変領域 (V L) が、N 末端から C 末端に、V H (C L D N) - V L (C L D N) - V H (C D 3) - V L (C D 3) の順、V H (C D 3) - V L (C D 3) - V H (C L D N) - V L (C L D N) の順、または、V H (C D 3) - V L (C D 3) - V L (C L D N) - V H (C L D N) の順で配置される、請求項 1 8 に記載の結合剤。

【請求項 2 0】

前記重鎖可変領域 (V H) およびその対応する軽鎖可変領域 (V L) が、長いペプチドリンカーを介して、好ましくは、(G G G G S) 3 または V E (G G G G S) 2 G G V D のアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介してつながれる、請求項 1 9 に記載の結合剤。

20

【請求項 2 1】

前記 2 つの V H - V L 型 s c F v ユニットまたは V L - V H 型 s c F v ユニットが、短いペプチドリンカーを介して、好ましくは、S G G G G S または G G G G S のアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介してつながれる、請求項 1 9 または 2 0 に記載の結合剤。

【請求項 2 2】

前記 C L D N が C L D N 1 8 . 2 であり、前記 V H (C L D N) が、配列番号 8 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記 V L (C L D N) が、配列番号 1 5 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む、請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の結合剤。

30

【請求項 2 3】

前記 C L D N が C L D N 6 であり、前記 V H (C L D N) が、配列番号 2 2 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記 V L (C L D N) が、配列番号 2 3 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む、請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の結合剤。

40

【請求項 2 4】

前記 V H (C D 3) が、配列番号 3 6 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記 V L (C D 3) が、配列番号 3 7 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む、請求項 1 5 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 2 5】

前記 C L D N が C L D N 1 8 . 2 であり、かつ、当該結合剤が、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む、請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 のいずれか一項に記

50

載の結合剤。

【請求項 26】

前記 CLDN が CLDN6 であり、かつ、当該結合剤が、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44 および配列番号 45 からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む、請求項 1～21、23 および 24 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 27】

CLDN18.2 を発現する前記ガン細胞が、胃ガン、食道ガン、膵臓ガン、肺ガン（例えば、非小細胞肺ガン（NSCLC）など）、乳ガン、卵巣ガン、結腸ガン、肝ガン、頭頸部ガン、胆嚢のガン、ならびに、それらの転移物、クルケンベルグ腫瘍、腹膜転移物 および / またはリンパ節転移物からなる群から選択されるガンのガン細胞である、請求項 5～22、24 および 25 のいずれか一項に記載の結合剤。

10

【請求項 28】

CLDN6 を発現する前記ガン細胞が、膀胱ガン、卵巣ガン（特に、卵巣腺ガンおよび卵巣奇形ガン）、肺ガン（小細胞肺ガン（SCLC）および非小細胞肺ガン（NSCLC））を含むが、特に、扁平上皮肺ガンおよび扁平上皮肺腺ガン）、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン（特に、基底細胞ガンおよび扁平上皮ガン）、悪性メラノーマ、頭頸部ガン（特に、悪性多形性腺腫）、肉腫（特に、滑膜肉腫および滑膜ガン肉腫）、胆管ガン、膀胱のガン（特に、移行上皮ガンおよび移行上皮乳頭状ガン）、腎臓ガン（特に、腎明細胞ガンおよび乳頭状腎細胞ガンを含む腎細胞ガン）、結腸ガン、小腸ガン（回腸のガン、特に、小腸腺ガンおよび回腸の腺ガンを含む）、精巣胎児性ガン、胎盤性絨毛ガン、子宮頸ガン、精巣ガン（特に、精巣セミノーマ、精巣奇形腫および胎芽性精巣ガン）、子宮ガン、胚細胞腫瘍（例えば、奇形ガンまたは胚性ガン腫など、特に、精巣の胚細胞腫瘍）、および、それらの転移形態物からなる群から選択されるガンのガン細胞である、請求項 5～21、23、24 および 26 のいずれか一項に記載の結合剤。

20

【請求項 29】

N 末端の分泌シグナルおよび / または C 末端のヒスチジンエピトープタグ（好ましくはヒスチジンが 6 個のエピトープタグ）を有する、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項 30】

請求項 1～29 のいずれか一項に記載される結合剤をコードする組換え核酸。

30

【請求項 31】

ベクターの形態または RNA の形態である請求項 30 に記載の組換え核酸。

【請求項 32】

請求項 30 または 31 に記載される組換え核酸を含む宿主細胞。

【請求項 33】

治療において使用されるための、特に、ガンを処置することまたは防止することにおいて使用されるための、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の結合剤、請求項 30 または 31 に記載の組換え核酸、あるいは、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

請求項 1～29 のいずれか一項に記載される結合剤、請求項 30 または 31 に記載される組換え核酸、あるいは、請求項 32 に記載される宿主細胞を含む医薬組成物。

40

【請求項 35】

請求項 34 に記載される医薬組成物を患者に投与することを含む、ガン疾患を処置するか、または防止する方法。

【請求項 36】

前記ガンの細胞が、前記結合剤が結合することができるクローデインを発現する、請求項 33 に記載の結合剤、組換え核酸または宿主細胞、あるいは、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

50

前記クローディングがCLDN18.2であり、かつ、前記ガンが、胃ガン、食道ガン、膵臓ガン、肺ガン（例えば、非小細胞肺ガン（NSCLC）など）、乳ガン、卵巣ガン、結腸ガン、肝ガン、頭頸部ガン、胆嚢のガン、ならびに、それらの転移物、クルケンベルグ腫瘍、腹膜転移物および/またはリンパ節転移物からなる群から選択される、請求項36に記載の結合剤、組換え核酸、宿主細胞または方法。

【請求項38】

前記クローディングがCLDN6であり、かつ、前記ガンが、膀胱ガン、卵巣ガン（特に、卵巣腺ガンおよび卵巣奇形ガン）、肺ガン（小細胞肺ガン（SCLC）および非小細胞肺ガン（NSCLC）を含むが、特に、扁平上皮肺ガンおよび扁平上皮肺腺ガン）、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン（特に、基底細胞ガンおよび扁平上皮ガン）、悪性メラノーマ、頭頸部ガン（特に、悪性多形性腺腫）、肉腫（特に、滑膜肉腫および滑膜ガン肉腫）、胆管ガン、膀胱のガン（特に、移行上皮ガンおよび移行上皮乳頭状ガン）、腎臓ガン（特に、腎明細胞ガンおよび乳頭状腎細胞ガンを含む腎細胞ガン）、結腸ガン、小腸ガン（回腸のガン、特に、小腸腺ガンおよび回腸の腺ガンを含む）、精巣胎児性ガン、胎盤性絨毛ガン、子宮頸ガン、精巣ガン（特に、精巣セミノーマ、精巣奇形腫および胎芽性精巣ガン）、子宮ガン、胚細胞腫瘍（例えば、奇形ガンまたは胚性ガン腫など、特に、精巣の胚細胞腫瘍）、および、それらの転移形態物からなる群から選択される、請求項36に記載の結合剤、組換え核酸、宿主細胞または方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

クローディングは、上皮および内皮のタイトジャンクションの内部に位置する内在性膜タンパク質である。クローディングは、2つの細胞外ループを伴う4つの膜貫通セグメント、ならびに、細胞質に位置するN末端およびC末端を有することが予測される。クローディング（CLDN）ファミリーの膜貫通タンパク質は、非常に重要な役割を上皮および内皮のタイトジャンクションの維持において果たしており、また、細胞骨格の維持および細胞のシグナル伝達においても役割を果たしているかもしれない。

【背景技術】

【0002】

クローディング18（CLDN18）分子は、4つの膜貫通する疎水性領域および2つの細胞外ループ（疎水性領域1および疎水性領域2によって囲まれるループ1；疎水性領域3および疎水性領域4によって囲まれるループ2）を有する内在性の膜貫通タンパク質（テトラスパニン）である。CLDN18には、2つの異なるスプライス変化体が存在し、これらがマウスおよびヒトにおいて記載されている（Niimi, Mol. Cell. Biol., 21: 7380~90, 2001）。これらのスプライス変化体（Genbankアクセション番号：スプライス変化体1（CLDN18.1）：NP_057453、NM_016369、および、スプライス変化体2（CLDN18.2）：NM_001002026、NP_001002026）は分子量がおよそ27,9kD/27,72kDである。スプライス変化体のCLDN18.1およびCLDN18.2は、最初の膜貫通（TM）領域およびループ1を含むN末端部分が異なり、これに対して、C末端の一次タンパク質配列は同一である。

30

40

【0003】

正常な組織では、CLDN18.2の検出可能な発現は、CLDN18.2が短寿命の分化した胃上皮細胞の表面にもっぱら発現される胃を除いて全く認められない。CLDN18.2は、悪性形質転換の過程において維持されており、したがって、ヒト胃ガン細胞の表面にしばしば呈示される。そのうえ、この汎腫瘍抗原は、食道腺ガン、膵臓腺ガンおよび肺腺ガンにおいて顕著なレベルで異所性に活性化される。CLDN18.2タンパク質はまた、胃ガン腺ガンのリンパ節転移物に、また、とりわけ卵巣内への遠位転移物（いわゆるクルケンベルグ腫瘍）に局在化する。

【0004】

50

CLDN6は、一連の異なるヒトガン細胞において発現し、一方、正常な組織における発現は胎盤に限定される。

【0005】

ガン細胞と正常な細胞との間における様々なクローディング（例えば、CLDN18.2およびCLDN6など）の示差的発現、それらの膜局在化、および、毒性と関連した正常な組織の大部分にはそれらが存在しないことにより、これらの分子がガン免疫療法のための魅力的な標的になっており、したがって、クローディングを標的化するための抗体に基づく治療学を使用することにより、高レベルの治療特異性が見込まれる。

T細胞の潜在能力をガンの処置のために使用する取り組みには、腫瘍由来のタンパク質、RNAまたはペプチド抗原を用いるワクチン接種、腫瘍由来のエクスピボ拡大されたT細胞の注入（これは養子移入と呼ばれる）、T細胞受容体遺伝子移入、あるいは、二重特異性抗体または三重特異性抗体によるT細胞の直接的関与が含まれる。同様に、T細胞応答の多くの刺激剤が併用で、または単独療法として臨床試験されており、例えば、Toll様受容体のためのリガンド、T細胞上のCTLA-4を阻止する抗体、免疫刺激性サイトカイン、または、ガン細胞の免疫回避に関与する分子（例えば、TGF-ベータまたはB7-H1など）を中和する抗体などが臨床試験されている。T細胞に基づく治療法の集中的な開発が、患者の腫瘍がT細胞によって浸潤されるならば、患者は有意に長く生存するようであるという所見によって動機づけられる。そのうえ、数多くのマウスモデルは、様々な手段によるT細胞の関与により、大きな腫瘍さえも根絶することができることを示しており、いくつかのT細胞治療法が近年では、著しい進歩を、様々なガン適応症を処置

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Niimi, Mol. Cell. Biol., 21: 7380~90, 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ガン疾患の治療法のための新規な剤および方法を提供することが本発明の目的の1つであった。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の根底にある課題の解決策は、腫瘍に伴うクローディング分子に対して、すなわち、ガン細胞に対して特異的である結合ドメインを含有する結合剤を作製するという考えに基づく。他の結合ドメインが、T細胞に結合することを可能にするCD3に対して特異的であり、かつ、T細胞を複合体の中に引き入れることを可能にし、したがって、これにより、T細胞の細胞傷害性影響を標的としてのガン細胞に向けさせることが可能になる。この複合体の形成は、細胞傷害性T細胞におけるシグナル伝達を自身で、または、補助細胞との組合せでのどちらかで誘導することができ、これにより、細胞傷害性媒介因子の放出が引き起こされる。

40

【0009】

本発明者らは、クローディングおよびCD3を標的化する結合剤が、強力なT細胞媒介細胞溶解を誘導することができ、かつ、腫瘍疾患を処置することにおいて効果的であることを初めて報告する。

【0010】

1つの局面において、本発明は、少なくとも2つの結合ドメインを含み、第1の結合ドメインがクローディングに結合し、かつ、第2の結合ドメインがCD3に結合する結合剤に関連する。本発明の結合剤は、（CD3受容体と会合することによって）細胞傷害性細胞に結合し、かつ、標的として破壊されることになる、CLDNを発現するガン細胞に結合

50

する場合がある。

【0011】

1つの実施形態において、前記結合剤は二重特異性分子であり、例えば、二重特異性抗体などであり、具体的には二重特異性単鎖抗体である。1つの実施形態において、前記クローディングはガン細胞において発現される。1つの実施形態において、前記クローディングはガン細胞の表面に発現される。1つの実施形態において、前記クローディングは、クローディング18.2およびクローディング6からなる群から選択される。1つの実施形態において、前記第1の結合ドメインは前記クローディングの細胞外ドメインに結合する。1つの実施形態において、前記第1の結合ドメインは、生細胞の表面に存在するCLDNの生来型エピトープに結合する。1つの実施形態において、前記第1の結合ドメインはCLDNの最初の細胞外ループに結合する。1つの実施形態において、前記第2の結合ドメインはCD3のイプシロン鎖に結合する。1つの実施形態において、前記CD3はT細胞の表面に発現される。1つの実施形態において、前記結合剤がT細胞上のCD3に結合することにより、前記T細胞の増殖および/または活性化が引き起こされ、ただし、前記活性化されたT細胞により、細胞傷害性因子（例えば、パーフォリンおよびグランザイム）が好ましくは放出され、かつ、ガン細胞の細胞溶解およびアポトーシスが開始される。1つの実施形態において、クローディングに対する前記結合および/またはCD3に対する前記結合は特異的な結合である。

10

【0012】

1つの実施形態において、前記結合剤は全長型抗体または抗体フラグメントの形式である。1つの実施形態において、前記結合剤は、少なくとも2つの結合ドメインを伴う4つの抗体可変ドメインを含み、ただし、少なくとも1つの結合ドメインがクローディングに結合し、かつ、少なくとも1つの結合ドメインがCD3に結合する。1つの実施形態において、前記結合剤は、免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン(VH)で、クローディング抗原に対する特異性を有する可変ドメイン(VH(CLDN))、免疫グロブリンの軽鎖の可変ドメイン(VL)で、クローディング抗原に対する特異性を有する可変ドメイン(VL(CLDN))、免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン(VH)で、CD3に対する特異性を有する可変ドメイン(VH(CD3))、および、免疫グロブリンの軽鎖の可変ドメイン(VL)で、CD3に対する特異性を有する可変ドメイン(VL(CD3))を含む。

20

【0013】

1つの実施形態において、前記結合剤は、同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメインにつながる重鎖可変ドメインを含むジアポディーの形式であり、その結果、これら2つのドメインが対形成しないようにされる。1つの実施形態において、前記ジアポディーは2つのポリペプチド鎖を含み、ただし、一方のポリペプチドがVH(CLDN)およびVL(CD3)を含み、他方のポリペプチド鎖がVH(CD3)およびVL(CLDN)を含む。

30

【0014】

1つの実施形態において、前記結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つのscFv分子からなる二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域(VH)およびその対応する軽鎖可変領域(VL)が好ましくは、N末端からC末端に、VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3)の順、VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN)の順、または、VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN)の順で配置される。1つの実施形態において、前記重鎖可変領域(VH)およびその対応する軽鎖可変領域(VL)は、長いペプチドリンカーを介して、好ましくは、(GGGGG)3またはVE(GGGGS)2GGVDのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記2つのVH-VL型scFvユニットまたはVL-VH型scFvユニットは、短いペプチドリンカーを介して、好ましくは、SGGGGSまたはGGGGSのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介してつながれる。

40

【0015】

50

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN18.2であり、前記VH(CLDN)は、配列番号8によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CLDN)は、配列番号15によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

【0016】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN18.2であり、前記VH(CLDN)は、配列番号6によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CLDN)は、配列番号11によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

10

【0017】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN6であり、前記VH(CLDN)は、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CLDN)は、配列番号23によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

【0018】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN6であり、前記VH(CLDN)は、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CLDN)は、配列番号97、配列番号98、配列番号99または配列番号100によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

20

【0019】

1つの実施形態において、前記VH(CD3)は、配列番号36、配列番号94または配列番号95によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CD3)は、配列番号37または配列番号96によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

【0020】

1つの実施形態において、前記VH(CD3)は、配列番号36によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CD3)は、配列番号37によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

30

【0021】

1つの実施形態において、前記VH(CD3)は、配列番号95によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記VL(CD3)は、配列番号96によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

【0022】

1つの局面において、本発明の結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つのscFv分子を含む二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域(VH)およびその対応する軽鎖可変領域(VL)がN末端からC末端に、VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3)の順で配置される。1つの実施形態において、前記VH(CD3)およびVL(CD3)は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸(好ましくはグリシンおよび/またはセリン)からなるペプチドリナーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列(GGGGS)4を含むペプチドリナーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VH(CLDN)およびVL(CLDN)は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸(好ましくはグリシンおよび/またはセリン)からなるペプチドリナーを介してつながれ、

40

50

好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 4 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記2つのVH - VL型 s c F v ユニットは、アミノ酸配列 S G G G G S を含むリンカーペプチドを介してつながれる。前記2つのVH - VL型 s c F v ユニットのうちの1つまたは両方が1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む場合がある。

【0023】

1つの局面において、本発明の結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つの s c F v 分子を含む二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域 (VH) およびその対応する軽鎖可変領域 (VL) がN末端からC末端に、VL (CLDN) - VH (CLDN) - VH (CD3) - VL (CD3) の順で配置される。1つの実施形態において、前記VH (CD3) およびVL (CD3) は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリンカーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 4 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VL (CLDN) およびVH (CLDN) は、20個~25個、好ましくは20個または25個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリンカーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 5 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VL - VH型 s c F v ユニットおよびVH - VL型 s c F v ユニットは、アミノ酸配列 S G G G G S を含むリンカーペプチドを介してつながれる。前記2つのVL - VH型 s c F v ユニットまたはVH - VL型 s c F v ユニットのうちの1つまたは両方が1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む場合がある。

10

20

【0024】

1つの局面において、本発明の結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つの s c F v 分子を含む二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域 (VH) およびその対応する軽鎖可変領域 (VL) がN末端からC末端に、VH (CLDN) - VL (CLDN) - VL (CD3) - VH (CD3) の順で配置される。好ましくは、前記VL (CD3) - VH (CD3) s c F v ユニットは1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む。1つの実施形態において、前記VL (CD3) およびVH (CD3) は、20個~25個、好ましくは20個または25個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリンカーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 5 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VH (CLDN) およびVL (CLDN) は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリンカーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 4 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VH - VL型 s c F v ユニットおよびVL - VH型 s c F v ユニットは、アミノ酸配列 S G G G G S を含むリンカーペプチドを介してつながれる。前記VH (CLDN) - VL (CLDN) s c F v ユニットは1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む場合がある。

30

【0025】

1つの局面において、本発明の結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つの s c F v 分子を含む二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域 (VH) およびその対応する軽鎖可変領域 (VL) がN末端からC末端に、VL (CLDN) - VH (CLDN) - VL (CD3) - VH (CD3) の順で配置される。好ましくは、前記VL (CD3) - VH (CD3) s c F v ユニットは1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む。1つの実施形態において、前記VL (CD3) およびVH (CD3) は、20個~25個、好ましくは20個または25個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリンカーを介してつながれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 5 を含むペプチドリンカーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記VL (CLDN) およびVH (CLDN) は、20個~25個、好ましくは20個または25個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペ

40

50

プチドリナーを介してつなわれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 5 を含むペプチドリナーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記2つのV L - V H型 s c F v ユニットは、アミノ酸配列 S G G G G S を含むリンカーペプチドを介してつながれる。前記V L (C L D N) - V H (C L D N) s c F v ユニットは1つまたは複数の相互接続ジスルフィド架橋を含む場合がある。

【 0 0 2 6 】

上記局面のいずれかの1つの実施形態において、前記C L D NはC L D N 1 8 . 2 である。好ましくは、前記V H (C L D N) は、配列番号8によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記V L (C L D N) は、配列番号15によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。代替において、前記V H (C L D N) は、配列番号6によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記V L (C L D N) は、配列番号11によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。1つの実施形態において、前記V H (C D 3) は、配列番号95によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記V L (C D 3) は、配列番号96によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

10

【 0 0 2 7 】

1つの局面において、本発明の結合剤は、リンカーペプチドを介してつながれる2つの s c F v 分子を含む二重特異性単鎖抗体の形式であり、ただし、前記重鎖可変領域 (V H) およびその対応する軽鎖可変領域 (V L) がN末端からC末端に、V H (C L D N) - V L (C L D N) - V H (C D 3) - V L (C D 3) の順またはV H (C D 3) - V L (C D 3) - V H (C L D N) - V L (C L D N) の順で配置される。1つの実施形態において、前記V H (C L D N) およびV L (C L D N) は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリナーを介してつなわれ、好ましくは、アミノ酸配列 (G G G G S) 3 を含むペプチドリナーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記V H (C D 3) およびV L (C D 3) は、15個~20個、好ましくは15個または20個のアミノ酸 (好ましくはグリシンおよび/またはセリン) からなるペプチドリナーを介してつなわれ、好ましくは、アミノ酸配列 G G G G S (G G S) 3 G G G S を含むペプチドリナーを介してつながれる。1つの実施形態において、前記2つのV H - V L型 s c F v ユニットは、アミノ酸配列 S G G G G S を含むリンカーペプチドを介してつながれる。

20

30

【 0 0 2 8 】

上記局面の1つの実施形態において、前記C L D NはC L D N 6 である。好ましくは、前記V H (C L D N) は、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。好ましくは、前記V L (C L D N) は、配列番号98、配列番号99または配列番号100によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。最も好ましくは、前記V L (C L D N) は、配列番号99によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。1つの実施形態において、前記V H (C D 3) は、配列番号95によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含み、かつ、前記V L (C D 3) は、配列番号96によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントあるいは前記アミノ酸配列またはフラグメントの変化体を含む。

40

【 0 0 2 9 】

1つの実施形態において、前記C L D NはC L D N 1 8 . 2 であり、かつ、本発明の前記結合剤は、配列番号38、配列番号39、配列番号40および配列番号41からなる群

50

から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。

【0030】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN18.2であり、かつ、本発明の前記結合剤は、配列番号103、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92および配列番号93からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN18.2であり、かつ、前記結合剤は、配列番号103、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92および配列番号93からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含み、ただし、前記アミノ酸配列は、分泌シグナル、例えば、N末端の分泌シグナルなど、具体的には、分泌シグナルが存在するならば、配列番号51による配列を欠いており、かつ/または、Hisタグ、例えば、C末端のHisタグなど、具体的には、Hisタグが存在するならば、配列Gly-Gly-Ser-(His)₆または配列(His)₆を欠いている。

10

20

【0031】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN6であり、かつ、本発明の前記結合剤は、配列番号42、配列番号43、配列番号44および配列番号45からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。

【0032】

1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN6であり、かつ、本発明の前記結合剤は、配列番号101、配列番号102、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64および配列番号65からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。1つの実施形態において、前記CLDNはCLDN6であり、かつ、前記結合剤は、配列番号101、配列番号102、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64および配列番号65からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含み、ただし、前記アミノ酸配列は、分泌シグナル、例えば、N末端の分泌シグナルなど、具体的には、分泌シグナルが存在するならば、配列番号51による配列を欠いており、かつ/または、Hisタグ、例えば、C末端のHisタグなど、具体的には、Hisタグが存在するならば、配列Gly-Gly-Ser-(His)₆または配列(His)₆を欠いている。

30

【0033】

1つの実施形態において、CLDN18.2を発現する前記ガン細胞は、胃ガン、食道ガン、膵臓ガン、肺ガン(例えば、非小細胞肺ガン(NSCLC)など)、乳ガン、卵巣ガン、結腸ガン、肝ガン、頭頸部ガン、胆嚢のガン、ならびに、それらの転移物、クルケンベルグ腫瘍、腹膜転移物および/またはリンパ節転移物からなる群から選択されるガンのガン細胞である。

40

【0034】

1つの実施形態において、CLDN6を発現する前記ガン細胞は、膀胱ガン、卵巣ガン(特に、卵巣腺ガンおよび卵巣奇形ガン)、肺ガン(小細胞肺ガン(SCLC)および非小細胞肺ガン(NSCLC)を含むが、特に、扁平上皮肺ガンおよび扁平上皮肺腺ガン)、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン(特に、基底細胞ガンおよび扁平上皮ガン)、悪性メラノーマ、頭頸部ガン(特に、悪性多形性腺腫)、肉腫(特に、滑膜肉腫お

50

よび滑膜ガン肉腫)、胆管ガン、膀胱のガン(特に、移行上皮ガンおよび移行上皮乳頭状ガン)、腎臓ガン(特に、腎明細胞ガンおよび乳頭状腎細胞ガンを含む腎細胞ガン)、結腸ガン、小腸ガン(回腸のガン、特に、小腸腺ガンおよび回腸の腺ガンを含む)、精巣胎児性ガン、胎盤性絨毛ガン、子宮頸ガン、精巣ガン(特に、精巣セミノーマ、精巣奇形腫および胎芽性精巣ガン)、子宮ガン、胚細胞腫瘍(例えば、奇形ガンまたは胚性ガン腫など、特に、精巣の胚細胞腫瘍)、および、それらの転移形態物からなる群から選択されるガンのガン細胞である。

【0035】

1つの実施形態において、前記結合剤は、N末端の分泌シグナルおよび/またはC末端のヒスチジンエピトープタグ(好ましくはヒシジン(hisidin)が6個のエピトープタグ)を有する。

10

【0036】

1つの局面において、本発明は、本発明の結合剤をコードする組換え核酸に関連する。1つの実施形態において、組換え核酸はベクターの形態である。1つの実施形態において、組換え核酸はRNAである。

【0037】

1つの局面において、本発明は、本発明の組換え核酸を含む宿主細胞に関連する。

【0038】

1つの局面において、本発明は、治療において使用されるための、特に、ガンを処置することまたは防止することにおいて使用されるための本発明の結合剤、本発明の組換え核酸または本発明の宿主細胞に関連する。

20

【0039】

1つの局面において、本発明は、本発明の結合剤、本発明の組換え核酸または本発明の宿主細胞を含む医薬組成物に関連する。

【0040】

1つの局面において、本発明は、本発明の医薬組成物を患者に投与することを含む、ガン疾患を処置するか、または防止する方法に関連する。

【0041】

1つの実施形態において、前記ガンの細胞は、前記結合剤が結合することができるクローデインを発現する。

30

【0042】

1つの実施形態において、前記クローデインはCLDN18.2であり、かつ、前記ガンは、胃ガン、食道ガン、膵臓ガン、肺ガン(例えば、非小細胞肺ガン(NSCLC)など)、乳ガン、卵巣ガン、結腸ガン、肝ガン、頭頸部ガン、胆嚢のガン、ならびに、それらの転移物、クルケンベルグ腫瘍、腹膜転移物および/またはリンパ節転移物からなる群から選択される。

【0043】

1つの実施形態において、前記クローデインはCLDN6であり、かつ、前記ガンは、膀胱ガン、卵巣ガン(特に、卵巣腺ガンおよび卵巣奇形ガン)、肺ガン(小細胞肺ガン(SCLC)および非小細胞肺ガン(NSCLC)を含むが、特に、扁平上皮肺ガンおよび扁平上皮肺腺ガン)、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン(特に、基底細胞ガンおよび扁平上皮ガン)、悪性メラノーマ、頭頸部ガン(特に、悪性多形性腺腫)、肉腫(特に、滑膜肉腫および滑膜ガン肉腫)、胆管ガン、膀胱のガン(特に、移行上皮ガンおよび移行上皮乳頭状ガン)、腎臓ガン(特に、腎明細胞ガンおよび乳頭状腎細胞ガンを含む腎細胞ガン)、結腸ガン、小腸ガン(回腸のガン、特に、小腸腺ガンおよび回腸の腺ガンを含む)、精巣胎児性ガン、胎盤性絨毛ガン、子宮頸ガン、精巣ガン(特に、精巣セミノーマ、精巣奇形腫および胎芽性精巣ガン)、子宮ガン、胚細胞腫瘍(例えば、奇形ガンまたは胚性ガン腫など、特に、精巣の胚細胞腫瘍)、および、それらの転移形態物からなる群から選択される。

40

【0044】

50

1つの態様において、本発明は、本明細書中に記載される処置方法において使用されるための本明細書中に記載されるような結合剤、または、該結合剤をコードする本明細書中に記載されるような核酸、または、本明細書中に記載されるような宿主細胞を提供する。1つの実施形態において、本発明は、本明細書中に記載される処置方法において使用されるための本明細書中に記載されるような医薬組成物を提供する。

【0045】

本発明によれば、CLDN18.2は好ましくは、配列番号1によるアミノ酸配列を有し、CLDN6は好ましくは、配列番号2または配列番号3によるアミノ酸配列を有する。

【0046】

本発明の他の特徴および利点が下記の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】TAA CLDN18.2を標的化する組換えbi-scFvタンパク質の設計を例示するモジュール配置図。抗TAA可変領域に関する(A)N末端位置および(B)C末端位置におけるbi-scFvの設計。抗CLDN18.2のVH領域およびVL領域が、モノクローナルなCLDN18.2抗体(mCLDN18.2ab)の配列から作製される。抗CD3は、下記のモノクローナルなCD3抗体の配列から作製されるVH領域およびVL領域を包括的に表す：UCHT1-HU(ヒト化mAB)、UCHT1、CLB-T3、TR66、145-2C11。Bi-scFvは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；Hisはヘキサヒスチジルタグを示す；HUは、ヒト化されたことを示す；LLは、長いリンカー(15個~18個のアミノ酸)を示す；Secは分泌シグナルを示す；SLは、短いリンカー(5個~6個のアミノ酸)を示す；TAAは腫瘍関連抗原を示す；Vは抗体の重(H)鎖および軽(L)鎖の可変領域を示す。

【図2】特異的な標的細胞溶解に対するドメイン配向および抗CD3-scFv選抜の影響：5'-mCLDN18.2abVH-VL__TR66VH-VL-3'型bi-scFvの1BiMABおよびno.15が最も強力な変化体である。CLDN18.2およびCD3に対して向けられるいくつかのbi-scFv変化体を、それらの効力を細胞傷害性アッセイにおいて比較するためにHEK293T細胞において一過性に発現させ、Ni-NTAカラムを用いて小規模精製した。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞で、ルシフェラーゼを安定的に発現するNugC4細胞を標的細胞として選んだ。ヒトT細胞および標的細胞を96ウエル形式において5ng/mlのそれぞれのbi-scFvタンパク質とともに5:1のE:T比でインキュベーションした。陰性コントロールとして、発現されないTAAを標的化するno.35、ならびに、no.11およびno.16(これらはともに、ヒトT細胞ではなく、マウスT細胞を標的化する)を選んだ。それぞれ試験サンプルを六連で置床し、L_{min}のためのコントロールサンプルを九連で置床した。分析前の共インキュベーション時間が、8時間、16時間および24時間であった。ルシフェリン溶液を所与の時点で加えた後、発光を、Infinite M200 TECANリーダーで測定した。特異的な標的細胞溶解を、コントロールbi-scFvのno.35(L_{min})を用いたサンプルに対する正規化によって計算した。最も強力なbi-scFvタンパク質、すなわち、1BiMABおよびno.15は、ドメイン配向およびmAB TR66の抗CD3起源がともに同じであり、しかし、それらのコドン最適化(HSおよびCHO、それぞれ)および長いリンカー配列において異なる。CHOはチャイニーズハムスター卵巣を示す；mABはモノクローナル抗体を示す；HUは、ヒト化されたことを示す；TAAは腫瘍関連抗原を示す。

【図3】bi-scFvタンパク質1BiMABのクーマシーゲルおよびウエスタンブロット分析。1BiMABを安定的に発現するモノクローナルなHEK293細胞のFCS非含有上清をNi-NTAアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)により精製した。種々の精製段階のアリコート(4-12% Bis-Trisゲル)に負荷した。(A

10

20

30

40

50

細胞上清、溶出液の素通り画分および8個の分画物のクーマシー染色。最初に溶出されたピークの分画物を捨て、2番目に溶出されたピークの分画物をさらなる研究のためにプールし、PBSに対して透析し、続いて、200mMアルギニン緩衝液に対して透析した。(レーン1: HEK293/1BiMAB SN; レーン2: IMA C素通り画分; レーン3~レーン4: 溶出ピーク1の分画物(これらは捨てられた); レーン5~レーン10: 溶出ピーク2の分画物(これらはプールされた)) (B)3回の独立した精製から得られる0.5 μ gの1BiMABのウエスタンブロット分析(レーン1、レーン2、レーン3)。検出を一次のモノクローナル抗His抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。IMA Cは固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを示す; PBSはリン酸塩緩衝化生理的食塩水を示す; SNは上清を示す; WBはウエスタンブロットを示す。

【図4A】bi-scfvタンパク質1BiMABはCLDN18.2発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

【図4B】bi-scfvタンパク質1BiMABはCLDN18.2発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

【図4C】bi-scfvタンパク質1BiMABはCLDN18.2発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

【図4D】bi-scfvタンパク質1BiMABはCLDN18.2発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。(A)CLDN18.2を内因的に発現する 2.5×10^5 個のNugC4細胞を、50 μ g/mlの1BiMAB、または、陽性コントロールとしての10 μ g/mlのmCLDN18.2ab、および、それらの対応するAPCコンジュゲート化二次抗体とインキュベーションした。コントロール染色には、単独での二次のAPCコンジュゲート化抗体(g-a-h、g-a-m)、抗Hisおよびg-a-m APC、または、1BiMABおよびg-a-m APCが含まれた。分析をフローサイトメトリーにより行った。APCシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。(B)CLDN18.2を内因的に発現する 1×10^5 個のNugC4細胞を、増大する1BiMAB濃度(20pg/ml~20 μ g/ml)、抗Hisおよびg-a-m APCにより染色した。陰性コントロールとして、細胞を抗Hisおよびg-a-m APCとインキュベーションした。陽性コントロールとして、mCLDN18.2abおよびg-a-h APCを使用した。APCシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。(C) 1×10^6 個のヒトT細胞を、増大する1BiMAB濃度(2ng/ml~2 μ g/ml)、抗Hisおよびg-a-m APCとインキュベーションした。陰性コントロールとして、細胞を、抗Hisおよびg-a-m APC、または、単独でのg-a-m APCとインキュベーションした。APCシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。(D) 1×10^5 個のCLDN18.2陰性PA-1細胞を、増大する1BiMAB濃度(10ng/ml~10 μ g/ml)、抗Hisおよびg-a-m APCとインキュベーションした。陰性コントロールとして、細胞を、抗Hisおよびg-a-m APC、または、単独でのg-a-h APCにより染色した。10 μ g/mlのmCLDN18.2abおよびg-a-h APCを使用して、細胞のCLDN18.2陰性を確認した。g-a-hはヤギ抗ヒトを示す; g-a-mはヤギ抗マウスを示す; MFIは平均蛍光強度を示す; TLはTリンパ球を示す。

【図5】bi-scfvタンパク質1BiMABはT細胞のクラスター化をCLDN18.2陽性標的細胞の表面で引き起こす。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞を6ウェルプレートにおいて、1ng/mlおよび1 μ g/mlの1BiMAB、ならびに、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と24時間インキュベーションした。単独でのT細胞(TL)、単独での標的細胞(NugC4)、および、標的細胞を伴うヒトT細胞(-ctrl)をコントロールサンプルとして選んだ。24時間後、サンプルを、Nikon Eclipse Ti顕微鏡で200xの倍率により写真撮影した。白の矢印は標的細胞上のT細胞のクラスターを示す。TLはTリンパ球を示す。

10

20

30

40

50

【図6】1BiMABはT細胞活性化を用量依存的様式で媒介する。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞を24ウエル形式において二連で、増大する濃度のbi-scFvタンパク質1BiMAB(0.001ng/ml~1000ng/ml)および5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と24時間および48時間インキュベーションした。コントロールとして、ヒトT細胞を、1BiMABによって媒介されるT細胞の標的依存的活性化を確認するためにNugC4標的細胞を伴うことなく1ng/ml~1000ng/mlの1BiMABとインキュベーションした。24時間後(A)および48時間後(B)、T細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD25-PEおよび抗CD69-APCにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。TLはTリンパ球を示す。

10

【図7】1BiMABは、CLDN18.2の高発現細胞株、低発現細胞株および非発現細胞株との長期間のインキュベーションの後でさえ、厳密に標的依存的なT細胞活性化を媒介する。(A)6つの腫瘍細胞株の総RNAからもたらされるRT-PCRデータが示される。ハウスキーピング遺伝子HPRTに対して正規化されるCLDN18.2発現のCt値が2つの独立した実験から計算されている。乳ガン細胞株MCF7(灰色棒)を陰性のCLDN18.2発現コントロール細胞株として選んだ。(B)(A)からのガン細胞株を6ウエル形式において二連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞を伴って、または伴うことなく、5ng/mlのbi-scFvタンパク質1BiMABと144時間インキュベーションした。T細胞を、抗CD3-FITC、抗CD25-PEおよび抗CD69-APCにより標識して、全T細胞集団(CD3)、T細胞の初期活性化(CD69)および後期活性化(CD25)をフローサイトメトリーによって分析した。TLはTリンパ球を示す。

20

【図8】1BiMABはT細胞の増殖およびグランザイムBのアップレギュレーションをCLDN18.2陽性標的細胞の存在下でのみ誘導する。(A)ヒトT細胞をCFSE染色し、単独で(TL)、あるいは、1ng/mlの1BiMABの存在下(TL+1ng/ml 1BiMAB)、NugC4細胞の存在下(TL+NugC4)、または、NugC4細胞および1ng/mlの1BiMABの存在下(TL+1ng/ml 1BiMAB+NugC4)で120時間培養した。5:1のエフェクター対標的比を選択した。T細胞の増殖を示すCFSEシグナルの低下をフローサイトメトリーによって分析した。(B)ヒトT細胞を、NugC4標的細胞を伴って、または伴うことなく、かつ、5ng/mlのbi-scFv 1BiMABタンパク質を伴って、または伴うことなくインキュベーションした。エフェクター対標的比が6ウエル形式において5:1であった。96時間の共インキュベーションの後、T細胞を集め、抗GrB-PEにより細胞内染色し、フローサイトメトリーによって分析した。抗GrB-PEシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。非染色サンプル(TL+NugC4+5ng/ml 1BiMAB)のシグナルをすべてのサンプルから差し引いた。CFSEはカルボキシフルオレセインスクシニミジルエステルを示す; GrBはグランザイムBを示す; MFIは平均蛍光強度を示す; PEはフィコエリトリンを示す; TLはTリンパ球を示す。

30

【図9】48時間後における特異的な標的細胞溶解についての1BiMABのEC₅₀はおおよそ10pg/mlである。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞で、ルシフェラーゼを安定的に発現するNugC4細胞を96ウエル形式において三連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞を伴って、増大する濃度(0.001ng/ml~1000ng/ml)でのbi-scFvタンパク質1BiMABと24時間および48時間インキュベーションした。最小溶解(L_{min})コントロールとして、エフェクター細胞および標的細胞を、bi-scFv 1BiMABを伴うことなく置床した。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加の直前に、エフェクター細胞および標的細胞をbi-scFvの非存在下で含有するコントロールウエルに加えることによって達成した。ルシフェリン溶液を加えた後、発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーで24時間後および48時間後に測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の

40

50

式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min}} - L_{\text{max}})] \times 100$ 。値を1 BiMAB濃度の \log_{10} に対してプロットした。 EC_{50} は50%最大有効濃度を示す；Lは溶解を示す。

【図10A】1 BiMABはインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図10B】1 BiMABはインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図10C】1 BiMABはインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図10D】1 BiMABはインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。 NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG)マウスに、CLDN18.2を安定的に発現する 1×10^7 個のHEK293をSC注入した。5日後、 2×10^7 個のヒトPBMCエフェクター細胞をG3群およびG4群にIP注入し、コントロール群(G1およびG2)はPBSのみを受けた。動物あたり $5 \mu\text{g}$ のbi-scfvタンパク質1 BiMAB、または、コントロールとしてのビヒクルの毎日のIP適用を翌日から開始した。治療を22日間にわたって施し、腫瘍体積を、カリパスを使用して測定し、下記の式によって計算した： $\text{mm}^3 = \text{長さ}(\text{mm}) \times \text{幅}(\text{mm}) \times (\text{幅}(\text{mm}) / 2)$ 。(A)マウス個々の腫瘍体積および群あたりのメジアンが、0日目および15日目の処置日(上段列)、ならびに、処置終了後の3日および13日(下段列)について示される。(B)ヒトエフェクター細胞が移植される2つの処置群の平均腫瘍体積が示される。ダッシュ記号は、屠殺された動物を示す。(C)すべての群を腫瘍接種日から41日目まで示す Kaplan-Meier 生存曲線。動物を、腫瘍体積が 500mm^3 を超えるとすぐに屠殺した。41日目の後、すべての残存動物を、マウスの脾臓におけるヒトエフェクター細胞の生着を分析するために屠殺した。(D)すべてのマウスの脾細胞を単離し、ヒトT細胞をフローサイトメトリーによって検出するために抗CD45-APCおよび抗CD3-FITCにより染色した。メジアン生着がボックスプロット図で示される。Gは群を示す；IPは腹腔内を示す；PBMCは末梢血単核細胞を示す；PBSはリン酸塩緩衝化生理的食塩水を示す；SCは皮下を示す。

【図11】TAA CLDN6を標的化する組換えbi-scfvタンパク質の設計を例示するモジュール配置図。抗TAA可変領域に関する(A)N末端位置および(B)C末端位置におけるbi-scfvの設計。抗CLDN6のVH領域およびVL領域が、モノクローナルなCLDN6抗体(mCLDN6ab)の配列から作製される。抗CD3のVH領域およびVL領域が、モノクローナルなCD3抗体TR66の配列から作製される。Bi-scfvは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；Hisはヘキサヒスチジルタグを示す；LLは、長いリンカー(15個~18個のアミノ酸)を示す；Secは分泌シグナルを示す；SLは、短いリンカー(5個のアミノ酸)を示す；TAAは腫瘍関連抗原を示す；Vは抗体の重(H)鎖および軽(L)鎖の可変領域を示す。

【図12】bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3はT細胞のクラスター化をCLDN6陽性標的細胞の表面で引き起こす。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を6ウエルプレートにおいて、 50ng/ml の6PHU5または6PHU3、および、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と24時間インキュベーションした。単独でのT細胞(TL)、単独での標的細胞(PA-1)、および、標的細胞を伴うヒトT細胞(-ctrl)をコントロールサンプルとして選んだ。24時間後、サンプルを、Nikon Eclipse Ti顕微鏡で $200 \times$ の倍率により写真撮影した。白の矢印は標的細胞上のT細胞のクラスターを示す。TLはTリンパ球を示す。

【図13】効力に対するドメイン配向の影響：bi-scfvタンパク質6PHU3は、T細胞活性化を誘導することにおいて6PHU5よりもわずかに効率的である。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を6ウエル形式において二連で、増大する濃度($5 \text{ng/ml} \sim 200 \text{ng/ml}$)の6PHU5または6PHU3および5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と44時間インキュベーションした。コントロールとして、ヒトT細胞を、標的細胞を伴うことなく、 100ng/ml および 200ng/ml の6PHU5または6PHU3とインキュベーションした。44時間後、T細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD25-PEおよび抗CD69-APCにより標識した。用量依存

10

20

30

40

50

的なT細胞活性化をフローサイトメトリーによって分析した。Huはヒトを示す；TLはTリンパ球を示す。

【図14】6PHU3タンパク質のクーマシーゲルおよびウエスタンブロット分析。6PHU3を安定的に発現するポリクローナルなHEK293細胞のFCS非含有上清をNi-NTAアフィニティークロマトグラフィー（IMAC）により精製した。種々の精製段階のアリコート（4-12% Bis-Trisゲル）に負荷した。（A）細胞上清、溶出液の素通り画分および9個の分画物のクーマシー染色。最初に溶出されたピークの分画物を捨て、2番目および3番目に溶出されたピークの分画物をさらなる研究のためにプールし、PBSに対して透析し、続いて、200mMアルギニン緩衝液に対して透析した。（レーン1：HEK293/6PHU3 SN；レーン2：IMAC素通り画分；レーン3～レーン5：溶出ピーク1の分画物（これらは捨てられた）；レーン6～レーン11：溶出ピーク2および溶出ピーク3の分画物（これらはプールされた））（B）2回の独立した精製から得られる0.5μgの6PHU3のウエスタンブロット分析。検出を一次のモノクローナル抗His抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。IMACは固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを示す；PBSはリン酸塩緩衝化生理的食塩水を示す；SNは上清を示す；WBはウエスタンブロットを示す。

10

【図15A1】bi-scfvタンパク質6PHU3はCLDN6発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

【図15A2】bi-scfvタンパク質6PHU3はCLDN6発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

20

【図15B】bi-scfvタンパク質6PHU3はCLDN6発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。

【図15C】bi-scfvタンパク質6PHU3はCLDN6発現標的細胞およびヒトT細胞に効率的かつ特異的に結合する。（A）CLDN6を内因的に発現する 1×10^5 個のPA-1細胞およびOV-90細胞を、増大する濃度の6PHU3またはコントロールbi-scfvの1BiMAB（ $10 \text{ ng/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ）および $10 \mu\text{g/ml}$ のmCLDN6abまたはコントロールmABのmCLDN18.2abと、それらの対応するAPCコンジュゲート化二次抗体を伴ってインキュベーションした。コントロール染色は単独での二次のAPCコンジュゲート化抗体（g-a-h、g-a-m）であった。分析をフローサイトメトリーにより行った。APCシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。（B） 5×10^5 個のヒトT細胞を、増大する6PHU3濃度（ $100 \text{ ng/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ）、抗Hisおよびg-a-mPEとインキュベーションした。陰性コントロールとして、細胞を、抗Hisおよびg-a-mPE、または、単独でのg-a-mPEとインキュベーションした。PEシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。（C） 1×10^5 個のCLDN6陰性NuG4細胞を、増大する6PHU3濃度および1BiMAB濃度（ $10 \text{ ng/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ）、抗Hisおよびg-a-m APCとインキュベーションした。陰性コントロールとして、細胞を単独でのg-a-m APCとインキュベーションした。 $10 \mu\text{g/ml}$ のmCLDN6abおよびg-a-h APCを使用して、細胞のCLDN6陰性を確認した。陽性コントロールとして、mCLDN18.2abおよびg-a-h APCを使用した。APCシグナルのMFIをFlowJoソフトウェアによって計算した。APCはアロフィコシアニンを示す；g-a-hはヤギ抗ヒトを示す；g-a-mはヤギ抗マウスを示す；mABはモノクローナル抗体を示す；MFIは平均蛍光強度を示す；PEはフィコエリトリンを示す；TLはTリンパ球を示す。

30

40

【図16】6PHU3はT細胞活性化を用量依存的様式で媒介する。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を24ウエル形式において二連で、増大する濃度のbi-scfvタンパク質6PHU3（ $0.001 \text{ ng/ml} \sim 1000 \text{ ng/ml}$ ）および5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と24時間および48時間インキュベーションした。コントロールとして、ヒトT細胞を、6PHU3によって媒介されるT細胞の標的依

50

存的活性化を確認するためにPA-1標的細胞を伴うことなく1ng/ml~1000ng/mlの6PHU3とインキュベーションした。24時間後(A)および48時間後(B)、T細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD25-PEおよび抗CD69-APCにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。TLはTリンパ球を示す。

【図17】48時間後における特異的な標的細胞溶解についての6PHU3のEC₅₀がおおよそ10pg/mlである。ルシフェラーゼを安定的に発現する、CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を96ウェル形式において三連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞を伴って、増大する濃度(0.001ng/ml~1000ng/ml)での6PHU3タンパク質と24時間および48時間インキュベーションした。最小溶解コントロール(L_{min})として、エフェクター細胞および標的細胞を、bi-scfv 6PHU3を伴うことなく置床した。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加の直前に、エフェクター細胞および標的細胞をbi-scfvの非存在下で含有するコントロールウェルに加えることによって達成した。ルシフェリン溶液を加えた後、発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーで24時間後および48時間後に測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min}} - L_{\text{max}})] \times 100$ 。値を6PHU3濃度のlog₁₀に対してプロットした。EC₅₀は50%最大有効濃度を示す；Lは溶解を示す。

【図18A】6PHU3はインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図18B】6PHU3はインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図18C】6PHU3はインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。

【図18D】6PHU3はインビボ治療効力を進行SC腫瘍モデルにおいて示す。NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスに、CLDN6を内因的に発現する1×10⁷個のPA-1をSC注入した。15日後、2×10⁷個のヒトPBMCをG3群およびG4群にIP注入し、コントロール群(G1およびG2)はPBSのみを受けた。動物あたり5μgの6PHU3、あるいは、コントロールとしてのコントロールbi-scfvの1BiMABまたは単独でのビヒクルの毎日のIP適用をPBMC注入の5日後から開始した。治療を25日間にわたって施し、腫瘍体積を、カリパスを使用して測定し、下記の式によって計算した： $\text{mm}^3 = \text{長さ}(\text{mm}) \times \text{幅}(\text{mm}) \times (\text{幅}(\text{mm}) / 2)$ 。(A)マウス個々の腫瘍体積および群あたりのメジアンが、0日目および14日目の処置日(上段)ならびに21日目および25日目の処置日(下段)について示される。(B)すべての処置群の平均腫瘍体積が示される。ダッシュ記号は、屠殺された動物を示す。(C)腫瘍接種日から45日目までのすべての群のカプラン・マイヤー生存曲線が示される。動物を、腫瘍体積が1500mm³を超えたときに屠殺した。45日目の後、すべての残存動物を、マウスに脾臓におけるヒトエフェクター細胞の生着を分析するために屠殺した。(D)すべてのマウスの脾細胞を単離し、ヒトT細胞をフローサイトメトリーによって検出するために抗CD45-APCおよび抗CD3-FITCにより染色した。メジアン生着がボックスプロット図で示される。IPは腹腔内を示す；PBMCは末梢血単核細胞を示す；PBSはリン酸塩緩衝化生理的食塩水を示す；SCは皮下を示す。

【図19AB】6PHU3処置に対する応答における、SC PA-1腫瘍の中への高まったT細胞浸潤。

【図19CD】6PHU3処置に対する応答における、SC PA-1腫瘍の中への高まったT細胞浸潤。

【図19E】6PHU3処置に対する応答における、SC PA-1腫瘍の中への高まったT細胞浸潤。NSGマウスに、CLDN6を内因的に発現する1×10⁷個のPA-1をSC注入した。15日後、2×10⁷個のヒトPBMCをG3群およびG4群にIP注入し、コントロール群(G1およびG2)はPBSのみを受けた。動物あたり5μgの6PHU3、あるいは、コントロールとしてのコントロールbi-scfvの1BiMAB

10

20

30

40

50

Bまたは単独でのビヒクルの毎日のIP適用をPBM C注入の5日後から開始した。腫瘍を、サイズが1500mm³となったときまたは実験が終了したときに解剖し、パラフィン包埋化のために4%の緩衝化ホルムアルデヒド溶液において保存した。SCPA-1腫瘍のパラフィン包埋された腫瘍組織を免疫組織化学的染色に供した。連続切片をポリクローム一次抗体の抗クローディン6または抗ヒトCD3のどちらかにより染色した。一次抗体を、二次のHRPコンジュゲート化抗ウサギ抗体を使用して検出した。A~Eの上段列はCLDN6染色を示し、下段列はCD3染色を示す。画像を、Miraxスキャナーを用いて取り込んだ。(A)および(B)は、ヒトエフェクター細胞を全く受けず、かつ、ビヒクルまたはbi-scfv 6PHU3を受けたPBSコントロール群のG1およびG2をそれぞれ示す。(C)は、ヒトエフェクター細胞およびビヒクルを処置として受けたコントロール群G3を示す。(D)は、ヒトエフェクター細胞およびbi-scfv 6PHU3を処置として受けた群G4を示す。(E)は、ヒトエフェクター細胞およびコントロールbi-scfv 1BiMABを受けたコントロール群G5を示す。陽性シグナルが赤色の染色として現れる。黒の矢印はCD3シグナルの実例を示す。IPは腹腔内を示す；PBM Cは末梢血単核細胞を示す；PBSはリン酸塩緩衝化生理的食塩水を示す；SCは皮下を示す。

【図20】TAA CLDN18.2を標的化するbi-scfv抗体をコードするIVT-RNA分子の概略的例示。抗CLDN18.2bi-scfv抗体をコードするインビトロ転写されたRNA配列の略図。(A)抗TAA可変領域に関する5'側位置および3'側位置におけるIVT-mRNA。(B)抗TAA可変領域に関する5'側位置におけるIVTアルファウイルスレプリコン。抗CLDN18.2のVH領域およびVL領域をモノクローナルなCLDN18.2抗体(mCLDN18.2ab)の配列から作製した。"Cap"が、ARCA、ベータ-S-ARCA(D1)またはベータ-S-ARCA(D2)に代わって一律に使用される。(A)において、"anti-CD3"は、下記のモノクローナルなCD3抗体の配列から作製されるVH領域およびVL領域を包括的に表す：UCHT1-HU(ヒト化mAB)、UCHT1、CLB-T3、TR66、145-2C11。(B)において、"anti-CD3"は、TR66に由来するVHおよびVLのみを表す。Aはアデニンを示す；bi-scfvは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；hAgはヒトアルファグロビンの5'-UTRを示す；hBgはヒトベータグロビンの3'-UTRを示す；Hisはヘキサヒスチジルタグを示す；IVTは、インビトロ転写されたことを示す；LLは、長いリンカー(15個~18個のアミノ酸)を示す；nsP1~4は非構造タンパク質1~4を示す；Secは分泌シグナルを示す；sgPはサブゲノムプロモーターを示す；SLは、短いリンカー(5個~6個のアミノ酸)を示す；TAAは腫瘍関連抗原を示す；UTRは非翻訳領域を示す；Vは抗体の重(H)鎖および軽(L)鎖の可変領域を示す。

【図21】標的依存的なT細胞活性化および特異的な標的細胞溶解に対するドメイン配向および抗CD3-scfv選抜の影響。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞を、それらの効力を細胞傷害性アッセイにおいて比較するために、CLDN18.2およびCD3に対して向けられるいくつかのbi-scfv変化体により一過性にトランスフェクションした。変化体につき、5x10⁶個のNugC4細胞を20μg/mlのIVT-mRNAによりエレクトロポレーションした。トランスフェクションされた標的細胞を計数し、1x10⁵個の細胞を6ウェルプレートあたり播種し、5:1のE:T比でヒト細胞傷害性T細胞(CD8⁺の選択されたT細胞)とインキュベーションした。陰性コントロールとして、発現されないTAAを標的化するbi-scfv IVT-mRNA(control)と、CLDN18.2を標的化し、しかし、T細胞を標的化しない元のIgG mABのchCLDN18.2ab(control IgG)とを選んだ。1BiMABタンパク質が5ng/mlの濃度で陽性コントロールとして役立った。バックグラウンドでの死細胞の参照として、エレクトロポレーションされた標的細胞を、T細胞を伴うことなく播種し、また、バックグラウンドでの活性化の参照として、T細胞を、標的細胞を伴うことなく播種した。それぞれのサンプルを二連で播種した。48時間後、T細胞

10

20

30

40

50

および標的細胞を集め、抗CD3 - FITC、抗CD25 - PE、抗CD69 - APCおよび生死染色のための7 -AADにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。(A) TAA依存的なbi - scFv媒介のT細胞活性化がすべての抗CLDN18 . 2 bi - scFv変化体により認められた。(B) 特異的な標的細胞溶解を、7 -AAD参照集団を7 -AADサンプル標的細胞集団から差し引くことによって求めた。わずかなより大きい標的細胞溶解を引き起こすbi - scFv抗体、すなわち、1BiMABおよびno . 5は、ドメイン配向およびmAB TR66の抗CD3起源がともに同じであり、しかし、それらのコドン最適化(HSおよびCHO、それぞれ)および長いリンカー配列において異なる。bi - scFvは二重特異性単鎖可変フラグメントを示す；ctrlはコントロールを示す；IgGは免疫グロブリンGを示す；IVTは、インビトロ転写されたことを示す；mRNAはメッセンジャーRNAを示す；TLはTリンパ球を示す。

【図22】1BiMABのIVT - mRNAによりトランスフェクションされる標的細胞とヒトT細胞との共インキュベーションはT細胞のクラスター化を引き起こす。CLDN18 . 2を内因的に発現するNugC4細胞を、80 μ g / mlの1BiMAB IVT - mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションし、96ウェルプレートにおいて5 : 1のエフェクター対標的比でのヒト細胞傷害性T細胞(CD8⁺の選択されたT細胞)と共インキュベーションした。陰性コントロールサンプルとして、発現されないTAAを標的化するbi - scFv IVT - mRNAによりトランスフェクションされたNugC4標的細胞(-ctrl)で、ヒト細胞傷害性T細胞と共インキュベーションされるものを使用した(上段列、左側)。下段列は、コントロールbi - scFvのIVT - mRNA(左側)または1BiMABのIVT - mRNA(右側)によりトランスフェクションされたNugC4細胞で、ヒトT細胞を伴わないものを示す。24時間の共インキュベーションの後、サンプルを、Nikon Eclipse Ti顕微鏡により200xの倍率で写真撮影した。白の矢印は標的細胞上のT細胞のクラスターを示す。CTLは細胞傷害性Tリンパ球を示す；ctrlはコントロールを示す；huはヒトを示す。

【図23】IVT - mRNAによるトランスフェクションの後の標的細胞によって分泌される1BiMABはT細胞の活性化を濃度依存的様式で媒介する。CLDN18 . 2を内因的に発現するNugC4細胞を、0 . 4 μ g / ml ~ 40 μ g / mlの1BiMAB IVT - mRNAおよび適量のルシフェラーゼIVT - mRNAを含有する合計で40 μ g / mlのIVT - mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションされた標的細胞を6ウェルプレートにおいて二連で、5 : 1のエフェクター対標的比でのヒト細胞傷害性T細胞(CD8⁺の選択されたT細胞)と共インキュベーションした。T細胞活性化の参照として、ヒトT細胞を、40 μ g / mlのルシフェラーゼIVT - mRNA(0 . 0 μ g / mlの1BiMAB IVT - mRNA)によりトランスフェクションされるNugC4標的細胞と共インキュベーションした。24時間後(A)および48時間後(B)、T細胞を集め、抗CD3 - FITC、抗CD25 - PEおよび抗CD69 - APCにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。グラフは、FlowJoソフトウェアを用いて求められる場合の陽性染色された細胞傷害性ヒトT細胞の百分率を明らかにする。IVTは、インビトロ転写されたことを示す；mRNAはメッセンジャーRNAを示す；TLはTリンパ球を示す。

【図24】IVT - mRNAによるトランスフェクションの後の標的細胞によって分泌される1BiMABは濃度依存的な標的細胞溶解を引き起こす。CLDN18 . 2を内因的に発現するNugC4細胞を、0 . 4 μ g / ml ~ 40 μ g / mlの1BiMAB IVT - mRNAおよび適量のルシフェラーゼIVT - mRNAを含有する合計で40 μ g / mlのIVT - mRNAにより、または、参照サンプルとしての40 μ g / mlのルシフェラーゼIVT - mRNAのみによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションされた標的細胞を5 : 1のエフェクター対標的比でのヒト細胞傷害性T細胞(CD8⁺の選択されたT細胞)とともに播種し、または、それぞれの個々のエレクトロポレーションによるバックグラウンドでの死んでいる標的

10

20

30

40

50

細胞の百分率を求めるためにエフェクター細胞を伴うことなく播種した。すべてのサンプルを6ウエルプレートにおいて二連で培養した。24時間後(A)および48時間後(B)、T細胞を集め、生死染色のためのヨウ化プロピジウム(PI)により標識し、フローサイトメトリーによって分析した。死んでいる(PI⁺)標的細胞の百分率をFlowJoソフトウェアにより求めた。値をさらに、それぞれの個々のバックグラウンドサンプルに対して、かつ、参照サンプルに対して正規化した。IVTは、インビトロ転写されたことを示す；mRNAはメッセンジャーRNAを示す；TLはTリンパ球を示す。

【図25】T細胞の増殖がCLDN18.2の存在下において標的細胞による1BiMAB分泌に応答して特異的に誘導される。ヒトT細胞をアッセイのためにCFSE染色した。T細胞を、標的細胞を伴うことなく(T細胞)、陽性の活性化コントロールとしての5μg/mlのOKT3および2μg/mlのCD28との組合せで(+ctrl)、または、5ng/mlの標的化しないコントロールbi-scFvとともに(-ctrlタンパク質)、または、5ng/mlの1BiMABタンパク質(1BiMABタンパク質)とともに培養した。T細胞と、CLDN18.2を過剰発現するNugC4標的細胞とを一緒に(T細胞+CLDN18.2陽性標的細胞)、何も伴うことなく(模擬)、または、5ng/mlの1BiMABタンパク質(1BiMABタンパク質)とインキュベーションした。IVT-mRNAを試験するために、NugC4細胞を、20μg/mlの1BiMAB IVT-mRNA(1BiMAB mRNA)、または、発現されないTAAを標的化するbi-scFv IVT-mRNA(-ctrl mRNA)によりトランスフェクションし、T細胞とインキュベーションした。加えて、発現されないTAAを標的化するbi-scFv IVT-mRNAによりトランスフェクションされるNugC4細胞を、5ng/mlの1BiMABタンパク質と組み合わせた(-ctrl mRNA+1BiMABタンパク質)。さらなる特異性コントロールとして、CLDN18.2を発現しない標的細胞株MDA-MB-231をT細胞と一緒に伴うサンプルを含めた(T細胞+CLDN18.2陰性標的細胞)。MDA-MB-231を処理しないで使用し、何も伴うことなく(模擬)、または、5ng/mlのコントロールbi-scFvタンパク質(-ctrlタンパク質)または5ng/mlの1BiMABタンパク質(1BiMABタンパク質)とインキュベーションしたか、あるいは、MDA-MB-231を、20μg/mlの1BiMAB IVT-mRNA(1BiMAB mRNA)、または、発現されないTAAを標的化するbi-scFv IVT-mRNA(-ctrl mRNA)によりトランスフェクションした。アッセイを96ウエルにおいて5:1のエフェクター対標的比で行い、それぞれのサンプルが三連であり、インキュベーション時間が72時間であった。T細胞の増殖を示すCFSEシグナルの低下をフローサイトメトリーによって分析し、FlowJoソフトウェアによって計算し、%増殖性T細胞としてプロットした。CFSEはカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルを示す；IVTは、インビトロ転写されたことを示す；mRNAはメッセンジャーRNAを示す。

【図26】1BiMAB分泌に対する応答におけるT細胞の活性化およびT細胞媒介の標的細胞溶解が0.3:1のエフェクター対標的比により始まる。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞を、40μg/mlの1BiMAB IVT-mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションされた標的細胞を6ウエルプレートにおいて二連で、0.3:1から10:1までの示されたエフェクター対標的比でのヒト細胞傷害性T細胞(CD8⁺の選択されたT細胞)と共インキュベーションした。参照として、ヒトT細胞を標的細胞の非存在下で培養し((A)、1:0)、また、コントロールIVT-mRNAによりトランスフェクションされる標的細胞をエフェクター細胞の非存在下で培養した((B)、0:1)。陰性コントロールとして、ヒトT細胞を、40μg/mlのルシフェラーゼIVT-mRNAによりトランスフェクションされるNugC4標的細胞(ctrl IVT-mRNA)と、10:1のE:T比で共インキュベーションした((A)および(B) ctrl IVT-mRNA、10:1)。48時間後、細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD

10

20

30

40

50

25 - PE、抗CD69 - APCおよび生死染色のためのヨウ化プロピジウム (PI) により標識し、フローサイトメトリーによって分析した。(A)は、陽性染色された細胞傷害性ヒトT細胞の百分率を示す。(B)は、死んでいる(PI⁺)標的細胞の百分率を明らかにする。すべての値をFlowJoソフトウェアにより求めた。E:Tはエフェクター対標的を示す; IVTは、インビトロ転写されたことを示す; mRNAはメッセンジャーRNAを示す; TLはTリンパ球を示す。

【図27】ヒト細胞傷害性T細胞はbi-scfvのIVT-mRNAのレシピエント細胞および産生細胞として働くことができる。ヒト細胞傷害性T細胞をCD8陽性選択によってPBMCから新たに単離し、続いて、80 μg/mlまたは240 μg/mlの1BiMAB IVT-mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションされたエフェクター細胞を6ウエルプレートにおいて二連で、5:1のエフェクター対標的比で、CLDN18.2を内因的に発現するNugC4標的細胞と共にインキュベーションした。参照として、処理されていないヒトT細胞を標的細胞とともに培養した。陰性コントロールとして、80 μg/mlまたは240 μg/mlのeGFPコントロールIVT-mRNAによりトランスフェクションされるヒトT細胞をNugC4標的細胞と共にインキュベーションした。48時間後、細胞を集め、抗CD3 - FITC、抗CD25 - PE、抗CD69 - APCおよび生死染色のためのヨウ化プロピジウム (PI) により標識し、フローサイトメトリーによって分析した。(A)は、陽性染色された細胞傷害性ヒトT細胞の百分率を示す。(B)において、参照サンプルに対して正規化される死んでいる(PI⁺)標的細胞の百分率がプロットされる。すべての値をFlowJoソフトウェアにより求めた。ctrlはコントロールを示す; IVTは、インビトロ転写されたことを示す; mRNAはメッセンジャーRNAを示す; TLはTリンパ球を示す。

【図28】1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされるCLDN18.2陰性標的細胞はT細胞によって溶解されない。ルシフェラーゼを安定的に発現するCLDN18.2陰性細胞株PA-1は標的細胞株として役立った。5 × 10⁶個のPA-1/luc細胞を合計で40 μg/mlのIVT-mRNAによりエレクトロポレーションによってトランスフェクションした。4 μg/mlおよび40 μg/mlの1BiMAB IVT-mRNA、または、陽性コントロールとしての、内因的に発現されるCLDN6を標的化する6RHU3をトランスフェクションした。bi-scfv陰性コントロールとして、発現されないTAAを標的化する40 μg/mlのbi-scfv IVT-mRNA(-ctrl)をトランスフェクションした。このIVT-mRNAは4 μg/mlのIVT-mRNAサンプルにおけるフィルアップ(fill-up)用RNAとしてもまた役立った(IVT-mRNA 4 μg/ml 1BiMAB、IVT-mRNA 4 μg/ml 6RHU3)。bi-scfv陰性コントロールによりトランスフェクションされたPA-1/luc細胞およびエフェクター細胞との組合せでの1BiMABおよび6RHU3を用いたタンパク質コントロールサンプルが含まれた。トランスフェクションされた標的細胞を5:1のエフェクター対標的比でヒト細胞傷害性T細胞(汎T細胞)とともに播種した。すべてのサンプルを96ウエル形式において三連で播種し、72時間にわたって共インキュベーションした。最小溶解コントロール(L_{min})として、それぞれの個々のトランスフェクションされた標的細胞サンプルを、エフェクター細胞を伴うことなく播種した。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加前に、エフェクター細胞および処理されていない標的細胞を含有するコントロールウエル(L_{max1})、または、処理されていない標的細胞を単独で含有するコントロールウエル(L_{max2})に加えることによって達成した。ルシフェリン溶液を加えた30分後、発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーで測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した: %特異的溶解 = [1 - (発光試験サンプル - L_{max1}) / (L_{min}試験サンプル - L_{max2})] × 100。ctrlはコントロールを示す; IVTは、インビトロ転写されたことを示す; mRNAはメッセンジャーRNAを示す

10

20

30

40

50

す。

【図29A】 *b i - s c F v* *I V T - m R N A*または*b i - s c F v* *I V T -*レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による1*B i M A B*産生の証拠。

【図29B】 *b i - s c F v* *I V T - m R N A*または*b i - s c F v* *I V T -*レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による1*B i M A B*産生の証拠。

【図29C】 *b i - s c F v* *I V T - m R N A*または*b i - s c F v* *I V T -*レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による1*B i M A B*産生の証拠。

(A) 5×10^6 個のBHK21細胞を、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ の1*B i M A B* *I V T - m R N A*または1*B i M A B* *I V T -*レプリコンRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。模擬コントロールとして、細胞を、RNAを伴うことなくエレクトロポレーションした。トランスフェクションの18時間後、上清および細胞を集めた。細胞を溶解し、上清を約50倍の濃縮に供した。処理されていない上清および濃縮された上清を、Ni-NTAプレート、抗*c h C L D N 18 . 2 a b*イデオタイプmAbおよび二次のAPコンジュゲート化抗体を使用してELISAによって分析した。2倍ずつで $2.3 \text{ ng}/\text{ml}$ から $37.5 \text{ ng}/\text{ml}$ にまで及ぶ希釈列における精製された1*B i M A B*タンパク質を標準物として使用した。(B)濃縮された上清、(A)の細胞溶解物、および、陽性コントロールとしての $0.1 \mu\text{g}$ の精製された1*B i M A B*タンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ウエスタンブロット分析を一次のモノクローナル抗*H i s*抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。(C) 5×10^6 個のBHK21細胞を、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ の1*B i M A B* *I V T - m R N A*または*n o . 25* *I V T - m R N A*によりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。模擬コントロールとして、細胞を、RNAを伴うことなくエレクトロポレーションした。トランスフェクションの48時間後、上清を集め、40倍の濃縮に供した。SN、および、陽性コントロールとしての $0.1 \mu\text{g}$ の精製された1*B i M A B*タンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ウエスタンブロット分析を一次のモノクローナル抗*H i s*抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。ctrlはコントロールを示す；mAbはモノクローナル抗体を示す；SNは上清を示す；WBはウエスタンブロットを示す。

【図30】1*B i M A B*の*b i - s c F v* *I V T - m R N A*または*I V T -*レプリコンRNAの注入はインビボ産生および検出可能な1*B i M A B* *b i - s c F v*分子をマウスにおいて引き起こす。 $10 \mu\text{g}$ の1*B i M A B* *I V T - m R N A*を、EBKの*I V T - m R N A*を伴って、または伴うことなく、あるいは、 $10 \mu\text{g}$ の1*B i M A B* *I V T -*レプリコンを、NSGマウスにIM注入した。注入の2日後、4日後および7日後に採取される血液からの血清をインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて適用した。CLDN18.2およびルシフェラーゼを安定的に発現するNuGC4-LVT-CLDN18.2/luc標的細胞を、 $20 \mu\text{l}$ のサンプル上清とともに48時間、30:1のE:T比でのヒトT細胞と共インキュベーションした。標準物1*B i M A B*タンパク質コントロール、*L m i n*および*L m a x*は、 $20 \mu\text{l}$ のNSG模擬血清を含有した。EBKはワクシニアウイルスタンパク質カクテル(E3、B-18R、K3)を示す；IMは筋肉内を示す。

【図31】TAA CLDN6を標的化する*b i - s c F v*抗体をコードする*I V T - R N A*分子の概略的例示。抗CLDN6 *b i - s c F v*抗体をコードするインビトロ転写されたRNA配列の略図。(A)抗TAA可変領域に関する5'側位置および3'側位置における*I V T m R N A*。(B)抗TAA可変領域に関する3'側位置における*I V T*アルファウイルスレプリコン。抗CLDN6のVH領域およびVL領域が、モノクローナルなCLDN6抗体(*m C L D N 6 a b*)の配列から作製される。"Cap"が、ARCA、ベータ-S-ARCA(D1)またはベータ-S-ARCA(D2)に代わって一律に使用される。抗CD3のVH領域およびVL領域が、モノクローナルなCD3抗体TR6

10

20

30

40

50

6の配列から作製される。Aはアデニンを示す；b i - s c F vは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；h A gはヒトアルファグロビンの5'-UTRを示す；h B gはヒトベータグロビンの3'-UTRを示す；H i sはヘキサヒスチジルタグを示す；I V Tは、インビトロ転写されたことを示す；L Lは、長いリンカー（15個～18個のアミノ酸）を示す；n s P 1～4は非構造タンパク質1～4を示す；S e cは分泌シグナルを示す；s g Pはサブゲノムプロモーターを示す；S Lは、短いリンカー（5個～6個のアミノ酸）を示す；T A Aは腫瘍関連抗原を示す；U T Rは非翻訳領域を示す；Vは抗体の重（H）鎖および軽（L）鎖の可変領域を示す。

【図32】抗CLDN6 b i - s c F v I V T - m R N Aによりトランスフェクションされる標的細胞とヒトT細胞との共インキュベーションはT細胞のクラスター化を引き起こす。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を、20 μg/mlの6RHU5 I V T - m R N Aまたは6RHU3 I V T - m R N Aによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションし、6ウエルプレートにおいて5：1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞（汎T細胞）と共インキュベーションした。陰性コントロールサンプルとして、発現されないTAAを標的化するb i - s c F v I V T - m R N AによりトランスフェクションされたPA-1標的細胞（- c t r l）で、ヒトT細胞と共インキュベーションされるものを使用した（上段列、左側写真）。中段列は、非処理のPA-1細胞およびヒトT細胞で、陰性コントロールとして、タンパク質を伴わない場合（模擬、左側写真）、あるいは、陽性コントロールとして、50 μg/mlの精製された抗CLDN6 b i - s c F vタンパク質の6PHU5（中央）または6PHU3（右側）を伴う場合を示す。下段列は単独での非処理のPA-1細胞（左側）およびヒトT細胞（右側）を示す。24時間の共インキュベーションの後、サンプルを、N i k o n E c l i p s e T i顕微鏡により200xの倍率で写真撮影した。白の矢印は標的細胞上のT細胞のクラスターを示す。b i - s c F vは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；c t r lはコントロールを示す；h uはヒトを示す；I V Tは、インビトロ転写されたことを示す；m R N AはメッセンジャーRNAを示す；T LはTリンパ球を示す。

【図33】効力に対するドメイン配向の影響：抗CLDN6 b i - s c F v 6RHU3による標的細胞のトランスフェクションは、6RHU5による場合よりも大きい割合の活性化されたT細胞をもたらす。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を、それらの効力をT細胞活性化アッセイにおいて比較するために、CLDN6およびCD3に対して向けられる2つのb i - s c F v変化体（6RHU5および6RHU3）により一過性にトランスフェクションした。変化体につき、 5×10^6 個のPA-1細胞を20 μg/mlのI V T - m R N Aによりエレクトロポレーションした。トランスフェクションされた標的細胞を再計数し、 1×10^5 個の細胞を6ウエルプレートあたり播種し、5：1のE：T比でヒト細胞傷害性T細胞（CD8⁺の選択されたT細胞）とインキュベーションした。陰性コントロールとして、処理されていない標的細胞（h u T L + P A - 1 非処理）と、発現されないTAAを標的化するb i - s c F v I V T - m R N Aによりトランスフェクションされる標的細胞（h u T L + P A - 1 - c t r l）とを選んだ。6PHU5タンパク質が50 ng/mlの濃度で陽性コントロールとして役立った（h u T L + P A - 1タンパク質c t r l）。さらに、T細胞を、標的細胞を伴うことなく、バックグラウンドでの活性化の参照として、6PHU5タンパク質を伴って、または伴うことなく播種した。それぞれのサンプルを二連で播種した。分析を24時間後および48時間後に行った：T細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD25-PE、抗CD69-APCおよび生死染色のための7-AADにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。TAA依存的なb i - s c F v媒介のT細胞活性化が、共インキュベーションの24時間後（A）および48時間後（B）に両方の抗CLDN6 b i - s c F v変化体により認められた。b i - s c F v 6RHU3によるトランスフェクションは、およそ20%より大きいT細胞活性化を両方の時点で引き起こした。b i - s c F vは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；c t r lはコントロールを示す；h uはヒトを示す；I V Tは、インビトロ転写されたことを示す；m R N AはメッセンジャーRNAを示

10

20

30

40

50

す；TLはTリンパ球を示す。

【図34】6RHU3の分泌はT細胞活性化を濃度依存的様式で媒介する。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ の6RHU3 IVT-mRNAと、発現されないTAAを標的化する適量のbi-scfv IVT-mRNAとを含有する合計で $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のIVT-mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。発現されないTAAを標的化する $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のbi-scfv IVT-mRNA ($0.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の6RHU3 IVT-mRNA)のトランスフェクションは、特異性コントロールとして役立った。トランスフェクションされた標的細胞を6ウエルプレートにおいて二連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒト細胞傷害性T細胞(汎T細胞)と共インキュベーションした。T細胞活性化の参照として、ヒトT細胞を、6PHU5タンパク質を伴うことなく単独で(hu TL-)、または、6PHU5タンパク質とともに培養した(hu TLタンパク質ctrl)。陰性コントロールとして、T細胞を、処理されていないPA-1標的細胞と共インキュベーションした(hu TL+PA-1-ctrl)。6PHU5タンパク質が $50\text{ng}/\text{ml}$ の濃度で陽性コントロールとして役立った(hu TL+PA-1タンパク質ctrl)。48時間後、T細胞を集め、抗CD3-FITC、抗CD25-PEおよび抗CD69-APCにより標識し、フローサイトメトリーによって分析した。グラフは、FlowJoソフトウェアにより求められる場合の陽性染色されたヒトT細胞の百分率を明らかにする。bi-scfvは二重特異性の単鎖可変フラグメントを示す；ctrlはコントロールを示す；huはヒトを示す；IVTは、インビトロ転写されたことを示す；mRNAはメッセンジャーRNAを示す；TLはTリンパ球を示す。

【図35】48時間後における特異的な標的細胞溶解についての6RHU3の EC_{50} がおおよそ $200\text{ng}/\text{ml}$ である。ルシフェラーゼを安定的に発現する、CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を、 $0.004\mu\text{g}/\text{ml} \sim 13.3\mu\text{g}/\text{ml}$ の6RHU3と、発現されないTAAを標的化する適量のbi-scfv IVT-mRNAとを含有する合計で $13.3\mu\text{g}/\text{ml}$ のbi-scfv IVT-mRNAの総濃度を用いたエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションされた標的細胞を96ウエル形式において三連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞とともに播種した。最小溶解コントロール(L_{min})として、それぞれの個々のトランスフェクションされた標的細胞サンプルを、エフェクター細胞を伴うことなく播種した。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加の直前に、エフェクター細胞および処理されていない標的細胞を含有するコントロールウエルに加えることによって達成した。ルシフェリン溶液を加えた30分後、発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーで24時間後および48時間後に測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{max}) / (L_{min} - \text{試験サンプル} - L_{max})] \times 100$ 。値を6RHU3濃度の \log_{10} に対してプロットした。 EC_{50} は50%最大有効濃度を示す；Lは溶解を示す。

【図36】T細胞の増殖がCLDN6の存在下において標的細胞による6RHU3分泌に応答して特異的に誘導される。ヒトT細胞をアッセイのためにCFSE染色した。T細胞を、標的細胞を伴うことなく(T細胞)、陽性の活性化コントロールとして $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のOKT3および $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のCD28との組合せで(+ctrl)、または、 $5\text{ng}/\text{ml}$ の標的化しないコントロールbi-scfvとともに(-ctrlタンパク質)、または、 $5\text{ng}/\text{ml}$ の6PHU3タンパク質(6PHU3タンパク質)とともに培養した。T細胞と、CLDN6を内因的に発現するPA-1標的細胞とを一緒に(T細胞+CLDN6陽性標的細胞)、何も伴うことなく(模擬)、または、 $5\text{ng}/\text{ml}$ の6PHU3タンパク質(6PHU3タンパク質)とインキュベーションした。IVT-mRNAを試験するために、PA-1細胞を、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の6RHU3 IVT-mRNA(6RHU3 mRNA)、または、発現されないTAAを標的化するbi-scfv IVT-mRNA(-ctrl mRNA)によりトランスフェクションし、T細胞とイ

10

20

30

40

50

ンキュベーションした。加えて、発現されないTAAを標的化するbi-scfv IVT-mRNAによりトランスフェクションされるPA-1細胞を、5 ng/mlの6PHU3タンパク質と組み合わせた(-ctrl mRNA+6PHU3タンパク質)。さらなる特異性コントロールとして、CLDN6を発現しない標的細胞株MDA-MB-231をT細胞と一緒に伴うサンプルを含めた(T細胞+CLDN6陰性標的細胞)。MDA-MB-231を処理しないで使用し、何も伴うことなく(模擬)、または、5 ng/mlのコントロールbi-scfvタンパク質(-ctrlタンパク質)もしくは5 ng/mlの6PHU3(6PHU3タンパク質)とインキュベーションしたが、あるいは、MDA-MB-231を、20 µg/mlの6RHU3 IVT-mRNA(6RHU3 mRNA)、または、発現されないTAAを標的化するbi-scfv IVT-mRNA(-ctrl mRNA)によりトランスフェクションした。アッセイを96ウエルにおいて5:1のエフェクター対標的比で行い、それぞれのサンプルが三連であり、インキュベーション時間が72時間であった。T細胞の増殖を示すCFSEシグナルの低下をフローサイトメトリーによって分析し、FlowJoソフトウェアによって計算し、%増殖性T細胞としてプロットした。CFSEはカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルを示す; IVTは、インビトロ転写されたことを示す; mRNAはメッセンジャーRNAを示す。

【図37A】bi-scfvのIVT-mRNAまたはIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による6RHU3翻訳の証拠。

【図37B】bi-scfvのIVT-mRNAまたはIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による6RHU3翻訳の証拠。

【図37C】bi-scfvのIVT-mRNAまたはIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされる哺乳動物細胞による6RHU3翻訳の証拠。(A) 5×10^6 個のBHK21細胞を、40 µg/mlの6RHU3 IVT-mRNAまたは6RHU3 IVT-レプリコンRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。40 µg/mlのno.25 IVT-mRNAのトランスフェクションを追加のサンプルとして含めた。模擬ctrlとして、細胞を、RNAを伴うことなくエレクトロポレーションした。トランスフェクションの18時間後、上清および細胞を集めた。細胞を溶解し、上清を約50倍の濃縮に供した。非処理の上清および濃縮された上清を、Ni-NTAプレート、抗mCLDN6 antibodyタイプmAbおよび二次のAPコンジュゲート化抗体を使用してELISAによって分析した。2倍ずつで2.3 ng/mlから150 ng/mlにまで及ぶ希釈列における精製された6PHU3タンパク質を標準物として使用した。(B)濃縮された上清、(A)の細胞溶解物、および、陽性コントロールとしての0.1 µgの精製された6PHU3タンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ウエスタンブロット分析を一次のモノクローナル抗His抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。(C) 5×10^6 個のBHK21細胞を、40 µg/mlの6RHU3 IVT-mRNAまたはno.25 IVT-mRNAによりエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。模擬コントロールとして、細胞を、RNAを伴うことなくエレクトロポレーションした。トランスフェクションの48時間後、上清を集め、40倍の濃縮に供した。SN、および、陽性コントロールとしての0.1 µgの精製された6PHU3タンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ウエスタンブロット分析を一次のモノクローナル抗His抗体および二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化抗マウス抗体により行った。ctrlはコントロールを示す; mAbはモノクローナル抗体を示す; SNは上清を示す; WBはウエスタンブロットを示す。

【図38】6RHU3 bi-scfvのIVT-mRNAまたはIVT-レプリコンRNAの注入はインビボ翻訳および検出可能なbi-scfv分子をマウスにおいて引き起こす。10 µgの6RHU3 IVT-mRNAを、EBKのIVT-mRNAを伴って、または伴うことなく、あるいは、10 µgの6RHU3 IVT-レプリコンを、NSGマウスにIM注入した。注入の7日後に採取される血液からの血清をインビトロ細胞

傷害性アッセイにおいて適用した。CLDN6を内因的に発現し、かつ、ルシフェラーゼを安定的に発現するPA-1/Luc標的細胞を、20 μ lのサンプル血清とともに48時間、30:1のE:T比でのヒトT細胞と共にインキュベーションした。標準物6PHU3タンパク質コントロール、L_{min}およびL_{max}は、20 μ lのNSG模擬血清を含有した。EBKはワクシニアウイルスタンパク質カクテル(E3、B-18R、K3)を示す；IMは筋肉内を示す。

【図39A】scFv抗CD3結合ドメインをタンパク質のC末端部分に含有する抗CLDN18.2bi-scFvタンパク質の細胞傷害性結果。

【図39B】scFv抗CD3結合ドメインをタンパク質のC末端部分に含有する抗CLDN18.2bi-scFvタンパク質の細胞傷害性結果。

【図39C】scFv抗CD3結合ドメインをタンパク質のC末端部分に含有する抗CLDN18.2bi-scFvタンパク質の細胞傷害性結果。

【図39D】scFv抗CD3結合ドメインをタンパク質のC末端部分に含有する抗CLDN18.2bi-scFvタンパク質の細胞傷害性結果。CLDN18.2およびCD3に対して向けられるbi-scFv変化体を、それらの効力を細胞傷害性アッセイにおいて比較するためにCHO細胞において一過性に発現させ、プロテイン-L樹脂により精製した。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞で、ルシフェラーゼを安定的に発現するNugC4細胞を標的細胞として選んだ。ヒトT細胞および標的細胞を96ウエル形式において、5000ng/ml、1000ng/ml、200ng/mlおよび40ng/mlのそれぞれのbi-scFvタンパク質とともに5:1のE:T比でインキュベーションした。それぞれの試験サンプルを三連で置床し、L_{min}のためのコントロールサンプルを三連で置床した。分析前の共インキュベーション時間が24時間および48時間であった。ルシフェリン溶液を所与の時点で加えた後、発光を、Infinite M200 TECANリーダーで測定した。特異的な標的細胞溶解をそれぞれの濃度について計算し、特異的な標的細胞溶解が報告された。

a. 抗CD3の可変ドメインがVH-VLのドメイン順序であり、LL4ペプチドリンカーによって隔てられる。
b. 抗CD3の可変ドメインがVH-VLの順序であり、LL4ペプチドリンカーによって隔てられる。scFv抗CD3は相互接続ジスルフィド架橋をVHドメインとVLドメインとの間に含有する。
c. 抗CD3の可変ドメインがVL-VHの順序であり、LL5ペプチドリンカーによって隔てられる。
d. 抗CD3の可変ドメインがVL-VHの順序であり、LL5ペプチドリンカーによって隔てられる。scFv抗CD3は相互接続ジスルフィド架橋をVLドメインとVHドメインとの間に含有する。

【図40】抗CLDN6 bi-scFvタンパク質を用いたルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで得られるEC₅₀値のアッセイ内比較。ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイをT細胞調製のための3名の異なるドナーに関して行った。計算されたEC₅₀値(これは、24時間および48時間のインキュベーションの後、6つの試験された抗CLDN6 bi-scFvタンパク質により計算される)が、それぞれの独立したアッセイについて報告される(A、BおよびC)。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞を96ウエル形式において三連で、増大する濃度(AおよびBについては0.025ng/ml~5000ng/ml、Cについては0.0025ng/ml~5000ng/ml)の抗CLDN6 bi-scFvタンパク質および5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞と24時間および48時間インキュベーションした。最小溶解コントロール(L_{min})として、エフェクター細胞および標的細胞を、bi-scFvタンパク質を伴うことなく置床した。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加の直前に、エフェクター細胞および標的細胞をbi-scFvの非存在下で含有するコントロールウエルに加えることによって達成した。ルシフェリン溶液を加えた30分後、発光を、24時間および48時間の標的細胞およびエフェクター細胞のインキュベーションの後、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーで測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した：%特異的溶解 = [1 - (発光試験サンプル - L_{max}) / (L_{min} - L

10

20

30

40

50

m a x)] × 1 0 0 。 E C ₅₀ は 5 0 % 最大有効濃度を示す ; L は溶解を示す ; N A は、適用されないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は下記において詳しく記載されるにもかかわらず、本明細書中に記載される特定の方法論、プロトコルおよび試薬は変化することがあるので、本発明は、本明細書中に記載される特定の方法論、プロトコルおよび試薬に限定されないことを理解しなければならない。また、本明細書中で使用される術語は、特定の実施形態を記載するという目的のためだけであり、添付された特許請求の範囲によってのみ限定されることになる本発明の範囲を限定するために意図されないことも理解しなければならない。別途定義される場合を除き、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

10

【0049】

下記において、本発明の構成要素が記載されるであろう。これらの構成要素が具体的な実施形態とともに列挙されており、しかしながら、これらは、さらなる実施形態を創出するために、どのような様式であれ、また、どのような数であれ、組み合わせられ得ることが理解されなければならない。様々に記載されている実施例および好ましい実施形態は、本発明を明示的に記載された実施形態のみに限定するために解釈してはならない。この記載は、明示的に記載された実施形態を開示されている構成要素および / または好ましい構成要素のいくつとでも組み合わせる実施形態を裏づけるために、また、包含するために理解されなければならない。そのうえ、本特許出願におけるすべての記載された構成要素のどのような並び替えおよび組合せも、文脈がそれ以外のことを示す場合を除き、本特許出願の記載によって開示されると見なされなければならない。

20

【0050】

好ましくは、本明細書中で使用される用語は、"A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)" (H. G. W. Leuenberger, B. Nagel および H. Kolbl 編、Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel、スイス、(1995)) に記載されるように定義される。

【0051】

本発明の実施では、別途示される場合を除き、この分野における文献において説明される、化学、生化学、細胞生物学、免疫学および組換え DNA 技術の従来の方法が用いられるであろう (例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版 (J. Sambrook 他編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1989) を参照のこと)。

30

【0052】

本明細書および下記の特許請求の範囲の全体を通して、文脈が他のことを要求する場合を除き、単語 "comprise" (含む) および変化形 (例えば、"comprises" および "comprising" など) は、言及されたある構成要素、整数または工程、あるいは複数の構成要素、複数の整数または複数の工程の群を包含し、しかし、何らかの他の構成要素、整数または工程、あるいは複数の構成要素、複数の整数または複数の工程の群を除外しないことを暗示することが理解されるであろう。だが、いくつかの実施形態では、そのような他の構成要素、整数または工程、あるいは複数の構成要素、複数の整数または複数の工程の群が除外される、すなわち、主題が、ある構成要素、整数または工程、あるいは複数の構成要素、複数の整数または複数の工程の群からなる場合がある。本発明を記載するという状況 (とりわけ、特許請求の範囲の文脈) で使用される用語 "a" および用語 "an" および用語 "the" ならびに類似する言及は、本明細書中に別途示される場合または文脈によって明確に矛盾する場合を除き、単数および複数の両方を包含するように解釈されなければならない。本明細書中における値の範囲の列挙は、当該範囲に含まれる

40

50

それぞれの別個の値を個々に示す簡略的方法として役立つために単に意図されるだけである。本明細書中で別途示される場合を除き、それぞれの個々の値が、その値が本明細書中に個々に列挙されていたかのように本明細書に組み込まれる。本明細書中に記載されるすべての方法が、本明細書中に別途示される場合または文脈によって明確に矛盾する場合を除き、どのような順であれ、好適な順で行われることが可能である。ありとあらゆる例、または、例示的語法（例えば、"such as"（例えば、・・・など））の使用は、本明細書中に提供される場合、単に発明をより良く例示することのみを意図し、本発明または特許請求の範囲に対し限定を置くものではない。本明細書における語法はどれも、どのような構成要素であれ、本発明の実施に不可欠である主張されていない構成要素を示すとして解釈してはならない。

10

【0053】

いくつかの文書が本明細書の本文を通して引用される。上記または下記のどちらにおいてであろうと、本明細書中に引用される文書（すべての特許、特許出願、科学的刊行物、製造者の仕様書、説明書などを含む）のそれぞれが本明細書により、それらの全体において参照によって組み込まれる。本明細書中には、本発明は、そのような開示に先行する資格が先行発明によってないということを確認するものとして解釈されるものは何もない。

【0054】

クロードインは、タイトジャンクションの最も重要な成分である一群のタンパク質であり、タイトジャンクションにおいて、これらのタンパク質は、上皮の細胞の間での細胞間隙における分子の流れを制御する傍細胞バリアを規定する。クロードインは、N端側末端およびC端側末端がともに細胞質に位置する、膜を4回またがる膜貫通タンパク質である。1番目の細胞外ループ（これはEC1またはECL1と呼ばれる）は平均して53個のアミノ酸からなり、2番目の細胞外ループ（これはEC2またはECL2と呼ばれる）は24個前後のアミノ酸からなる。クロードインファミリーの細胞表面タンパク質、例えば、CLDN6およびCLDN18.2などが、様々な起源の腫瘍において発現され、これらは、それらの選択的発現（毒性と関連した正常な組織では発現が認められない）および原形質膜への局在化のために抗体媒介のガン免疫療法に関連して標的構造物として特に適する。

20

【0055】

本発明との関連において、好ましいクロードインがCLDN6およびCLDN18.2である。CLDN6およびCLDN18.2は、腫瘍組織において示差的に発現されるとして特定されており、CLDN18.2を発現する唯一の正常な組織が胃であり、CLDN6を発現する唯一の正常な組織が胎盤である。

30

【0056】

CLDN18.2は、胃粘膜の分化した上皮細胞における正常な組織において選択的に発現される。CLDN18.2は、様々な起源のガンにおいて、例えば、膵臓ガン腫、食道ガン腫、胃ガン腫、気管支ガン腫、乳ガン腫およびENT腫瘍などにおいて発現される。CLDN18.2は原発性腫瘍の防止および/または処置のための有益な標的であり、例えば、胃ガン、食道ガン、膵臓ガン、肺ガン（例えば、非小細胞肺ガン（NSCLC）など）、卵巣ガン、結腸ガン、肝ガン、頭頸部ガンおよび胆嚢のガンならびにそれらの転移物（特に、胃ガン転移物、例えば、クルケンベルグ腫瘍、腹膜転移物およびリンパ節転移物など）などの防止および/または処置のための有益な標的である。

40

【0057】

CLDN6は、例えば、卵巣ガン、肺ガン、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン、メラノーマ、頭頸部ガン、肉腫、胆管ガン、腎細胞ガンおよび膀胱ガンにおいて発現されることが見出されている。CLDN6は、卵巣ガン（特に、卵巣腺ガンおよび卵巣奇形ガン）、肺ガン（小細胞肺ガン（SCLC）および非小細胞肺ガン（NSCLC）を含むが、特に、扁平上皮肺ガンおよび扁平上皮肺腺ガン）、胃ガン、乳ガン、肝ガン、膵臓ガン、皮膚ガン（特に、基底細胞ガンおよび扁平上皮ガン）、悪性メラノーマ、頭頸部ガン（特に、悪性多形性腺腫）、肉腫（特に、滑膜肉腫および滑膜ガン肉腫）、胆管ガン

50

、膀胱のガン（特に、移行上皮ガンおよび移行上皮乳頭状ガン）、腎臓ガン（特に、腎明細胞ガンおよび乳頭状腎細胞ガンを含む腎細胞ガン）、結腸ガン、小腸ガン（回腸のガン、特に、小腸腺ガンおよび回腸の腺ガンを含む）、精巣胎児性ガン、胎盤性絨毛ガン、子宮頸ガン、精巣ガン（特に、精巣セミノーマ、精巣奇形腫および胎芽性精巣ガン）、子宮ガン、胚細胞腫瘍（例えば、奇形ガンまたは胚性ガン腫など、特に、精巣の胚細胞腫瘍）、および、それらの転移形態物の防止および/または処置のための特に好ましい標的である。1つの実施形態において、CLDN6発現に伴うガン疾患が、卵巣ガン、肺ガン、転移性卵巣ガンおよび転移性肺ガンからなる群から選択される。好ましくは、卵巣ガンはガン腫または腺ガンである。好ましくは、肺ガンはガン腫または腺ガンであり、好ましくは細気管支ガンであり、例えば、細気管支ガン腫または細気管支腺ガンなどである。

10

【0058】

用語「CLDN」は本明細書中で使用される場合、クローディンを意味し、CLDN18.2およびCLDN6を包含する。好ましくは、クローディンはヒトのクローディンである。

【0059】

用語「CLDN18」はクローディン18を示し、これには、クローディン18のスプライス変化体1（クローディン18.1（CLDN18.1））およびクローディン18のスプライス変化体2（クローディン18.2（CLDN18.2））を含めて、どのような変化体も含まれる。

【0060】

用語「CLDN18.2」は好ましくはヒトCLDN18.2に関連し、特に、配列表の配列番号1によるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変化体を含むタンパク質、好ましくは、配列表の配列番号1によるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変化体からなるタンパク質を示す。CLDN18.2の1番目の細胞外ループは好ましくは、配列番号1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸27～アミノ酸81を含み、より好ましくは、配列番号1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸29～アミノ酸78を含む。CLDN18.2の2番目の細胞外ループは好ましくは、配列番号1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸140～アミノ酸180を含む。前記1番目の細胞外ループおよび2番目の細胞外ループは好ましくは、CLDN18.2の細胞外部分を形成する。

20

【0061】

用語「CLDN6」は好ましくはヒトCLDN6に関連し、特に、配列表の配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列あるいは前記アミノ酸配列の変化体を含むタンパク質、好ましくは、配列表の配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列あるいは前記アミノ酸配列の変化体からなるタンパク質を示す。CLDN6の1番目の細胞外ループは好ましくは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸28～アミノ酸80を含み、より好ましくは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸28～アミノ酸76を含む。CLDN6の2番目の細胞外ループは好ましくは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸138～アミノ酸160を含み、好ましくは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸141～アミノ酸159を含み、より好ましくは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸145～アミノ酸157を含む。前記1番目の細胞外ループおよび2番目の細胞外ループは好ましくは、CLDN6の細胞外部分を形成する。

30

40

【0062】

本発明による用語「変化体」は特に、変異体、スプライス変化体、立体配座体、イソ型、対立遺伝子変化体、種変化体および種ホモログを示し、特に、天然に存在するそれらを示す。対立遺伝子変化体は、遺伝子の正常な配列における変化体に関連し、だが、その意味は多くの場合に不明である。完全な遺伝子配列決定により、多くの場合、数多くの対立遺伝子変化体が所与の遺伝子について特定される。種ホモログは、所与の核酸配列または

50

アミノ酸配列の起源の種とは異なる起源の種を有する核酸配列またはアミノ酸配列である。用語「変化体」は、翻訳後修飾された変化体および立体配座変化体のどのようなものも包含するものとする。

【0063】

本明細書中に記載される結合剤の第2の標的分子がCD3（分化クラスター3）である。CD3複合体は、成熟型ヒトT細胞、胸腺細胞、および、ナチュラルキラー細胞のサブセットの表面に多分子のT細胞受容体（TCR）複合体の一部として発現される抗原を意味する。このT細胞共受容体はタンパク質複合体であり、4つの異なった鎖から構成される。哺乳動物において、この複合体は、CD3鎖、CD3鎖および2つのCD3鎖を含有する。これらの鎖は、T細胞受容体（TCR）として知られている分子および鎖と会合して、活性化シグナルをTリンパ球において生じさせる。TCR、鎖およびCD3分子が一緒になって、TCR複合体を構成する。

10

【0064】

ヒトCD3イプシロンはGenBankアクセション番号NM_000733で示され、配列番号4を含む。ヒトCD3ガンマはGenBankアクセション番号NM000073で示される。ヒトCD3デルタはGenBankアクセション番号NM_000732で示される。CD3はTCRのシグナル伝達に関わっている。LinおよびWeiss（Journal of Cell Science 114、243~244（2001））によって記載されるように、MHC提示された特異的な抗原エピトープが結合することによるTCR複合体の活性化はSrcファミリーのキナーゼによる免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）のリン酸化をもたらす。これにより、Ca²⁺放出を含むT細胞活性化をもたらすさらなるキナーゼの動員が誘発される。T細胞上におけるCD3のクラスター化、例えば、固定化された抗CD3抗体によるCD3のクラスター化により、T細胞受容体の関与と類似するが、そのクローン典型的な特異性とは無関係なT細胞活性化が引き起こされる。

20

【0065】

本明細書中で使用される場合、「CD3」はヒトCD3を包含し、多分子のT細胞受容体複合体の一部としてヒトT細胞の表面に発現される抗原を意味する。

【0066】

CD3に関して、本発明の結合剤は好ましくはCD3のイプシロン鎖を認識し、特に、CD3イプシロンの最初の27個のN末端アミノ酸またはこの27アミノ酸範囲の機能的フラグメントに対応するエピトープを認識する。

30

【0067】

本発明によれば、用語「クローディン陽性ガン」または類似する用語は、クローディンを発現するガン細胞、好ましくは、クローディンをその表面に発現するガン細胞を伴うガンを意味する。

【0068】

「細胞表面」は、この技術分野におけるその通常の意味に従って使用され、したがって、タンパク質および他の分子による結合のために接触可能である細胞の外側を包含する。

【0069】

クローディンが細胞の表面に位置し、かつ、細胞に加えられるクローディン特異的な抗体による結合のために接触可能であるならば、クローディンは前記細胞の表面に発現している。

40

【0070】

用語「細胞外部分」は本発明との関連では、細胞の細胞外空間に面し、かつ、好ましくは、前記細胞の外側から、例えば、抗原結合分子（例えば、細胞の外側に位置する抗体など）によって接触可能である分子（例えば、タンパク質など）の一部を示す。好ましくは、この用語は、1つまたは複数の細胞外ループまたは細胞外ドメインあるいはそれらのフラグメントを示す。

【0071】

50

用語「一部分」または用語「フラグメント」は本明細書中では交換可能に使用され、連続している構成要素を示す。例えば、構造物（例えば、アミノ酸配列またはタンパク質など）の一部分は、前記構造物の連続している構成要素を示す。構造物の部分、一部分またはフラグメントは好ましくは、前記構造物の1つまたは複数の機能的性質を含む。例えば、エピトープまたはペプチドの部分、一部分またはフラグメントは好ましくは、それら由来するエピトープまたはペプチドと免疫学的に同等である。タンパク質配列の一部分またはフラグメントは好ましくは、当該タンパク質配列の少なくとも6個、特に、少なくとも8個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも50個または少なくとも100個の連続するアミノ酸の配列を含む。

【0072】

本発明によれば、CLDN18.2は、発現レベルが、胃の細胞または胃の組織における発現と比較してそれよりも低いならば、細胞において実質的に発現していない。好ましくは、発現レベルは胃の細胞または胃の組織における発現の10%未満であり、好ましくは5%未満、3%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満、0.1%未満または0.05%未満であり、あるいは、それよりも一層低い。好ましくは、CLDN18.2は、発現レベルが胃以外の非ガン性組織における発現レベルを最大でも2倍しか超えていないならば、好ましくは最大でも1.5倍しか超えていないならば、好ましくは前記非ガン性組織における発現レベルを超えていないならば、細胞において実質的に発現していない。好ましくは、CLDN18.2は、発現レベルが検出限界を下回っているならば、および/または、発現レベルが低すぎて、細胞に加えられるCLDN18.2特異的抗体による結合を可能にすることができないならば、細胞において実質的に発現していない。

【0073】

本発明によれば、CLDN18.2は、発現レベルが胃以外の非ガン性組織における発現レベルを好ましくは2倍を超えて、好ましくは10倍を超えて、100倍を超えて、1000倍を超えて、または10000倍を超えて超えるならば、細胞において発現している。好ましくは、CLDN18.2は、発現レベルが検出限界を上回っているならば、および/または、発現レベルが、細胞に加えられるCLDN18.2特異的抗体による結合を可能にするために十分に高いならば、細胞において発現している。好ましくは、細胞において発現されるCLDN18.2は前記細胞の表面に発現されるか、または露出する。

【0074】

本発明によれば、CLDN6は、発現レベルが、胎盤の細胞または胎盤の組織における発現と比較してそれよりも低いならば、細胞において実質的に発現していない。好ましくは、発現レベルは胎盤の細胞または胎盤の組織における発現の10%未満であり、好ましくは5%未満、3%未満、2%未満、1%未満、0.5%未満、0.1%未満または0.05%未満であり、あるいは、それよりも一層低い。好ましくは、CLDN6は、発現レベルが胎盤以外の非ガン性組織における発現レベルを最大でも2倍しか超えていないならば、好ましくは最大でも1.5倍しか超えていないならば、好ましくは前記非ガン性組織における発現レベルを超えていないならば、細胞において実質的に発現していない。好ましくは、CLDN6は、発現レベルが検出限界を下回っているならば、および/または、発現レベルが低すぎて、細胞に加えられるCLDN6特異的抗体による結合を可能にすることができないならば、細胞において実質的に発現していない。

【0075】

本発明によれば、CLDN6は、発現レベルが胎盤以外の非ガン性組織における発現レベルを好ましくは2倍を超えて、好ましくは10倍を超えて、100倍を超えて、1000倍を超えて、または10000倍を超えて超えるならば、細胞において発現している。好ましくは、CLDN6は、発現レベルが検出限界を上回っているならば、および/または、発現レベルが、細胞に加えられるCLDN6特異的抗体による結合を可能にするために十分に高いならば、細胞において発現している。好ましくは、細胞において発現されるCLDN6は前記細胞の表面に発現されるか、または露出する。

【0076】

本発明によれば、用語「疾患」は、どのような病理学的状態をも示し、これには、ガン、特に、本明細書中に記載されるガンのそのような形態が含まれる。ガンまたは特定の形態のガンに対する本明細書中での参照はどれも、そのガン転移物もまた包含する。好ましい実施形態において、本特許出願に従って処置されるための疾患は、クロードイン（CLDN）を発現する細胞、例えば、CLDN18.2および/またはCLDN6などを発現する細胞を伴う。

【0077】

「CLDNを発現する細胞に関連する疾患」または類似する表現は、本発明によれば、CLDNが患部組織または患部器官の細胞において発現されることを意味する。1つの実施形態において、患部組織または患部器官の細胞におけるCLDN発現が、健康な組織または器官における状態と比較して増大している。増大は、少なくとも10%の増大を示し、特に、少なくとも20%の増大、少なくとも50%の増大、少なくとも100%の増大、少なくとも200%の増大、少なくとも500%の増大、少なくとも1000%の増大、少なくとも10000%の増大またはそれよりも一層大きい増大を示す。1つの実施形態において、発現は患部組織において見出されるだけであり、一方、健康な組織における発現は抑制されている。本発明によれば、CLDNを発現する細胞に関連する疾患には、ガン疾患が含まれる。そのうえ、本発明によれば、ガン疾患は好ましくは、ガン細胞がCLDNを発現するガン疾患である。

10

【0078】

本明細書中で使用される場合、「ガン疾患」または「ガン」には、異常に調節された細胞成長、細胞増殖、細胞分化、細胞接着および/または細胞遊走によって特徴づけられる疾患が含まれる。「ガン細胞」によって、急速な制御されない細胞増殖によって成長し、かつ、新しい成長を開始させた刺激が終わった後も成長し続ける正常でない細胞が意味される。好ましくは、「ガン疾患」は、CLDNを発現する細胞によって特徴づけられ、ガン細胞がCLDNを発現する。CLDNを発現する細胞は好ましくはガン細胞であり、好ましくは、本明細書中に記載されるガンのガン細胞である。

20

【0079】

用語「ガン」は本発明によれば、白血病、セミノーマ、メラノーマ、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸ガン、子宮内膜ガン、腎臓ガン、副腎ガン、甲状腺ガン、血液ガン、皮膚ガン、脳のガン、子宮頸ガン、腸ガン、肝臓ガン、結腸ガン、胃ガン、腸ガン、頭頸部ガン、胃腸ガン、リンパ節ガン、食道ガン、結腸直腸ガン、膵臓ガン、耳鼻咽喉頭（ENT）ガン、乳ガン、前立腺ガン、子宮のガン、卵巣ガンおよび肺ガン、ならびに、それらの転移物を含む。その例が、肺ガン腫、乳房ガン腫、前立腺ガン腫、結腸ガン腫、腎細胞ガン腫、子宮頸ガン腫、あるいは、上記に記載されるガンタイプまたは腫瘍の転移物である。ガンの用語は本発明によれば、ガン転移物もまた含む。

30

【0080】

本発明によれば、「ガン（腫）」は、上皮細胞に由来する悪性腫瘍である。この一群は、乳ガン、前立腺ガン、肺ガンおよび結腸ガンの一般的な形態を含めて、最も一般的なガンを表す。

【0081】

「腺ガン」は、腺組織に起源を有するガンである。この組織はまた、上皮組織として知られているより大きい組織カテゴリーの一部である。上皮組織には、皮膚、腺、ならびに、身体の空洞および器官を裏打ちする様々な他の組織が含まれる。上皮は発生学的には、外胚葉、内胚葉および中胚葉に由来する。腺ガンとして分類されるためには、細胞は、分泌特性を有する限り、腺の一部分であることは必ずしも必要ない。この形態のガン腫が、ヒトを含めて、一部の高等哺乳動物において生じ得る。高分化型腺ガンは、それらが由来する腺組織に似る傾向があり、一方、低分化型腺ガンはそのような傾向を有しない場合がある。生検物からの細胞を染色することによって、病理学者は、腫瘍が腺ガンまたは何らかの他のタイプのガンであるかを決定するであろう。様々な腺ガンが、身体内の腺の遍在性のために身体の多くの組織において生じる可能性がある。それぞれの腺が同じ物質を分

40

50

泌し続けられないかもしれないが、細胞に対する外分泌機能が存在する限り、その細胞は腺であると見なされ、したがって、その悪性形態は腺ガンと呼ばれる。悪性の腺ガンは、そのための十分な時間が与えられるならば、他の組織に侵入し、多くの場合には転移する。卵巣の腺ガンは卵巣ガン腫の最も一般的なタイプである。これには、漿液性腺ガンおよび粘液性腺ガン、明細胞腺ガン、ならびに、類内膜腺ガンが含まれる。

【0082】

「転移」によって、ガン細胞がその最初の部位から身体別の部分に広がることが意味される。転移の形成は非常に複雑なプロセスであり、原発性腫瘍からの悪性細胞の剥離、細胞外マトリックスへの侵入、体腔および血管に進入するための内皮基底膜への浸透、その後、血液によって運ばれた後では標的器官への浸潤に依存する。最後に、標的部

10

【0083】

クルケンベルグ腫瘍は、すべての卵巣腫瘍の1%~2%を占める卵巣の珍しい転移性腫瘍である。クルケンベルグ腫瘍の予後は依然として非常に不良であり、クルケンベルグ腫瘍のための確立された処置は存在しない。クルケンベルグ腫瘍は卵巣の転移性印環細胞腺ガンである。胃が、ほとんどのクルケンベルグ腫瘍症例における原発部位である(70%)。結腸のガン腫、虫垂のガン腫および乳房のガン腫(主に浸潤性小葉ガン)が、次に最も一般的な原発部位である。胆嚢、胆道、膵臓、小腸、ファーター膨大部、子宮頸部および膀胱/尿管のガン腫に起源を有するクルケンベルグ腫瘍の希な症例が報告されている。

20

【0084】

「処置する」によって、腫瘍のサイズまたは腫瘍の数を被験体において縮小することを含めて、疾患を防止するか、または排除すること；疾患を被験体において停止させるか、または遅らせること；新しい疾患の発達を被験体において阻害するか、または遅らせること；症状の頻度もしくは重篤度および/または再発を、現時点で疾患を有する被験体において、または、以前に疾患を有したことがある被験体において低下させること；ならびに/あるいは、被験体の寿命を延ばすこと、すなわち、増大させることのために、化合物または組成物あるいは化合物または組成物の組合せを被験体に投与することが意味される。

30

【0085】

特に、用語「疾患の処置」には、疾患を治療すること、疾患の継続期間を短縮すること、疾患を改善すること、疾患を防止すること、疾患の進行または悪化を遅くするか、または阻害すること、あるいは、疾患の発症またはその症状を防止するか、または遅らせることが含まれる。

40

【0086】

本発明との関連において、「保護する」、「防止する」、「予防的」、「防止的」または「保護的」などの用語は、被験体における疾患の発生および/または伝播の防止または処置または両方に関連し、特に、被験体が疾患を発達させるであろう可能性を最小限に抑えること、または、疾患の発達を遅らせることに関連する。例えば、ガンの危険性がある人が、ガンを防止するための治療の候補であると考えられる。

【0087】

「危険性がある」によって、一般的な集団と比較して、疾患(特にガン)を発達させる可能性が通常よりも大きいとして特定される対象が意味される。加えて、疾患(特にガン)を有したことがある被験体、または、現時点で疾患(特にガン)を有する被験体は、疾

50

患を発達させることについての増大した危険性を有する被験体である。なぜならば、そのような被験体は疾患を発達させ続けることがあるからである。現時点でガンをも有する被験体、または、ガンをも有したことがある被験体はまた、ガン転移についての増大した危険性を有する。

【0088】

用語「患者」は、本発明によれば、処置のための被験体、特に、疾患をも有する被験体を意味し、これには、ヒト、ヒト以外の霊長類および別の動物、特に、哺乳動物、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類（例えば、マウスおよびラットなど）などが含まれる。特に好ましい実施形態において、患者はヒトである。

【0089】

「標的細胞」は、どのような細胞であれ、望まれない細胞（例えば、ガン細胞など）を意味するものとする。好ましい実施形態において、標的細胞はCLDNを発現する。

【0090】

用語「抗原」は、免疫応答が向けられ、かつ/または、向けられることになるエピトープを含む剤（例えば、タンパク質またはペプチドなど）に関連する。好ましい実施形態において、抗原は、腫瘍関連抗原（例えば、CLDN18.2またはCLDN6など）、すなわち、細胞質、細胞表面および細胞核に由来する可能性があるガン細胞の構成成分であり、特に、好ましくは多量に、細胞内に、またはガン細胞上の表面抗原として産生されるそのような抗原である。

【0091】

本発明との関連において、用語「腫瘍関連抗原」は好ましくは、正常な状態のもとでは、限定された数の組織および/または器官において、あるいは、特定の発達段階において特異的に発現され、かつ、1つまたは複数の腫瘍組織またはガン組織において発現されるか、あるいは異常に発現されるタンパク質に関連する。本発明との関連において、腫瘍関連抗原は好ましくは、ガン細胞の細胞表面に関連し、正常な組織においては好ましくは発現されないか、または、ほんの希にしか発現されない。

【0092】

用語「エピトープ」は、分子における抗原決定基、すなわち、免疫系によって認識される分子における一部分、例えば、抗体によって認識される分子における一部分を示す。例えば、エピトープは、免疫系によって認識される抗原上の離れた三次元部位である。エピトープは通常の場合、分子（例えば、アミノ酸または糖鎖など）の化学的に活性な表面群化からなり、通常の場合、特異的な三次元の構造的特徴、同様にまた、特異的な電荷特徴をも有する。配座的エピトープおよび非配座的エピトープが、後者に対する結合ではなく、前者に対する結合が変性溶媒の存在下では失われるという点で区別される。タンパク質のエピトープは好ましくは、前記タンパク質の連続した部分または不連続な部分を含み、好ましくは、長さが5個~100個の間のアミノ酸であり、好ましくは5個~50個の間のアミノ酸であり、より好ましくは8個~30個の間のアミノ酸であり、最も好ましくは10個~25個の間のアミノ酸であり、例えば、エピトープは長さが好ましくは、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個または25個のアミノ酸である場合がある。

【0093】

用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互につながれる少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質を示す。用語「抗体」には、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体が含まれる。それぞれの重鎖が重鎖可変領域（本明細書中ではVHと略記される）および重鎖定常領域から構成される。それぞれの軽鎖が軽鎖可変領域（本明細書中ではVLと略記される）および軽鎖定常領域から構成される。VH領域およびVL領域はさらに、より保存されている領域（これはフレームワーク領域（FR）と呼ばれる）が散らばる超可変性の領域（これは相補性決定領域（CDR）と呼ばれる）に細かく分けることができる。それぞれのVHおよびV

10

20

30

40

50

L が 3 つの C D R および 4 つの F R から構成され、これらがアミノ末端からカルボキシ末端に、下記の順で配置される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンが、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の最初の成分（C 1 q）を含めて、宿主の組織または因子に結合することを媒介する場合がある。

【 0 0 9 4 】

用語「モノクローナル抗体」は本明細書中で使用される場合、単一分子組成の抗体分子の調製物を示す。モノクローナル抗体は単一の結合特異性および親和性を呈示する。1 つの実施形態において、モノクローナル抗体が、ヒト以外の動物（例えば、マウス）から得られる B 細胞を不死化細胞に融合されて含むハイブリドーマによって産生される。

10

【 0 0 9 5 】

用語「組換え抗体」は本明細書中で使用される場合、組換え手段によって調製される、発現される、作出される、または単離されるすべての抗体を包含する：例えば、（ a ）免疫グロブリン遺伝子について遺伝子組換えまたは染色体組換えである動物（例えば、マウス）から、あるいは、当該動物から調製されるハイブリドーマから単離される抗体；（ b ）抗体を発現するように形質転換される宿主細胞から単離される抗体、例えば、トランスフェクトーマから単離される抗体；（ c ）組換えのコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体；および（ d ）免疫グロブリン遺伝子配列を他の D N A 配列にスプライシングすることを伴う何らかの他の手段によって調製される、発現される、作出される、または単離される抗体。

20

【 0 0 9 6 】

用語「ヒト抗体」は本明細書中で使用される場合、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を包含することが意図される。ヒト抗体は、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって、あるいは、インビボでの体細胞変異によって導入される変異）を含む場合がある。

【 0 0 9 7 】

用語「ヒト化抗体」は、ヒト以外の種から得られる免疫グロブリンに実質的に由来する抗原結合部位を有する分子であって、当該分子の残る免疫グロブリン構造がヒト免疫グロブリンの構造および/または配列に基づく分子を示す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合される完全な可変ドメイン、または、可変ドメインにおいて適切なフレームワーク領域にグラフト化される相補性決定領域（C D R）のみのどちらかを含む場合がある。抗原結合部位は野生型である場合があり、あるいは、1 つまたは複数のアミノ酸置換によって改変される場合があり、例えば、よりヒト免疫グロブリンに酷似するように改変される場合がある。いくつかの形態のヒト化抗体はすべての C D R 配列を保持している（例えば、マウス抗体に由来する 6 つすべての C D R を含有するヒト化されたマウス抗体）。他の形態は、元の抗体に関して変化させられる 1 つまたは複数の C D R を有する。

30

【 0 0 9 8 】

用語「キメラ抗体」は、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列のそれぞれの 1 つの部分が、特定の種に由来する抗体または特定のクラスに属する抗体における対応する配列に対して相通的であり、一方、鎖の残るセグメントが別の抗体における対応する配列に対して相通的であるそのような抗体を示す。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の鎖の可変領域が、哺乳動物の 1 つの種に由来する抗体の可変領域に似ており、一方、定常部分が、別の種に由来する抗体の配列に対して相通的である。そのようなキメラ形態に対する 1 つの明確な利点が、可変領域が好都合には、例えば、ヒト細胞調製物に由来する定常領域との組合せで、ヒト以外の宿主生物に由来する容易に入手可能な B 細胞またはハイブリドーマを使用して、現在知られている供給源に由来し得るということである。可変領域は、調製が容易であるという利点を有しており、かつ、特異性が供給源によって影響されないが、定常領域がヒトであることは、抗体が注射されたときには、免疫応答をヒト被験体から誘発する可

40

50

能性が、ヒト以外の供給源に由来する定常領域が誘発するであろうよりも低い。しかしながら、定義はこの特定の例に限定されない。

【0099】

抗体は、マウス、ラット、ウサギ、モルモットおよびヒト（これらに限定されない）を含めて、種々の種に由来する場合がある。

【0100】

本明細書中に記載される抗体には、I g A 抗体（例えば、I g A 1 抗体または I g A 2 抗体など）、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、I g G 4 抗体、I g E 抗体、I g M 抗体および I g D 抗体が含まれる。様々な実施形態において、抗体は、I g G 1 抗体、より具体的には I g G 1 カッパイソタイプまたは I g G 1 ラムダイソタイプ（すなわち、I g G 1、
、
）、I g G 2 a 抗体（例えば、I g G 2 a、
、
）、I g G 2 b 抗体（例えば、I g G 2 b、
、
）、I g G 3 抗体（例えば、I g G 3、
、
）または I g G 4 抗体（例えば、I g G 4、
、
）である。

10

【0101】

本明細書中で使用される場合、「異種抗体」は、そのような抗体を産生する遺伝子組換え動物に関連して定義される。この用語は、遺伝子組換え生物からならない生物に見出されるアミノ酸配列またはこれに対応するコードする核酸配列を有し、かつ、一般には、遺伝子組換え生物以外の種に由来する抗体を示す。

【0102】

本明細書中で使用される場合、「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖および重鎖を有する抗体を示す。例えば、マウス軽鎖を伴うヒト重鎖を有する抗体がヘテロハイブリッド抗体である。

20

【0103】

本明細書中に記載される抗体は好ましくは単離される。「単離された抗体」は、本明細書中で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を示すことが意図される（例えば、C L D N 1 8 . 2 に特異的に結合する単離された抗体は、C L D N 1 8 . 2 以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、ヒト C L D N 1 8 . 2 のエピトープ、イソ型または変化体に特異的に結合する単離された抗体は、例えば、他の種に由来する他の関連した抗原（例えば、C L D N 1 8 . 2 の種ホモログ）に対する交差反応性を有する場合がある。そのうえ、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない場合がある。本発明の1つの実施形態において、「単離された」モノクローナル抗体の組合せは、様々な抗体が異なる特異性を有し、かつ、十分に規定された組成物または混合物において組み合わせられることに関連する。

30

【0104】

抗体の「抗原結合部分」（または単に「結合性部分」）または抗体の「抗原結合フラグメント」（または単に「結合性フラグメント」）の用語あるいは類似する用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数のフラグメントを示す。抗体の抗原結合機能が全長抗体のフラグメントによって果たされ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」の用語の範囲内に包含される結合性フラグメントの例には、(i) F a b フラグメント、すなわち、V L ドメイン、V H ドメイン、C L ドメインおよび C H ドメインからなる一価のフラグメント；(i i) F (a b ') 2 フラグメント、すなわち、ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋によって連結される2つの F a b フラグメントを含む二価のフラグメント；(i i i) V H ドメインおよび C H ドメインからなる F d フラグメント；(i v) 抗体のただ1つだけのアームの V L ドメインおよび V H ドメインからなる F v フラグメント；(v) V H ドメインからなる d A b フラグメント（W a r d 他（1989）、N a t u r e、341:544~546）；(v i) 単離された相補性決定領域（C D R）；ならびに(v i i) 合成リンカーによって必要に応じてつながれる場合がある2つ以上の単離された C D R の組合せが含まれる。そのうえ、F v フラグメントの2つのドメイン、すなわち、V L および V H は、別個の遺伝子によってコードされるにもかか

40

50

ならず、それらは、V L領域およびV H領域が対形成して一価の分子（これは単鎖F v（s c F v）として知られている）を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を使用してつなぐことができる（例えば、B i r d他（1988）、S c i e n c e、242：423～426、および、H u s t o n他（1988）、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、85：5879～5883を参照のこと）。そのような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合フラグメント」の用語の範囲内に包含されることが意図される。さらなる例が、（i）免疫グロブリンのヒンジ領域ポリペプチドに融合される結合ドメインポリペプチド、（i i）ヒンジ領域に融合される免疫グロブリン重鎖C H 2定常領域、および、（i i i）C H 2定常領域に融合される免疫グロブリン重鎖C H 3定常領域を含む結合ドメイン・免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは重鎖可変領域または軽鎖可変領域であることが可能である。結合ドメイン・免疫グロブリン融合タンパク質がさらに、米国特許出願公開第2003/0118592号および同第2003/0133939号に開示される。これらの抗体フラグメントは、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、フラグメントは、無傷の抗体がスクリーニングされるのと同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。

10

【0105】

用語「結合ドメイン」は、本発明に関連して、所与の標的構造／抗原／エピトープに結合する／と相互作用する構造物（例えば、抗体の構造）を特徴とする。したがって、本発明による結合ドメインは「抗原相互作用部位」を示す。

20

【0106】

本発明の目的のために本明細書中に記載されるようなすべての抗体および抗体の誘導体（例えば、抗体フラグメントなど）が用語「抗体」によって包含される。用語「抗体誘導体」は抗体のどのような改変された形態をも示し、例えば、抗体と別の剤または抗体とのコンジュゲート、あるいは、抗体フラグメントを示す。さらに、本明細書中に記載されるような抗体および抗体の誘導体は、本発明の結合剤（例えば、抗体フラグメントなど）を製造するために有用である。

【0107】

天然に存在する抗体は一般に単一特異性である。すなわち、天然に存在する抗体はただ1つだけの抗原に結合する。本発明は、（C D 3受容体と会合することによって）細胞傷害性細胞に結合し、かつ、（C L D Nと会合することによって）ガン細胞に結合する結合剤を提供する。本発明の結合剤は、少なくとも二重特異性または多特異性（例えば、三重特異性、四重特異性など）である。

30

【0108】

本発明の結合剤は、抗体分子の形式、または、抗体様分子の形式、または、抗体様性質を有するタンパク質足場の形式、または、少なくとも2つの結合特異性を有する環状ペプチドの形式である場合がある。したがって、結合剤は、本明細書中に記載されるような1つまたは複数の抗体あるいはそのフラグメントを含む場合がある。

【0109】

本発明によれば、二重特異性分子、特に、二重特異性タンパク質、例えば、二重特異性抗体などは、2つの異なる結合特異性を有し、したがって、2つの異なるタイプの抗原（例えば、C L D NおよびC D 3など）に結合し得る分子である。特に、用語「二重特異性抗体」は、本明細書中で使用される場合、2つの抗原結合部位を含み、第1の結合部位が第1の抗原またはエピトープに対する親和性を有し、かつ、第2の結合部位が、第1の抗原またはエピトープと異なる第2の抗原またはエピトープに対する親和性を有する抗体を示す。具体的には、二重特異性抗体は、2つの異なる抗体のフラグメントから構成され（この場合、2つの異なる抗体の前記フラグメントにより、2つの結合ドメインが形成される）、かつ、その結果として、2つの異なるタイプの抗原に結合する人為的なタンパク質である。本発明による二重特異性抗体は、免疫細胞（例えば、免疫エフェクター細胞など）に対して、特に、（C D 3に結合することによって）T細胞（例えば、細胞傷害性細胞

40

50

など)に対して、かつ、破壊されるために(腫瘍関連抗原CLDNに結合することによって)ガン細胞のような標的細胞に対して同時に結合するために操作される。

【0110】

用語「二重特異性抗体」にはまた、ジアボディーが含まれる。ジアボディーは、VHドメインおよびVLドメインが単一ポリペプチド鎖で発現させられ、しかし、同じ鎖にあるこれら2つのドメインの間における対形成を可能にするには短すぎるリンカーが使用され、それにより、これらのドメインが別の鎖の相補的なドメインと対形成することが強制させられ、2つの抗原結合部位がもたらされる二価の二重特異性抗体である(例えば、Holliger, P.他(1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448; Poljak, R. J.他(1994)、Structure、2:1121~1123を参照のこと)。

10

【0111】

「多特異性の結合剤」は、3つ以上の異なる結合特異性を有する分子である。

【0112】

本発明に従って特に好ましいものが、二重特異性抗体フラグメントを含む二重特異性抗体であり、特に、二重特異性単鎖抗体フラグメントを含む二重特異性単鎖抗体である。用語「二重特異性単鎖抗体」は、2つの結合ドメインを含む単一ポリペプチド鎖を意味する。特に、本発明による用語「二重特異性単鎖抗体」または用語「単鎖二重特異性抗体」あるいは関連する用語は好ましくは、少なくとも2つの抗体可変領域を、完全な免疫グロブリンには存在する定常部分および/またはFc部分を欠く単一ポリペプチド鎖において連結することから生じる抗体構築物を意味する。

20

【0113】

例えば、二重特異性単鎖抗体は、合計で2つの抗体可変領域(例えば、2つのVH領域、それぞれが別個の抗原に特異的に結合することができる)が、短いポリペプチドスペーサーを介して互いにつながれ、その結果、それらの間に置かれたスペーサーを伴うこれら2つの抗体可変領域が単一の連続したポリペプチド鎖として存在するようにされる構築物である場合がある。二重特異性単鎖抗体の別の一例が、3つの抗体可変領域を有する単一ポリペプチド鎖である場合がある。ここで、2つの抗体可変領域が、例えば、1つのVHおよび1つのVLが、これら2つの抗体可変領域が合成ポリペプチドリンカーを介して互いにつながれるscFvを構成してもよく、ただし、この場合、後者は多くの場合、タンパク質分解に対して最大限に抵抗性のままでありながら、最小限に免疫原性であるように遺伝子操作される。このscFvは特定の抗原に特異的に結合することができ、また、当該scFvが結合する抗原とは異なる抗原に結合することができるさらなる抗体可変領域(例えば、VH領域)につながれる。二重特異性単鎖抗体のさらに別の一例が、4つの抗体可変領域を有する単一ポリペプチド鎖である場合がある。ここで、第1の2つの抗体可変領域が、例えば、VH領域およびVL領域が、1つの抗原に結合することができる1つのscFvを形成する場合があり、これに対して、第2のVH領域およびVL領域が、別の抗原に結合することができる第2のscFvを形成する場合がある。単一の連続したポリペプチド鎖の内部において、1つの特異性の個々の抗体可変領域が好都合には、合成ポリペプチドリンカーによって隔てられる場合があり、これに対して、それぞれのscFvが好都合には、上記で記載されるような短いポリペプチドスペーサーによって隔てられる場合がある。

30

40

【0114】

本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第1の結合ドメインは1つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはVHHドメインを含む。本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第1の結合ドメインは2つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはscFv、すなわち、VH-VLまたはVL-VHを含む。本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第2の結合ドメインは1つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはVHHドメインを含む。本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第2の結合ドメインは2つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはscFv、すなわち、VH-V

50

LまたはV L - V Hを含む。したがって、その最小形態において、本発明による二重特異性抗体における抗体可変領域の総数はほんの2にすぎない。例えば、そのような抗体は2つのV Hドメインまたは2つのV H Hドメインを含むことができるかもしれない。

【0115】

本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインはそれぞれが1つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはV H Hドメインを含む。本発明の1つの実施形態によれば、二重特異性抗体の第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインはそれぞれが2つの抗体可変ドメインを含み、好ましくはs c F v、すなわち、V H - V LまたはV L - V Hを含む。この実施形態において、本発明の結合剤は好ましくは、(i) C L D N抗体の重鎖可変ドメイン(V H)、(i i) C L D N抗体の軽鎖可変ドメイン(V L)、(i i i) C D 3抗体の重鎖可変ドメイン(V H)、および、(i v) C D 3抗体の軽鎖可変ドメイン(V L)を含む。

10

【0116】

二重特異性の全長型抗体が、2つのモノクローナル抗体を共有結合により連結することによって、または、従来ハイブリッド-ハイブリドーマ技術によって得られる場合がある。2つのモノクローナル抗体を共有結合により連結することが、Anderson、Blood、80(1992)、2826~34に記載される。本発明との関連において、これらの抗体の一方の抗体がC L D Nに対して特異的であり、他方の抗体がC D 3に対して特異的である。

【0117】

1つの実施形態において、二重特異性の結合剤は、異なる特異性を有する2つの連続するN端側可変ドメインを含有する重鎖と、異なる特異性を有する2つの連続する可変ドメインを有する軽鎖とを有し、その結果、2つの異なる特異性を有する4つの結合ドメインをもたらす抗体様分子の形式であり(Wu他、Nat. Biotechnology、2007、25(11))、ただし、この場合、一方の特異性がC D 3であり、他方の特異性がC L D Nである。

20

【0118】

好ましい実施形態において、本発明の二重特異性の結合剤は抗体フラグメントの形式である。

【0119】

1つの実施形態において、本発明による二重特異性分子は2つのF a b領域を含み、この場合、一方が、C L D Nに対するものであり、他方が、C D 3に対するものである。1つの実施形態において、本発明の分子は抗原結合フラグメント(F a b)2複合体である。F a b 2複合体は2つのF a bフラグメントから構成され、この場合、一方のF a bフラグメントが、C D 3抗原に対して特異的なF vドメイン(すなわち、V HドメインおよびV Lドメイン)を含み、他方のF a bフラグメントが、C L D Nに対して特異的なF vドメインを含む。これらのF a bフラグメントのそれぞれが、2つの単一鎖から、すなわち、V L - C LモジュールおよびV H - C Hモジュールから構成される場合がある。代替において、個々のF a bフラグメントのそれぞれが単一鎖で配置される場合があり、好ましくはV L - C L - C H - V Hで配置される場合があり、かつ、個々の可変ドメインおよび定常ドメインがペプチドリンカーによりつながれる場合がある。一般に、個々の単一鎖およびF a bフラグメントは、ジスルフィド結合、接着性ドメイン、化学的に連結されて、および/またはペプチドリンカーを介してつながれる場合がある。二重特異性分子はまた、3つ以上のF a bフラグメントを含む場合があり、特に、分子は、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の異なる抗原に対する特異性を有するF a b 3、F a b 4またはマルチマーF a b複合体である場合がある。本発明にはまた、化学的に連結されたF a bが含まれる。

30

40

【0120】

1つの実施形態において、本発明による結合剤には、様々なタイプの二価および三価の単鎖可変フラグメント(s c F v)、すなわち、2つの抗体の可変ドメインを模倣する融

50

合タンパク質が含まれる。単鎖可変フラグメント (s c F v) は、免疫グロブリンの重鎖 (V H) および軽鎖 (V L) の可変領域が 10 個 ~ 約 25 個のアミノ酸の短いリンカーペプチドによりつながれる融合タンパク質である。リンカーは通常、柔軟性のためにグリシンに富み、同様にまた、溶解性のためにセリンまたはトレオニンに富み、V H の N 末端を V L の C 末端とつなぐこと、または、逆に、V L の N 末端を V H の C 末端とつなぐことのどちらも可能である。二価 (d i v a l e n t 、 b i v a l e n t) の単鎖可変フラグメント (d i - s c F v 、 b i - s c F v) は、2 つの s c F v を連結することによって操作することができる。これを、2 つの V H 領域および 2 つの V L 領域を有する単一ペプチド鎖を作製することによって行うことができ、これにより、タンデム型 s c F v がもたらされる。本発明にはまた、3 つ以上の s c F v 結合ドメインを含む多特異性分子が含まれる。このことは、分子が多数の抗原特異性を含み、三重特異性分子、四重特異性分子または多特異性分子であること、あるいは、分子が、同じ抗原に対する特異性を有する 2 つ以上の s c F v 結合ドメインを含む二重特異性分子であることのどちらも可能にする。特に、本発明の分子は多特異性単鎖 F v である場合がある。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

別の可能性が、2 つの可変領域が一緒に折り重なるには短すぎるリンカーペプチド (約 5 個のアミノ酸) を用い、これにより、s c F V が二量体化することを強制する s c F v を作出することである。このタイプはジアボディーとして知られている。さらにより短いリンカー (1 個または 2 個のアミノ酸) は、三量体 (いわゆるトリアボディーまたはトリボディー) の形成を引き起こす。テトラボディーもまた作製されている。それらは、それらの標的に対して、ジアボディーよりも一層大きい親和性を示す。

【 0 1 2 2 】

二重特異性抗体フラグメントの特に好ましい一例がジアボディー (K i p r i y a n o v 、 I n t . J . C a n c e r 、 7 7 (1 9 9 8) 、 7 6 3 ~ 7 7 2) であり、これは小さい二価かつ二重特異性の抗体フラグメントである。ジアボディーは、重鎖可変ドメイン (V H) を、同じ鎖にある 2 つのドメインの間における対形成を可能にするには短すぎるペプチドリンカーによってつながれる同じポリペプチド鎖 (V H - V L) における軽鎖可変ドメイン (V L) につながれて含む。このことは、別の鎖の相補的なドメインとの対形成を強制し、2 つの機能的な抗原結合部位を有する二量体分子の組立てを促進させる。本発明の二重特異性ジアボディーを構築するために、抗 C D 3 抗体および抗 C L D N 抗体の V ドメインが、V H (C D 3) - V L (C L D N) 、 V H (C L D N) - V L (C D 3) の 2 つの鎖を作出するために融合される場合がある。それぞれの鎖は単独では、それぞれの抗原に結合することができず、しかし、抗 C D 3 抗体および抗 C L D N 抗体の機能的な抗原結合部位を、他方の鎖と対形成したときに再形成する。この目的を達成するために、同じ鎖にある 2 つのドメインの間における対形成を可能にするには短すぎるペプチドリンカーが使用される。分子内二量体化のためには短すぎる重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間のリンカーとともに、これら 2 つの s c F v 分子は共発現され、自己集合して、2 つの結合部位を反対側に有する二重特異性分子を形成する。

【 0 1 2 3 】

1 つの実施形態において、本発明による多特異性分子は免疫グロブリンの可変ドメイン (V H 、 V L) および定常ドメイン (C) を含む。1 つの実施形態において、二重特異性分子はミニボディーであり、好ましくは、それぞれの鎖の定常ドメイン (C) を介して互いにつながれる 2 つの単一の V H - V L - C 鎖を含むミニボディーである。この局面によれば、対応する可変重鎖領域 (V H) 、対応する可変軽鎖領域 (V L) 、および、定常ドメイン (C) が、N 末端から C 末端に、V H (C L D N) - V L (C L D N) - (C) および V H (C D 3) - V L (C D 3) - C (式中、C は好ましくは C H 3 ドメインである) の順で配置される。定常ドメインの対形成により、ミニボディーの形成がもたらされる。

【 0 1 2 4 】

別の特に好ましい局面によれば、本発明の二重特異性の結合剤は、少なくとも 2 つの結

合ドメインを含むか、または、少なくとも2つの結合ドメインからなり、それにより、前記ドメインの一方がCLDNに結合し、第2のドメインがCD3に結合する二重特異性単鎖抗体構築物の形式である。そのような分子は、「二重特異性T細胞エンゲージャー (engager) (BiTE)とも呼ばれるものであり(用語BiTEは、1つのアームがCD3に対して特異的である二重特異性分子を示すだけである)、リンカーペプチドを介してつながれる2つのscFv分子からなる。

【0125】

本明細書中で使用される場合、「二重特異性単鎖抗体」は、2つの結合ドメインを含む単一ポリペプチド鎖を意味する。それぞれの結合ドメインが抗体重鎖からの可変領域(「VH領域」)を含み、ただし、この場合、第1の結合ドメインのVH領域がCLDNに特異的に結合し、第2の結合ドメインのVH領域がCD3に特異的に結合する。これら2つの結合ドメインは必要に応じて、短いポリペプチドスペーサーによって互いに連結される。ポリペプチドスペーサーについての限定されない一例が、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(G-G-G-G-S)およびその反復体である。それぞれの結合ドメインはさらに、抗体軽鎖からの1つの可変領域(「VL領域」)を含む場合があり、この場合、第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインのそれぞれの内部のVH領域およびVL領域が、第1の結合ドメインのVH領域およびVL領域ならびに第2の結合ドメインのVH領域およびVL領域が互いに対形成することを可能にするために十分に長いポリペプチドリンカーを介して互いに連結される。

【0126】

この局面によれば、対応する可変重鎖領域(VH)および対応する可変軽鎖領域(VL)が、N末端からC末端に、VH(CLDN)-VL(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3)の順、VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN)の順、または、VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN)の順で配置される。しかしながら、本発明の二重特異性単鎖抗体は、他のドメイン配置、例えば、VL(CLDN)-VH(CLDN)-VH(CD3)-VL(CD3)、VL(CLDN)-VH(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3)、VH(CLDN)-VL(CLDN)-VL(CD3)-VH(CD3)、VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CLDN)-VL(CLDN)、VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CLDN)-VH(CLDN)などを含むこともまた想定される。

【0127】

長いリンカーは一般には、対応する可変重鎖領域(VH)および対応する可変軽鎖領域(VL)をつないで、scFv結合ドメインをもたらし、一方、短いリンカーは一般に、2つのscFv結合ドメインをつなぐ。リンカーは一般に、柔軟性およびプロテアーゼ抵抗性を提供するように設計され、好ましくは、リンカーはグリシンおよび/またはセリンのアミノ酸残基を含む。短いペプチドリンカーは、12個以下のアミノ酸から、例えば、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個または2個のアミノ酸から、好ましくは5個または6個のアミノ酸からなる場合がある。短いペプチドリンカーは好ましくは、SGGGGSまたはGGGGSのアミノ酸配列を含む。長いペプチドリンカーは、12個以上のアミノ酸から、例えば、15個~25個のアミノ酸または15個~20個のアミノ酸または15個~18個のアミノ酸からなる場合がある。長いペプチドリンカーは好ましくは、(GGGGS)3またはVE(GGSGGS)2GGVDのアミノ酸配列を含む。さらなる長いペプチドリンカーは、(GGGGS)4、(GGGGS)5またはGGGGS(GGS)3GGGSのアミノ酸配列を含む場合がある。

【0128】

本発明による結合剤はまた、当該分子の分泌を容易にするためのアミノ酸配列(例えば、N末端の分泌シグナルなど)、および/あるいは、当該分子の結合、精製または検出を容易にする1つまたは複数のエピトープタグを含む場合がある。

【0129】

好ましくは、分泌シグナルは、分泌経路の十分な通過および/または細胞外環境への結

10

20

30

40

50

合剤の分泌を可能にするシグナル配列（例えば、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5 のいずれか 1 つから選択されるシグナル配列）である。好ましくは、分泌シグナル配列は切断可能であり、成熟型結合剤から除かれる。分泌シグナル配列は好ましくは、結合剤が産生される細胞または生物に関して選定される。

【0130】

エピトープタグのアミノ酸配列が、結合剤のアミノ酸配列の中のどのような位置に対しても導入される場合があり、また、コードされたタンパク質構造の内部においてループの形態を取る場合があり、あるいは、結合剤に N 末端または C 末端で融合される場合がある。好ましくは、エピトープタグは結合剤に C 末端で融合される。エピトープタグは、当該タグを結合剤から除くことを可能にする切断部位を含有する場合がある。前記エピトープタグは、天然条件および/または変性条件のもとで機能的であるどのような種類のエピトープタグであることも可能であり、好ましくはヒスチジンタグであり、最も好ましくは 6 個のヒスチジンを含むタグである。

10

【0131】

本発明の二重特異性の結合剤は、前記第 1 の結合メインおよび第 2 の結合メインに加えて、例えば、腫瘍細胞に対する選択性を高めるために役立つさらなる結合ドメインを含有する場合がある。このことを、例えば、腫瘍細胞上に発現される他の抗原に結合する結合ドメインを提供することによって達成することができる。

【0132】

本発明との関連において、作製された結合剤は好ましくは、本明細書中に記載されるような免疫エフェクター機能を誘発することができる。好ましくは、前記免疫エフェクター機能は、腫瘍関連抗原 CLDN をその表面に有する細胞に対するものである。

20

【0133】

用語「免疫エフェクター機能」は本発明との関連では、例えば、腫瘍の播種および転移の阻害を含めて、腫瘍成長の阻害および/または腫瘍発達の阻害をもたらす、免疫系の成分によって媒介されるどのような機能をも含む。好ましくは、免疫エフェクター機能により、腫瘍細胞の殺傷がもたらされる。そのような機能は、補体依存性細胞傷害 (CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞媒介性食作用 (ADCP)、腫瘍関連抗原を有する細胞におけるアポトーシスの誘導、腫瘍関連抗原を有する細胞の細胞溶解、および/または、腫瘍関連抗原を有する細胞の増殖の阻害を含む。結合剤はまた、ガン細胞の表面の腫瘍関連抗原に単に結合することによって影響を及ぼす場合がある。例えば、抗体は、ガン細胞の表面の腫瘍関連抗原に単に結合することによって腫瘍関連抗原の機能を阻止するか、または、アポトーシスを誘導する場合がある。

30

【0134】

本明細書中に記載される結合剤は治療用の成分または薬剤にコンジュゲート化される場合があり、例えば、細胞毒、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性同位体などにコンジュゲート化される場合がある。細胞毒または細胞毒性剤には、細胞にとって有害であり、かつ、特に細胞を殺すどのような薬剤も含まれる。例には、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (tenoposide)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン (dihydroxyanthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマシンド、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらのアナログおよびホモログが含まれる。コンジュゲートを形成するための好適な治療用薬剤には、下記の薬剤が含まれるが、それらに限定されない：代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ (thioepa)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾト

40

50

シン、マイトマイシンC、ならびに、cis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)(シスプラチン)、アントラサイクリン系薬剤(例えば、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマシン)、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))、ならびに、有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)。好ましい実施形態において、治療用薬剤は細胞毒性剤または放射性毒性剤である。別の実施形態において、治療用薬剤は免疫抑制剤である。さらに別の実施形態において、治療用薬剤はGM-CSFである。好ましい実施形態において、治療用薬剤は、ドキソルビシン、シスプラチン、プレオマイシン、スルファート、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミドまたはリシンAである。

10

【0135】

結合剤はまた、細胞傷害性の放射性医薬品を作製するために放射性同位体(例えば、ヨウ素-131、イットリウム-90またはインジウム-111)にコンジュゲート化することができる。

【0136】

そのような治療用成分を抗体にコンジュゲート化するための様々な技術が広く知られている。例えば、Arnon他、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeld他(編)、243頁~56頁(Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom他、"Antibodies For Drug Delivery"、Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinson他(編)、623頁~53頁(Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe、"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"、Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications、Pinchera他(編)、475頁~506頁(1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwin他(編)、303頁~16頁(Academic Press, 1985)、および、Thorpe他、"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates"、Immunol. Rev., 62(1982)、119~58を参照のこと。

20

30

【0137】

用語「結合(性)」は本発明によれば、好ましくは、特異的な結合に関連する。

【0138】

本発明によれば、抗体などの剤は、所定の標的に対する著しい親和性を有し、かつ、標準的なアッセイにおいてこの所定の標的に結合するならば、この所定の標的に結合することができる。「親和性」または「結合親和性」は多くの場合、平衡解離定数(KD)によって測定される。好ましくは、用語「著しい親和性」は、 10^{-5} M以下、 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、 10^{-11} M以下または 10^{-12} M以下の解離定数(KD)により所定の標的に結合することを示す。

40

【0139】

剤は、標的に対する著しい親和性を全く有さず、かつ、標準的なアッセイにおいてこの標識に有意に結合しないならば、特に、検出可能なほどに結合しないならば、この標的に(実質的に)結合することができない。好ましくは、剤は、前記標的が $2 \mu\text{g/ml}$ まで

50

の濃度で存在するならば、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度で存在するならば、より好ましくは $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度で存在するならば、特に、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれ以上までの濃度で存在するならば、前記標的に検出可能なほどに結合しない。好ましくは、剤は、この剤が結合することができる所定の標的に対する結合についてのKDよりも少なくとも 10 倍大きいKDにより、 100 倍大きいKDにより、 10^3 倍大きいKDにより、 10^4 倍大きいKDにより、 10^5 倍大きいKDにより、または、 10^6 倍大きいKDにより標的に結合するならば、この標的に対する著しい親和性を有していない。例えば、剤が、この剤が結合することができる標的に結合することについてのKDが 10^{-7} Mであるならば、この剤が著しい親和性を全く有しない標的に対する結合についてのKDは、少なくとも 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、 10^{-3} M、 10^{-2} Mまたは 10^{-1} Mであろうと思われる。

【0140】

抗体などの剤は、所定の標的に結合することができ、一方で、他の標的には結合することができないならば、すなわち、著しい親和性を他の標的に対して全く有さず、かつ、標準的なアッセイにおいて他の標的に有意に結合しないならば、この所定の標的に対して特異的である。本発明によれば、剤がCLDNに結合することができ、しかし、他の標的には(実質的に)結合することができないならば、この剤はCLDNに対して特異的である。好ましくは、そのような他の標的に対する親和性および結合が、CLDN非関連のタンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、ヒト血清アルブミン(HSA)またはクローディン以外の膜貫通タンパク質(例えば、MHC分子またはトランスフェリン受容体など)あるいは何らかの他の指定されたポリペプチドなど)に対する親和性または結合を有意に超えないならば、剤はCLDNに対して特異的である。好ましくは、剤は、この剤が特異的でない標的に対する結合についてのKDの少なくとも 10 分の1であるKDにより、 100 分の1であるKDにより、 103 分の1であるKDにより、 104 分の1であるKDにより、 105 分の1であるKDにより、または、 106 分の1であるKDにより所定の標的に結合するならば、この所定の標的に対して特異的である。例えば、剤が、この剤が特異的である標的に結合することについてのKDが 10^{-7} Mであるならば、この剤が特異的でない標的に対する結合についてのKDは、少なくとも 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、 10^{-3} M、 10^{-2} Mまたは 10^{-1} Mであろうと思われる。

【0141】

標的に対する剤の結合を、いずれかの好適な方法(例えば、Berzofsky他、"Antibody - Antigen Interactions", Fundamental Immunology, Paul, W. E. 編、Raven Press New York, NY (1984); Kuby, Janis, Immunology, W. H. Freeman and Company, New York, NY (1992)を参照のこと)および本明細書中に記載される方法を使用して実験的に求めることができる。親和性が、従来技術を使用して、例えば、平衡透析などによって; BIAcore 2000装置を、製造者によって概略される一般的手順を使用して使用することによって; 放射能標識された標的抗原を使用する放射免疫アッセイによって; または、当業者に知られている別の方法によって容易に求められる場合がある。親和性データは、例えば、Scatchard他(Ann N. Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949))の方法によって分析される場合がある。特定の抗体-抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件(例えば、塩濃度、pH)のもとで測定されるならば、異なる可能性がある。したがって、親和性および他の抗原結合パラメーター(例えば、KD、IC50)の測定は好ましくは、抗体および抗原の標準化された溶液ならびに標準化された緩衝液を用いて行われる。

【0142】

本明細書中で使用される場合、「イソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)を示す。

【0143】

本明細書中で使用される場合、「イソタイプスイッチング」は、抗体のクラス、すなわち、抗体のイソタイプが1つのIgクラスから他のIgクラスの1つに変化する現象を示す。

【0144】

用語「天然に存在する」は、対象物に適用されるように本明細書中で使用される場合、対象物が自然界に見出され得るという事実を示す。例えば、自然界の供給源から単離することができ、かつ、実験室において人によって意図的に改変されていない、生物（ウイルスを含む）に存在するポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列は、天然に存在している。

10

【0145】

用語「再編成された」は本明細書中で使用される場合、Vセグメントが、本質的には完全なVHドメインまたはVLドメインをそれぞれコードする配座でD-JセグメントまたはJセグメントにじかに隣接して配置される重鎖免疫グロブリン遺伝子座または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の配置を示す。再編成された免疫グロブリン（抗体）遺伝子の遺伝子座を、生殖系列のDNAに対する比較によって特定することができる；再編成された遺伝子座は、少なくとも1つの組み換えられたヘプタマー/ノナマー相同性エレメントを有するであろう。

【0146】

用語「再編成されていない配置」または用語「生殖系列配置」は、Vセグメントに関連して本明細書中で使用される場合、Vセグメントが、DセグメントまたはJセグメントにじかに隣接しているようには組み換えられない配置を示す。

20

【0147】

1つの実施形態において、本発明の結合剤は、CLDN18.2に結合する能力、すなわち、CLDN18.2に存在するエピトープに結合する能力、好ましくは、CLDN18.2の細胞外ドメイン（特に、1番目の細胞外ループ、好ましくはCLDN18.2のアミノ酸位置29～アミノ酸位置78）の中に位置するエピトープに結合する能力を有する。特定の実施形態において、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、CLDN18.1の表面に存在しないCLDN18.2上のエピトープに結合する。

【0148】

CLDN18.2に結合する能力を有する剤は好ましくは、CLDN18.2には結合するが、CLDN18.1には結合しない。好ましくは、CLDN18.2に結合する能力を有する剤はCLDN18.2に対して特異的である。好ましくは、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、細胞表面に発現されるCLDN18.2に結合する。特定の好ましい実施形態において、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、生細胞の表面に存在するCLDN18.2の生来型エピトープに結合する。

30

【0149】

好ましい実施形態において、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。

40

【0150】

好ましい実施形態において、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0151】

ある特定の好ましい実施形態において、CLDN18.2に結合する能力を有する剤は、下記の可能性（i）～可能性（ix）から選択される重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）の組合せを含む：

（i）VHは、配列番号5によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含

50

み、V Lは、配列番号12によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(i i) V Hは、配列番号6によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号11によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(i i i) V Hは、配列番号7によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号13によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(i v) V Hは、配列番号9によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号16によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v) V Hは、配列番号8によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号15によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i) V Hは、配列番号10によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号14によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i i) V Hは、配列番号10によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号17によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i i i) V Hは、配列番号10によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号18によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(i x) V Hは、配列番号10によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号19によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0152】

特に好ましい実施形態において、C L D N 1 8 . 2に結合する能力を有する剤は、重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号8によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号15によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0153】

さらなる特に好ましい実施形態において、C L D N 1 8 . 2に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号6によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号11によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0154】

用語「フラグメント」は特に、重鎖可変領域(V H)および/または軽鎖可変領域(V L)の相補性決定領域(C D R)の1つまたは複数を示し、好ましくは、少なくとも、重鎖可変領域(V H)および/または軽鎖可変領域(V L)のC D R 3可変領域を示す。1つの実施形態において、相補性決定領域(C D R)の前記1つまたは複数は、一組の相補性決定領域(C D R 1、C D R 2およびC D R 3)から選択される。特に好ましい実施形態において、用語「フラグメント」は、重鎖可変領域(V H)および/または軽鎖可変領域(V L)の相補性決定領域のC D R 1、C D R 2およびC D R 3を示す。

【0155】

1つの実施形態において、1つまたは複数のC D R、一組のC D Rあるいは複数組のC D Rの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記C D Rをそれらの介在フレームワーク領域と一緒に含む。好ましくは、部分はまた、1番目および4番目のフレームワーク領域のどちらかまたは両方の少なくとも約50%を含むであろうし、ただし、前記50%は1番目のフレームワーク領域のC端側50%および4番目のフレームワーク領域のN端側50%である。組換えDNA技術によって作製される結合剤の構築は、本発

10

20

30

40

50

明の可変領域を、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えば、ジアボディーの製造において）またはタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列につなぐためのリンカーの導入を含めて、クローニング工程または他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによってコードされる可変領域のN端側またはC端側の残基の導入をもたらす場合がある。

【0156】

1つの実施形態において、1つまたは複数のCDR、一組のCDRあるいは複数組のCDRの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記CDRをヒト抗体フレームワーク内に含む。

【0157】

1つの実施形態において、本発明の結合剤は、CLDN6に結合する能力、すなわち、CLDN6に存在するエピトープに結合する能力、好ましくは、CLDN6の細胞外ドメイン（特に、1番目の細胞外ループ、好ましくはCLDN6のアミノ酸位置28～アミノ酸位置76、または、2番目の細胞外ループ、好ましくはCLDN6のアミノ酸位置141～アミノ酸位置159）の中に位置するエピトープに結合する能力を有する。特定の実施形態において、CLDN6に結合する能力を有する剤は、CLDN9の表面に存在しないCLDN6上のエピトープに結合する。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する剤は、CLDN4および/またはCLDN3の表面に存在しないCLDN6上のエピトープに結合する。最も好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する剤は、CLDN6以外のCLDNタンパク質の表面に存在しないCLDN6上のエピトープに結合する。

【0158】

CLDN6に結合する能力を有する剤は好ましくは、CLDN6には結合するが、CLDN9には結合せず、かつ、好ましくは、CLDN4および/またはCLDN3には結合しない。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する剤はCLDN6に対して特異的である。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する剤は、細胞表面に発現されるCLDN6に結合する。特定の好ましい実施形態において、CLDN6に結合する能力を有する剤は、生細胞の表面に存在するCLDN6の生来型エピトープに結合する。

【0159】

好ましい実施形態において、CLDN6に結合する能力を有する剤は、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。

【0160】

好ましい実施形態において、CLDN6に結合する能力を有する剤は、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0161】

ある特定の好ましい実施形態において、CLDN6に結合する能力を有する剤は、下記の可能性（i）～可能性（x i）から選択される重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）の組合せを含む：

（i）VHは、配列番号20によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VLは、配列番号21によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

（ii）VHは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VLは、配列番号23によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

（iii）VHは、配列番号24によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VLは、配列番号25によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

（iv）VHは、配列番号26によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを

10

20

30

40

50

含み、V Lは、配列番号27によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号21によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号28によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i i) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号29によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v i i i) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号97によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(i x) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号98によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(x) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号99によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(x i) V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号100によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0162】

特に好ましい実施形態において、C L D N 6に結合する能力を有する剤は、重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号23によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0163】

さらなる特に好ましい実施形態において、C L D N 6に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号97によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0164】

さらなる特に好ましい実施形態において、C L D N 6に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号98によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0165】

さらなる特に好ましい実施形態において、C L D N 6に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号99によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0166】

さらなる特に好ましい実施形態において、C L D N 6に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域(V H)および軽鎖可変領域(V L)の下記の組合せを含む；

V Hは、配列番号22によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、V Lは、配列番号100によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0167】

用語「フラグメント」は特に、重鎖可変領域(V H)および/または軽鎖可変領域(V

10

20

30

40

50

L)の相補性決定領域(CDR)の1つまたは複数を示し、好ましくは、少なくとも、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)のCDR3可変領域を示す。1つの実施形態において、相補性決定領域(CDR)の前記1つまたは複数は、一組の相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)から選択される。特に好ましい実施形態において、用語「フラグメント」は、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)の相補性決定領域のCDR1、CDR2およびCDR3を示す。

【0168】

1つの実施形態において、1つまたは複数のCDR、一組のCDRあるいは複数組のCDRの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記CDRをそれらの介在フレームワーク領域と一緒に含む。好ましくは、部分はまた、1番目および4番目のフレームワーク領域のどちらかまたは両方の少なくとも約50%を含むであろうし、ただし、前記50%は1番目のフレームワーク領域のC端側50%および4番目のフレームワーク領域のN端側50%である。組換えDNA技術によって作製される結合剤の構築は、本発明の可変領域を、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン(例えば、ジアボディーの製造において)またはタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列につなぐためのリンカーの導入を含めて、クローニング工程または他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによってコードされる可変領域のN端側またはC端側の残基の導入をもたらす場合がある。

10

【0169】

1つの実施形態において、1つまたは複数のCDR、一組のCDRあるいは複数組のCDRの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記CDRをヒト抗体フレームワーク内に含む。

20

【0170】

本発明による結合剤を提供するために有用である抗CD3抗体には、UCHT1-HS(ヒト化mAB)、UCHT1-MM(マウスmAB)、CLB-T3、TR66、145-2C11が含まれるが、これらに限定されない。

【0171】

UCHT1は、CD3をヒトおよび霊長類のサンプルタイプにおいて検出するモノクローナルなIgG1抗CD3モノクローナル抗体である。CLB-T3は、CD3抗原に対して向けられ、かつ、80%~90%のヒト末梢Tリンパ球および髄様胸腺細胞と反応するマウスモノクローナル抗CD3抗体である。TR66は、ヒトCD3のイプシロン鎖を認識するマウスIgG1モノクローナル抗CD3抗体である。145-2C11は、アルメニアンハムスターのモノクローナル抗マウスCD3抗体である。

30

【0172】

好ましくは、CD3結合ドメインのVH領域およびVL領域は、TCRをその生来型配置で発現する活性化された初代ヒトT細胞の表面に存在するような他のTCRサブユニットの状況においてヒトCD3を特異的に認識することができる抗体/抗体分子および抗体様分子に由来する。CD3イプシロン鎖に対して特異的な抗体に由来するVH領域およびVL領域が最も好ましく、前記(親)抗体は、生来型またはほぼ生来型の構造を反映するエピトープ、あるいは、TCR複合体の状況で提示されるヒトCD3の配座的エピトープと特異的に結合しなければならない。本発明の好ましい実施形態において、CD3結合ドメインのVH領域およびVL領域は、UCHT1-HS、UCHT1-MM、CLB-T3およびTR66からなる群から選択されるCD3特異的抗体に由来し、好ましくは、TR66に由来する。

40

【0173】

好ましい実施形態において、CD3に結合する能力を有する剤は、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号94、配列番号95およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。

【0174】

好ましい実施形態において、CD3に結合する能力を有する剤は、配列番号31、配列

50

番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 96 およびそれらのフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0175】

ある特定の好ましい実施形態において、CD3 に結合する能力を有する剤は、下記の可能性 (i) ~ 可能性 (ix) から選択される重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の組合せを含む：

(i) VH は、配列番号 30 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 31 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(ii) VH は、配列番号 32 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 33 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(iii) VH は、配列番号 34 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 34 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(iv) VH は、配列番号 36 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 37 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(v) VH は、配列番号 94 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 37 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(vi) VH は、配列番号 95 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 37 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(vii) VH は、配列番号 36 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 96 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(viii) VH は、配列番号 94 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 96 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む；

(ix) VH は、配列番号 95 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 96 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0176】

特に好ましい実施形態において、CD3 に結合する能力を有する剤は、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の下記の組合せを含む：

VH は、配列番号 36 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 37 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0177】

さらなる特に好ましい実施形態において、CD3 に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の下記の組合せを含む：

VH は、配列番号 94 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 37 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0178】

さらなる特に好ましい実施形態において、CD3 に結合する能力を有する剤は重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の下記の組合せを含む：

VH は、配列番号 95 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含み、VL は、配列番号 96 によって表されるアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む。

【0179】

用語「フラグメント」は特に、重鎖可変領域 (VH) および / または軽鎖可変領域 (V

10

20

30

40

50

L)の相補性決定領域(CDR)の1つまたは複数を示し、好ましくは、少なくとも、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)のCDR3可変領域を示す。1つの実施形態において、相補性決定領域(CDR)の前記1つまたは複数は、一組の相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)から選択される。特に好ましい実施形態において、用語「フラグメント」は、重鎖可変領域(VH)および/または軽鎖可変領域(VL)の相補性決定領域のCDR1、CDR2およびCDR3を示す。

【0180】

1つの実施形態において、1つまたは複数のCDR、一組のCDRあるいは複数組のCDRの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記CDRをそれらの介在フレームワーク領域と一緒に含む。好ましくは、部分はまた、1番目および4番目のフレームワーク領域のどちらかまたは両方の少なくとも約50%を含むであろうし、ただし、前記50%は1番目のフレームワーク領域のC端側50%および4番目のフレームワーク領域のN端側50%である。組換えDNA技術によって作製される結合剤の構築は、本発明の可変領域を、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン(例えば、ジアボディーの製造において)またはタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列につなぐためのリンカーの導入を含めて、クローニング工程または他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによってコードされる可変領域のN端側またはC端側の残基の導入をもたらす場合がある。

10

【0181】

1つの実施形態において、1つまたは複数のCDR、一組のCDRあるいは複数組のCDRの組合せを含む本明細書中に記載されるような結合剤は、前記CDRをヒト抗体フレームワーク内に含む。

20

【0182】

本発明によれば、CLDN18.2を標的化する好ましい結合剤は、配列番号38、配列番号39、配列番号40および配列番号41からなる群から選択されるアミノ酸配列またはその変化体を含む。

【0183】

本発明によれば、CLDN18.2を標的化するさらなる好ましい結合剤は、配列番号103、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92および配列番号93からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。1つの実施形態において、前記アミノ酸配列は、分泌シグナル、例えば、N末端の分泌シグナルなど、具体的には、分泌シグナルが存在するならば、配列番号51による配列を欠いており、かつ/または、Hisタグ、例えば、C末端のHisタグなど、具体的には、Hisタグが存在するならば、配列Gly-Gly-Ser-(His)₆または配列(His)₆を欠いている。

30

【0184】

本発明によれば、CLDN6を標的化する好ましい結合剤は、配列番号42、配列番号43、配列番号44および配列番号45からなる群から選択されるアミノ酸配列またはその変化体を含む。

40

【0185】

本発明によれば、CLDN6を標的化するさらなる好ましい結合剤は、配列番号101、配列番号102、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64および配列番号65からなる群から選択されるアミノ酸配列あるいはそのフラグメントまたは変化体を含む。1つの実施形態において、前記アミノ酸配列は、分泌シグナル、例えば、N末端の分泌シグナルなど、具体的には、分泌シグナルが存在するならば、配列番号51による配列を欠いており、かつ/または、Hisタグ、例えば、C末端のHi

50

s タグなど、具体的には、His タグが存在するならば、配列 Gly - Gly - Ser - (His)₆ または配列 (His)₆ を欠いている。

【0186】

本明細書中に記載される結合剤は、当該剤をコードする核酸（例えば、RNA など）を投与することによって、および/または、当該剤をコードする核酸（例えば、RNA など）を含む宿主細胞を投与することによって患者に送達される場合があることを理解しなければならない。したがって、結合剤をコードする核酸は、患者に投与されたときには、ネイキド形態で、あるいは、好適な送達ビヒクルにおいて、例えば、リポソームまたはウイルス粒子などの形態で、すなわち、宿主細胞の中に存在する場合がある。提供される核酸は、上記剤を、治療用抗体（特に、二重特異性抗体）については少なくとも部分的に観測される不安定性を軽減する持続した様式で長期間にわたって産生することができる。患者に送達されるための核酸は組換え手段によって作製することができる。核酸が、宿主細胞内に存在することなく、患者に投与されるならば、核酸は好ましくは、核酸によってコードされる結合剤の発現のために患者の細胞によって取り込まれる。核酸が、宿主細胞内に存在しながら、患者に投与されるならば、核酸は好ましくは、核酸によってコードされる結合剤を産生するように患者体内の宿主細胞によって発現される。

10

【0187】

用語「組換え」は本発明との関連では、「遺伝子操作により作製された」ことを意味する。好ましくは、「組換え物」、例えば、本発明との関連での組換え核酸などは、天然に存在していない。

20

【0188】

用語「天然に存在する」は本明細書中で使用される場合、対象物が自然界に見出され得るという事実を示す。例えば、生物（ウイルスを含む）に存在しており、自然界の供給源から単離することができ、かつ、実験室において人によって意図的に改変されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在している。

【0189】

用語「核酸」は本明細書中で使用される場合、DNA および RNA、例えば、ゲノム DNA、cDNA、mRNA、組換え産生された分子および化学合成された分子などを含むことが意図される。核酸が一本鎖または二本鎖である場合がある。RNA には、インビトロ転写された RNA (IVT RNA) または合成 RNA が含まれる。

30

【0190】

核酸がベクターに含まれる場合がある。用語「ベクター」は、本明細書中で使用される場合、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター（例えば、ラムダファージなど）、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクターまたはバキュロウイルスベクターなど）または人工染色体ベクター（例えば、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC) または P1 人工染色体 (PAC) など）を含めて、当業者に知られているどのようなベクターをも包含する。前記ベクターには、発現ベクター、同様にまた、クローニングベクターが含まれる。発現ベクターは、プラスミド、同様にまた、ウイルスベクターを含み、一般には、所望されるコード配列、および、機能的に連結されたコード配列を特定の宿主細胞（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫または哺乳動物）において、または、インビトロ発現系において発現させるために必要である適切な DNA 配列を含有する。クローニングベクターは、ある特定の所望される DNA フラグメントを操作するために、また、増幅するために一般に使用されており、所望される DNA フラグメントの発現のために必要とされる機能的な配列を欠いている場合がある。

40

【0191】

本発明との関連において、用語「RNA」は、リボヌクレオチド残基を含む分子、好ましくは、リボヌクレオチド残基から全体が構成されるか、または実質的に構成される分子に関連する。「リボヌクレオチド」は、ヒドロキシル基を -D- リボフラノシル基の 2' 位に有するヌクレオチドに関連する。この用語には、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、単離された RNA（例えば、部分精製された RNA など）、本質的に純粋な RNA、合成 R

50

RNA、組換え産生されたRNA、同様にまた、1つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変化によって天然に存在するRNAとは異なる改変されたRNAが含まれる。そのような変化は、非ヌクレオチド物質の付加で、例えば、RNAの末端への付加、あるいは、内部における、例えば、RNAの1つまたは複数のヌクレオチドにおける付加などを含むことができる。RNA分子におけるヌクレオチドはまた、非標準的なヌクレオチドを含むことができ、例えば、天然に存在しないヌクレオチドあるいは化学合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどを含むことができる。これらの変化したRNAは、アナログまたは天然に存在するRNAのアナログとして示すことができる。

【0192】

本発明によれば、用語「RNA」は、「メッセンジャーRNA」を意味し、かつ、DNAをテンプレートとして使用して産生させられる場合があり、ペプチドまたはタンパク質をコードする「転写物」に関連する「mRNA」を包含し、好ましくは、そのような「mRNA」に関連する。mRNAは典型的には、5'非翻訳領域(5'-UTR)、タンパク質またはペプチドのコード領域、および、3'非翻訳領域(3'-UTR)を含む。mRNAは細胞内およびインビトロでは限定された半減時間を有する。好ましくは、mRNAは、DNAテンプレートを使用するインビトロ転写によって産生させられる。本発明の1つの実施形態において、RNAがインビトロ転写または化学合成によって得られる。インビトロ転写方法論は当業者には知られている。例えば、市販されている様々なインビトロ転写キットが存在する。

【0193】

本発明の1つの実施形態において、RNAは自己複製RNAであり、例えば、一本鎖の自己複製RNAなどである。1つの実施形態において、自己複製RNAは、プラス・センスの一本鎖RNAである。1つの実施形態において、自己複製RNAはウイルスRNAまたはウイルスRNA由来のRNAである。1つの実施形態において、自己複製RNAはアルファウイルスのゲノムRNAであり、または、アルファウイルスのゲノムRNAに由来する。1つの実施形態において、自己複製RNAはウイルス遺伝子発現ベクターである。1つの実施形態において、ウイルスはセムリキ森林ウイルスである。1つの実施形態において、自己複製RNAは1つまたは複数の導入遺伝子を含み、ただし、この場合、前記導入遺伝子の少なくとも1つが、本明細書中に記載される結合剤をコードする。1つの実施形態において、RNAがウイルスRNAまたはウイルスRNA由来であるならば、導入遺伝子は部分的または完全にウイルス配列(例えば、構造タンパク質をコードするウイルス配列など)に取って代わる場合がある。1つの実施形態において、自己複製RNAは、インビトロ転写されたRNAである。

【0194】

アルファウイルスのゲノムは、大きいポリタンパク質のための2つのオープンリーディングフレーム(ORF)をコードするプラス・センスの一本鎖RNA(ssRNA(+))である。ゲノムの5'末端におけるORFは非構造タンパク質のnSP1~nSP4(nsP1~nsP4)をコードしており、これらはRNA依存性RNAポリメラーゼ(レプリカーゼ)に翻訳およびプロセッシングされる; 3'末端におけるORFは、構造タンパク質、すなわち、キャプシドおよび糖タンパク質をコードする。両方のORFは、この構造的ORFの転写を支配するいわゆるサブゲノムプロモーター(SGP)によって隔てられている。遺伝子ベクターとして利用されるとき、SGPの後に続く構造タンパク質は一般には、導入遺伝子によって置き換えられる。そのようなベクターをウイルス粒子にパッケージングするために、構造タンパク質は一般に、ヘルパー構築物からトランスで発現される。アルファウイルスは、もっぱらRNAレベルで感染細胞の細胞質において複製する。感染後、ssRNA(+)ゲノムが、ウイルスの生活環の初期段階では自己タンパク質分解的にnsP123およびnsP4のフラグメントにプロセッシングされるnsP1234ポリタンパク質前駆体の翻訳のためのmRNAとして作用する。nsP123およびnsP4のフラグメントは、(-)鎖のRNAをゲノムRNAテンプレートから転写する(

10

20

30

40

50

-) 鎖レプリカーゼ複合体を形成する。後期段階において、nsP1234ポリタンパク質は、新しい(+)鎖ゲノム、同様にまた、構造タンパク質または導入遺伝子をコードするサブゲノム転写物を合成する(+)鎖レプリカーゼ複合体に集合する個々のタンパク質に完全に切断される。サブゲノムRNAは、新しいゲノムRNAと同様に、キャップ化およびポリアデニル化を受け、したがって、標的細胞感染後、mRNAとして認識される。新しいゲノムRNAのみが、出芽中のピリオンへのゲノムRNAの排他的パッケージングを保證するパッケージングシグナルを含有する。ベクトロロジー(vectorology)のためのアルファウイルスレプリコンの魅力は、キャップ化およびポリアデニル化を受けたRNAゲノムがプラス配向であることに基づいている。翻訳可能なレプリコンRNAを容易にインビトロ合成することができ、それにより、キャップ化が、インビトロ転写反応に加えられるキャップアナログ(cap-analoga)により達成される場合があり、また、ポリAテールがプラスミドテンプレートにおいてポリT連続としてコードされる場合がある。インビトロ転写(IVT)されたレプリコンは従来のトランスフェクション技術によってトランスフェクションされ、少量の開始時のIVT RNAでさえ迅速に増やされる。移入後数時間以内に、SGPの下流側に置かれている導入遺伝子が細胞あたり約40,000コピー~200,000コピーのサブゲノムRNAの非常に多数のコピー数にまで転写され、したがって、組換えタンパク質が強く発現されることは驚くべきことではない。具体的な目的に依存して、IVTレプリコンは標的細胞内に直接にトランスフェクションされる場合があり、または、構造遺伝子をトランスで提供するヘルパーベクターと一緒にアルファウイルス粒子内にパッケージングされる場合がある。皮膚内または筋肉内への移入により、大きい持続した局所的発現がもたらされ、この場合、これには、体液性免疫応答および細胞性免疫応答の強い誘導が並行する。

10

20

【0195】

本発明に従って使用されるRNAの発現および/または安定性を増大させるために、RNAは改変される場合があり、好ましくは、発現されたペプチドまたはタンパク質の配列を変化させることなく改変される場合がある。

【0196】

用語「改変された」は、本発明に従って使用されるようなRNAとの関連では、前記RNAに天然には存在していないRNAのどのような改変をも包含する。

【0197】

本発明の1つの実施形態において、本発明に従って使用されるRNAは、キャップ化されていない5'-三リン酸を有していない。そのようなキャップ化されていない5'-三リン酸の除去を、RNAをホスファターゼにより処理することによって達成することができる。

30

【0198】

本発明によるRNAは、その安定性を増大させるために、および/または、細胞毒性を低下させるために、改変された天然に存在するリボヌクレオチドまたは合成リボヌクレオチドを有する場合がある。例えば、1つの実施形態において、本発明に従って使用されるRNAでは、5-メチルシチジンが、部分的または完全に、好ましくは完全に、シチジンに代わって使用される。代替において、または、加えて、1つの実施形態において、本発明に従って使用されるRNAでは、プソイドウリジンが、部分的または完全に、好ましくは完全に、ウリジンに代わって使用される。

40

【0199】

1つの実施形態において、用語「改変」は、RNAに5'-キャップまたは5'-キャップアナログを与えることに関連する。用語「5'-キャップ」は、mRNA分子の5'末端に見出されるキャップ構造を示し、一般には、普通でない5'から5'へのリン酸連結を介してmRNAにつながるグアノシンヌクレオチドからなる。1つの実施形態において、このグアノシンは7位がメチル化される。用語「従来の5'-キャップ」は、天然に存在するRNAの5'-キャップを示し、好ましくは7-メチルグアノシンキャップ(m7G)を示す。本発明との関連において、用語「5'-キャップ」には、RNAキャップ構造

50

に似ており、かつ、RNAに付け加えられるならば、好ましくは生体内および/または細胞内においてRNAを安定化する能力を有するように改変される5'-キャップアナログが含まれる。

【0200】

RNAに5'-キャップまたは5'-キャップアナログを与えることが、前記5'-キャップまたは5'-キャップアナログの存在下におけるDNAテンプレートのインビトロ転写によって達成される場合があり、ただし、この場合、前記5'-キャップは、生じたRNA鎖に共転写により取り込まれるか、または、RNAが、例えば、インビトロ転写によって生じる場合があり、そして、5'-キャップが、キャッピング酵素を使用して、例えば、ワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して転写後にRNAに付け加えられる場合がある。

10

【0201】

RNAはさらなる改変を含む場合がある。例えば、本発明において使用されるRNAのさらなる改変が、天然に存在するポリ(A)テールの伸長または短縮化、あるいは、5'側または3'側の非翻訳領域(UTR)の変化、例えば、前記RNAのコード領域に関連しないUTRの導入など、例えば、グロビン遺伝子(例えば、アルファ2-グロビン、アルファ1-グロビン、ベータ-グロビンなど、好ましくはベータ-グロビン、より好ましくはヒトベータ-グロビン)に由来する3'-UTRの1コピーまたは複数コピーの挿入、好ましくは2コピーの挿入である場合がある。

【0202】

したがって、本発明に従って使用されるRNAの安定性および/または発現を増大させるために、RNAは、ポリA配列と併せて存在するように、好ましくは10個~500個のアデノシン残基を有するポリA配列、より好ましくは30個~300個のアデノシン残基を有するポリA配列、一層より好ましくは65個~200個のアデノシン残基を有するポリA配列、とりわけ100個~150個のアデノシン残基を有するポリA配列と併せて存在するように改変される場合がある。とりわけ好ましい実施形態において、ポリA配列は、およそ120個のアデノシン残基の長さを有する。加えて、2つ以上の3'非翻訳領域(UTR)をRNA分子の3'非翻訳領域に組み込むことにより、翻訳効率における強化をもたらすことができる。1つの特定の実施形態において、3'-UTRはヒト-グロビン遺伝子に由来する。

20

30

【0203】

好ましくは、RNAは、細胞(特に、生体内に存在する細胞)に送達されるならば、すなわち、細胞(特に、生体内に存在する細胞)の中にトランスフェクションされるならば、RNAによってコードされるタンパク質、ペプチドまたは抗原を発現する。

【0204】

用語「トランスフェクション」は、核酸(特に、RNA)を細胞に導入することに関連する。本発明の目的のために、用語「トランスフェクション」はまた、細胞内への核酸の導入、または、そのような細胞による核酸の取り込みを包含し、ただし、この場合、細胞は被験体(例えば、患者)に存在する場合がある。したがって、本発明によれば、本明細書中に記載される核酸のトランスフェクションのための細胞はインビトロまたはインビボにおいて存在することができ、例えば、細胞は、患者の器官、組織および/または有機体の一部を形成することができる。本発明によれば、トランスフェクションは一過性または安定的であることが可能である。トランスフェクションのいくつかの適用のために、トランスフェクションは、トランスフェクションされた遺伝物質が一過性にだけ発現されるならば、十分である。トランスフェクションプロセスで導入される核酸は通常、核ゲノムには組み込まれないので、外来核酸は有糸分裂を介して希釈されることになるか、または分解されることになる。核酸のエピソーム増幅を可能にする細胞では、希釈速度が大きく低下する。トランスフェクションされた核酸が実際に細胞およびその娘細胞のゲノムに留まることが所望されるならば、安定的なトランスフェクションが生じなければならない。RNAを、そのコードされたタンパク質を一過性に発現させるために細胞にトランスフェク

40

50

ションすることができる。

【0205】

RNAの用語「安定性」はRNAの「半減期」に関連する。「半減期」は、分子の活性、量または数の半分を除くために必要とされる期間に関連する。本発明との関連では、あるRNAの半減期は、前記RNAの安定性について示すものである。RNAの半減期は、当該RNAの「発現の持続期間」に影響を与える場合がある。長い半減期を有するRNAは長期間にわたって発現されるであろうことが予想され得る。

【0206】

本発明との関連では、用語「転写」は、DNA配列における遺伝暗号がRNAに転写されるプロセスに関連する。続いて、そのRNAはタンパク質に翻訳される場合がある。本発明によれば、用語「転写」は「インビトロ転写」を含み、ただし、この場合、用語「インビトロ転写」は、RNA（特に、mRNA）が、無細胞系において、好ましくは、適切な細胞抽出物を使用してインビトロ合成されるプロセスに関連する。好ましくは、様々なクロニングベクターが転写物の生成のために適用される。これらのクロニングベクターは転写ベクターとして一般には示され、本発明によれば、用語「ベクター」によって包含される。

10

【0207】

用語「翻訳」は本発明によれば、メッセンジャーRNAの鎖が、ペプチドまたはタンパク質を作製するためのアミノ酸の配列の組立てを導く細胞のリボソームにおけるプロセスに関連する。

20

【0208】

用語「発現」はその最も一般的な意味で本発明に従って使用され、RNAおよび/またはペプチドもしくはタンパク質を、例えば、転写および/または翻訳によって生じさせることを含む。RNAに関して、用語「発現」または用語「翻訳」は、特にペプチドまたはタンパク質を生じさせることに関連する。用語「発現」または用語「翻訳」はまた、核酸の部分的な発現を含む。そのうえ、発現は一過性または安定的であることが可能である。本発明によれば、発現の用語にはまた、「正常から外れた発現」または「正常でない発現」が含まれる。

【0209】

「正常から外れた発現」または「正常でない発現」は、本発明によれば、発現が、参照と比較して、例えば、ある特定のタンパク質（例えば、腫瘍抗原）の正常から外れた発現または正常でない発現に伴う疾患を有しない被験体における状態と比較して変化していること、好ましくは増大していることを意味する。発現における増大は、少なくとも10%の増大を示し、特に、少なくとも20%、少なくとも50%または少なくとも100%あるいはそれ以上の増大を示す。1つの実施形態において、発現は患部組織において見出されるだけであり、一方、健康な組織における発現は抑制されている。

30

【0210】

用語「特異的に発現される」は、タンパク質が特定の組織または器官において本質的に発現されるだけであることを意味する。例えば、胃粘膜において特異的に発現される腫瘍抗原は、前記タンパク質が主として胃粘膜において発現され、他の組織では発現されないか、あるいは、他の組織タイプまたは器官タイプでは顕著な程度に発現されないことを意味する。したがって、胃粘膜の細胞においてもっばら発現され、かつ、どのような組織であれ、他の組織（例えば、精巣）では有意により少ない程度に発現されるタンパク質は、胃粘膜の細胞において特異的に発現される。いくつかの実施形態において、腫瘍抗原はまた、2つ以上の組織タイプまたは器官において、例えば、2つまたは3つの組織タイプまたは器官において、しかし、好ましくは、3つを超えない異なる組織タイプまたは器官タイプにおいて正常な状態のもとで特異的に発現される場合がある。この場合において、腫瘍抗原はその場合にはこれらの器官において特異的に発現される。例えば、腫瘍抗原が、正常な状態のもと、肺および胃において、好ましくはおよそ等しい程度に発現されるならば、前記腫瘍抗原は肺および胃において特異的に発現される。

40

50

【0211】

本発明によれば、用語「RNAエンコーディング」は、RNAが適切な環境に存在するならば、好ましくは細胞内に存在するならば、RNAが、RNAによってコードされるタンパク質またはペプチドを産生するように発現され得ることを意味する。

【0212】

本発明のいくつかの局面は、核酸（例えば、本明細書中に記載される結合剤をコードするRNAなど）によりインビトロでトランスフェクションされ、そして、低い前駆体頻度から臨床的に妥当な細胞数へのエクスピボ拡大の後であることが好ましいが、レシピエント（例えば、患者など）に移される宿主細胞の養子移入に依拠する。本発明による処置のために使用される宿主細胞は、処置されたレシピエントに対して自己、同種または同系である場合がある。

10

【0213】

用語「自己（の）」は、どのようなものであれ、同じ被験体に由来するものを表すために使用される。例えば、「自己移植片」は、同じ被験体に由来する組織または器官の移植片を示す。そのような手順は、他の場合には拒絶を生じさせる免疫学的バリアを克服するので、好都合である。

【0214】

用語「同種（の）」は、どのようなものであれ、同じ種の異なる個体に由来するものを表すために使用される。2つ以上の個体は、1つまたは複数の遺伝子座における遺伝子が同一でないときには互いに同種であると言われる。

20

【0215】

用語「同系（の）」は、どのようなものであれ、同一の遺伝子型を有する個体または組織に由来するもの、すなわち、同一の双子または同じ近交系統の動物あるいはそれらの組織に由来するものを表すために使用される。

【0216】

用語「異種（の）」は、多数の異なる要素からなる何かを表すために使用される。一例として、ある個体の骨髄を異なる個体に移すことは、異種移植を構成する。異種遺伝子は、被験体以外の供給源に由来する遺伝子である。

【0217】

用語「ペプチド」は本発明によれば、オリゴペプチドおよびポリペプチドを含み、2個以上、好ましくは3個以上、好ましくは4個以上、好ましくは6個以上、好ましくは8個以上、好ましくは9個以上、好ましくは10個以上、好ましくは13個以上、好ましくは16個以上、好ましくは21個以上で、好ましくは8個までのアミノ酸、10個までのアミノ酸、20個までのアミノ酸、30個までのアミノ酸、40個までのアミノ酸または50個までのアミノ酸、特に100個までのアミノ酸がペプチド結合による共有結合によって連結されて含まれる物質を示す。用語「タンパク質」は、大きいペプチドを示し、好ましくは、100個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドを示し、しかし、一般には、用語「ペプチド」および用語「タンパク質」は同義的であり、本明細書中では交換可能に使用される。

30

【0218】

特定のアミノ酸配列（例えば、配列表に示されるアミノ酸配列）に関して本明細書中において与えられる教示は、前記特定の配列と機能的に同等である配列をもたらず前記特定の配列の変化体、例えば、特定のアミノ酸配列の性質と同一であるか、または、特定のアミノ酸配列の性質に類似する性質を示すアミノ酸配列にもまた関連するように解釈されなければならない。1つの重要な性質は、標的に対する結合を保持すること、または、エフェクター機能を持続することである。好ましくは、特定の配列に関して変化体である配列は、その配列が抗体における特定の配列に取って代わるとき、前記抗体がCLDNおよび/またはCD3に結合すること、ならびに、好ましくは、本明細書中に記載されるような前記抗体の機能、例えば、CDC媒介溶解またはADC媒介溶解を保持する。

40

【0219】

50

例えば、配列表に示される配列は、1つまたは複数のフリーのシステイン残基を、好ましくはすべてのフリーのシステイン残基を、特にこれらのシステイン残基をシステイン以外のアミノ酸によって置換することによって、好ましくは、セリン、アラニン、トレオニン、グリシン、チロシン、ロイシンまたはメチオニンによって置換することによって、最も好ましくはアラニンまたはセリンによって置換することによって除くように改変することができる。例えば、配列表の配列番号36に示される配列の103位におけるシステイン、または、前記配列を含む配列における対応するシステインが、このように改変される場合がある。このように改変することができるさらなるシステインは、配列番号42の178位におけるシステイン、配列番号43の197位におけるシステイン、配列番号44の427位におけるシステイン、または、配列番号45の446位におけるシステインである。

10

【0220】

特に、CDR領域、超可変領域および可変領域の配列が、CLDNおよび/またはCD3に結合する能力を失うことなく改変され得ることが、当業者によって理解されるであろう。例えば、CDR領域は、本明細書中で指定される抗体の領域と同一であるか、または非常に相同的であるかのどちらかであろう。「非常に相同的」によって、1つ~5つの置換、好ましくは、1つ~4つの置換、例えば、1つ~3つの置換、あるいは、1つまたは2つの置換などがCDRにおいてなされる場合があることが意図される。加えて、超可変領域および可変領域が、本明細書中に具体的に開示される抗体の領域との実質的な同一性を示すように改変される場合がある。

20

【0221】

本発明の目的のために、アミノ酸配列の「変化体」は、アミノ酸挿入変化体、アミノ酸付加変化体、アミノ酸欠失変化体および/またはアミノ酸置換変化体を含む。タンパク質のN末端および/またはC末端における欠失を含むアミノ酸欠失変化体はまた、N末端短縮変化体および/またはC末端短縮変化体と呼ばれる。

【0222】

アミノ酸挿入変化体は、特定のアミノ酸配列における1個だけまたは2個以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変化体の場合、1つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸配列における特定の部位に挿入され、だが、生じた生成物の適切なスクリーニングを伴うランダム挿入もまた可能である。

30

【0223】

アミノ酸付加変化体は、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個またはそれ以上のアミノ酸など）のアミノ末端融合体および/またはカルボキシ末端融合体を含む。

【0224】

アミノ酸欠失変化体は、配列からの1つまたは複数のアミノ酸の除去によって、例えば、1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個またはそれ以上のアミノ酸の除去によって特徴づけられる。欠失はタンパク質のどのような位置であってもよい。

【0225】

アミノ酸置換変化体は、配列における少なくとも1つの残基が除かれ、別の残基がその場所に挿入されることによって特徴づけられる。改変が、相同的なタンパク質またはペプチドの間において保存されていないアミノ酸配列内の位置にあること、ならびに/あるいは、アミノ酸を、類似する性質を有する他のアミノ酸により置換することが好ましい。好ましくは、タンパク質変化体におけるアミノ酸変化は保存的なアミノ酸変化であり、すなわち、類似する荷電アミノ酸または非荷電アミノ酸を代わりに使用するものである。保存的なアミノ酸変化は、それらの側鎖において関連づけられるアミノ酸のファミリーのアミノ酸の置換を伴う。天然に存在するアミノ酸は一般には、下記の4つのファミリーに分けられる：酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性アミノ酸（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）および非荷電極性アミノ

40

50

酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン）。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはときには、一緒にして芳香族アミノ酸として分類される。

【0226】

好ましくは、与えられたアミノ酸配列と、前記与えられたアミノ酸配列の変化体であるアミノ酸配列との間における類似性の程度、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%であろう。類似性または同一性の程度は好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%であるアミノ酸領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が200アミノ酸からなるならば、類似性または同一性の程度は好ましくは、少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約60個、少なくとも約80個、少なくとも約100個、少なくとも約120個、少なくとも約140個、少なくとも約160個、少なくとも約180個、または、約200個のアミノ酸（好ましくは連続するアミノ酸）について与えられる。好ましい実施形態において、類似性または同一性の程度は参照アミノ酸配列の全長について与えられる。配列類似性を求めるためのアラインメントを、好ましくは、配列同一性を求めるためのアラインメントを、この技術分野で知られているツールを用いて、好ましくは、最良配列アラインメントを使用して、例えば、Alignを使用して行うことができ、この場合、標準的な設定が使用され、好ましくは、EMBOSS::needle、Matrix: Blosum62、Gap Open 10.0、Gap Extend 0.5が使用される。

10

20

【0227】

「配列類似性」は、同一であるアミノ酸、または、保存的なアミノ酸置換を表すアミノ酸のどちらであっても、これらのアミノ酸の百分率を示す。2つのアミノ酸配列の間における「配列同一性」は、配列間において同一であるアミノ酸の百分率を示す。

【0228】

用語「百分率同一性」は、最良アラインメントの後で得られる、比較されるべき2つの配列の間において同一であるアミノ酸残基の百分率を意味することが意図され、ただし、この百分率は純粋に統計学的であり、これら2つの配列の間における違いが、ランダムに、かつ、それらの全長にわたって分布する。2つのアミノ酸配列の間における配列比較は従来のには、これらの配列を最適にアラインメントした後でこれらの配列を比較することによって行われ、ただし、この場合、前記比較は、配列類似性の局所的領域を特定し、比較するためにセグメントによって、または、「比較の窓」によって行われる。比較のための配列の最適なアラインメントは、手作業によって行われるほかに、SmithおよびWaterman(1981、Ads App. Math.、2、482)の局所的相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch(1970、J. Mol. Biol.、48、443)の局所的相同性アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman(1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85、2444)の類似性検索法によって、または、これらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N、および、TFASTA、これらは、Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group、575 Science Drive、Madison、Wis.)に含まれる)によってもたらされる場合がある。

30

40

【0229】

百分率同一性は、比較されている2つの配列の間における同一位置の数を求め、この数を比較された位置の数によって除し、そして、得られた結果を100倍して、これら2つの配列の間における百分率同一性を得るようにすることによって計算される。

50

【0230】

本発明の結合剤は細胞内に（例えば、細胞質ゾルにおいて、ペリプラズマ（periplasma）において、または、封入体で）生成させ、その後、宿主細胞から単離し、必要な場合にはさらに精製することができるか、あるいは、本発明の結合剤は細胞外に（例えば、宿主細胞が培養される培地に）生成させ、その後、培養培地から単離し、必要な場合にはさらに精製することができる。ポリペプチドの組換え産生のために使用される様々な方法および試薬、例えば、具体的な好適な発現ベクター、形質転換方法またはトランスフェクション方法、選択マーカー、タンパク質発現の誘導方法および培養条件などがこの技術分野において知られている。同様に、様々なタンパク質単離技術およびタンパク質精製技術が当業者には広く知られている。

10

【0231】

用語「細胞」または用語「宿主細胞」は好ましくは、無傷な細胞、すなわち、その正常な細胞内成分（例えば、酵素、オルガネラまたは遺伝物質など）を放出していない無傷の膜を有する細胞に関連する。無傷の細胞は好ましくは、生存可能な細胞、すなわち、その正常な代謝機能を行うことができる生細胞である。好ましくは、前記用語は本発明によれば、外因性核酸によりトランスフェクションすることができるどのような細胞にも関連する。好ましくは、細胞は、外因性核酸によりトランスフェクションされ、レシピエントに移されたとき、当該核酸をレシピエントにおいて発現することができる。用語「細胞」には、細菌細胞が含まれる；他の有用な細胞は、酵母細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞である。好適な細菌細胞には、グラム陰性細菌菌株、例えば、大腸菌、プロテウス属およびシュードモナス属の菌株など、ならびに、グラム陽性細菌菌株、例えば、バシラス属、ストレプトミセス属、ブドウ球菌属およびラクトコッカス属の菌株などに由来する細胞が含まれる。好適な真菌細胞には、トリコデルマ属、アカパンカビ属およびアスペルギルス属の種に由来する細胞が含まれる。好適な酵母細胞には、サッカロミセス属の種（例えば、サッカロミセス・セレビジアエ（*Saccharomyces cerevisiae*））、シゾサッカロミセス属の種（例えば、シゾサッカロミセス・ボンベ（*Schizosaccharomyces pombe*））、ピキア属の種（例えば、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）およびピキア・メタノリクド（*Pichia methanolicus*））およびハンセヌラ属の種に由来する細胞が含まれる。好適な哺乳動物細胞には、例えば、CHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞、293HEKなどが含まれる。しかしながら、異種タンパク質の発現のためにこの技術分野において使用される両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞およびどのような他の細胞も同様に使用することができる。哺乳動物細胞が養子移入のために特に好ましい（例えば、ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギおよび霊長類に由来する細胞など）。細胞は、非常に多くの組織タイプに由来する場合があり、初代細胞および細胞株、例えば、免疫系の細胞、特に、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびT細胞など）、幹細胞（例えば、造血幹細胞および間葉系幹細胞など）および他の細胞タイプなどを包含する。抗原提示細胞は、抗原をその表面において主要組織適合遺伝子複合体の状況で呈示する細胞である。T細胞は、この複合体を、そのT細胞受容体（TCR）を使用して認識する場合がある。

20

30

【0232】

「減少させる」、「低下させる」または「阻害する」は本明細書中で使用される場合、レベルにおける、例えば、発現のレベルにおける、または、細胞の増殖のレベルにおける、好ましくは5%以上、10%以上、20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%以上の全体的な低下、あるいは、そのような全体的な低下を生じさせることができることを意味する。

40

【0233】

「増大させる」または「高める」などの用語は好ましくは、約少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、一層より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも10

50

00%、少なくとも10000%、または、それどころか、それ以上の増大または強化に関連する。

【0234】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害

A D C C は、本明細書中に記載されるようなエフェクター細胞（特に、リンパ球）の細胞殺傷能を表し、ただし、これは好ましくは、標的細胞に印が抗体によってつけられることを必要とする。

【0235】

A D C C は好ましくは、抗体が腫瘍細胞表面の抗原に結合し、かつ、抗体の F c ドメインが免疫エフェクター細胞の表面の F c 受容体（F c R）と会合するときに生じる。いくつかのファミリーの F c 受容体が特定されており、特異的な細胞集団が、規定された F c 受容体の特徴的に発現する。A D C C は、抗原提示および腫瘍に向けられた T 細胞応答の誘導を引き起こす可変的な即時的腫瘍破壊を直接に誘導するための機構として見ることができる。好ましくは、A D C C のインビボ誘導は、腫瘍に向けられた T 細胞応答および宿主由来の抗体応答を引き起こすであろう。

10

【0236】

補体依存性細胞傷害

C D C は、抗体によって導かれ得る別の細胞殺傷法である。I g M は、補体活性化のための最も効果的なイソタイプである。I g G 1 および I g G 3 はともにまた、古典的補体活性化経路を介して C D C を導くことにおいて非常に効果的である。好ましくは、このカスケードにおいて、抗原-抗体複合体の形成により、多数の C 1 q 結合部位の露出が、関与している抗体分子（例えば、I g G 分子など）の C H 2 ドメインの表面における極近傍においてもたらされる（C 1 q は補体 C 1 の 3 つの副成分のうちの 1 つである）。好ましくは、これらの露出した C 1 q 結合部位は、以前には低親和性の C 1 q - I g G 相互作用を高アビディティの相互作用に転換し、これにより、一連の他の補体タンパク質を伴う事象のカスケードの引き金が引かれ、エフェクター細胞走化性因子/活性化因子の C 3 a および C 5 a のタンパク質分解的放出が引き起こされる。好ましくは、補体カスケードは、膜攻撃複合体の形成で終わり、これにより、水および溶質の細胞内および細胞外への自由な通過を容易にする細胞膜における細孔が生じる。

20

【0237】

本明細書中に記載される抗体、例えば、V L 領域および V H 領域を提供するための本明細書中に記載される抗体は、従来モノクローナル抗体方法論、例えば、K o h l e r および M i l s t e i n (N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5)) の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含めて、様々な技術によって製造することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいにもかかわらず、原理的には、モノクローナル抗体を製造するための他の技術を用いることができ、例えば、Bリンパ球のウイルス形質転換または発ガン性形質転換、あるいは、抗体遺伝子のライブラリーを使用するファージディスプレイ技術を用いることができる。

30

【0238】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための好ましい動物系がマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は、非常に十分に確立された手法である。様々な免疫化プロトコル、および、融合のための免疫化された脾細胞を単離するための技術がこの技術分野において知られている。様々な融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手法もまた知られている。

40

【0239】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための他の好ましい動物系がラット系およびウサギ系である（これらが、例えば、S p i e k e r - P o l e t 他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 9 2 : 9 3 4 8 (1 9 9 5) に記載される。R o s s i 他、A m . J . C l i n . P a t h o l . 1 2 4 : 2 9 5 (2 0 0 5) もまた参照のこと）。

50

【0240】

さらに別の好ましい実施形態において、ヒトモノクローナル抗体を、マウス系ではなく、むしろ、ヒト免疫系の一部を有する遺伝子組換えマウスまたは染色体組換えマウスを使用して生じさせることができる。これらの遺伝子組換えマウスおよび染色体組換えマウスには、HuMAbマウスおよびKMマウスとしてそれぞれ知られているマウスが含まれ、これらはまとめて、本明細書中では「遺伝子組換えマウス」として示される。そのような遺伝子組換えマウスにおけるヒト抗体の製造を、国際公開WO2004035607においてCD20について詳しく記載されるように行うことができる。

【0241】

モノクローナル抗体を生じさせるためのさらに別の戦略が、抗体をコードする遺伝子を、規定された特異性の抗体を産生するリンパ球から直接に単離することである。例えば、Babcock他(1996、A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities)を参照のこと。組換え抗体工学の詳細については、WelschhofおよびKraus、Recombinant antibodies for cancer therapy (ISBN-0-89603-918-8)、ならびに、Benny K. C. Lo、Antibody Engineering (ISBN 1-58829-092-1)もまた参照のこと。

【0242】

抗体を生じさせるために、マウスを記載されるように、抗原配列、すなわち、抗体が向けられることになる配列に由来するキャリアコンジュゲート化ペプチド、組換え発現された抗原もしくはそのフラグメントの富化された調製物、および/または、抗原を発現する細胞により免疫化することができる。代替では、マウスを、抗原またはそのフラグメントをコードするDNAにより免疫化することができる。抗原の精製された調製物または富化された調製物を使用する免疫化が抗体をもたらさない場合には、マウスはまた、免疫応答を促進させるために、当該抗原を発現する細胞(例えば、細胞株)により免疫化することができる。

【0243】

免疫応答を、血漿サンプルおよび血清サンプルが尾静脈採血または後眼窩採血によって得られる免疫化プロトコルの経過にわたってモニターすることができる。免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合のために使用することができる。マウスには、抗原発現細胞による腹腔内または静脈内への追加抗原刺激を、特異的抗体を分泌するハイブリドーマの割合を増大させるために、屠殺および脾臓取り出しの3日前に行うことができる。

【0244】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生じさせるために、免疫化マウスからの脾細胞およびリンパ節細胞を単離し、適切な不死化された細胞株(例えば、マウス骨髄腫細胞株など)に融合することができる。得られたハイブリドーマはその後、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。その後、個々のウエルを抗体分泌ハイブリドーマについてELISAによってスクリーニングすることができる。抗原発現細胞を使用する免疫蛍光分析およびFACS分析によって、特異性を当該抗原について有する抗体を特定することができる。抗体分泌ハイブリドーマを再置床し、再びスクリーニングことができ、そして、依然としてモノクローナル抗体について陽性であるならば、限界希釈によってサブクローン化することができる。その後、安定なサブクローンは、抗体を特徴づけのために組織培養培地において生じさせるためにインビトロ培養することができる。

【0245】

抗体はまた、例えば、この技術分野において広く知られているような組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して宿主細胞トランスフェクターマにおいて産生させることができる(Morrison, S. (1985)、Scienc

10

20

30

40

50

e、229:1202)。

【0246】

例えば、1つの実施形態において、目的とする遺伝子、例えば、抗体遺伝子を、発現ベクター（例えば、真核生物用発現プラスミド（例えば、国際公開WO87/04462、同WO89/01036および欧州特許EP338841に開示されるGS遺伝子発現系によって使用される真核生物用発現プラスミドなど）、または、この技術分野において広く知られている他の発現系など）に連結することができる。クローン化された抗体遺伝子を有する精製されたプラスミドを、真核生物宿主細胞（例えば、CHO細胞、NS/O細胞、HEK293T細胞またはHEK293細胞など）に導入することができ、あるいは、代替では、植物由来細胞、真菌細胞または酵母細胞のような他の真核生物細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために使用される方法は、この技術分野において記載される方法が可能であり、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクチンまたはリポフェクタミンなどが可能である。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入した後で、抗体を発現する細胞を特定し、選択することができる。これらの細胞は、次いでそれらの発現レベルについて増幅することができ、また、抗体を産生させるためにスケールアップすることができるトランスフェクターを表す。組換え抗体をこれらの培養上清および/または細胞から単離し、精製することができる。

10

【0247】

代替では、クローン化された抗体遺伝子を、原核生物細胞（例えば、微生物など）を含めて、他の発現系において、例えば、E. coliにおいて発現させることができる。さらには、抗体を、ヒト以外の遺伝子組換え動物において、例えば、ヒツジおよびウサギから乳汁において、または、ニワトリから卵において、または、遺伝子組換え植物において産生させることができる；例えば、Verma, R. 他(1998)、J. Immunol. Meth., 216:165~181; Pollock 他(1999)、J. Immunol. Meth., 231:147~157; および、Fischer, R. 他(1999)、Biol. Chem., 380:825~839を参照のこと。

20

【0248】

キメラ化

非標識のマウス抗体は、繰り返し適用されたときにはヒトにおいて非常に免疫原性であり、このことは治療効果の低下を引き起こす。主たる免疫原性が重鎖定常領域によって媒介される。それぞれの抗体がキメラ化またはヒト化されるならば、ヒトにおけるマウス抗体の免疫原性を低下させることができ、または、完全に回避することができる。キメラ抗体は、その種々の部分が異なる動物種に由来する抗体であり、例えば、マウス抗体に由来する可変領域と、ヒト免疫グロブリンの定常領域とを有する抗体などである。抗体のキメラ化が、（例えば、Kraus 他によって、Methods in Molecular Biology シリーズ、Recombinant antibodies for cancer therapy (ISBN-0-89603-918-8) に記載されるように) マウス抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をヒトの重鎖および軽鎖の定常領域と連結することによって達成される。好ましい実施形態において、キメラ抗体が、ヒトカップ軽鎖定常領域をマウス軽鎖可変領域に連結することによって作製される。同様に好ましい実施形態において、キメラ抗体を、ヒトラムダ軽鎖定常領域をマウス軽鎖可変領域に連結することによって作製することができる。キメラ抗体を作製するための好ましい重鎖定常領域が、IgG1、IgG3およびIgG4である。キメラ抗体を生じさせるための他の好ましい重鎖定常領域が、IgG2、IgA、IgDおよびIgMである。

30

40

【0249】

ヒト化

抗体は、主には重鎖および軽鎖の6つの相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、個々の抗体の間では、CDRの外側の配列よりも大きい多様性を有する。CDR配列がほとんどの抗体-抗原相互作用に関わっているため、特定の天然に存在する抗体の性質を模倣する組

50

換え抗体を、異なる性質を有する異なる抗体に由来するフレームワーク配列にグラフト化される特異的な天然に存在する抗体から得られるCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. 他(1998)、Nature、332:323~327; Jones, P. 他(1986)、Nature、321:522~525; および、Queen, C. 他(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、86:10029~10033を参照のこと)。そのようなフレームワーク配列を、生殖系列の抗体遺伝子配列を含む公開されているDNAデータベースから得ることができる。これらの生殖系列配列は、完全に組み立てられた可変遺伝子(これはB細胞成熟化の期間中にV(D)J連結によって形成される)を含まないであろうので、成熟型抗体の遺伝子配列とは異なるであろう。生殖系列の遺伝子配列はまた、可変領域全域にわたって一様に個々において高親和性の二次的なレパートリー抗体の配列と異なるであろう。

10

【0250】

抗原と結合する抗体および他の結合剤の能力は、標準的な結合アッセイ(例えば、ELISA分析、ウエスタンブロット分析、免疫蛍光分析およびフローサイトメトリー分析)を使用して求めることができる。

【0251】

抗体を精製するために、選択された産生細胞株を組換え抗体の精製のために2リットルのスピナーフラスコにおいて成長させることができる。代替では、抗体を透析に基づくバイオリアクターにおいて産生させることができる。上清を、プロテインL-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーの前にもろし、必要ならば、濃縮することができる。溶出されたIgGを、純度を保証するためにゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによって調べることができる。緩衝液溶液をPBSに交換することができ、濃度を、それぞれの吸光係数を使用してOD280によって求めることができる。組換え抗体は小分けし、-80℃で貯蔵することができる。

20

【0252】

抗原を発現する生細胞にモノクローナル抗体が結合することを明らかにするために、フローサイトメトリーを使用することができる。抗原を天然において、または、トランスフェクションの後で発現する細胞株、および、抗原発現を欠く陰性コントロール(これらは標準的な成長条件のもとで成長させられる)を、ハイブリドーマ上清において、または、1%のFBSを含有するPBSにおいて様々な濃度のモノクローナル抗体と混合することができ、4℃で30分間インキュベーションすることができる。洗浄後、APCまたはAlexa647により標識される抗IgG抗体は、一次抗体染色と同じ条件のもと、抗原と結合したモノクローナル抗体に結合することができる。サンプルは、個々の生細胞に対してゲート開閉するために光および側方散乱特性を使用するFACS装置を用いてフローサイトメトリーによって分析することができる。抗原特異的なモノクローナル抗体をただ1回の測定で非特異的な結合体から識別するために、共トランスフェクションの方法を用いることができる。抗原および蛍光性マーカーをコードするプラスミドにより一過性にトランスフェクションされた細胞を上記のように染色することができる。トランスフェクションされた細胞を、抗体により染色された細胞とは異なる蛍光チャンネルで検出することができる。トランスフェクションされた細胞の大部分が両方の導入遺伝子を発現するので、抗原特異的なモノクローナル抗体は優先的に蛍光マーカー発現細胞に結合し、これに対して、非特異的な抗体は、非トランスフェクション細胞に対して同程度の比率で結合する。蛍光顕微鏡法を使用する代わりにアッセイが、フローサイトメトリーアッセイに加えて、または、フローサイトメトリーアッセイの代わりに使用される場合がある。細胞は、まさに上記のように染色し、蛍光顕微鏡法によって調べることができる。

30

40

【0253】

抗原を発現する生細胞にモノクローナル抗体が結合することを明らかにするために、免疫蛍光顕微鏡法分析を使用することができる。例えば、抗原を自発的またはトランスフェクション後のどちらかで発現する細胞株、および、抗原発現を欠く陰性コントロールが、

50

10%のウシ胎児血清(FCS)、2mMのL-グルタミン、100IU/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンが補充されるDMEM/F12培地における標準的な成長条件のもと、チャンバースライドにおいて成長させられる。その後、細胞はメタノールまたはパラホルムアルデヒドにより固定することができ、あるいは、処理されないままにしておくことができる。その後、細胞は、25℃で30分間、抗原に対するモノクローナル抗体と反応させることができる。洗浄後、細胞は、同じ条件のもと、Alexa555標識された抗マウスIgG二次抗体(Molecular Probes)と反応させることができる。その後、細胞を蛍光顕微鏡法によって調べることができる。

【0254】

抗原を発現する細胞から得られる細胞抽出物、および、適切な陰性コントロールを調製し、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離された抗原はニトロセルロースメンブランに転写され、ブロッキング処理され、試験されるモノクローナル抗体によりプローブ探査されるであろう。IgG結合を、抗マウスIgGペルオキシダーゼを使用して検出し、ECL基質により発色させることができる。

【0255】

抗体はさらに、当業者に広く知られている様式で、例えば、常法的な手術手順の期間中に患者から、あるいは、抗原を自発的に、またはトランスフェクションの後で発現する細胞株が接種された異種移植腫瘍を有するマウスから得られる非ガン組織サンプルおよびガン組織サンプルに由来するパラホルムアルデヒド固定凍結切片またはアセトン固定凍結切片あるいはパラホルムアルデヒド固定されるパラフィン包埋組織切片を使用して免疫組織化学によって抗原との反応性について調べることができる。免疫染色のために、抗原に対する反応性を有する抗体をインキュベーションすることができ、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲート化されたヤギ抗マウス抗体またはヤギ抗ウサギ抗体(DAKO)を供給者の説明書に従ってインキュベーションすることができる。

【0256】

前臨床研究

本明細書中に記載される結合剤はまた、CLDNを発現する腫瘍細胞の成長を抑制することにおけるその効力を求めるために、インビボモデルにおいて、例えば、CLDNを発現する細胞株が接種された異種移植腫瘍を有する免疫不全マウスにおいて試験することができる。

【0257】

CLDN発現腫瘍細胞を免疫低下したマウスまたは他の動物に異種移植した後のインビボ研究を、本明細書中に記載される結合剤を使用して行うことができる。結合剤を、腫瘍を有しないマウスに投与し、その後、腫瘍細胞を注入して、腫瘍の形成または腫瘍関連症状を防止するための結合剤の効果を測定することができる。結合剤を、腫瘍を有するマウスに投与して、腫瘍成長、転移または腫瘍関連症状を軽減するためのそれぞれの結合剤の治療効力を求めることができる。結合剤の適用を、細胞分裂抑制薬物、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、血管形成阻害剤または抗体のような他の物質の適用と組み合わせて、組合せ物の相乗的効力および潜在的毒性を求めることができる。結合剤によって媒介される毒性副作用を分析するために、動物には、結合剤またはコントロール試薬を接種することができ、そして、動物を、CLDN結合剤療法に関連づけられている可能性のある症状について入念に調査することができる。

【0258】

結合剤によって認識されるエピトープのマッピングを、"Epitope Mapping Protocols"(Methods in Molecular Biology)(Glenn E. Morris、ISBN-089603-375-9)および"Epitope Mapping: A Practical Approach"(Practical Approach Series 248、Olwyn M.R. We

10

20

30

40

50

st wood、Frank C. Hay) に詳しく記載されるように行うことができる。

【0259】

本明細書中に記載される化合物および薬剤は、どのような組成物であれ、好適な医薬組成物の形態で投与される場合がある。

【0260】

本発明の医薬組成物は好ましくは無菌であり、かつ、所望される反応または所望される効果を生じさせるために、効果的な量の明細書中に記載される結合剤と、必要な場合には、効果的な量の明細書中で議論されるようなさらなる薬剤とを含有する。

【0261】

医薬組成物は通常の場合には均一な投薬形体物で提供され、それ自体は知られている様式で調製される場合がある。医薬組成物は、例えば、溶液または懸濁物の形態である場合がある。

【0262】

医薬組成物は、塩、緩衝剤物質、保存剤、キャリア、希釈剤および/または賦形剤を含む場合があり、ただし、それらのすべてが好ましくは、医薬的に許容されるものである。用語「医薬的に許容される」は、医薬組成物の活性な成分の作用と相互作用しない材料の非毒性を示す。

【0263】

医薬的に許容されない塩が、医薬的に許容される塩を調製するために使用される場合があり、本発明において含まれる。この種の医薬的に許容される塩は、限定されない様式で、下記の酸から調製される塩を含む：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸およびコハク酸など。医薬的に許容される塩はまた、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩として、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩などとして調製される場合がある。

【0264】

医薬組成物において使用されるための好適な緩衝剤物質には、塩での酢酸、塩でのクエン酸、塩でのホウ酸、および、塩でのリン酸が含まれる。

【0265】

医薬組成物において使用されるための好適な保存剤には、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサルが含まれる。

【0266】

注射用配合物は、医薬的に許容される賦形剤、例えば、リンゲル乳酸加(Ringer Lactate)などを含む場合がある。

【0267】

用語「キャリア」は、活性な成分が、適用を容易にするために、適用を高めるために、または、適用を可能にするために一緒にされる天然または合成の有機成分または無機成分を示す。本発明によれば、用語「キャリア」にはまた、患者への投与のために好適である1つまたは複数の適合性の固体または液体の増量剤、希釈剤またはカプセル化用物質が含まれる。

【0268】

非経口投与のための可能なキャリア物質が、例えば、無菌水、リンゲル、リンゲル乳酸加、無菌の塩化ナトリウム溶液、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレン、および、特に、生体適合性のラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンコポリマーである。

【0269】

用語「賦形剤」は、本明細書中で使用される場合、医薬組成物に存在することがあり、かつ、有効成分でないすべての物質を示すことが意図される(例えば、キャリア、結合剤、滑剤、増粘剤、表面活性剤、保存剤、乳化剤、緩衝剤、香味矯臭剤または着色剤など)。

【0270】

10

20

30

40

50

本明細書中に記載される剤および組成物は、どのような経路であれ、従来の経路を介して、例えば、注射または注入による投与を含む非経口投与によって投与される場合がある。投与は好ましくは非経口であり、例えば、静脈内、動脈内、皮下、皮内または筋肉内である。

【0271】

非経口投与のために好適である組成物は通常、好ましくはレシピエントの血液に対して等張性である、活性な化合物の無菌の水性調製物または非水性調製物を含む。適合性のキャリアおよび溶媒の例が、リンゲル溶液および等張性の塩化ナトリウム溶液である。加えて、通常の場合には無菌である固定油が溶液媒体または懸濁媒体として使用される。

【0272】

本明細書中に記載される剤および組成物は効果的な量で投与される。「効果的な量」は、所望される反応または所望される効果を単独で達成するか、または、さらなる用量と一緒に達成する量を示す。特定の疾患または特定の状態を処置する場合、所望される反応は好ましくは、当該疾患の経過を阻害することに関連する。これは、疾患の進行を遅らせること、および、特に、疾患の進行を中断させること、または逆転させることを含む。疾患または状態の処置における所望される反応はまた、前記疾患または前記状態の発症を遅らせること、あるいは、前記疾患または前記状態の発症を防止することである場合がある。

【0273】

本明細書中に記載される剤または組成物の効果的な量は、処置されるべき状態、疾患の重篤度、患者の個々のパラメーター（年齢、生理学的状態、大きさおよび体重を含む）、処置の継続期間、付随する治療のタイプ（存在する場合）、具体的な投与経路および類似する様々な要因に依存するであろう。したがって、本明細書中に記載される剤の投与される用量は、様々なそのようなパラメーターに依存する場合がある。患者における反応が初期用量により不十分である場合には、より大きい用量（または、異なる、より限局的な投与経路によって達成される事実上より大きい用量）が使用される場合がある。

【0274】

本明細書中に記載される剤および組成物は、様々な障害（例えば、本明細書中に記載される障害など）を処置するために、または防止するために、患者に、例えば、インビボで投与することができる。好ましい患者には、本明細書中に記載される剤および組成物を投与することによって矯正され得るか、または改善され得る障害を有するヒト患者が含まれる。これには、CLDN（例えば、CLDN18.2および/またはCLDN6など）の変化した発現パターンによって特徴づけられる細胞を伴う障害が含まれる。

【0275】

例えば、1つの実施形態において、本明細書中に記載される剤は、ガン疾患を有する患者、例えば、CLDNを発現するガン細胞の存在によって特徴づけられる本明細書中に記載されるものなどのガン疾患を有する患者を処置するために使用することができる。

【0276】

本発明に従って記載される医薬組成物および処置方法はまた、本明細書中に記載される疾患を防止するための免疫化またはワクチン接種のために使用される場合がある。

【0277】

本発明の医薬組成物は、免疫強化物質（例えば、1つまたは複数のアジュバントなど）を補うことと一緒に投与される場合があり、1つまたは複数の免疫強化物質を、その有効性をさらに増大させるために、好ましくは、免疫刺激の相乗効果を達成するために含む場合がある。用語「アジュバント」は、免疫応答を引き延ばすか、または高めるか、または促進させる化合物に関連する。様々な機構が、アジュバントの様々なタイプに依存して、この点において可能である。例えば、DCの成熟化を可能にする化合物、例えば、リポ多糖またはCD40リガンドは、好適なアジュバントの第1の部類を形成する。一般にどのような剤であれ、「危険信号」のタイプの免疫系に影響を与える剤（LPS、GP96、dsRNAなど）、または、サイトカイン（例えば、GM-CSFなど）を、免疫応答が、制御された様式で増強されることおよび/または影響されることを可能にするアジュバ

10

20

30

40

50

ントとして使用することができる。C p Gオリゴデオキシヌクレオチドもまた、必要に応じて、この関連において使用することができ、だが、上記で説明されるように、ある特定の状況のもとで生じるそれらの副作用が考慮されなければならない。特に好ましいアジュバントがサイトカインであり、例えば、モノカイン、リンホカイン、インターロイキンまたはケモカインなどであり、例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 12、INF、INF -、GM - CSF、LT - または増殖因子（例えば、hGH）である。さらなる知られているアジュバントが、水酸化アルミニウム、フロイントアジュバント、または、オイル（例えば、Montanide（登録商標）など）であり、最も好ましいものがMontanide（登録商標）ISA51である。リポペプチド、例えば、Pam3Cysなどもまた、本発明の医薬組成物におけるアジュバントとしての使用のために好適である。

10

【0278】

本明細書中に提供される剤および組成物は、単独で、または、従来の治療計画（例えば、手術、放射線、化学療法および/または骨髄移植（自己、同系、同種または非血縁）など）との組合せで使用される場合がある。

【0279】

ガンの処置は、高頻度で、2つ、3つ、4つ、または、それどころか、それ以上のガン薬物/治療法の組み合わせられた作用により、単独療法アプローチの影響よりもかなり強い相乗効果をもたらされるので、併用戦略がとりわけ望ましい分野を表す。したがって、本発明の別の実施形態において、免疫またはワクチン接種に基づく機構を利用するガン処置、例えば、本発明の方法および医薬組成物などを利用するガン処置は、類似する特異的機構または他の特異的機構を標的化する様々な他の薬物および/または方法と効果的に組み合わせられる場合がある。そのようなものには、例えば、従来の腫瘍治療法、多重エピトープ戦略、さらなる免疫療法、および、血管形成またはアポトーシスを標的化する処置アプローチとの組合せが含まれる（総説については、例えば、Andersen他、2008、Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies、Cancer Immunology Immunotherapy、57(11):1735~1743を参照のこと）。異なる薬剤の逐次投与はガン細胞成長を異なるチェックポイントで阻害する場合があります、一方、他の薬剤は、例えば、血管新生、悪性細胞の生存または転移（これらは潜在的にはガンを慢性疾患に転換する）を阻害する場合があります。下記の列挙では、本発明との組合せで使用することができる抗ガン薬物および抗ガン治療法のいくつかの限定されない例が提供される：

20

30

【0280】

1. 化学療法

化学療法は、多数のタイプのガンのための標準治療である。最も一般的な化学療法剤は、ガン細胞の主要な性質の1つである、速く分裂する細胞を殺すことによって作用する。したがって、従来の化学療法薬物との組合せ、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン系化合物、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および、細胞分裂またはDNA合成のどちらかに影響を及ぼす他の抗腫瘍剤などとの組合せは、サプレッサー細胞を排除すること、すなわち、免疫系の再起動によって、または、腫瘍細胞を免疫媒介殺傷に対してより感受性にするによって、または、免疫系の細胞のさらなる活性化によって本発明の治療効果を著しく改善する場合があります。化学療法薬物と、ワクチン接種に基づく免疫療法薬物との相乗的な抗ガン作用が、多数の研究において明らかにされている（例えば、Quoix他、2011、Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial、Lancet Oncol.、12(12):1125~33を参照のこと；同様に、Liseth他、20

40

50

10、Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience、J Biomed Biotechnol、2010: 6920979も参照のこと；同様に、Hirooka他、2009、A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer、Pancreas、38(3): e69~74も参照のこと)。併用療法のために基本的に好適である利用可能な数百の化学療法薬物が存在する。本発明と組み合わせることができる化学療法薬物のいくつかの(限定されない)例として、カルボプラチン(Paraplatin)、シスプラチン(Platinol、Platinol-AQ)、シクロホスファミド(Cytosan、Neosar)、ドセタキセル(Taxotere)、ドキシソルピシン(Adriamycin)、エルロチニブ(Tarceva)、エトポシド(Vepesid)、フルオロウラシル(5-FU)、ゲムシタピン(Gemzar)、イマチニブメシラート(Gleevec)、イリノテカン(Camptosar)、メトトレキサート(Folex、Mexate、Amethopterin)、パクリタキセル(Taxol、Abraxane)、ソラフィニブ(sorafenib)(Nexavar)、スニチニブ(Sutent)、トポテカン(Hycamtin)、ピンクリスチン(Oncovin、Vincasar PFS)およびビンブラスチン(Velban)が挙げられる。

10

20

【0281】

2. 手術

ガン手術、すなわち、腫瘍を取り除くための手術は、依然としてガン処置の基礎である。手術は、どのような腫瘍細胞であれ、残存する腫瘍細胞を除去するために他のガン処置と組み合わせることができる。外科的方法をその後の免疫療法処置と組み合わせることは、数え切れないほどにこれまで実証されている有望な取り組みである。

【0282】

3. 放射線

放射線治療は依然としてガン処置の重要な構成要素であり、すべてのガン患者のおよそ50%が放射線治療をその病気経過の期間中に受ける。放射線治療の主たる目標が、ガン細胞からその増殖(細胞分裂)能を奪うことである。ガンを処置するために使用される放射線のタイプには、光子放射線(X線およびガンマ線)および粒子放射線(電子ビーム、陽子ビームおよび中性子ビーム)がある。放射線をガンの場所に送達するための2つの方法がある。外部ビーム放射線は、高エネルギー線(光子、陽子または粒子放射線)を腫瘍の場所に向けることによって身体の外側から送達される。内部放射線または近接照射療法は、カテーテルまたはシードに密封される放射性線源によって身体の内部から、直接に腫瘍部位の中に送達される。本発明との組合せで適用可能である放射線治療技術が、例えば、分割(分割された治療計画で送達される放射線治療、例えば、数週間にわたって与えられる1.5 Gy~3 Gyの毎日の分割照射)、3D原体照射療法(3DCRT;これは放射線を肉眼的腫瘍体積に応じて送達する);強度変調放射線治療(IMRT;多数の放射線ビームのコンピューター制御された強度変調)、画像誘導放射線治療(IGRT;補正について可能にする放射線療法前の画像化を含む技術)、および、定位身体放射線治療(SRBT、非常に大きい個々の線量の放射線をほんの数回の分割された処置にわたって送達する)である。放射線治療の総説については、Baskar他、2012、Cancer and radiation therapy: current advances and future directions、Int. J Med Sci.、9(3): 193~199を参照のこと)。

30

40

【0283】

4. 抗体

抗体(好ましくは、モノクローナル抗体)は、ガン細胞に対するその治療効果を、様々

50

な機構を介して達成する。抗体は、直接的な影響を、アポトーシス、すなわち、プログラム化された細胞死をもたらすことにおいて有することができる。抗体は、シグナル伝達経路の構成要素（例えば、増殖因子受容体など）を阻止し、これにより、腫瘍細胞の増殖を停止させることができる。モノクローナル抗体を発現する細胞において、細胞は抗イデオタイプ抗体の形成をもたらすことができる。間接的な影響には、細胞傷害性を有する細胞（例えば、単球およびマクロファージなど）を動員することが含まれる。このタイプの抗体媒介細胞殺傷は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）と呼ばれる。抗体はまた、補体と結合し、これにより、補体依存性細胞傷害（CDC）として知られている直接的な細胞毒性を引き起こす。外科的方法を免疫療法薬物または免疫療法的方法と組み合わせることは、例えば、Gadri他、2009、Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma、J Immunother、32(4):333~40において明らかにされるように、成功している取り組みである。下記の列挙では、本発明との組合せで使用することができる抗ガン抗体および潜在的な抗体標的（括弧内）のいくつかの限定されない例が提供される：アバゴボマブ（Abagovomab）（CA-125）、アブシキシマブ（CD41）、アデカツムマブ（Adecatumumab）（EpCAM）、アフツズマブ（CD20）、アラシズマブペゴール（Alacizumab pegol）（VEGFR2）、アルツモマブペンテタート（Altumomab pentetate）（CEA）、アマツキシマブ（Amatuximab）（MORAb-009）、アナツモマブマフェナトクス（Anatumomab mafenatox）（TAG-72）、アポリズマブ（HLA-DR）、アルシツモマブ（CEA）、バビツキシマブ（Bavituximab）（ホスファチジルセリン）、ベクツモマブ（Bectumomab）（CD22）、ベリムマブ（BAFF）、ベバシズマブ（VEGF-A）、ビバツズマブメルタンシン（Bivatuzumab mertansine）（CD44 v6）、ブリナツモマブ（Blinatumomab）（CD19）、ブレンツキシマブベドチン（Brentuximab vedotin）（CD30 TNFRSF8）、カンツズマブメルタンシン（ムチンCanAg）、カンツズマブラブタンシン（ravtansine）（MUC1）、カプロマブペンデチド（Capromab pendetide）（前立腺ガン細胞）、カルルマブ（Carlumab）（CNTO888）、カツマキソマブ（Catumaxomab）（EpCAM、CD3）、セツキシマブ（EGFR）、シタツズマブボガトクス（Citatumumab bogatox）（EpCAM）、シクスツムマブ（Cixutumumab）（IGF-1受容体）、クロージキシマブ（Claudiximab）（クローディン）、クリバツズマブテトラキセタン（Clivatuzumab tetraxetan）（MUC1）、コナツムマブ（Conatumumab）（TRAIL-R2）、ダセツズマブ（CD40）、ダロツズマブ（Dalotuzumab）（インスリン様増殖因子I受容体）、デノスマブ（RANKL）、デツモマブ（Detumomab）（B-リンパ腫細胞）、ドロジツマブ（Drozitumab）（DR5）、エクロメキシマブ（Echromeximab）（GD3ガングリオシド）、エドレコロマブ（EpCAM）、エロツズマブ（SLAMF7）、エナバツズマブ（Enavatuzumab）（PDL192）、エンシツキシマブ（Ensituximab）（NPC-1C）、エプラツズマブ（Epratuzumab）（CD22）、エルツマキソマブ（Ertumaxomab）（HER2/neu、CD3）、エタラシズマブ（Etaracizumab）（インテグリン v3）、ファーレッツズマブ（葉酸受容体1）、FBTA05（CD20）、フィクラツズマブ（Ficlaturuzumab）（SCH900105）、フィギツムマブ（IGF-1受容体）、フランボツマブ（Flanvotumab）（糖タンパク質75）、フレソリムマブ（Fresolimumab）（TGF-）、ガリキシマブ（CD80）、ガニツマブ（Ganitumab）（IGF-I）、ゲムツズマブオゾガミシン（CD33）、ゲボキズマブ（IL-1）、ギレンツキシマブ（Girentuximab）（炭酸

脱水酵素9 (CA - IX)、グレムバツムマブベドチン (Glembatumumab vedotin) (GPNMB)、イブリツモマブチウキセタン (CD20)、イクルクマブ (Icrucumab) (VEGFR - 1)、イゴボマ (Igovoma) (CA - 125)、インダツキシマブラブタンシン (Indatuximab ravtansine) (SDC1)、インテツムマブ (Intetumumab) (CD51)、イノツズマブオゾガミシン (Inotuzumab ozogamicin) (CD22)、イピリムマブ (CD152)、イラツムマブ (Iratumumab) (CD30)、ラベツズマブ (CEA)、レクサツムマブ (TRAIL - R2)、リビビルマブ (Livi virumab) (B型肝炎表面抗原)、リンツズマブ (CD33)、ロルボツズマブメルタンシン (Lorvotuzumab mertansine) (CD56)、ルカツムマブ (Lucatumumab) (CD40)、ルミリキシマブ (CD23)、マパツズマブ (TRAIL - R1)、マツズマブ (EGFR)、メボリズマブ (IL - 5)、ミラツズマブ (CD74)、ミツモマブ (Mitumomab) (GD3ガングリオシド)、モガムリズマブ (CCR4)、モクセツモマブパストクス (Moxetumomab pasudotox) (CD22)、ナコロマブタフェナトクス (Nacolomab tafenatox) (C242抗原)、ナプツモマブエスタフェナトクス (Naptumomab estafenatox) (5T4)、ナルナツマブ (Narnatumab) (RON)、ネシツムマブ (EGFR)、ニモツズマブ (Nimotuzumab) (EGFR)、ニボルマブ (IgG4)、オフアツムマブ (CD20)、オララツマブ (Olaratumab) (PDGF - R)、オナルツズマブ (Onartuzumab) (ヒト散乱因子受容体キナーゼ)、オポルツズマブモナトクス (Opportuzumab monatox) (EpCAM)、オレゴボマブ (CA - 125)、オクセルマブ (Oxelumab) (OX - 40)、パニツムマブ (EGFR)、パトリツマブ (Patri tumab) (HER3)、ペムツモマ (Pemtumoma) (MUC1)、ペルツズマブ (HER2/neu)、ピンツモマブ (Pintumomab) (腺ガン抗原)、プリツムマブ (Pritumumab) (ビメンチン)、ラコツモマブ (Racotumomab) (N - グリコリルノイラミン酸)、ラドレツマブ (Radretumab) (フィブロネクチンエクストラドメイン - B)、ラフィビルマブ (Rafivirumab) (狂犬病ウイルス糖タンパク質)、ラムシルマブ (VEGFR2)、リロツムマブ (Rilotumumab) (HGF)、リツキシマブ (CD20)、ロバツムマブ (Robatumumab) (IGF - 1受容体)、サマリズマブ (Santalizumab) (CD200)、シブロツズマブ (Sibrotuzumab) (FAP)、シルツキシマブ (Siltuximab) (IL - 6)、タバールマブ (Tabalumab) (BAFF)、タカツズマブテトラキセタン (Tacatuzumab tetraxetan) (アルファ - フェトプロテイン)、タブリツモマブパプトクス (Taplutumomab paptox) (CD19)、テナツモマブ (Tenatumomab) (テネイシンC)、テプロツムマブ (Teprotumumab) (CD221)、チシリムマブ (Ticilimumab) (CTLA - 4)、チガツズマブ (TRAIL - R2)、TNX - 650 (IL - 13)、トシツモマブ (CD20)、トラスツズマブ (HER2/neu)、TRBS07 (GD2)、トレメリムマブ (CTLA - 4)、ツコツズマブセルモロイキン (Tucotuzumab celmoleukin) (EpCAM)、ウブリツキシマブ (Ublituximab) (MS4A1)、ウレルマブ (Urelumab) (4 - 1BB)、ボロシキシマブ (インテグリン 5 1)、ボツムマブ (Votumumab) (腫瘍抗原CTAA16.88)、ザルツムマブ (EGFR)、ザノリムマブ (CD4)。

【0284】

5. サイトカイン、ケモカイン、共刺激性分子、融合タンパク質

本発明の抗原コード医薬組成物を、有益な免疫調節効果または腫瘍阻害効果を誘発するために、サイトカイン、ケモカイン、共刺激性分子および/またはそれらの融合タンパク質と一緒に併用使用することは、本発明の別の実施形態である。腫瘍内への免疫細胞の浸

10

20

30

40

50

潤を増大させるために、また、腫瘍排出リンパ節への抗原提示細胞の動きを容易にするために、C構造、CC構造、CXC構造およびCX3C構造を有する様々なケモカインが使用される場合があるかもしれない。最も有望なケモカインのいくつかは、例えば、CCR7ならびにそのリガンドのCCL19およびCCL21、さらには、CCL2、CCL3、CCL5およびCCL16である。他の例が、CXCR4、CXCR7およびCXCL12である。さらには、共刺激性分子または調節性分子、例えば、B7リガンド(B7.1およびB7.2)などが有用である。同様に有用なものが他のサイトカインである：例えば、とりわけ、インターロイキン(例えば、IL-1~IL17)、インターフェロン(例えば、IFN α 1~IFN α 8、IFN α 10、IFN α 13、IFN α 14、IFN α 16、IFN α 17、IFN α 21、IFN β 1、IFN ω 、IFNE1およびIFNK)、造血因子、TGF(例えば、TGF- β 、TGF- α およびTGFファミリーの他のメンバー)、最後に、受容体の腫瘍壊死因子ファミリーのメンバーおよびそれらのリガンド、同様にまた、他の共刺激性分子、これらには、下記の分子が含まれるが、それらに限定されない：4-1BB、4-1BB-L、CD137、CD137L、CTLA-4GITR、GITRL、Fas、Fas-L、TNFR1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、p75NGF-R、DR6、LT β R、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn114、Troy/Trade、TAJ、TNFR1I、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、GITRL、TACI、BAFF-R、BCMA、RELT、ならびに、CD95(Fas/APO-1)、グルコシルチコイド誘導TNFR関連タンパク質、TNF受容体関連アポトーシス媒介タンパク質(TRAMP)および死受容体-6(DR6)。とりわけ、CD40/CD40LおよびOX40/OX40Lが、T細胞の生存および増殖に対するそれらの直接的な影響のために、組み合わせられた免疫療法のための重要な標的である。総説については、Lechner他、2011、Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors、Immunotherapy、3(11)、1317~1340を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0285】

6. 細菌処置

研究者らは、酸素の乏しい腫瘍の内部を消耗させるために嫌気性細菌(例えば、クロストリジウム・ノーヴィ(Clostridium novyi)など)を使用してきている。これらの嫌気性細菌は、腫瘍の酸素化された面と接触したときには死滅すべきであり、このことは、これらの嫌気性細菌が身体他の部分に対して無害であろうということを意味する。別の戦略は、非毒性のプロドラッグを毒性薬物に変換することができる酵素により形質転換されている嫌気性細菌を使用することである。腫瘍の壊死性領域および低酸素領域における細菌の増殖とともに、この酵素がもつばら腫瘍において発現される。したがって、全身適用されたプロドラッグが腫瘍だけにおいて毒性薬物に代謝される。このことが、非病原性嫌気性菌クロストリジウム・スポロゲネス(Clostridium sporogenes)を用いて効果的であることが明らかにされている。

【0286】

7. キナーゼ阻害剤

補完的なガン治療のための可能性のある標的の別の大きな一群はキナーゼ阻害剤を含む。なぜならば、ガン細胞の成長および生存がキナーゼ活性の脱調節と密接に連動するからである。正常なキナーゼ活性を取り戻し、したがって、腫瘍成長を低下させるために、広範囲の様々な阻害剤が使用されている。標的化されたキナーゼの一群は、受容体チロシンキナーゼ、例えば、BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbB2、IGF-IR、PDGFR- α 、PDGFR- β 、c-Kit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK、細胞質チロシンキナーゼ、例えば、c-SRC、c-YES、Abl、JAK-

2、セリン/トレオニンキナーゼ、例えば、ATM、Aurora A & B、様々なCDK、mTOR、PKC α 、様々なPLK、b-Raf、S6K、STK11/LKB1、および、脂質キナーゼ、例えば、PI3K、SK1を含む。小分子のキナーゼ阻害剤として、例えば、PHA-739358、ニロチニブ、ダサチニブ、ならびに、PD166326、NSC743411、ラパチニブ(GW-572016)、カネルチニブ(CI-1033)、セマキシニブ(SU5416)、パタラニブ(PTK787/ZK222584)、スーテント(Sutent)(SU11248)、ソラフェニブ(BAY43-9006)およびレフルノミド(SU101)が挙げられる。さらなる情報については、例えば、Zhang他、2009、Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors、Nature Reviews Cancer、9、28~39を参照のこと。

10

【0287】

8. Toll様受容体

Toll様受容体(TLR)ファミリーのメンバーは、自然免疫と適応免疫との間をつなぐ重要なものであり、多くのアジュバントの効果がTLRの活性化に依拠している。ガンに対する非常に多数の確立されたワクチンが、ワクチン応答を増強するためにTLRに対するリガンドを組み込んでいる。TLR2のほか、TLR3、TLR4、とりわけ、TLR7およびTLR8が、受動免疫療法の取り組みにおけるガン治療のために調べられている。近縁関係にあるTLR7およびTLR8は、免疫細胞、腫瘍細胞および腫瘍微小環境に影響を与えることによって抗腫瘍応答に寄与しており、また、ヌクレオシドアナログ構造物によって活性化される場合がある。すべてのTLRが単独型の免疫治療剤またはガンワクチンアジュバントとして使用されており、また、本発明の配合物および方法と相乗的に組み合わせられる場合がある。さらなる情報については、van Duin他、2005、Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology、Trends in Immunology、27(1):49~55を参照のこと。

20

【0288】

9. 血管形成阻害剤

腫瘍媒介逃避機構および免疫抑制によって影響される免疫調節受容体を標的とする治療法に加えて、腫瘍環境を標的とする治療法がある。血管形成阻害剤は、腫瘍が生存のために必要とする血管の広範囲にわたる成長(血管形成)を妨げる。例えば、腫瘍細胞の増大する栄養分要求および酸素要求を満たすために腫瘍細胞によって促進される血管形成を、種々の分子を標的化することによって阻止することができる。本発明と組み合わせられることがある血管形成媒介分子または血管形成阻害剤の限定されない例として、可溶性VEGF(VEGFイソ型のVEGF121およびVEGF165、受容体のVEGFR1、VEGFR2、ならびに、共受容体のニューロピリン-1およびニューロピリン-2)1およびNRP-1、アンジオポイエチン2、TSP-1およびTSP-2、アンジオスタチンおよび関連分子、エンドスタチン、バソスタチン、カルレチクリン、血小板因子-4、TIMPおよびCD41、Meth-1およびMeth-2、IFN- α 、IFN- β およびIFN- γ 、CXCL10、IL-4、IL-12およびIL-18、プロトロンビン(クリングルドメイン-2)、アンチトロンピンIIIフラグメント、プロラクチン、VEGI、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン(canstatin)、プロリフェリン(proliferin)関連タンパク質、レスチン(restin)、ならびに、薬物、例えば、ベバシズマブ、イトラコナゾール、カルボキシアミドトリアゾール、TNP-470、CM101、IFN- α 、血小板因子-4、スラミン、SU5416、トロンボスポンジン、VEGFRアンタゴニスト、血管新生抑制ステロイド+ヘパリン、軟骨由来血管形成阻害因子、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、2-メトキシエストラジオール、テコガラン(tecogalan)、テトラチオモリブデン酸塩、サリドマイド、トロンボスポンジン、プロラクチンV3阻害剤、リノミド(linomide)、タスキニモド(tasquinimod)が挙げられる。総説につ

30

40

50

いては、SchoenfeldおよびDranoff、2011、Anti-angiogenesis immunotherapy、Hum Vaccin、(9):976~81を参照のこと。

【0289】

10．小分子により標的化される治療薬物

小分子により標的化される治療薬物は一般に、ガン細胞内の変異タンパク質、過剰発現タンパク質または他の場合には決定的なタンパク質における酵素ドメインの阻害剤である。突出した、限定されない例として、チロシンキナーゼ阻害剤のイマチニブ(Gleevec/Glivex)およびゲフィチニブ(Iressa)が挙げられる。小分子、例えば、いくつかのキナーゼを標的化するスニチニブリンゴ酸塩および/またはソラフェニブトシル酸塩をガン治療のためにワクチンとの併用で使用することがまた、以前の特許出願(米国特許出願公開第2009004213)に記載される。

10

【0290】

11．ウイルス型ワクチン

組み合わせられた治療的取り組みにおいて本発明の配合物と一緒に使用することができる利用可能であるか、または開発中であるウイルス型ガンワクチンがいくつか存在する。そのようなウイルスベクターを使用することの1つの利点が、ウイルス感染の結果として生じる炎症反応により、免疫活性化のために必要な危険信号がもたらされるとともに、免疫応答を開始させるその固有的能力である。理想的なウイルスベクターは安全でなければならず、かつ、抗腫瘍性の特異的な応答を増強することを可能にするために抗ベクター免疫応答を持ち込んではいない。組換えウイルス、例えば、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルスおよびアピボックスウイルスなどが、動物腫瘍モデルにおいて使用されており、そして、それらの勇気づける結果に基づいて、ヒト臨床試験が開始されている。とりわけ重要なウイルス型ワクチンが、ウイルス様粒子(VLP)、すなわち、ウイルスの外被コートに由来するある特定のタンパク質を含有する小さい粒子である。ウイルス様粒子は、ウイルスに由来する遺伝物質を何ら含有せず、かつ、感染を引き起こすことができず、しかし、腫瘍抗原をそのコート表面に提示するように構築することができる。VLPは様々なウイルスに由来することができ、例えば、B型肝炎ウイルス、または、パルボウイルス科(例えば、アデノ関連ウイルス)、レトロウイルス科(例えば、HIV)およびフラビウイルス科(例えば、C型肝炎ウイルス)を含む他のウイルス科などに由来することができる。一般的な総説については、SorensenおよびThompson、2007、Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going?、APMIS、115(11):1177~93を参照のこと;ガンに対するウイルス様粒子が下記において総説される: Buonaguro他、2011、Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer、Expert Rev Vaccines、10(11):1569~83、ならびに、Guillen他、2010、Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies、Procedia in Vaccinology、2(2)、128~133。

20

30

40

【0291】

12．多重エピトープ戦略

多重エピトープの使用はワクチン接種についての有望な結果を示している。知的アルゴリズムシステムと組み合わせられた高速配列決定技術は、腫瘍ミュータノーム(mutanome)の利用を可能にしており、本発明と組み合わせることができる個別化ワクチンのための多数のエピトープを提供する場合がある。さらなる情報については、2007、V

50

accination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides、J Immunother、30:762~772、さらには、Castle他、2012、Exploiting the mutanome for tumor vaccination、Cancer Res、72(5):1081~91を参照のこと。

【0292】

13. 養子T細胞移入

例えば、腫瘍抗原ワクチン接種とT細胞移入との組合せが下記において記載される：Rapoport他、2011、Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma、Blood、117(3):788~97。

【0293】

14. ペプチドに基づく標的治療法

様々なペプチドが、細胞表面受容体、または、腫瘍を取り囲む置かれた細胞外マトリックスに結合することができる。これらのペプチド(例えば、各種RGD)に結合させられる放射性核種は、核種が細胞の近傍で崩壊するならば、最終的にはガン細胞を殺傷する。とりわけ、これらの結合モチーフのオリゴマーまたはマルチマーが非常に興味深い。なぜならば、これは、高まった腫瘍特異性およびアビディティを引き起こすことができるからである。限定されない例については、Yamada、2011、Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma、Nihon Rinsho、69(9):1657~61を参照のこと。

【0294】

15. 他の治療法

相乗効果をもたらすために本発明の配合物および方法と組み合わせることができる数多くの他のガン治療法がある。限定されない例として、アポトーシスを標的とする処置、温熱療法、ホルモン療法、テロメラーゼ療法、インスリン増強療法、遺伝子療法および光線力学的療法が挙げられる。

【0295】

本発明がさらに、本発明の範囲を限定するものとして解釈されない下記の実施例によって例示される。

【実施例】

【0296】

実施例1: CLDN18.2およびCD3を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

a. bi-scFv構築物の配列起源、設計および発現ベクターへのクローニング

ヒトT細胞受容体成分CD3およびヒト腫瘍関連抗原(TAA)に対して特異的である結合ドメインを含有する二重特異性のタンDEM型単鎖抗体構築物(bi-scFv)を調製した。それぞれの構築物のための対応する可変重鎖領域(VH)および対応する可変軽鎖領域(VL)を具体的には、N末端からC末端に、下記の連続する順で配置した:

【化1】

$N - V_H^{\alpha\text{CLDN18.2}} - V_L^{\alpha\text{CLDN18.2}} - V_H^{\alpha\text{CD3}} - V_L^{\alpha\text{CD3}} - C$ (1BiMAB, 18PHU5, no.11-15)

$N - V_H^{\alpha\text{CD3}} - V_L^{\alpha\text{CD3}} - V_H^{\alpha\text{CLDN18.2}} - V_L^{\alpha\text{CLDN18.2}} - C$ (18PHU3, no.16-20)

【0297】

表1には、本発明の過程で作製された、TAA CLDN18.2およびPLAC1に対して特異的であるすべてのbi-scFv構築物がまとめられる。これらのbi-scFv構築物を、対応する抗体のVH配列およびVL配列を使用してGeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH、Regensburg、ドイツ)による遺伝子合成によって作製した。コドン最適化、例えば、ヒト(Homo sapiens)(HS)、ハツカネズミ(Mus musculus)(MM)またはチャニーズハムスター卵巣(CHO)をGeneArt社のGeneOptimizer(登録商標)ソフトウェアによって実行した。これらが表1に示される。特異性、モノクローナル抗体(mAb)からの配列起源、コドン使用頻度、さらなる配列特徴、および、すべての適用されたドメインの参考文献に関する情報が表2にまとめられる。それぞれのCD3抗体の可変ドメイン配列起源が表2に示される。ヒトTAAおよびマウスTAAの大きい相同性のために、同じ抗TAA VH配列およびVL配列を、マウス特異的な抗CD3抗体クローン145-2C11のVH配列、VL配列との組合せでの場合を除いて、マウスアッセイのためのbi-scFv構築物の作製のために使用することができた。

10

DNAクローニングおよび発現ベクター構築を、当業者によって広く知られている標準的な手順(Green/Sambrook、Molecular Cloning、2012)に従って行った。簡単に記載すると、最初のbi-scFv DNA配列には、5'側でのHindIII制限部位および3'側でのXhoI制限部位(bi-scFv 1 BiMABの場合にはHindIIIおよびXbaI)が発現プラスミドへのクローニングのために与えられた。分泌シグナル配列を細胞質から培養培地へのタンパク質分泌のために5'末端においてbi-scFv配列の上流側に導入した。15個~18個のアミノ酸の柔軟なグリシン-セリンペプチドリンカーをコードする配列を、一方がCD3に結合し、かつ、他方がTAAに結合する単鎖可変抗体フラグメント(scFv)を組み立てるためのVHドメインおよびVLドメインをつなぎ合わせるために挿入した。二重特異性単鎖抗体を形成するために、これら2つのscFvドメイン配列を、短いペプチドリンカー(GGGGS)をコードする配列によってつないだ。このリンカー配列と一緒に、BamHI制限部位を、今後予定されているbi-scFv構築物のクローニングのためのscFvドメイン交換のために導入した。詳細には、5'側のscFvドメインをHindIIIおよびBamHIの制限によって交換することができ、3'側のscFvドメインをBamHIおよびXhoIの制限によって交換することができた。構築物の概要については、図1もまた参照のこと。

20

30

すべての使用されたbi-scFv抗体構築物を標準的な哺乳動物発現ベクターのpcDNA(商標)3.1/myc-His(+)(Invitrogen/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)にクローン化した。C末端の6xHisタグが、タンパク質の金属親和性精製のために、また、検出分析のために役立った。すべての構築物をMWGの単回読み取り配列サービス(Eurofins MWG Operon、Ebersberg、ドイツ)による配列決定によって確認した。

【0298】

40

【表 1】

表1:TAAおよびCD3に特異的な二重特異性単鎖抗体構築物の要約

社内名称	TAA	特異性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	コドン使用頻度
1BiMAB	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
no.11	CLDN18.2	マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	CHO
no.12	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	CHO
no.13	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	UCHT1	CHO
no.14	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	CLB-T3	CHO
no.15	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	CHO
no.16	CLDN18.2	マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	CHO
no.17	CLDN18.2	ヒト	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	CHO
no.18	CLDN18.2	ヒト	UCHT1	mCLDN18.2ab	CHO
no.19	CLDN18.2	ヒト	CLB-T3	mCLDN18.2ab	CHO
no.20	CLDN18.2	ヒト	TR66	mCLDN18.2ab	CHO
18PHU5	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
18PHU3	CLDN18.2	ヒト	TR66	mCLDN18.2ab	HS
18PMU5	CLDN18.2	マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	MM
18PMU3	CLDN18.2	マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	MM
コントロールbi-scFv					
no.35	PLAC1	ヒト	78H11	TR66	CHO

CHO、チャイニーズハムスター卵巣;HS、ヒト(Homo sapiens);HU、ヒト化;MM、Mus

10

20

【 0 2 9 9 】

【表 2】

表2: bi-scFv構築物情報の要約

CD3結合性成分 TAA結合性成分

社内名称	mAB 起源	種反応性	TAA	mAB 起源	種反応性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短リンカー
1BIMAB	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
no.11	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGGGS
no.12	UCHT1-HU	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	SGGGGS
no.13	UCHT1	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	UCHT1	SGGGGS
no.14	CLB-T3	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	CLB-T3	SGGGGS
no.15	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	SGGGGS
no.16	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.17	UCHT1-HU	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.18	UCHT1	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	UCHT1	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.19	CLB-T3	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	CLB-T3	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.20	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN18.2ab	SGGGGS
18PHU5	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	SGGGGS
18PHU3	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN18.2ab	SGGGGS
18PMU5	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGGGS
18PMU3	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.35	TR66	ヒト	PLAC1	78H11	ヒト、マウス	78H11	TR66	SGGGGS

表2(続き)

社内名称	5'-長リンカー	3'-長リンカー	分泌シグナル	コドン使用頻度	抗-CD3 mAB 参考文献
1BIMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.11	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.12	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.13	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.14	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.15	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.16	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.17	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.18	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.19	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGSLIFLALILKGVQC	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.20	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLLSVTTGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18PMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVATATGVHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
18PMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.35	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWNLFLMAAQAQA	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987

CHOはチャイニーズハムスター卵巣を示す;HSはヒト(Homo sapiens)を示す;mABはモノクローナル抗体を示す;MMはハツカネズミ(Mus musculus)を示す;TAAは腫瘍関連抗原を示す。

10

20

30

40

50

【0300】

b. 安定な産生細胞株の作製

CLDN18.2 特異的 bi-scfv タンパク質の安定な産生細胞クローンを作製するために、ヒト胚性腎臓細胞株 HEK293 (ATCC CRL-1573) およびチャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO-K1 (ATCC CCL-61) を使用した。

【0301】

HEK293 のトランスフェクション

1×10^7 個の HEK293 細胞をトランスフェクションの2日前に、14.5 cm の組織培養ディッシュに、20 ml の完全 DMEM 培地 (10% の熱不活化 FBS および 0.5% のペニシリン - ストレプトマイシンが補充される DMEM/F-12 Gluta Max; すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, ドイツ) から得た) において置床した。トランスフェクションの前に、細胞を、2 mM の EDTA が補充される DPBS により洗浄し、その後、FBS も抗生物質も含まない 20 ml の非補充 DMEM を加えた。実施例 1.a で記載される構築物の 20 μ g の線状化 DNA を 0.5 ml の非補充 DMEM/F-12 培地で希釈した。1 mg/ml の線状 PEI 溶液 (ポリエチレンジアミン; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, ドイツ) の 75 μ l を希釈された DNA に加え、激しくボルテックス撹拌した。RT での 15 分間のインキュベーションの後、DNA/PEI 複合物を細胞に滴下して加え、細胞培養ディッシュを穏やかに回転させ、その後、37、5% CO₂ においてインキュベーションした。トランスフェクション後 24 時間で、培地を交換した。トランスフェクションされた細胞の選抜を、G418 硫酸塩 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, ドイツ) を 0.8 mg/ml の最終濃度で用いてトランスフェクション後 48 時間で開始した。G418 を常時、細胞培養のために培養培地に加えた。

10

20

【0302】

CHO-K1 のトランスフェクション

1×10^6 個の CHO-K1 細胞をトランスフェクションの1日前に、6 ウェル組織培養プレートに、2 ml の完全 DMEM 培地 (10% の熱不活化 FBS が補充され、抗生物質を含まない DMEM/F-12 Gluta Max; すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, ドイツ) から得た) において置床した。トランスフェクションの前に、細胞を、2 mM の EDTA が補充される DPBS により洗浄し、その後、FCS も抗生物質も含まない 1.5 ml の非補充 DMEM を加えた。実施例 1.a で記載される構築物の 4 μ g の線状化 DNA を 0.25 ml の非補充 DMEM/F-12 培地で希釈し、穏やかに混合した。第2の反応チューブにおいて、2.5 μ l のリポフェクタミン 2000 (Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, ドイツ) を 0.25 ml の非補充 DMEM/F-12 培地で希釈し、穏やかに混合し、RT で 5 分間インキュベーションした。DNA ミックスおよびリポフェクタミン ミックスを 1:1 の比率で一緒にし、穏やかに混合し、RT で 20 分間インキュベーションした。DNA/リポフェクタミン 2000 複合物を細胞に滴下して加え、細胞培養ディッシュを穏やかに回転させ、その後、37、5% CO₂ においてインキュベーションした。トランスフェクション後 6 時間で、培地を完全 DMEM/F-12 培地に交換した。細胞を翌日、1:10 の比率で分割した。トランスフェクションされた細胞の選抜を、G418 硫酸塩 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, ドイツ) を 0.5 mg/ml の最終濃度で用いてトランスフェクション後 48 時間で開始した。G418 を常時、細胞培養のために培養培地に加えた。

30

40

【0303】

c. 産生細胞としての HEK293 の選抜

実施例 1.b で記載される安定的にトランスフェクションされた HEK293 細胞株および CHO-K1 細胞株による bi-scfv タンパク質の発現を、bi-scfv 発現

50

を標準的な手順 (Current Protocols in Immunology、2012) に従って検出するために免疫蛍光染色によって特徴づけた。簡単に記載すると、 2×10^5 個の細胞をガラススライド上で24時間成長させ、その後、細胞に2% PFAを浸透させた。5%のBSAおよび0.2%のサポニンが補充されるDPBSをブロッキング緩衝液として使用した。DPBSによる洗浄およびブロッキング緩衝液によるブロッキング処理の後、細胞を、ブロッキング緩衝液において1:500で希釈される一次抗体のAnti-HIS Epitope-Tag (Dianova GmbH、Hamburg、ドイツ) とRTで30分間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による洗浄の後、ブロッキング緩衝液において1:500で希釈される二次のCy3コンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Europe、Suffolk、英国) を加え、RTで3時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液およびH₂Oによる洗浄の後、細胞を、Hoechst 33342色素 (Pierce/Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国) が補充されるDAKO封入剤 (Dako、Carpinteria、CA、米国) に包埋した。スライドを、bi-scFv陽性細胞の存在について、Nikon-Eclipse Ti 蛍光顕微鏡を用いて調べ、写真撮影した (データは示されず)。HEK293細胞は、CHO-K1細胞よりも全体的に良好なbi-scFvタンパク質の発現を示し、したがって、HEK293細胞を産生細胞株として選んだ。

【0304】

d. HEK293クローン#28によるbi-scFvタンパク質1BiMABの産生および検出 20

bi-scFvの1BiMABを、様々なアッセイを確立するために産生され、精製され、また、使用されるための最初のbi-scFvタンパク質として選んだ。この目的のために、1BiMABを安定的に発現するHEK293未分画 (bulk) 細胞のクローン細胞株 (実施例1.bを参照のこと) を、FACS Aria細胞選別器 (BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) を使用する単一細胞選別によって得た。ほぼ40個のクローン株を拡大培養した後、最も良い産生体クローンを実施例1.cで記載されるように免疫蛍光によって選抜した。

選抜された産生体クローン#28を拡大培養し、10層のCell Factory (Nunc、Roskilde、デンマーク) で、10%のFBS、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシンおよび0.8mg/mlのG418が補充されるDMEM/F-12 GlutaMax (すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt、ドイツ) から得た) において製造者の指針に従って培養した。コンフルエントな段階で、細胞をDPBSにより洗浄し、培地を、抗生物質を含むが、FBSを含まないDMEM/F-12培地に変えた。bi-scFvタンパク質1BiMABを含有する細胞上清を4週間までにわたって3日~5日毎に集めた。上清を、500mlのSteritop Filter Unit (Merck Millipore、Billerica、MA、米国) を用いてろ過し、FPLC精製まで4で貯蔵した。 30

FPLC精製の前に、細胞培養上清におけるbi-scFvの存在を、標準法 (Current Protocols in Protein Science、2012) によって行われるポリアクリルアミドゲル電気泳動、続く、クーマシー染色およびウエスタンブロット分析によって調べた。上清を、製造者のプロトコルに従って、Centric Centrifugal Filter Device (10K MWCO) (Merck Millipore、Billerica、MA、米国) によって5x~10x濃縮した。濃縮された上清および濃縮されていない上清を、NuPAGE Novex 4-12% Bis-Trisゲル (Invitrogen/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ) で分離した。続いて、ゲルを、細胞培養上清に含有される50kD~60kDの間のbi-scFvタンパク質1BiMABおよび他のタンパク質の間においてを検出するために標準的な手順に従ってクーマシー 40 50

ブリリアントブルー溶液により染色した。ウエスタンブロット分析を、*bi-scFc* タンパク質 1 Bi M A B をその 6 × His タグにより特異的に検出するために行った。簡単に記載すると、タンパク質を P V D F メンブランにブロットし、ブロッキング処理を P B S T / 3 % 粉乳により行った後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において 1 : 5 0 0 で希釈される一次抗体 *Anti - HIS Epitope - Tag* (*Dianova GmbH*、*Hamburg*、ドイツ) と 4 で 1 時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による洗浄の後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において 1 : 1 0 0 0 0 で希釈される *Fc* 特異的な二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗マウス *IgG* 抗体 (*Sigma Aldrich*、ドイツ) と 4 で 1 時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による洗浄の後、シグナルを、*SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (*Pierce / Thermo Fisher Scientific*、*Rockford*、*IL*、米国) によって可視化し、*ImageQuant LAS 4000 Imager* (*GE Healthcare Life Sciences*、*Munich*、ドイツ) によって記録した。*bi-scFv* のシグナルが、内部分子量標準と比較した場合、5 0 k D と 6 0 k D との間に検出された (図 3 A および図 3 B を参照のこと)。

10

【 0 3 0 5 】

e . *bi-scFv* タンパク質 1 Bi M A B の精製および定量

bi-scFv タンパク質 1 Bi M A B を含有する H E K 2 9 3 クローン # 2 8 の細胞培養上清 (実施例 1 . d で記載されるもの) を、標準的な手順 (*Current Protocols in Protein Science*、2 0 1 2) を使用する固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (*IMAC*) に供した。簡単に記載すると、ろ過された細胞培養上清を、*AKTA Purifier 10 FPLC* システムにつながる *His Trap FF* (5 ml) カラムに負荷した (ともに、*GE Healthcare Life Sciences*、*Munich*、ドイツ)。*PBS* 洗浄緩衝液は 1 0 m M のイミダゾールを含有し、*PBS* 溶出緩衝液は、5 0 0 m M の *NaCl*、5 0 m M の *NaH₂PO₄* および 2 5 0 m M のイミダゾールを含有し、両方の緩衝液の *pH* を 7 . 4 に調節した。溶出を段階的勾配によって行った。溶出された *bi-scFv* タンパク質 1 Bi M A B を、*Slide - A - Lyzer G2 Dialysis Cassette* (1 0 K M W C O) (*Pierce / Thermo Fisher Scientific*、*Rockford*、*IL*、米国) を使用して 1 × *PBS* に対して直ちに透析した。1 × *PBS* に対する透析の後、*bi-scFv* を、*H₂O* に基づく 2 0 0 m M アルギニン緩衝液 (*L - アルギニン塩酸塩* ; *Roth*、*Karlsruhe*、ドイツ) に対して透析した。

20

30

bi-scFv の濃度を、*ProtParam* ツール (<http://web.expasy.org/protparam/>) により求められる *bi-scFv* タンパク質 1 Bi M A B の吸光係数および分子量の考慮のもと、*NanoDrop 2000c* を用いた 2 8 0 n m の測定によって求めた。精製されたタンパク質を小分けし、長期間の貯蔵のためには - 8 0 で貯蔵し、直ちに使用するためには 4 で保った。

bi-scFv タンパク質 1 Bi M A B の品質および純度を、実施例 1 . d で記載されるようにクーマシー染色およびウエスタンブロット分析によって調べた (図 3 A および図 3 B もまた参照のこと)。*BSA* 標準物希釈物を、*NanoDrop* によって測定される濃度を大雑把に確認するためにクーマシー手法では含めた (データは示されず)。

40

【 0 3 0 6 】

f . *ELISA* アッセイの確立

H E K 2 9 3 細胞の細胞培養上清における 1 Bi M A B の定量化のために、特異的な *ELISA* アッセイを確立しなければならなかった。この目的のために、実施例 1 . d からの上清と、実施例 1 . e で記載される精製された *bi-scFv* タンパク質 1 Bi M A B とを使用した。*BSA* で事前にブロッキング処理された *Ni - NTA* プレート (*Thermo Fisher Scientific*、*Rockford*、*IL*、米国) を使用し

50

て、bi-scFvタンパク質1BiMABをその6xHisタグにより固定化した。すべての洗浄工程をウエルあたり200 μ lの1xPBS/0.05%Tween(洗浄緩衝液)により3回行い、すべての工程を室温で実行した。標準物として、精製された1BiMABタンパク質を使用し、これを10ng/ml~500ng/mlの範囲内において1xPBSで希釈した。上清を1xPBSにおいて1:10で希釈した。100 μ lの希釈タンパク質または上清をそれぞれのウエルに移し、振とうしながら1時間インキュベーションした。洗浄後、mCLDN18.2abのVH-VLドメインに対する抗イデオタイプ抗体を1xPBS/3%BSAにおいて0.5 μ g/mlの最終濃度に希釈した。100 μ lの抗mCLDN18.2ab溶液をウエルあたり加え、振とうしながら1時間インキュベーションした。洗浄後、APコンジュゲート化抗マウスFc抗体(Jackson ImmunoResearch Europe、Suffolk、英国)を1xPBS/3%BSAにおいて300ng/mlの最終濃度に希釈した。100 μ lのこの二次抗体溶液をウエルあたり加え、振とうしながらさらに1時間インキュベーションした。陰性コントロールとして、二次抗体のみ、1BiMAB+二次抗体、および、抗mCLDN18.2ab+二次抗体を使用した。加えて、bi-scFvタンパク質を含まないHEK293細胞上液をアッセイに含めた。最後に、50 μ lのAP基質溶液(1mlの基質緩衝液あたり1.5mgのpNPP、AppliChem GmbH、Darmstadt、ドイツ)を洗浄後にウエルあたり加えた。暗所での5分、15分および30分のインキュベーションの後、492nmの励起波長を用いた405nmにおける吸収を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダー(Tecan、Mannedorf、スイス)を用いて測定した。上清由来のbi-scFvタンパク質の濃度を標準物列に対する計算によって求めた(データは示されず)。

【0307】

g. 比較研究のためのCLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質の一過性トランスフェクション

好ましくは多量のCLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質を一過性に生成させるために、ヒト胚性腎臓細胞株HEK293T(ATCC CRL-11268)をトランスフェクションのために使用した。

1x10⁷個のHEK293T細胞をトランスフェクションの2日前に、14.5cmの組織培養ディッシュに、20mlの完全DMEM培地(10%の熱不活化FBSおよび0.5%のペニシリン-ストレプトマイシンが補充されるDMEM/F-12 Glutamax;すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH(Darmstadt、ドイツ)から得た)において置床した。トランスフェクションの前に、細胞を、2mMのEDTAが補充されるDPBSにより洗浄し、その後、FBSも抗生物質も含まない20mlの非補充DMEMを加えた。20 μ gの環状DNA構築物(1BiMAB、no.11~no.20およびno.35(これらは実施例1.bで記載される))を0.5mlの非補充DMEM/F-12培地で希釈した。1mg/mlの線状PEI溶液(ポリエチレンジアミン; Polysciences Europe GmbH、Eppelheim、ドイツ)の75 μ lを希釈されたDNAに加え、激しくボルテックス攪拌した。RTでの15分間のインキュベーションの後、DNA/PEI複合物を細胞に滴下して加え、細胞培養ディッシュを穏やかに回転させ、その後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂において24時間インキュベーションした。非補充DMEM/F-12による培地交換の後、細胞を、33 $^{\circ}$ C、5%CO₂においてさらに48時間インキュベーションした。細胞上清をインキュベーション後に集め、0.2 μ mのMinisartシリンジフィルター(Sigma-Aldrich、ドイツ)により無菌ろ過した。続いて、bi-scFvタンパク質を製造者のプロトコル(Qiagen、Hilden、ドイツ)に従ってNi-NTAスピンカラムによって細胞培養上清から小規模で精製した。bi-scFvタンパク質の濃度を、実施例1.fで記載されるようにELISAによって見積もり、実施例1.eで記載されるようにウエスタンブロット分析によって確認した(データは示されず)。精製されたタンパク質を、直ちに使用するために4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

【0308】

実施例2：bi-scfvタンパク質によって媒介される標的変更させられたT細胞による特異的なT細胞活性化および標的細胞溶解をモニターするための機能的アッセイの確立

FPLC精製されたbi-scfvタンパク質1BiMABを使用して、ヒトエフェクター細胞をTAA陽性標的細胞に特異的に標的変更させるbi-scfvタンパク質の能力をモニターするためのインビトロアッセイを確立した。この目的は、影響を可視化すること、ならびに、ヒトT細胞の活性化および特異的な標的細胞溶解を定量化することであった。

【0309】

a. bi-scfvタンパク質によって標的細胞に標的変更させられるT細胞の顕微鏡法分析

bi-scfvタンパク質の機能性を可視化するためには、bi-scfvタンパク質によるCLDN18.2発現標的細胞へのエフェクター細胞の標的変更を顕微鏡により示すためのアッセイを確立しなければならなかった。この目的のために、比較的高レベルのヒトCLDN18.2を内因的に発現する胃ガン細胞株NugC4 (Sahin U. 他、Clin Cancer Res、2008 (Dec 1)、14 (23) : 7624 ~ 34) を標的細胞株として使用した。

ヒトエフェクター細胞を標準的な手順 (Current Protocols in Immunology、2012) に従って健康なドナーからのヒト血液から新たに単離した：簡単に記載すると、血液をDPBSにより希釈し、Ficoll-Plus (GE Healthcare Life Sciences、Munich、ドイツ) に重層し、遠心分離した。末梢血単核細胞 (PBMC) を相間から回収し、2mMのEDTAが補充される冷DPBSにより洗浄し、計数した。続いて、ヒトT細胞を、PBMCから、Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec、Teterow、ドイツ) により製造者の指針に従って磁気活性化細胞分離 (MACS) によって分離した。

1×10^5 個のNugC4細胞を組織培養用6ウエルプレートにウエルあたり播種した。ヒト細胞を上記のように調製し、5:1のエフェクター対標的 (E:T) 比で加えた。5%の熱不活化ヒトAB血清、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシン、 $1 \times \text{NEA}$ および1mMのピルビン酸ナトリウムが補充されるRPMI1640培地 (Gibco/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ) をすべての細胞のために使用し、ウエルあたりの最終体積を2ml/ウエルに調節した。コントロールサンプルは、bi-scfvタンパク質を伴って、また、bi-scfvタンパク質を伴うことなく、単独での標的細胞またはT細胞を含んだ。組織培養プレートを続けて、37、5%CO₂においてインキュベーションした。アッセイを、共インキュベーションの6時間から48時間まで、Wilovert S倒立顕微鏡 (Hund、Wetzlar、ドイツ) を用いて連続して観察した。bi-scfvタンパク質1BiMABの存在下における標的細胞上でのT細胞クラスター化、免疫学的シナプスの形成および標的細胞の殺傷に関しての著しい影響が24時間で認められた。48時間後、生存可能な標的細胞をほとんど見出すことができなかった。写真を、Nikon Eclipse TS100倒立顕微鏡 (Nikon、日本) を用いて24時間において撮影した。図5もまた参照のこと。

このアッセイをさらには、様々なウエル形式でのすべての細胞傷害性アッセイにおいて可視性コントロールとして含めた。

【0310】

b. bi-scfvタンパク質1BiMABによる標的依存的なT細胞活性化

bi-scfvタンパク質によるヒトT細胞の特異的な活性化を検出するために、フローサイトメトリーアッセイを確立した。T細胞活性化を検出するために、初期活性化マーカーCD69および後期活性化マーカーCD25を蛍光コンジュゲート抗体による染色

10

20

30

40

50

のために選択した。標的細胞およびT細胞の混合物におけるヒトT細胞の検出のために、T細胞上のCD3を染色した。

上記から設定されるアッセイを選んだ(実施例2.a)。簡単に記載すると、NugC4標的細胞を2mlの完全培地において5:1のE:T比でヒトT細胞と一緒に播種し、bi-scfvタンパク質1BiMABを0.001ng/ml~1000ng/mlの範囲内の濃度で加えた。コントロールサンプルは、bi-scfvタンパク質1BiMABを伴って、また、bi-scfvタンパク質1BiMABを伴うことなく、単独での標的細胞またはT細胞を含有した。24時間後および/または48時間後(これは可視性コントロールの結果に依存した)、すべての細胞を、Cell Scrapers (Sarstedt AG&Co、Nurmbrecht、ドイツ)を用いて穏やかに掻き取るこ
10
とによって集め、5mlの丸底チューブ(BD Falcon、Heidelberg、ドイツ)に移した。細胞を遠心分離し、DPBSにより洗浄した。細胞染色のために、マウス抗ヒトCD3-FITC、マウス抗ヒトCD69-APCおよびマウス抗ヒトCD25-PE(すべての抗体が、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を使用した。細胞ペレットを、蛍光コンジュゲート化抗体を含有する50μlのFACS緩衝液(5%のFBSが補充されるDPBS)に再懸濁した。インキュベーションを暗所において4で20分間行った後、サンプルを4mlのDPBSにより洗浄し、細胞ペレットを、死細胞の検出のために、ヨウ化プロピジウム(PI)または7-AAD(ともに、Sigma Aldrich、ドイツ)を1:1000の最終希釈度で含有する200μlのFACS緩衝液に再懸濁した。サンプルを、測定期間中を通して氷上および
20
暗所において保った。アッセイの確立を、FACS Caliburを用いて行い、その後の測定を、FACSCanto IIフローサイトメーターを用いて行った(ともに、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)。分析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、San Carlos、CA、米国)によって評価した。

図6Aおよび図6Bに示されるように、1BiMAB媒介のT細胞活性化が標的細胞の非存在下では全く検出できず、このことは、bi-scfv機能性の厳密な標的依存性を強調している。標的細胞の存在下における著しいT細胞活性化が24時間後にほんの0.001ng/mlの1BiMABにより生じた。最大効率には、100ng/mlの1BiMABを使用して達した。
30

T細胞活性化の研究のほかに、このアッセイはまた、標的細胞集団に対してゲート開閉し、PI陽性または7-AAD陽性の標的細胞の割合を推定することによって標的細胞殺傷に対するbi-scfv媒介影響の定性的分析を可能にする(データは示されず)。すべての分析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、San Carlos、CA、米国)を用いて行った。

【0311】

c. ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ

CLDN18.2およびCD3に対して向けられるbi-scfvタンパク質の標的細胞殺傷能におけるかすかな違いを明らかにするために、高感度アッセイを開発しなければならなかった。この目的は、標的細胞殺傷をハイスループット様式で定量的にモニターすることができるアッセイを確立することであった。このことを達成するために、ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイを選んだ。これとともに、生存可能な標的細胞によるルシフェラーゼ発現の測定は、抗体の存在下で細胞傷害性エフェクター細胞によって媒介される標的細胞溶解を間接的に求めることを可能にする。
40

最初に、NugC4細胞(上記)を、ホタルルシフェラーゼ、EGFPレポーター遺伝子および抗生物質選択マーカーを有するレンチウイルスベクターにより形質導入した。形質導入された細胞の抗生物質による選抜の後、EGFP高発現細胞をFACS Aria細胞選別器(BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)によって選別し、ルシフェラーゼの高発現について分析し、続いて、さらなる研究のために拡大培養した。

10

20

30

40

50

ヒトエフェクター細胞を実施例 2 . a で記載されるように調製した。アッセイの確立を *bi - scFv* タンパク質 1 B i M A B の $1 \text{ ng} / \text{ml} \sim 100 \text{ ng} / \text{ml}$ の範囲で行い、それにより、 $5 \text{ ng} / \text{ml}$ の濃度が非常に効率的かつ再現性のある影響をもたらすことが見出され、この濃度をさらには、標準濃度として使用した。ルシフェラーゼを安定的に発現する Nu g C 4 細胞 (上記) を標的細胞として使用した。 1×10^4 個の標的細胞を白色の平底 96 ウエルプレートにウエルあたり播種した。ヒト T 細胞 (実施例 2 . a で記載されるように調製されたもの) を 5 : 1 の E : T 比で加えた。上記 (実施例 2 . a) で記載される培地を使用し、ウエルあたりの最終体積を $100 \mu\text{l}$ に調節した。試験サンプルおよびコントロールサンプルを少なくとも三連で置床した。

細胞培養マイクロプレートを、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ において 24 時間および 48 時間インキュベーションした。分析のために、 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ のルシフェリン (B D M o n o l i g h t、B D B i o s c i e n c e s、H e i d e l b e r g、ドイツ) および 50 mM の H E P E S を含有する水溶液の $50 \mu\text{l}$ をウエルあたり加え、続いて、プレートを 37°C において暗所で 30 分間インキュベーションした。ルシフェラーゼを発現する生細胞によるルシフェリンの酸化から生じる発光をマイクロプレートリーダー (I n f i n i t e M 200、T e c a n、M a n n e d o r f、スイス) で測定した。特異的な標的細胞溶解の百分率を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min}} - L_{\text{max}})] \times 100$ 、ただし、"L" は溶解を示す。 L_{min} は *bi - scFv* の非存在下における最小溶解を示し、 L_{max} は、T r i t o n X - 100 (2% の最終濃度) の添加によって達成される *bi - scFv* の非存在下における最大溶解 (自然発光カウント数に等しい) を示す。

エフェクター細胞に依存しない標的細胞に対する *bi - scFv* タンパク質の潜在的な直接的影響を、すべてのコントロール (例えば、 L_{min} および L_{max} など) を含めて、ヒト T 細胞を伴うことなく標的細胞を置床することによって求めた。

このアッセイを、標的細胞の特異的な T 細胞媒介溶解を詳しく調べるためのさらなる研究のために使用した。様々な改変を、例えば、*bi - scFv* 濃度、*bi - scFv* タンパク質、E : T 比またはエフェクター細胞 (C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、P B M C) を変更することによって実行した。

【 0 3 1 2 】

実施例 3 : C L D N 1 8 . 2 特異的 *bi - scFv* リード候補物の選択

最も強力な *bi - scFv* 変化体を選択するための様々な C L D N 1 8 . 2 特異的 *bi - scFv* タンパク質を用いたルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ

T A A C L D N 1 8 . 2 に対して特異的な 10 個すべての C H O コドン最適化構築物 (n o . 1 1 ~ n o . 2 0) を、C L D N 1 8 . 2 を内因的に発現し、かつ、ルシフェラーゼを異所性に発現する Nu g C 4 標的細胞を用いたルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイにおいてヒトコドン最適化 *bi - scFv* タンパク質 1 B i M A B との比較で試験した (実施例 2 . c もまた参照のこと) 。使用された *bi - scFv* タンパク質の特徴が表 2 に詳しく示される。P L A C 1 が Nu g C 4 細胞によって発現されないので、T A A P L A C 1 に対して特異的な *bi - scFv* n o . 3 5 をイソタイプコントロールとして使用した。ヒト T 細胞上の C D 3 に対する結合活性が F A C S 結合アッセイで証明されていた (データは示されず) 。すべての *bi - scFv* タンパク質を、実施例 1 . g で記載されるように作製し、実施例 2 . c で記載されるように設定される細胞傷害性アッセイのために使用した。

すべての *bi - scFv* タンパク質を $5 \text{ ng} / \text{ml}$ の最終濃度で使用した。 L_{min} の決定のために、コントロールの *bi - scFv* タンパク質 n o . 3 5 を標的細胞および T 細胞とともに九連で播種し、試験サンプルを六連で置床した。時点あたり 1 つのプレートを分析のために調製した。

それぞれの分析された時点 (8 h、16 h、24 h) における特異的な溶解を、使用された *bi - scFv* タンパク質に対してプロットした。 *bi - scFv* タンパク質の 1 B i M A B (配列番号 39) および n o . 15 (配列番号 41) (これらは、同じ配向で構

10

20

30

40

50

築され、かつ、同じ抗CD3配列(TR66)を含有しており、核酸レベルでのそれらのコドン使用頻度において、また、リンカー配列においてだけ異なる)は、標的細胞溶解を媒介することにおいて最も強力な抗体であることが判明した(図2を参照のこと)。1BiMABおよびno.15はそれらの効率において等しいので、これまでに比較的良好に調べられているbi-scFvタンパク質1BiMABをすべてのその後のアッセイのために選択した。18PHU3および18PHU5の構築物(表1および表2を参照のこと)を1BiMABに対してその後の時点で比較した。18PHU5の効率が1BiMABと同等であり、18PHU3はそれほど強力でなかった(データは示されず)。

【0313】

実施例4: bi-scFvタンパク質1BiMABの結合能

10

FACSに基づく結合アッセイの確立

bi-scFvタンパク質のCLDN18.2標的化成分およびCD3標的化成分の結合能を評価するために、フローサイトメトリーアッセイを確立した。CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞を、抗CLDN18.2部位を詳しく調べるために使用し、ヒトT細胞を、抗CD3部位を詳しく調べるために使用した。

抗CLDN18.2結合能を詳しく調べるために、NugC4細胞をトリプシン処理し、完全RPMI1640培地により洗浄し、続いてDPBSにより洗浄した。すべての洗浄工程を4における6分間の1200rpmでの遠心分離によって行った。2.5×10⁵個のNugC4細胞を5mlの丸底チューブに移し、FACS緩衝液における50μg/mlのFPLC精製された1BiMABタンパク質と4で30分間インキュベーションした。細胞を2mlのFACS緩衝液により洗浄し、続いて、3.3μg/mlのモノクローナル抗体Anti-HIS Epitope-Tag(Dianova GmbH, Hamburg, ドイツ)と4で30分間インキュベーションした。2mlのFACS緩衝液による洗浄の後、細胞ペレットを、FACS緩衝液における1:200の希釈度でのAPCコンジュゲート化ヤギ抗マウス二次抗体(Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, 英国)と暗所において4で20分間インキュベーションした。細胞を2mlのFACS緩衝液により2回洗浄し、最後に、1μg/mlのPI(Sigma Aldrich, ドイツ)が補充される150μlのFACS緩衝液に再懸濁して、死細胞を対比染色した。Anti-HIS Epitope-Tag抗体を用いないことを除いて同じ手順による別の染色が、50μg/mlの1BiMABおよびAPCコンジュゲート化ヤギ抗マウス二次抗体(1:200)を使用して含まれた。陰性コントロールサンプルには、単独での二次のヤギ抗マウスAPC抗体、モノクローナル抗体Anti-HIS Epitope-Tag+二次のヤギ抗マウスAPC抗体が含まれた。陽性コントロールとして、二次のヤギ抗ヒトAPC抗体(Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, 英国)により染色される10μg/mlのモノクローナルなCLDN18.2特異的抗体mCLDN18.2ab、および、その二次抗体のみのコントロールを実行した。

20

30

サンプルを、FACS Caliburフローサイトメーター(BD Biosciences, Heidelberg, ドイツ)を用いて測定し、FlowJoソフトウェア(Tree Star, San Carlos, CA, 米国)によって分析した。強いシグナルが、1BiMAB、Anti-HIS Epitope-Tagおよびヤギ抗マウスAPCによる逐次染色によって検出された。シグナル強度が、ヤギ抗ヒトAPCを伴う陽性コントロールmCLDN18.2abと同程度であった。1BiMABに対するヤギ抗マウスAPCの低い直接的な結合が、Anti-HIS Epitope-Tagを伴うことなく1BiMABおよびヤギ抗マウスAPCにより染色されるサンプルにおいて認められた(図4Aを参照のこと)。

40

bi-scFvタンパク質の結合能を詳しく調べるためのすべてのさらなるFACS結合アッセイのために、bi-scFv、Anti-HIS Epitope-Tagおよびヤギ抗マウスAPCによる逐次染色プロトコルを使用した(図4B、図4Cおよび図4Dを参照のこと)。1BiMABの非特異的な結合を除外するために、RT-PCRによ

50

って確認されるような、CLDN18.2を発現しない標的細胞（データは示されず）を、FACSに基づいたこの結合アッセイに供した。1BiMABの非特異的な結合が、図4Dに示されるように何ら検出されなかった。

【0314】

bi-scFvタンパク質1BiMABの抗CD3アームの結合能を詳しく調べるために、ヒトT細胞を使用した。実施例2.aにおいて記載されるように調製される 1×10^6 個のT細胞を5mlの丸底チューブに移し、FACS緩衝液における $0.002 \mu\text{g/ml} \sim 2 \mu\text{g/ml}$ の範囲内のFPLC精製された1BiMABタンパク質と4で30分間インキュベーションした。さらなる染色手順は上記の通りであった。コントロールサンプルには、単独での二次のヤギ抗マウスAPC抗体、および、モノクローナル抗体Anti-HIS Epitope-Tag+二次のヤギ抗マウスAPC抗体が含まれた。測定および分析を上記のように行った。著しいシグナルが $2 \mu\text{g/ml}$ の1BiMABにより得られた（図4Cを参照のこと）。

10

【0315】

実施例5：bi-scFvの1BiMABによる非常に特異的な標的依存的T細胞活性化の調査

高レベルまたは低レベルのCLDN18.2を内因的に発現するガン細胞株、および、CLDN18.2を発現しないガン細胞株を、インビトロ細胞傷害性アッセイにおけるbi-scFvタンパク質1BiMABの厳密な標的依存性を証明するために選んだ。選ばれた細胞株は、CLDN18.2を発現する2つの主要なガン腫タイプのものであった：胃ガン（NugC4、MKN7、SNU-1）および膵臓ガン（DanG、KP-4）。乳ガン細胞株のMCF7を陰性コントロールとして使用した。

20

【0316】

a. ガン細胞株のCLDN18.2のRT-PCR

総RNAを製造者のプロトコル（Qiagen、Hilden、ドイツ）に従ってRNeasy Mini Kitの手順によって上述のガン腫細胞株から抽出した。 $5 \mu\text{g}$ のRNAを、SuperScript II逆転写酵素（Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ）によるcDNA合成のために使用した。

RT-PCR分析を、Sybr Green色素および下記のプライマーを使用して、ABI Prism 7300 Real Time PCR System（Applied Biosystems/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ）で行った：

30

CLDN18.2、順方向：TGGCTCTGTGTCTGACACTGTG；逆方向：GTGTACATGTTAGCTGTGGAC

HPRT、順方向：TGACACTGGCAAAACAATGCA；逆方向：GGTCTTTTTCACCAAGCAAGCT

デルタCtを、ハウスキーピング遺伝子HPRTのCt値をCLDN18.2のCt値から引くことによって計算した（結果については図7Aを参照のこと）。

【0317】

b. CLDN18.2の存在下における排他的なT細胞活性化

細胞傷害性アッセイを実施例2.aで記載されるように設定した。定量的RT-PCRにより実施例5.aでCLDN18.2転写物について調べられるガン腫細胞株を標的細胞として使用した。このアッセイにおけるbi-scFvタンパク質1BiMABの濃度を 5ng/ml に設定した。標的細胞をヒトT細胞および1BiMABとともに二連で播種して、T細胞活性化を分析した。bi-scFvタンパク質1BiMABに依存しない標的細胞に対するT細胞の何らかの潜在的な同種反応性をモニターするために、標的細胞およびT細胞を、1BiMABを伴うことなく二連で播種した。細胞を、T細胞のクラスター化および標的細胞の結合を確認するために顕微鏡で継続的に観察した。CLDN18.2高発現細胞株のNugC4の場合には、著しい影響が24時間後に生じた；48時間後

40

50

では、生存可能な標的細胞がほとんど認められなかった。CLDN18.2低発現細胞株のDanGの場合には、最初の影響が96時間後に見られ、著しい影響が120時間後に見られた。CLDN18.2陰性細胞株に関しては、何らかのT細胞活性化を示す影響を144時間後でさえ見ることができなかった。すべてのサンプルのT細胞を、初期T細胞活性化マーカーのCD69および後期活性化マーカーのCD25について実施例2.aで記載されるようにフローサイトメトリーにより、標的細胞との144時間の共インキュベーションの後で分析し、T細胞集団についてはCD3により対比染色し、死細胞についてはPIにより対比染色した。興味深いことに、NugC4および1BiMABと共インキュベーションされたT細胞の100%までがCD25陽性であり、しかし、CD69陰性であった。このことは、CD69のダウンレギュレーションが既に生じたT細胞の長期間の活性化を示している。DanGおよび1BiMABと共インキュベーションされたT細胞の大雑把には75%が活性化され、そのうちの約40%がCD25およびCD69を同時に発現した。このことは、依然として継続中であるT細胞活性化を示している。CLDN18.2陰性細胞株と共インキュベーションされたT細胞はT細胞活性化の兆候を何ら示さなかった：CD69またはCD25のどちらの発現も、1BiMABを伴わないサンプルのレベルと比較して著しく上昇しなかった(図7Bもまた参照のこと)。

10

【0318】

実施例6：bi-scfvタンパク質1BiMABにより誘導されるT細胞機能の調査
a. T細胞増殖の誘導

T細胞増殖はT細胞活性化の指標である。T細胞増殖をCLDN18.2陽性標的細胞の存在下でのbi-scfvタンパク質1BiMABに対する応答において示すために、フローサイトメトリーアッセイを使用した。簡単に記載すると、実施例2.aで記載されるように単離された 1×10^6 個のヒトT細胞を、DPBSに溶解される $0.5 \mu\text{M}$ のカルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル(CellTrace CFSE、Invitrogen/Life Technologies GmbH、ドイツ)により暗所において37°Cで10分間染色した。染色を、5体積の冷却された完全RPMI1640培地を加えることによって停止させた。細胞を氷上で5分間保ち、完全RPMI培地(5%の熱不活化ヒトAB血清、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシン、 $1 \times \text{NEAA}$ および1mMのピルビン酸ナトリウム)により3回洗浄し、続いて、 1×10^5 細胞/mlに再懸濁した。実施例2.bで記載されるような細胞傷害性アッセイを、CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞と、エフェクター細胞としてのヒトT細胞とを用いて設定した。1mlの培地あたり50UのIL-2を細胞に加えた。サンプルには、単独でのT細胞、1ng/mlの1BiMABを伴うT細胞、T細胞およびNugC4細胞、ならびに、1ng/mlの1BiMABおよびNugC4細胞を伴うT細胞が含まれた。120時間の共インキュベーションの後、T細胞を集め、5mlの丸底チューブに採取し、洗浄し、死細胞を対比染色するために1:1000での7-AADのDPBS溶液により4°Cで15分間線染色した。DPBSによる洗浄の後、細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、FACSCanto II(BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を用いて分析した。

20

30

T細胞の増殖が、標的細胞およびbi-scfvタンパク質1BiMABの存在下のみにおける低下するCFSEシグナルによって検出された(図8Aもまた参照のこと)。

40

【0319】

b. セリンプロテアーゼのグランザイムBの誘導

CLDN18.2陽性標的細胞の存在下でbi-scfvタンパク質1BiMABによって媒介されるT細胞活性化の後におけるタンパク質分解性分子のアプレギュレーションを明らかにするために、フローサイトメトリー分析によるセリンプロテアーゼのグランザイムBの検出を選んだ。実施例2.bで記載されるような細胞傷害性アッセイを、CLDN18.2を内因的に発現するNugC4細胞と、エフェクター細胞としてのヒトT細胞とを用いて設定した。サンプルには、単独でのT細胞、5ng/mlの1BiMABを伴うT細胞、T細胞およびNugC4細胞、ならびに、5ng/mlの1BiMABおよ

50

び N u g C 4 細胞を伴う T 細胞が含まれた。96 時間の共インキュベーションの後、T 細胞を集め、5 ml の丸底チューブに採取し、洗浄し、死細胞を対比染色するために 1 : 1 0 0 0 の 7 - A A D の D P B S 溶液により 4 で 15 分間線染色した。D P B S による洗浄の後、細胞を R T で 20 分間、100 μ l の C y t o p e r m / C y t o f i x 溶液により固定処理した。細胞を 1 x P e r m / W a s h により洗浄し、続いて、P E コンジュゲート化マウス抗ヒトグランザイム B 抗体により R T で 20 分間染色した。洗浄後、細胞を F A C S 緩衝液に再懸濁し、F A C S C a n t o I I を用いて分析した (すべての試薬および F A C S 装置が、B D B i o s c i e n c e s 、H e i d e l b e r g 、ドイツ)。

T 細胞におけるグランザイム B のアップレギュレーションが、標的細胞および b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B の存在下のみにおいて検出された (図 8 B もまた参照のこと)。

【0320】

実施例 7 : インビトロ細胞傷害性アッセイにおける b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B の E C ₅₀ の決定

ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ

b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B の 50 % 最大有効用量を求めるために、1 B i M A B の力価測定列を、主に実施例 2 . c で記載されるようにインビトロルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。

実施例 2 . c で記載される安定的にルシフェラーゼを発現する N u g C 4 細胞を、ヒト T 細胞および (10 倍ずつで) 1 p g / m l から 1 μ g / m l までの範囲における b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B 濃度とともに、または、L _{m i n} 値を求めるために、1 B i M A B を伴うことなくインキュベーションした。生細胞の発光を、アッセイ設定後の 24 時間および 48 時間で、I n f i n i t e M 2 0 0 T e c a n プレートリーダーを用いて測定した。特異的な標的細胞溶解を、実施例 2 . c で例示される式によって計算した。

最大溶解には、1 n g / m l ~ 10 n g / m l の 1 B i M A B により 48 時間後に達した。このアッセイにおける 48 時間後での決定された E C ₅₀ がおよそ 10 p g / m l である (図 9 もまた参照のこと)。このアッセイの結果は、他者によってもまた報告されるように (例えば、L u t t e r b u e s e , R 他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、2010 (J u l 13)、107 (28) : 12605 ~ 10)、ドナーの免疫状態に従って変化するヒト T 細胞の効力に強く依存する。そのことに加えて、使用された標的細胞株 N u g C 4 は、結果に同様に影響を与える C L D N 18 . 2 の様々な発現を示す。したがって、10 p g / m l ~ 300 p g / m l の範囲における b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B の E C ₅₀ 値の変動が本発明の過程の期間中に観測されている。

【0321】

実施例 8 : マウス異種移植モデルにおける効力

b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B の治療可能能をインビボで詳しく調べるために、N O D . C g - P r k d ^{s c i d} I L 2 r g ^{t m 1 W j l} / S z J または s h o r t N S G のマウス系統 (J a c k s o n l a b o r a t o r y 、B a r H a r b o u r 、M E 、米国) を選んだ。記載された研究のために、マウスにおけるヒトエフェクター細胞およびヒト T リンパ球の生着が、T 細胞と会合する b i - s c F v の影響をインビボで研究するためには不可欠である。B 細胞、T 細胞および NK 細胞を完全に欠いているので、マウス系統 N S G がこの種の異種移植研究のためには好適である。P B M C 注入後の生着したヒト T 細胞を主に有するマウスモデルを発明の一部として確立した。

【0322】

a . b i - s c F v タンパク質 1 B i M A B を用いたマウスにおける進行した C L D N 18 . 2 高発現腫瘍の後期開始処置

例示された研究において、8 週齢での 40 匹のメス N S G マウスに、高レベルのヒト C

10

20

30

40

50

LDN18.2を安定的に発現する 1×10^7 個のHEK293細胞(HEK293-CLDN18.2)を皮下に接種した。腫瘍細胞接種後5日で、マウスをそれらの腫瘍体積に従って処置群に階層化し、腫瘍成長を有しないマウスは除外した。同じ日に、末梢血単核細胞(PBMC)を、実施例2.aに記載されるようなFicol1密度勾配技術によって健康なドナーのヒト血液から単離し、インビボでのエフェクター細胞として使用した。300 μ lのDPBSで希釈される 2×10^7 個のPBMCを、"PBMC"により示される実験処置群に単離当日に腹腔内注入した。"PBS"により示される処置群は300 μ lの非補充DPBSを代わりに腹腔内に受け、ヒトエフェクター細胞を伴わないコントロールとして役立った。"PBS"コントロール群により、1BiMAB自体による腫瘍成長に対する潜在的影響、あるいは、マウス組織に対するヒトエフェクター細胞によってではなく、1BiMABまたはビヒクルによって引き起こされる何らかの潜在的副作用(すなわち、マウス組織に対するヒトエフェクター細胞によって及ぼされる移植片対宿主反応)の調査を調べることができた。群"PBS/ビヒクル"は4匹のマウスを含み($n=4$)、群"PBS/1BiMAB"は5匹のマウスを含み($n=5$)、群"PBMC/ビヒクル"は13匹のマウスを含み($n=13$)、群"PBMC/1BiMAB"は15匹のマウスを含んだ($n=15$)。治療を、DPBSまたはPBMCを適用した1日後に開始した:群"PBS/1BiMAB"および群"PBMC/1BiMAB"は動物あたり、200 μ lのDPBSで希釈される5 μ gの精製されたbi-scFvタンパク質1BiMABを腹腔内に受けた。群"PBS/ビヒクル"および群"PBMC/ビヒクル"は、DPBSで希釈されるビヒクル緩衝液(H₂Oに溶解される200mMのL-アルギニン塩酸塩、無菌ろ過されたもの)の200 μ lを腹腔内に受けた。処置群が表3にまとめられる。治療を22日間にわたって毎日行った。週に2回、腫瘍の大きさを校正済みのデジタル式カリパスにより測定し、腫瘍体積を下記の式に従って計算した: $mm^3 = \text{長さ} \times \text{幅} \times (\text{幅} / 2)$ 。図10Aおよび図10Bは、ヒトエフェクター細胞の存在下での抗体のみによる"PBMC/1BiMAB"群のマウスの半数における腫瘍成長の阻害および腫瘍負荷の除去を例示する。マウスを、腫瘍体積が500 mm^3 を超えたとき、または、重篤な病的状態の場合(移植片対宿主症状が一部のマウスにおいて認められた)には頸椎脱臼によって屠殺した。

10

20

30

40

【0323】

【表3】

表3: 処置群

処置群 (G)	マウスの数 (n)	エフェクター細胞	Bi-scFv タンパク質	μ g bi-scFv タンパク質/マウス
G1	4	-	-	-
G2	5	-	1BiMAB	5
G3	13	PBMC	-	-
G4	15	PBMC	1BiMAB	5

【0324】

b. 体重に対する治療影響の決定

それぞれのマウスの体重を、実験室用はかりを使用して週に2回測定した。どの群のマウスも体重減少を処置期間にわたって示さなかった(データは示されず)。両方の"PBMC"群における一部のマウスが移植片対宿主反応の症状をPBMC注入の4週間後および処置終了の数日後に示した。体重に対する1BiMAB自体の影響、または、マウスの健康に関する何らかの他の副作用は認められなかった。

【0325】

c. 組織の保存および脾細胞の単離

50

マウスを殺した後、腫瘍を解剖し、組織を直ちに、免疫組織化学分析のために10mlのRoti-Histofix 4% (Carl Roth, Karlsruhe, ドイツ)において固定処理した。そのうえ、脾臓を、ヒト細胞の生着をフローサイトメトリー分析によって検出するために解剖した。脾細胞の単離を、脾臓を3ml~5mlのシリンジの無菌プランジャーによりすりつぶして、50mlの反応チューブの中に置かれる70 μ mの細胞ろ過器に通し、温DPBSによる細胞ろ過器の反復したフラッシングを行うことによって脾臓解剖の直後に行った。単離された脾細胞を遠心分離し、DPBSをデカンテーションによって除き、脾細胞のペレットを、10%のDMSOが補充される1mlの熱不活化ウシ胎児血清に再懸濁した。すべてのマウスからの脾細胞サンプルが完了するまで、サンプルを直ちに-80で凍結し、貯蔵した。

10

【0326】

d. マウス脾臓におけるヒトTリンパ球の生着の分析

すべてのマウスからの脾細胞を実施例8.cで記載されるように集め、凍結した。脾細胞サンプルの完成した収集物を一度に解凍し、すべての細胞を温DPBSにより2回洗浄し、サンプルあたり 1×10^6 個の脾細胞を蛍光コンジュゲート化抗体と暗所において4で20分間インキュベーションして、ヒト細胞の生着を抗CD45染色によって検出し、ヒトT細胞の割合を、抗CD3染色、抗CD4染色および抗CD8染色によって検出した。フローサイトメトリー分析を、FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, ドイツ)を用いて行った。両方の"PBM C"群におけるヒトT細胞の生着を、図10Dに示されるように、CD45-CD3の二重陽性脾細胞の大きい割合によって確認することができた。

20

【0327】

実施例9: CLDN6およびCD3を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

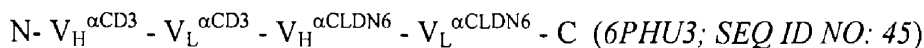
a. bi-scfv構築物の配列起源、設計および発現ベクターへのクローニング

二重特異性のタンデム型単鎖抗体構築物(bi-scfv)は、ヒトT細胞受容体成分CD3およびヒト腫瘍関連抗原(TAA)に対して特異的である結合ドメインを含有した。対応する可変重鎖領域(VH)および対応する可変軽鎖領域(VL)が、それぞれの構築物について具体的には、N末端からC末端に、下記の連続する順で配置される:

【化2】



30



【0328】

表4には、本発明の過程で作製された、TAA CLDN6に対して特異的であるすべてのbi-scfv構築物がまとめられる。CLDN18.2特異的bi-scfv構築物1BiMABをコントロール抗体として使用した。これらのbi-scfv構築物を、対応する抗体のVH配列およびVL配列を使用してGeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, ドイツ)による遺伝子合成によって作製した。コドン最適化、例えば、ヒト(Homo sapiens)(HS)またはハツカネズミ(Mus musculus)(MM)をGeneArt社のGeneOptimizer(登録商標)ソフトウェアによって実行した。これらが表5に示される。特異性、モノクローナル抗体(mAb)からの配列起源、コドン使用頻度、さらなる配列特徴、および、すべての適用されたドメインの参考文献に関する情報が表5にまとめられる。それぞれのCD3抗体の可変ドメイン配列起源が表5に示される。ヒトTAAおよびマウスTAAの大きい相同性のために、同じ抗TAA VH配列およびVL配列を、マウス特異的な抗CD3抗体クローン145-2C11のVH配列、VL配列との組合せでの場合を除いて、マウスアッセイのためのbi-scfv構築物の作製のために使用することができた。

40

50

DNAクローニングおよび発現ベクター構築を、当業者によって広く知られている標準的な手順(Sambrook、1989)に従って行った。簡単に記載すると、bi-scFv DNA配列には、5'側でのHindIII制限および3'側でのBamHI制限が発現プラスミドへのクローニングのために与えられた。分泌シグナル配列を細胞質から培養培地へのタンパク質分泌のために5'末端においてbi-scFv配列の上流側に導入した。15個~18個のアミノ酸の柔軟なグリシン-セリンペプチドリンカーをコードする配列を、一方がCD3に結合し、かつ、他方がTAAに結合する単鎖可変抗体フラグメント(scFv)を組み立てるためのVHドメインおよびVLドメインをつなぎ合わせるために挿入した。二重特異性単鎖抗体を形成するために、これら2つのscFvドメイン配列を、短いペプチドリンカー(GGGGS)をコードする配列によってつないだ。このリンカー配列と一緒に、BamHI制限部位を、今後予定されているbi-scFv構築物のクローニングのためのscFvドメイン交換のために導入した。詳細には、5'側のscFvドメインをHindIIIおよびBamHIの制限によって交換することができ、3'側のscFvドメインをBamHIおよびXhoIの制限によって交換することができた。

すべての使用されたbi-scFv抗体構築物を標準的な哺乳動物発現ベクターのpcDNA(商標)3.1/myc-His(+)(Invitrogen/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)にクローン化した。C末端の6xHisタグが、タンパク質の金属親和性精製のために、また、検出分析のために役立った。すべての構築物をMWGの単回読み取り配列サービス(Eurofins MWG Operon、Ebersberg、ドイツ)による配列決定によって確認した。構築物の概要については、図11もまた参照のこと。

【0329】

【表4】

表4:TAAおよびCD3に特異的な二重特異性単鎖抗体構築物の要約

社内名称	TAA	特異性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	コドン使用頻度
1BiMAB	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
6PHU5	CLDN6	ヒト	mCLDN6ab	TR66	HS
6PHU3	CLDN6	ヒト	TR66	mCLDN6ab	HS
6PMU5	CLDN6	マウス	mCLDN6ab	145-2C11	MM
6PMU3	CLDN6	マウス	145-2C11	mCLDN6ab	MM

HS、ヒト(Homo sapiens);MM、ハツカネズミ(Mus musculus);TAA、腫瘍関連抗原。

【0330】

10

20

30

【表5】

表5: bi-scFv構築物情報の要約

社内名称	CD3結合性成分			TAA結合性成分			短リンカー	
	mAB 起源	種反応性	TAA	mAB 起源	種反応性	5'-V _H -V _L		3'-V _H -V _L
1BiMAB	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
6PHU5	TR66	ヒト	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	mCLDN6ab	TR66	SGGGGS
6PHU3	TR66	ヒト	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN6ab	SGGGGS
6PMU5	145-2C11	マウス	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	mCLDN6ab	145-2C11	SGGGGS
6PMU3	145-2C11	マウス	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN6ab	SGGGGS

10

表5(続き)

社内名称	5'-長リンカー	3'-長リンカー	分泌シグナル	コドン使用頻度	抗-CD3 mAB 参考文献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIIIFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIIIFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCIIIFLVATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6PMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCIIIFLVATATGVHS	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
6PMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVLTCLKGIQG	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987

20

HS、ヒト(Homo sapiens); mAB、モノクローナル抗体; MM、ハツカネズミ(Mus musculus); TAA、腫瘍関連抗原。

【0331】

b. 安定な産生細胞株の作製

CLDN6 特異的 bi-scFv タンパク質の安定な産生細胞クローンを作製するために、ヒト胚性腎臓細胞株 HEK293 (ATCC CRL-1573) を使用した。

1 × 10⁷ 個の HEK293 細胞をトランスフェクションの2日前に、14.5 cm の組織培養ディッシュに、20 ml の完全 DMEM 培地 (10% の熱不活化 FBS および 0.5% のペニシリン-ストレプトマイシンが補充される DMEM/F-12 Glutamax; すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt、ドイツ) から得た) において置床した。トランスフェクションの前に、細胞を、2 mM の EDTA が補充される DPBS により洗浄し、その後、FBS も抗生物質も含まない 20 ml の非補充 DMEM を加えた。pcDNA3.1/6PHU5 および pcDNA3.1/6PHU3 の構築物 (これらは実施例 9.a で記載される) の 20 μg の線状化 DNA を 0.5 ml の非補充 DMEM/F-12 培地で希釈した。1 mg/ml の線状 PEI 溶液 (ポリエチレンイミン; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim、ドイツ) の 75 μl を希釈された DNA に加え、激しくボルテックス撹拌した。RT (室温) での 15 分間のインキュベーションの後、DNA/PEI 複合物を細胞に滴下して加え、細胞培養ディッシュを穏やかに回転させ、その後、37 °C、5% CO₂ においてインキュベーションした。トランスフェクション後 24 時間で、培地を交換した。トランスフェクションされた細胞の選抜を、G418 硫酸塩 (Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt、ドイツ) を 0.8 mg/ml の最終濃度で用いてトランスフェクション後 48 時間で開始した。G418 を常時、細胞培養のために培養培地に加えた。

30

40

【0332】

50

c. ポリクローナルなHEK293細胞によるbi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3の小規模産生

bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3をインビトロ比較のために小規模で産生させ、ポリクローナルなHEK293細胞の上清から精製した。

簡単に記載すると、コンフルエントな状態において、FBSを含まない上清を、実施例9.bで記載されるポリクローナルな細胞株から集め、0.2 μ mのMinisartシリンジフィルター(Sigma-Aldrich、ドイツ)によりろ過した。続いて、bi-scfvタンパク質を製造者のプロトコル(Qiagen、Hilden、ドイツ)に従ってNi-NTAスピンカラムによって細胞培養上清から小規模で精製した。bi-scfvタンパク質の濃度を、bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3の吸光係数および分子量(これらはProtParamツール(<http://web.expasy.org/protparam/>)により求められる)の考慮のもと、NanoDrop 2000cを用いた280nmでの測定によって求めた。精製されたタンパク質を、直ちに使用するために4℃で貯蔵した。

bi-scfvタンパク質を、標準的な手順(Current Protocols in Protein Science、2012)によって行われるポリアクリルアミドゲル電気泳動、続く、クーマシー染色およびウエスタンブロット分析によって試験した。小規模で精製されたタンパク質を、NuPAGE Novex 4-12%Bis-Trisゲル(Invitrogen/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)で分離した。続いて、ゲルを、細胞培養上清に含有されるbi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3ならびに他のタンパク質を検出するために標準的な手順(Current Protocols in Protein Science、2012)に従ってクーマシープリリアントブルー溶液により染色した。ウエスタンブロット分析を、bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3をそれらの6xHisタグにより特異的に検出するために行った。簡単に記載すると、タンパク質をPVDFメンブランにブロットし、ブロッキング処理をPBST/3%粉乳により行った後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において1:500で希釈される一次抗体Anti-HIS Epitope-Tag(Dianova GmbH、Hamburg、ドイツ)と4℃で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による洗浄の後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において1:10000で希釈されるFc特異的な二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG抗体(Sigma Aldrich、ドイツ)と4℃で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による洗浄を再び行った後、シグナルを、SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate(Pierce/Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国)によって可視化し、ImageQuant LAS 4000 Imager(GE Healthcare Life Sciences、Munich、ドイツ)によって記録した。bi-scfvタンパク質のシグナルが、内部分子量標準と比較した場合、50kDと60kDとの間に検出された。

【0333】

d. ポリクローナルなHEK293細胞によるbi-scfvタンパク質6PHU3の大規模産生

ポリクローナルな産生細胞株を、10層のCell Factory(Nunc、Roskilde、デンマーク)で、10%のFBS、5.0%のペニシリン-ストレプトマイシンおよび0.8mg/mlのG418が補充されるDMEM/F-12 GlutaMax(すべての試薬を、Gibco/Life Technologies GmbH(Darmstadt、ドイツ)から得た)において製造者の指針に従って培養した。コンフルエントな段階で、細胞をDPBSにより洗浄し、培地を、抗生物質を含むが、FBSを含まないDMEM/F-12培地に変えた。bi-scfvタンパク質6PHU3を含有する細胞上清を3週間までにわたって3日~5日毎に集めた。上清を、500mlの

Steritop Filter Unit (Merck Millipore, Billerica, MA, 米国)を用いてろ過し、FPLC精製まで4 で貯蔵した。

FPLC精製の前に、細胞培養上清におけるbi-scfvの存在を、実施例9.cで簡単に記載されるような標準的な手順によって行われるポリアクリルアミドゲル電気泳動、続く、クーマシー染色およびウエスタンブロット分析によって調べた。

【0334】

e. bi-scfvタンパク質6PHU3の精製および定量

bi-scfvタンパク質6PHU3を含有するポリクローナルなHEK293細胞の細胞培養上清(実施例9.bで記載されるもの)を、標準的な手順(Current Protocols in Protein Science, 2012)を使用する固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)に供した。簡単に記載すると、細胞培養上清を、AKTA Purifier 10 FPLCシステムにつながるHis Trap FF(5ml)カラムに負荷した(ともに、GE Healthcare Life Sciences, Munich, ドイツ)。PBS洗浄緩衝液は10mMのイミダゾールを含有し、PBS溶出緩衝液は、500mMのNaCl、50mMのNaH₂PO₄および250mMのイミダゾールを含有し、両方の緩衝液のpHを7.4に調節した。溶出を段階的勾配によって行った。溶出されたbi-scfvタンパク質6PHU3を、Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette(10K MWCO)(Pierce/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, 米国)を使用して1xPBSに対して直ちに透析した。PBS透析の後、bi-scfvを、H₂Oに基づく200mMアルギニン緩衝液(L-アルギニン塩酸塩; Roth, Karlsruhe, ドイツ)に対して透析した。

bi-scfvの濃度を、bi-scfvタンパク質6PHU3の吸光係数および分子量の考慮のもと、NanoDrop 2000cを用いた280nmでの測定によって求めた。精製されたタンパク質を小分けし、長期間の貯蔵のためには-80 で貯蔵し、直ちに使用するためには4 で保った。

bi-scfvタンパク質6PHU3の品質および純度を、実施例9.cで記載されるようにクーマシー染色およびウエスタンブロット分析によって調べた。BSA標準物希釈物を、NanoDropによって測定される濃度を大雑把に確認するためにクーマシー手法では含めた(データは示されず)。

【0335】

実施例10: CLDN6を標的化するbi-scfv候補物の6PHU5および6PHU3の効率

a. bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3によって標的細胞に標的変更させられるT細胞の顕微鏡法分析

エフェクター細胞がbi-scfvタンパク質によってCLDN6発現標的細胞に標的変更させられることを顕微鏡法分析により可視化するために、インビトロ細胞傷害性アッセイを行った。NiNTAカラムで精製されたbi-scfvタンパク質の6PHU3および6PHU5(実施例9.cを参照のこと)を使用して、これら2つの変化体をそれらの効率に従って比較した。標的細胞株として、高レベルのヒトCLDN6を内因的に発現する卵巣奇形ガン細胞株PA-1を使用した。

ヒトエフェクター細胞を標準的な手順(Current Protocols in Protein Science, 2012)に従って健康なドナーからのヒト血液から新たに単離した:簡単に記載すると、血液をDPBSにより希釈し、Ficoll-Plus(GE Healthcare Life Sciences, Munich, ドイツ)に重層し、遠心分離した。末梢血単核細胞(PBMC)を相間から回収し、2mMのEDTAが補充される冷DPBSにより洗浄し、計数した。続いて、ヒトT細胞を、PBMCから、Pan T Cell Isolation Kit II(Miltenyi Biotec, Teterow, ドイツ)により製造者の指針に従って磁気活性化細胞分離(MACS)によって分離した。

10

20

30

40

50

ウエルあたり 1×10^5 個の PA-1 細胞を組織培養用 6 ウエルプレートに播種した。ヒト細胞を上記のように調製し、5 : 1 のエフェクター対標的 (E : T) 比で加えた。10 % の熱不活化ヒト FBS、0.5 % のペニシリン - ストレプトマイシン、 $1 \times \text{NEAA}$ 、1 mM の重炭酸ナトリウムおよび 1 mM のピルビン酸ナトリウムが補充される MEM 培地 (Gibco / Life Technologies GmbH, Darmstadt、ドイツ) をすべての細胞のために使用し、ウエルあたりの最終体積を 2 ml / ウエルに調節した。使用された bi-scfv タンパク質濃度はこのアッセイでは 50 ng / ml であった。コントロールサンプルは、bi-scfv タンパク質を伴うことなく、単独での標的細胞または T 細胞を含んだ。組織培養プレートを続けて、37 °C、5 % CO₂ においてインキュベーションした。アッセイを、共インキュベーションの 6 時間から 24 時間まで、Wilovert S 倒立顕微鏡 (Hund, Wetzlar、ドイツ) を用いて連続して観察した。bi-scfv タンパク質の 6 PHU5 および 6 PHU3 の存在下における標的細胞上での T 細胞クラスター化、免疫学的シナプスの形成および標的細胞の殺傷に関しての著しい影響が 24 時間で認められ、これらの影響を、Nikon Eclipse TS100 倒立顕微鏡 (Nikon、日本) を用いて写真撮影した。両方の bi-scfv タンパク質が、図 12 に示されるような強い T 細胞クラスター化および標的細胞殺傷を引き起こす。

10

【0336】

b. bi-scfv タンパク質の 6 PHU5 および 6 PHU3 により媒介される T 細胞活性化

20

T 細胞活性化を検出するために、また、これら 2 つの CLDN6 特異的 bi-scfv 変化体の効率における違いを明確にするために、FACS に基づく T 細胞活性化アッセイを使用した。初期活性化マーカー CD69 および後期活性化マーカー CD25 を蛍光コンジュゲート化抗体による染色のために選択した。標的細胞および T 細胞の混合物におけるヒト T 細胞の検出のために、T 細胞上の CD3 を染色した。

一般には、上記から設定されるアッセイを選んだ (実施例 10 . a)。簡単に記載すると、CLDN6 を内因的に発現する PA-1 標的細胞を 2 ml の完全培地において 5 : 1 の E : T 比でヒト T 細胞と一緒に播種し、bi-scfv タンパク質の 6 PHU5 または 6 PHU3 を 5 ng / ml ~ 200 ng / ml の範囲内の濃度で加えた。コントロールサンプルは、bi-scfv タンパク質を伴って、また、bi-scfv タンパク質を伴うことなく、単独での標的細胞または T 細胞を含んだ。24 時間後および 48 時間後、T 細胞をフラッシングによって集め、5 ml の丸底チューブ (BD Falcon, Heidelberg、ドイツ) に移した。細胞を遠心分離し、DPBS により洗浄した。細胞染色のために、マウス抗ヒト CD3 - FITC、マウス抗ヒト CD69 - APC およびマウス抗ヒト CD25 - PE (すべての抗体が、BD Biosciences, Heidelberg、ドイツ) を使用した。細胞ペレットを、蛍光コンジュゲート化抗体を含有する 50 μ l の FACS 緩衝液 (5 % の FBS が補充される DPBS) および 2 μ l の 7 -AAD (BD Biosciences, Heidelberg、ドイツ) において再懸濁した。インキュベーションを暗所において 4 °C で 20 分間行った後、サンプルを 4 ml の DPBS により洗浄し、細胞ペレットを 200 μ l の FACS 緩衝液に再懸濁した。サンプルを、FACSCanto II フローサイトメーター (ともに、BD Biosciences, Heidelberg、ドイツ) を用いた測定の期間中を通して氷上および暗所において保った。分析を FlowJo ソフトウェア (Tree Star, San Carlos, CA、米国) によって評価した。

30

40

両方の CLDN6 特異的 bi-scfv 変化体が、60 % までの効率的な T 細胞活性化をもたらした。変化体 6 PHU3 (bi-scfv CD3 x CLDN6) は 5 ng / ml ~ 10 ng / ml の低濃度範囲においてより強力であり (図 13 もまた参照のこと)、したがって、さらなる研究のために選択された。

【0337】

実施例 11 : bi-scfv 6 PHU3 の結合能

50

FACS結合アッセイ

bi-scfvタンパク質6PHU3のCLDN6標的化成分およびCD3標的化成分の結合能を評価するために、フローサイトメトリーアッセイを使用した。CLDN6を内因的に発現するPA-1細胞およびOV-90細胞を、抗CLDN6部位を詳しく調べるために使用し、ヒトT細胞を、抗CD3部位を詳しく調べるために使用した。CLDN6陰性のNugC4細胞をコントロール細胞として使用した。

抗CLDN6結合能を詳しく調べるために、CLDN6陽性細胞(PA-1、OV-90)およびCLDN6陰性細胞(NugC4)をトリプシン処理し、完全培地により洗浄し、続いてDPBSにより洗浄した。すべての洗浄工程を4における6分間の1200rpmでの遠心分離によって行った。1×10⁵個の細胞を5mlの丸底チューブに移し、FACS緩衝液における0.01μg/ml~10μg/mlのFPLC精製された6PHU3タンパク質またはコントロールbi-scfvタンパク質1BiMABと4で30分間インキュベーションした。細胞を2mlのFACS緩衝液により洗浄し、続いて、3.3μg/mlのモノクローナル抗体Anti-HIS Epitope-Tag(Dianova GmbH、Hamburg、ドイツ)と4で30分間インキュベーションした。2mlのFACS緩衝液による洗浄の後、細胞ペレットを、FACS緩衝液における1:200の希釈度でのAPCコンジュゲート化ヤギ抗マウス二次抗体(Jackson ImmunoResearch Europe、Suffolk、英国)と暗所において4で20分間インキュベーションした。細胞を2mlのFACS緩衝液により2回洗浄し、最後に、1μg/mlのPI(Sigma Aldrich、ドイツ)が補充される150μlのFACS緩衝液に再懸濁して、死細胞を対比染色した。陰性コントロールサンプルには、単独での二次のヤギ抗マウスAPC抗体が含まれていた。陽性コントロールとして、二次のヤギ抗ヒトAPC抗体(Jackson ImmunoResearch Europe、Suffolk、英国)により染色される10μg/mlのモノクローナルなCLDN6特異的抗体mCLDN6ab、および、その適切な二次抗体のみのコントロールを実行した。

サンプルを、FACSCaliburフローサイトメーター(BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を用いて測定し、FlowJoソフトウェア(Tree Star、San Carlos、CA、米国)によって分析した。10μg/mlの6PHU3のシグナル強度は陽性コントロールmCLDN6abの1/4~1/9であった(図15Aを参照のこと)。CLDN6陰性細胞株NugC4に対する6PHU3の非特異的な結合は検出されなかった(図15C)。

【0338】

bi-scfvタンパク質6PHU3の抗CD3アームの結合能を詳しく調べるために、ヒトT細胞を使用した。5×10⁵個のT細胞を5mlの丸底チューブに移し、FACS緩衝液における100ng/ml~10μg/mlの範囲内でのFPLC精製された6PHU3タンパク質と4で30分間インキュベーションした。さらなる染色手順は上記の通りであった。コントロールサンプルには、単独での二次のヤギ抗マウスAPC抗体、および、モノクローナル抗体Anti-HIS Epitope-Tag+二次のヤギ抗マウスPE抗体が含まれた。測定および分析を上記のように行った。著しいシグナルが100ng/mlの6PHU3により得られた(図15Bもまた参照のこと)。

【0339】

実施例12: bi-scfvの6PHU3による標的依存的T細胞活性化の調査

実施例10.aおよび実施例10.bに記載されるような細胞傷害性アッセイを行った。簡単に記載すると、CLDN6を内因的に発現するPA-1標的細胞を2mlの完全培地において5:1のE:T比でヒトT細胞と一緒に播種し、bi-scfvタンパク質6PHU3を0.001ng/ml~1000ng/mlの範囲内の濃度で加えた。bi-scfv媒介のT細胞活性化についての標的依存性を分析するために、T細胞を、標的細胞を伴うことなく播種し、しかし、標的細胞+T細胞のサンプルと同じ濃度のbi-scfv 6PHU3とインキュベーションした。24時間後および48時間後、T細胞をフ

ラッシングによって集め、5 mlの丸底チューブ (BD Falcon、Heidelberg、ドイツ)に移した。細胞染色および分析を実施例10.bで記載されるように行った。

図16Aおよび図16Bに示されるように、6PHU3媒介のT細胞活性化が標的細胞の非存在下では全く検出できず、このことは、bi-scfv機能性の厳密な標的依存性を強調している。著しいT細胞活性化がほんの0.1 ng/mlの6PHU3により48時間後に生じた。

【0340】

実施例13：インビトロ細胞傷害性アッセイにおけるbi-scfv 6PHU3のEC₅₀の決定

10

ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ

bi-scfvタンパク質6PHU3の50%最大有効用量を求めるために、6PHU3の力価測定列をインビトロルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。

安定的にルシフェラーゼを発現するPA-1細胞とヒトT細胞とを5:1のE:T比で、(10倍ずつで)1 pg/mlから1 μg/mlまでの範囲におけるbi-scfvタンパク質6PHU3濃度とともに、または、L_{min}値を求めるために、6PHU3を伴うことなくインキュベーションした。

細胞培養マイクロプレートを、37 °C、5%CO₂において24時間および48時間インキュベーションした。分析のために、1 mg/mlのルシフェリン (BD Monolight、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)および50 mMのHEPESを含有する水溶液の50 μlをウエルあたり加え、続いて、プレートを37 °Cにおいて暗所で30分間インキュベーションした。ルシフェラーゼを発現する生細胞によるルシフェリンの酸化から生じる発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダー (Tecan、Mannedorf、スイス)を用いて測定した。特異的な標的細胞溶解の百分率を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$ 、ただし、"L"は溶解を示す。L_{min}はbi-scfvの非存在下における最小溶解を示し、L_{max}は、Triton X-100 (2%の最終濃度)の添加によって達成されるbi-scfvの非存在下における最大溶解 (自然発光カウント数に等しい)を示す。

20

最大溶解には、1 ng/ml ~ 10 ng/mlの6PHU3により48時間後に達し、48時間後に決定的なEC₅₀がおよそ10 pg/mlである (図17もまた参照のこと)。このアッセイの結果は、他者によってもまた報告されるように (例えば、Lutterbuese, R他、2010、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2010 (Jul 13)、107 (28): 12605 ~ 10を参照のこと)、ドナーの免疫状態に従って変化するヒトT細胞の効力に強く依存する。したがって、3倍の差でのbi-scfvタンパク質6PHU3のEC₅₀値の変動が本発明の過程の期間中に観測されている。

30

【0341】

実施例14：マウス異種移植モデルにおける効力

bi-scfvタンパク質6PHU3の治療可能能をインビボで詳しく調べるために、NOD.Cg-Prkd^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJまたはshort NSGのマウス系統 (Jackson Laboratory、Bar Harbour、ME、米国)を選んだ。記載された研究のために、マウスにおけるヒトエフェクター細胞およびヒトTリンパ球の生着が、T細胞と会合するbi-scfvの影響をインビボで研究するためには不可欠である。B細胞、T細胞およびNK細胞を完全に欠いているので、マウス系統NSGがこの種の異種移植研究のためには好適である。PBMC注入後の生着したヒトT細胞を主に有するマウスモデルを発明の一部として確立した。

40

【0342】

a. bi-scfvタンパク質6PHU3によるマウスにおける進行したCLDN6高発現腫瘍の後期開始処置

50

例示された研究において、8週齢～11週齢での25匹のメスNSGマウスおよび25匹のオスNSGマウスに、高レベルのヒトCLDN6を内因的に発現する 1×10^7 個のPA-1細胞を皮下に接種した。腫瘍細胞接種後15日で、マウスをそれらの腫瘍体積に従って処置群に階層化し、腫瘍成長を有しないマウスは除外した。同じ日に、末梢血単核細胞(PBMC)をFicoll密度勾配技術によって健康なドナーのヒト血液から単離し、インビポでのエフェクター細胞として使用した。200 μ lのDPBSで希釈される 2×10^7 個のPBMCを、"PBMC"により示される実験処置群に単離当日に腹腔内注入した。"PBMC"により示される処置群は200 μ lの非補充DPBSを代わりに腹腔内に受け、ヒトエフェクター細胞を伴わないコントロールとして役立った。"PBMC"コントロール群により、6PHU3自体による腫瘍成長に対する潜在的影響、あるいは、マウス組織に対するヒトエフェクター細胞によってではなく、6PHU3またはビヒクルによって引き起こされる何らかの潜在的副作用(すなわち、マウス組織に対するヒトエフェクター細胞によって及ぼされる移植片対宿主反応)の調査を調べることができた。群"PBMC/ビヒクル"は8匹のマウスを含み($n=8$)、群"PBMC/6PHU3"は8匹のマウスを含み($n=8$)、群"PBMC/ビヒクル"は7匹のマウスを含み($n=7$)、群"PBMC/6PHU3"は7匹のマウスを含み($n=7$)群"PBMC/1BiMAB"は8匹のマウスを含んだ($n=8$)。治療を、DPBSまたはPBMCを適用した7日後に開始した:群"PBMC/6PHU3"、群"PBMC/6PHU3"および群"PBMC/1BiMAB"は動物あたり、200 μ lのDPBSで希釈される5 μ gの精製されたbi-scFvタンパク質6PHU3またはbi-scFvタンパク質1BiMABを腹腔内に受けた。群"PBMC/ビヒクル"および群"PBMC/ビヒクル"は、DPBSで希釈されるビヒクル緩衝液(H₂Oに溶解される200mMのL-アルギニン塩酸塩、無菌ろ過されたもの)の200 μ lを腹腔内に受けた。処置群が表6にまとめられる。治療を26日間にわたって毎日行った。週に2回、腫瘍の大きさを校正済みのデジタル式カリパスにより測定し、腫瘍体積を下記の式に従って計算した: $\text{mm}^3 = \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{幅} / 2$ 。図18Aおよび図18Bは、ヒトエフェクター細胞の存在下での抗体による"PBMC/6PHU3"群のすべてのマウスにおける腫瘍成長の阻害を例示する。マウスを、腫瘍体積が1500 mm^3 に達したとき、または、重篤な病的状態の場合(移植片対宿主症状が一部のマウスにおいて認められた)には頸椎脱臼によって屠殺した。

10

20

30

40

50

【0343】

【表6】

表6:処置群

処置群 (G)	マウスの数 (n)	エフェクター細胞	Bi-scFv タンパク質	μ g bi-scFv タンパク質/マウス
G1	8	-	-	-
G2	8	-	6PHU3	5
G3	7	PBMC	-	-
G4	7	PBMC	6PHU3	5
G5	8	PBMC	1BiMAB	5

【0344】

b. 体重に対する治療影響の決定

それぞれのマウスの体重を、実験室用はかりを使用して週に2回測定した。どの群のマウスも体重減少を処置期間にわたって示さなかった(データは示されず)。

【0345】

c. 組織の保存および脾細胞の単離

マウスを殺した後、腫瘍を解剖し、組織を直ちに、免疫組織化学分析のために10mlのRoti-Histofix 4%(Carl Roth、Karlsruhe、ドイツ)において固定処理した。そのうえ、脾臓を、ヒト細胞の生着をフローサイトメトリー

分析によって検出するために解剖した。脾細胞の単離を、脾臓を3 ml ~ 5 mlのシリンジの無菌プランジャーによりすりつぶして、50 mlの反応チューブの中に置かれる70 μ mの細胞ろ過器に通し、温DPBSによる細胞ろ過器の反復したフラッシングを行うことによって脾臓解剖の直後に行った。単離された脾細胞を遠心分離し、DPBSをデカンテーションによって除き、脾細胞のペレットを、10%のDMSOが補充される1 mlの熱不活化ウシ胎児血清に再懸濁した。すべてのマウスからの脾細胞サンプルが完了するまで、サンプルを直ちに-80 で凍結し、貯蔵した。

【0346】

d. マウス脾臓におけるヒトTリンパ球の生着の分析

すべてのマウスからの脾細胞を実施例14.cで記載されるように集め、凍結した。脾細胞サンプルの完成した収集物を一度に解凍し、すべての細胞を温DPBSにより2回洗浄し、サンプルあたり 1×10^6 個の脾細胞を蛍光コンジュゲート化抗体と暗所において4 で20分間インキュベーションして、ヒト細胞の生着を抗CD45染色によって検出し、ヒトT細胞の割合を、抗CD3染色、抗CD4染色および抗CD8染色によって検出した。フローサイトメトリー分析を、FACSCalibur (BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を用いて行った。両方の"PBMC"群におけるヒトT細胞の生着を、図18Dに示されるように、CD45 - CD3の二重陽性脾細胞の大きい割合によって確認することができた。

10

【0347】

e. 標的発現およびT細胞増殖を求めるための免疫組織化学

腫瘍を、解剖後、4%の緩衝化ホルムアルデヒド溶液 (Roti-Histofix、Carl Roth、Karlsruhe、ドイツ)を使用して4 で48時間、固定処理した。固定処理された腫瘍を2つに分け、脱水のための自動化された真空組織処理装置ASP200 (Leica Microsystems GmbH、Wetzlar、ドイツ)に移し、その後、パラフィン・ディスペンサー・ステーションMPS/C (Slee Medical GmbH、Mainz、ドイツ)によりパラフィン (Paraplast、Carl Roth、Karlsruhe、ドイツ)に包埋した。免疫組織化学染色のために、ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織の3 μ m厚の切片を、回転マイクロームRM2255 (Leica Microsystems GmbH、Wetzlar、ドイツ)を使用して作製した。脱パラフィン化および再水和を並行 (bi-linear) 回分式染色装置StainMate Max (Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国)で行い、その後、熱誘導によるエピトープ回復を、0.05%のTween 20を伴う10 mMクエン酸緩衝液 (pH 6) において120 で10分間行った。内因性ペルオキシダーゼを、続いてPBSにおける0.3%のH₂O₂溶液 (Carl Roth)を15分間使用して失活させ、その後、PBSにおける10%のヤギ血清 (PAA Laboratories GmbH/GE Healthcare、Pasching、オーストリア)とのインキュベーションを、非特異的な抗体結合部位を阻止するために30分間行った。TAAクローディングが、ポリクローナルな一次抗体の抗マウスクローディング (C) ウサギ (IBL-America、Minneapolis、MN、米国)との4 での一晚のインキュベーションによって検出された; T細胞が、ポリクローナルな抗CD3 AB (Abcam、Cambridge、英国)を4 で一晚使用して、その後、BrightVisionポリマーHRPコンジュゲート化抗ウサギ二次抗体 (ImmunoLogic、Duiven、オランダ)とのインキュベーションによって連続切片において検出された。結合反応を、Vector NovaREDキット (Vector Laboratories Ltd.、Peterborough、英国)を製造者の説明書に従って使用して、その後、ヘマトキシリン対比染色 (Carl Roth)、脱水および固定を行って可視化した。分析および記録を、Axio Imager M2またはMiraxスキャナーのどちらかを使用して行った (ともに、Carl Zeiss Microscopy GmbH、Goettingen、ドイツ)。

20

30

40

50

図19に示されるように、最大のT細胞浸潤が、とりわけCLDN6発現の境界領域において、CD3染色によって"PBMC/6PHU3"群の腫瘍において検出された。コントロール群におけるTAA CLDN6の不均一な発現パターン(図19A、図19B、図19Cおよび図19D)が、治療の結果として"PBMC/6PHU3"群の腫瘍におけるCLDN6発現のより密集した領域に変化した(図19D)。

【0348】

実施例15: CLDN18.2およびCD3を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

a. bi-scfv構築物の配列起源、設計およびテンプレートベクターへのクローニング

ヒトT細胞受容体成分CD3イプシロンおよびヒト腫瘍関連抗原(TAA)に対して特異的である結合ドメインを含有する二重特異性のタンデム型単鎖抗体構築物(bi-scfv)を調製した。それぞれの構築物のための対応する可変重鎖領域(VH)および対応する可変軽鎖領域(VL)を具体的には、5'末端から3'末端に、下記の連続する順で配置した:

【化3】

pST1-hAgKozak-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-V_H^{αCD3}-V_L^{αCD3}-His-2hBgUTR-A120

(1BiMAB, 18RHU5, no.1-5)

pST1-hAgKozak-V_H^{αCD3}-V_L^{αCD3}-V_H^{αCLDN18.2}-V_L^{αCLDN18.2}-His-2hBgUTR-A120

(18RHU3, no.6-10)

【0349】

表7には、本発明の過程で作製された、TAA CLDN18.2およびPLAC1に対して特異的であるすべてのbi-scfv構築物がまとめられる。これらのbi-scfv構築物を、対応する抗体のVH配列およびVL配列を使用してGeneArt AG (GeneArt/Life Technologies GmbH, Regensburg, ドイツ)による遺伝子合成によって作製した。コドン最適化、例えば、ヒト(Homo sapiens)(HS)、ハツカネズミ(Mus musculus)(MM)またはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)をGeneArt社のGeneOptimizer(登録商標)ソフトウェアによって実行した。これらが表7に示される。特異性、モノクローナル抗体(mAb)由来の配列起源、コドン使用頻度、さらなる配列特徴、および、すべての適用されたドメインの参考文献に関する情報が表8にまとめられる。それぞれのCD3抗体の可変ドメイン配列起源が表8に示される。ヒトTAAおよびマウスTAAの大きい相同性のために、同じ抗TAA VH配列およびVL配列を、マウス特異的な抗CD3抗体クローン145-2C11のVH配列、VL配列との組合せでの場合を除いて、マウスアッセイのためのbi-scfv構築物の作製のために使用することができた。

DNAクローニングおよび発現ベクター構築を、当業者によって広く知られている標準的な手順(Green/Sambrook, Molecular Cloning, 2012)に従って行った。簡単に記載すると、最初のbi-scfv DNA配列には、5'側でのBsmBI制限部位および3'側でのXhoI制限部位がpST1プラスミドへのクローニングのために与えられた。分泌シグナル配列をbi-scfvの分泌のために5'末端においてbi-scfv配列の上流側に導入した。15個~18個のアミノ酸の柔軟なグリシン-セリンペプチドリンカーをコードする配列を、一方がCD3に結合し、かつ、他方がTAAに結合する単鎖可変抗体フラグメント(scfv)を組み立てるためのVHドメインおよびVLドメインをつなぎ合わせるために挿入した。二重特異性単鎖抗体を形成するために、これら2つのscfvドメイン配列を、短いペプチドリンカー(GG

10

20

30

40

50

GGS)をコードする配列によってつないだ。このリンカー配列と一緒に、BamHI制限部位を、今後予定されているbi-scFv構築物のクローニングのためのscFvドメイン交換のために導入した。簡単に記載すると、5'側のscFvドメインをBsmBIおよびBamHIの制限によって交換し、3'側のscFvドメインをBamHIおよびXhoIの制限によって交換した。C末端の6xHisタグを、翻訳されたタンパク質の検出分析のために実行した。bi-scFv配列のヒトアルファグロビンの5'側の非翻訳領域およびヒトベータグロビンの3'側の非翻訳領域がpST1ベクターに存在した(詳細については、国際公開WO2007/036366A2; Waggoner, S. 他(2003)、Exp. Biol. Med. (Maywood)、228(4)、387頁~395頁を参照のこと)。

1BiMABレプリコンベクターの作製のために、分泌シグナルおよび6xHisタグを含む完全な1BiMAB配列を、K. Lundstromによって譲渡されたセムリキ森林ウイルスレプリコンベクター(pSFV)のサブゲノムプロモーターの3'側にサブクローン化した(Lundstrom, K. 他(2001)、Histochem. Cell Biol.、115(1)、83頁~91頁; Ehrengreuber, M. U. 他(1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96(12)、7041頁~7046頁)。

すべての構築物をMWGの単回読み取り配列サービス(Eurofins MWG Operon、Ebersberg、ドイツ)による配列決定によって確認し、正しい配列および100個を超えるアデニンのポリ(A)テールを有する構築物のみをインビトロRNA転写のために使用した。

構築物の概要については、図20Aもまた参照のこと。

【0350】

【表7】

表7:TAAおよびCD3に特異的な二重特異性単鎖抗体mRNAテンプレート構築物の要約

社内名称	TAA	特異性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	コドン使用頻度
1BiMAB	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
no.1	CLDN18.2	マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	CHO
no.2	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	CHO
no.3	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	UCHT1	CHO
no.4	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	CLB-T3	CHO
no.5	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	CHO
no.6	CLDN18.2	マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	CHO
no.7	CLDN18.2	ヒト	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	CHO
no.8	CLDN18.2	ヒト	UCHT1	mCLDN18.2ab	CHO
no.9	CLDN18.2	ヒト	CLB-T3	mCLDN18.2ab	CHO
no.10	CLDN18.2	ヒト	TR66	mCLDN18.2ab	CHO
18RHU5	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
18RHU3	CLDN18.2	ヒト	TR66	mCLDN18.2ab	HS
18RMU5	CLDN18.2	マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	MM
18RMU3	CLDN18.2	マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	MM
コントロール <i>bi-scFv</i>					
no.25	PLAC1	ヒト	78H11	TR66	CHO

Bi-scFvは二重特異性単鎖可変フラグメントを示す;CHOはチャイニーズハムスター卵巣を示す;HSはヒト(Homo sapiens)を示す;MMはハツカネズミ(Mus musculus)を示す;TAAは腫瘍関連抗原を示す;VHは可変重鎖ドメインを示す;VLは可変軽鎖ドメインを示す。

【0351】

【表 8】

表8:bi-scFv mRNAテンプレート構築物情報の要約

CD3結合性成分 TAA結合性成分

社内名称	mAB 起源	種反応性	TAA	mAB 起源	種反応性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短リンカー
1BiMAB	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS
no.1	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGGGS
no.2	UCHT1-HU	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	UCHT1-HU	SGGGGS
no.3	UCHT1	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	UCHT1	SGGGGS
no.4	CLB-T3	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	CLB-T3	SGGGGS
no.5	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	SGGGGS
no.6	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.7	UCHT1-HU	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	UCHT1-HU	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.8	UCHT1	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	UCHT1	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.9	CLB-T3	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	CLB-T3	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.10	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN18.2ab	SGGGGS
18RHU5	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	SGGGGS
18RHU3	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN18.2ab	SGGGGS
18RMU5	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	145-2C11	SGGGGS
18RMU3	145-2C11	マウス	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN18.2ab	SGGGGS
no.25	TR66	ヒト	PLAC1	78H11	ヒト、マウス	78H11	TR66	SGGGGS

10

20

表8(続き)

社内名称	5'-長リンカー	3'-長リンカー	分泌シグナル	コドン 使用頻度	抗-CD3 mAB 参考文献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVAT ATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.1	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.2	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.3	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.4	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.5	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
no.6	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVL TLKGIQG	CHO	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.7	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	CHO	Shalaby et al., J Exp Med 1992
no.8	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVL TLKGIQG	CHO	Beverley et al., Eur J Immunol 1981
no.9	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MNFGSLIFLALI LKGVCQ	CHO	Van Lier et al., Immunology 1989
no.10	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MEWSWIFLFLS VTGVHS	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18RHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVAT ATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18RHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFLVAT ATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
18RMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFLVAT ATGVHS	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
18RMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVFFVL TLKGIQG	MM	Leo et al., Proc Natl Acad Sci, 1987
no.25	(GGGGS) ₃	(GGGGS) ₃	MGWLWNLFLM AAAQSAQA	CHO	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987

30

40

CHOはチャイニーズハムスター卵巣を示す;HSはヒト(Homo sapiens)を示す;mABはモノクローナル抗体を示す;MMはハツカネズミ(Mus musculus)を示す;TAAは腫瘍関連抗原を示す。

b. IVT - RNA 合成

抗CLDN18.2特異的bi-scfvのIVTテンプレートを作製するために、プラスミドを、クラスIIsのエンドヌクレアーゼを使用してポリ(A)テールの下流側で線状化した。線状化されたテンプレートDNAを、どこか他のところで記載されるようにフェノール/クロロホルム抽出および酢酸ナトリウム沈澱によって精製した(Holtkamp, S. 他(2006)、Blood、108(13)、4009頁~4017頁)。

線状化されたDNAテンプレートを、MEGAscript Kits (Ambion / Life Technologies、Darmstadt、ドイツ)を製造者の指針に従って使用するインビトロ転写に供した：pST1テンプレートを、MEGAscript T7 Kitを用いて転写し、pSFVテンプレートをMEGAscript SP6 Kitを用いて転写した。キャップアナログとの反応のために、GTP濃度を1.5mMに下げ、6mMのARCA、beta-S-ARCA(D1)またはbeta-S-ARCA(D2) (これらは、どこか他のところで記載されるように合成された；Kowalska, J. 他(2008)、RNA、14(6)、1119頁~1131頁；Grudzien, E. 他(2004)、RNA、10(9)、1479頁~1487頁；Stepinski, J. 他(2001)、RNA、7(10)、1486頁~1495頁)を反応液に加えた。IVT-mRNAの精製を、MEGAclean Kit (Ambion / Life Technologies、Darmstadt、ドイツ)を用いてマニュアルに従って行った。IVT-RNAの濃度および品質を、分光光度法、および、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies、Santa Clara、CA、米国)での分析によって評価した。

【0353】

実施例16：様々なCLDN18.2特異的IVT-mRNAによりトランスフェクションされた標的細胞によるbi-scfv分泌に対する応答でのT細胞活性化

CLDN18.2特異的bi-scfvのIVT-RNAの機能性を調べるために、比較的高レベルのヒトCLDN18.2を内因的に発現する胃ガン細胞株NugC4 (Sahin U. 他(2008)、Clin Cancer Res、14(23)、7624頁~7634頁)を標的細胞株として使用した。

NugC4標的細胞 (これは、どのアッセイの前においてもFACS分析によってTAA発現について日常的に試験される) を、氷冷されたX-Vivo15培地 (LONZA、Basel、スイス) により2回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlの密度に再懸濁した。250 μ lの細胞懸濁物を、事前に冷却された0.4cmのGene Pulser / MicroPulserキュベット (Bio-Rad、Dreieich、ドイツ) に移し、20 μ g/mlのIVT-mRNAを加えた。使用されたIVT-mRNAは、1BiMAB、no. 2、no. 3、no. 4、no. 5、no. 7、no. 8、no. 9およびno. 10であった。bi-scfv変化体に関するさらなる情報については、表7および表8を参照のこと。注意深く混合した後、細胞を、BTX ECM 830エレクトロポレーター (Harvard Apparatus、Holliston、MA、米国) を用いて、下記の条件を使用してトランスフェクションした：250V、2回のパルス、12msのパルス長さ、400msの間隔長さ。エレクトロポレーション後直ちに、キュベットを短時間氷上に置き、その後、細胞懸濁物を15mlのチューブにおけるRTの温かいアッセイ培地 (5%の熱不活化ヒトAB血清、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシン、 $1 \times$ NEAAおよび1mMのピルビン酸ナトリウムが補充されるRPMI1640培地) (Gibco / Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ) に移した。トランスフェクションされた標的細胞を計数し、 1×10^5 細胞/mlに調節した。

ヒトエフェクター細胞を標準的な手順 (Current Protocols in Immunology、2012) に従って健康なドナーのヒト血液から新たに単離した：簡単に記載すると、血液をDPBSにより希釈し、Ficoll-Paque Plus

s (GE Healthcare Life Sciences, Munich, ドイツ) に重層し、遠心分離した。末梢血単核細胞 (PBMC) を相間から回収し、2 mM の EDTA が補充される冷 DPBS により洗浄し、計数した。ヒト細胞傷害性 T 細胞を、PBMC から、CD8⁺ T Cell Isolation Kit (ヒト) (Miltenyi Biotec, Teterow, ドイツ) により製造者の指針に従って磁気活性化細胞分離 (MACS) によって単離した。エフェクター細胞分離物を、FACS 分析 (CD4 染色、CD8 染色) により、成功した T 細胞単離について日常的に調べた。T 細胞をアッセイ培地において 5×10^5 細胞/ml に調節した。

1×10^5 個の標的細胞を 6 ウエルプレートのウエルあたり播種し、ヒト細胞傷害性 T 細胞を 5 : 1 の E : T 比に加えた。ウエルあたりの最終体積が 2 ml であった。エフェクター細胞および標的細胞を含有するコントロールサンプルは、no. 25 (親の IgG mAb chCLDN18.2ab) を分泌する標的細胞を含み、また、1 BiMAB タンパク質を 5 ng/ml の最終濃度で陽性コントロールとして含んだ。コントロールには、単独でのエレクトロポレーション後の標的細胞または単独での T 細胞が、1 BiMAB タンパク質を伴って、また、1 BiMAB タンパク質を伴うことなく含まれた。48 時間後、T 細胞および標的細胞を集め、標識し、フローサイトメトリーによって分析した。簡単に記載すると、すべての細胞を、Cell Scrapers (Sarstedt AG & Co, Nurbrecht, ドイツ) を用いて穏やかにかき取ることによって集め、5 ml の丸底チューブ (BD Falcon, Heidelberg, ドイツ) に移した。細胞を遠心分離し、DPBS により洗浄した。細胞染色のために、マウス抗ヒト CD3 - FITC、マウス抗ヒト CD69 - APC およびマウス抗ヒト CD25 - PE (すべての抗体が、BD Biosciences, Heidelberg, ドイツ) を使用した。細胞ペレットを、蛍光コンジュゲート化抗体を含有する 50 μ l の FACS 緩衝液 (5% の FBS が補充される DPBS) に再懸濁した。インキュベーションを暗所において 4 で 20 分間行った後、サンプルを 4 ml の DPBS により洗浄し、細胞ペレットを、死細胞の検出のために、ヨウ化プロピジウム (PI) (Sigma Aldrich, ドイツ) を 1 : 1000 の最終希釈度で含有する 200 μ l の FACS 緩衝液に再懸濁した。サンプルを、測定されるまで氷上および暗所において保った。アッセイの確立を、FACS Calibur (BD Biosciences, Heidelberg, ドイツ) を用いて行った。分析を FlowJo ソフトウェア (Tree Star, San Carlos, CA, 米国) によって評価した。

図 21A に示されるように、それぞれの CLDN18.2 特異的な IVT-mRNA が、効率的な T 細胞活性化において見られるような bi-scfv タンパク質の分泌をもたらした。ほんのわずかな差を T 細胞活性化において有する非常に強力な変化体が、大きい順に、no. 5 > no. 8 > no. 10 > no. 3 > 1 BiMAB であった。これらの変化体のすべてが、55% を超える総 T 細胞活性化を引き起こし、これに対して、no. 2、no. 4、no. 7 および no. 9 の変化体は 40% ~ 50% の総 T 細胞活性化を引き起こした。

特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した： $\% \text{溶解} = (\% \text{PI} + \text{標的細胞サンプル} - \% \text{PI} + \text{標的細胞EP参照})$ 、ただし、"サンプル" は、共インキュベーションされたエフェクター細胞および標的細胞を示し、"EP参照" は、それぞれの個々の IVT-mRNA エレクトロポレーションだけのエレクトロポレーションされた標的細胞を示す。図 21B に示されるように、65% を超える標的細胞溶解が、大きい順に、変化体 1 BiMAB > 変化体 no. 5 > 変化体 no. 8 > 変化体 no. 3 によって達成された。他の変化体は 55% ~ 64% の標的細胞溶解を媒介した。

最も強力な CLDN18.2 特異的 bi-scfv は TR66 の VH ドメインおよび VL ドメインを有し (1 BiMAB、no. 5、no. 10)、または、UCHT1 の VH ドメインおよび VL ドメインを有する (no. 3、no. 8)。ドメイン配向に関しては、タンパク質 bi-scfv 変化体とは対照的に、著しい違いが何ら認められなかった (実施例 3 を参照のこと)。タンパク質研究に従って、1 BiMAB をコードする IVT-

10

20

30

40

50

mRNAをさらなる研究のために選んだ。

18RHU5および18RHU3の構築物(表7および表8を参照のこと)を1BiMABに対してその後の時点で比較した。18RHU5の効率が1BiMABと同等であり、18RHU3はそれほど強力でなかった(データは示されず)。

【0354】

実施例17:CLDN18.2特異的bi-scfvの1BiMABを分泌する標的細胞に標的変更させられるT細胞の顕微鏡法分析

アッセイ設定は本質的には、実施例2.aで記載される通りであった。

ヒト細胞傷害性T細胞を、新たに単離されたPBMCから、CD8⁺T Cell Isolation Kit(ヒト)(Miltenyi Biotec、Teterow、ドイツ)により製造者の指針に従ってMACSによって単離した。

NugC4標的細胞を調製し、そして、80μg/mlの1BiMAB IVT-mRNAまたは80μg/mlのno.25 ctrl IVT-mRNAが使用されたことを除いて実施例16で記載されるようにトランスフェクションした。トランスフェクションされた標的細胞を計数し、2×10⁵細胞/mlに調節した。1×10⁴個の標的細胞を96ウエルプレートのウエルあたり播種し、ヒト細胞傷害性T細胞を5:1のE:T比に従って加えた。ウエルたりの最終体積が100μlであった。コントロールサンプルは、単独でのトランスフェクション後の標的細胞を、エレクトロポレーション後の健全性を証明するために含み、また、コントロールbi-scfvによりトランスフェクションされた標的細胞を、エフェクター細胞を伴って含んだ。組織培養プレートを続けて、37、5%CO₂においてインキュベーションした。1BiMABによりトランスフェクションされた標的細胞を含有するサンプルにおける標的細胞上でのT細胞クラスター化、免疫学的シナプスの形成および標的細胞の殺傷に関しての著しい影響が24時間で認められ、これらの影響を、Nikon Eclipse TS100倒立顕微鏡(Nikon、日本)を用いて記録した。T細胞クラスター化または標的細胞溶解が、no.25によりトランスフェクションされた標的細胞を有するコントロールサンプルでは何ら認められず、このことは、T細胞の活性化を誘導するためのTAA発現に対する厳密な依存性を暗示していた。図2.2もまた参照のこと。

【0355】

実施例18:CLDN18.2特異的bi-scfvの1BiMABによる濃度依存的なT細胞活性化のフローサイトメトリー分析

TAA発現標的細胞の存在下におけるT細胞のbi-scfv濃度依存的な活性化を詳しく調べるために、3倍希釈系列をトランスフェクションプロセスに適用した。

NugC4標的細胞を調製し、実施例16で記載されるように、しかし、40μg/mlの最終IVT-mRNA濃度によりトランスフェクションした。1BiMABのIVT-mRNAの濃度は0.4μg/mlから40μg/mlにまで及び、これらには、適量のルシフェラーゼIVT-mRNAが、すべてのサンプルをIVT-mRNA量に関して同じストレスレベルにさらすという目的により満たされた。

1×10⁵個のトランスフェクションされた標的細胞およびヒト細胞傷害性T細胞(実施例16で記載されるように単離されたもの)を6ウエル形式における2mlのアッセイ培地において10:1のE:T比で播種した。コントロールサンプルは、1BiMABのIVT-mRNAによるのではなく、40μg/mlのルシフェラーゼIVT-mRNAによりトランスフェクションされた標的細胞を含有した。標的細胞およびエフェクター細胞の24時間および48時間の共インキュベーションの後、細胞を、実施例16で記載されるように集め、染色し、分析した。

図2.3Aおよび図2.3Bに示されるように、著しいT細胞活性化が、4μg/mlの1BiMAB IVT-mRNAによりトランスフェクションされた標的細胞を含有するサンプルにおいて認められた。このアッセイにおける最大のT細胞活性化には、40μg/mlの1BiMAB IVT-mRNAにより達した。CD69およびCD25の発現が、共インキュベーション時間(図2.3A~図2.3B)およびIVT-mRNA濃度とともに

に変化した。1 BiMAB IVT - mRNA のより大きい量 (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) は、例えば、図 23 B における CD 69 の発現と比較して CD 25 の増大した発現においてははっきり見られるように、T 細胞活性化機構のより速い開始を引き起こした。総 T 細胞活性化は約 40% を超えなかった。

【0356】

実施例 19 : CLDN18 . 2 特異的 bi - scFv の 1 BiMAB による濃度依存的な T 細胞媒介の標的細胞溶解のフローサイトメトリー分析

bi - scFv 濃度依存的な T 細胞媒介の標的細胞溶解を詳しく調べるために、実施例 18 で記載される実験設定を使用した。エフェクター細胞および標的細胞の共インキュベーションサンプル ("サンプル") のほかに、個々にエレクトロポレーションされた標的細胞もまた単独で播種した。後者は、エレクトロポレーションプロセス自体によって死んだ標的細胞を T 細胞によって溶解された標的細胞から引くための参照サンプル ("EP 参照") として役立った。

採取および染色を実施例 18 に従って行った。標的細胞を最後に、FACSCalibur (BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) を用いて、ヨウ化プロピジウムのものであるそれらの取り込みにより分析した。

特異的な標的細胞溶解の割合をバックグラウンドでの死細胞の二段階の減算によって求めた：

$$1. \% \text{T 細胞媒介溶解} = (\% \text{PI} + \text{標的細胞サンプル} - \% \text{PI} + \text{標的細胞 EP 参照})$$

$$2. \% \text{特異的溶解} = (\% \text{T 細胞媒介溶解サンプル} - \% \text{T 細胞媒介溶解 ctrl})$$

"% T 細胞媒介溶解 ctrl" が、エフェクター細胞を伴う場合および伴わない場合のコントロールサンプル (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のルシフェラーゼ IVT - mRNA のみ) の PI + 標的細胞の差から推定される。

この計算によって、55.5% + / - 5.6% の最大特異的溶解には、この実験では 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 1 BiMAB IVT - mRNA により達する。エレクトロポレーションのストレスに対する NugC4 標的細胞の感受性、および、それに加えて、差し引かれる避けられないバックグラウンドでの死んでいる標的細胞のために、プロットされた特異的標的細胞溶解は、この実験設定では、実際の溶解割合よりも低いかもしれない。

【0357】

実施例 20 : 1 BiMAB の IVT - mRNA によるトランスフェクションに対する応答における T 細胞増殖

T 細胞増殖は T 細胞活性化の指標である。特異的な T 細胞増殖を CLDN18 . 2 陽性標的細胞の存在下での bi - scFv コード IVT - mRNA 1 BiMAB に対する応答において示すために、フローサイトメトリーアッセイを使用した。簡単に記載すると、実施例 16 で記載されるように単離された 1×10^7 個のヒト T 細胞を、DPBS に溶解される 1 μM のカルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル (CellTrace CFSE、Invitrogen / Life Technologies GmbH、ドイツ) により暗所において RT で 5 分間染色した。細胞を DPBS / 5% FCS により 2 回洗浄し、 2×10^6 細胞 / ml にアッセイ培地において再懸濁した。標的細胞として、ヒト CLDN18 . 2 がレンチウイルスにより形質導入される NugC4 細胞、および、特異性試験のためには CLDN18 . 2 陰性乳ガン細胞株 MDA - MB - 231 を選んだ。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の IVT - mRNA 1 BiMAB または非標的化コントロールをエレクトロポレーションのために使用した。NugC4 のエレクトロポレーションを実施例 16 で記載されるように行った。MDA - MB - 231 のエレクトロポレーションを、下記の条件を使用して行った：400 V、3 ms のパルス長さ、1 回のパルス、400 ms の間隔長さ、0.4 cm の Gene Pulser / MicroPulser キュベット (Bio-Rad、Dreieich、ドイツ) において。実施例 16 で記載されるような細胞傷害性アッセイを、トランスフェクションされた標的細胞と、エフェクター細胞としての CFSE 標識されたヒト T 細胞とを用いて設定した。単独での T 細胞、および、トランスフェクションされていない標的細胞またはコントロールトランスフ

エクシオンされた標的細胞 + T細胞を陰性コントロールとして使用した。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の OKT3 (Bio X Cell、West Lebanon、NH、米国) および 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD28 (BioLegend、Fell、ドイツ) により刺激される単独でのT細胞が陽性コントロールとして役立った。5 ng/ml の濃度での1BiMABタンパク質を、アッセイの妥当性を確認するために、トランスフェクションされていない標的細胞 + T細胞に適用した。非標的化bi-scfvタンパク質6PHU3と一緒にされるサンプルを特異性コントロールとして含めた。すべてのサンプルを96ウエルにおける0.2 mlのアッセイ培地の総体積において三連で設定した。72時間の共インキュベーションの後、T細胞を集め、5 mlの丸底チューブに採取し、洗浄し、ヒトT細胞を腫瘍細胞から区別するために2 μl の抗CD45-APCにより、また、200 μl のDPBSにおいて死細胞を対比染色するために0.25 μl のeFluor506 (BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) により4で30分間染色した。DPBSによる洗浄の後、細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、FACSCanto II (BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) を用いて分析した。

T細胞の増殖が、CLDN18.2陽性標的細胞およびbi-scfv 1BiMABの存在下のみにおける低下するCFSEシグナルによって検出された(図25もまた参照のこと)。陽性コントロールのほかに、42%~48%のT細胞増殖を、1BiMABタンパク質との組合せでCLDN18.2陽性標的細胞の存在下で認めることができた。1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされた標的陽性細胞は、22%+/-3%をもたらした。タンパク質に対する場合よりも低い、IVT-mRNAに対する応答における増殖はおそらくは、NugC4標的細胞により達成可能である低いトランスフェクション効率のためである。CLDN18.2陰性標的細胞MDA-MB-231とインキュベーションされるT細胞は、どのような型においてであれ、同様にまた、陽性コントロールを除いて、標的細胞を伴わないT細胞において著しい増殖を示していない。

【0358】

実施例21：効力のある比率を決定するためのエフェクター対標的比の用量設定

FACS分析に基づくインビトロ細胞傷害性アッセイの状況における好適なE:T比を求めるために、3倍ずつで0.3:1から10:1にまで及ぶE:T比を選んだ。

NugC4標的細胞を調製し、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のIVT-mRNA濃度を用いて実施例16で記載されるようにトランスフェクションした。1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞の1つの調製物をすべての試験サンプルのために使用した。40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のルシフェラーゼIVT-mRNAのトランスフェクションを陰性コントロールとして選択した。

ヒト細胞傷害性T細胞を実施例16で記載されるように、新たに単離されたPBMCから分離し、エフェクター細胞として扱った。1 $\times 10^5$ 個のトランスフェクションされた標的細胞を、6ウエルプレートにおいて二連で、下記のエフェクター対標的比で細胞傷害性T細胞と共インキュベーションした：0.3:1~1:1~3:1~10:1。加えて、ヒト細胞傷害性T細胞を、バックグラウンドでのT細胞活性化を求めるために標的細胞の非存在下で培養した。コントロールのIVT-mRNAまたは1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされる標的細胞はまた、エレクトロポレーションのストレスによるバックグラウンドでの死細胞を明確にするためにエフェクター細胞の非存在下で培養された。ルシフェラーゼ陰性コントロールは10:1の最大E:T比で播種されただけであった。48時間の共インキュベーションの後、細胞を、実施例16で記載されるように集め、標識し、分析した。

図26Aは、NugC4標的細胞による1BiMAB分泌に対する応答における細胞傷害性T細胞の特異的な活性化を示す。サンプルにおけるT細胞の数に関係なく、50%~60%の総活性化が検出された。そのうえ、サンプルにおけるCD25発現およびCD69発現の分布が非常に類似している。このことは、細胞傷害性T細胞の集団には、活性化され得るある特定の割合のT細胞が存在することを示している。

図26Bでは、効率的な標的細胞溶解が細胞傷害性T細胞の数に依存することが明白になる。標的細胞がほんの0.3:1のE:T比で溶解されるとしても、強力な溶解が3:1の比により始まる。

【0359】

実施例22: 1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされたエフェクター細胞を用いるFACS型アッセイにおけるT細胞活性化および標的細胞溶解の分析

この実験では、目的が、同様にヒトエフェクター細胞もIVT-mRNAトランスフェクションの後で1BiMABを産生し、かつ、分泌し得るかを試験することであった。この背後にある理論的根拠が、患者自身のT細胞をbi-scfvによりトランスフェクションし、その後、患者に再移入することができるであろうという仮想上の患者状況であった。

ヒト細胞傷害性T細胞(実施例16で記載されるように単離されたもの)をX-Vivo15培地(LONZA、Basel、スイス)により2回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlの密度に再懸濁した。250 μ lの細胞懸濁物を、事前に冷却された0.4cmのGenePulsar/MicroPulsarキュベット(Bio-Rad、Dreieich、ドイツ)に移し、80 μ g/mlまたは240 μ g/mlのIVT-mRNAを加えた。使用されるIVT-mRNAは、1BiMABと、コントロールとしてのeGFPとであった。注意深く混合した後、細胞を、BTX-ECM-830(Harvard Apparatus、Holliston、MA、米国)エレクトロポレーターを用いて、下記の条件を使用してエレクトロポレーションした: 500V、1回のパルス、3msのパルス長さ、400msの間隔長さ。エレクトロポレーション後直ちに、キュベットを短時間氷上に置き、その後、細胞懸濁物を、10U/mlのIL-2を含有するアッセイ培地(5%の熱不活化ヒトAB血清、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシン、1 \times NEAAおよび1mMのピルビン酸ナトリウムが補充されるRPMI1640培地)(Gibco/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)に移した。トランスフェクションされたエフェクター細胞を、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂において一晩培養した。翌日、トランスフェクション効率をFACSによって分析し、これにより、70%を超えるトランスフェクション効率が、eGFPのIVT-mRNAの両方の濃度について明らかにされた。それぞれのエフェクター細胞サンプルを計数し、 5×10^5 細胞/mlに調節した。NugC4標的細胞をトリプシン処理によって集め、アッセイ培地により洗浄し、計数し、 1×10^5 細胞/mlに調節した。エフェクター細胞および標的細胞を混合し、5:1の最終E:T比および2mlの最終体積を用いて6ウェルに二連で播種した。処理されていないT細胞を、バックグラウンドでの活性化シグナルを求めるために標的細胞を伴うことなく播種した。アッセイ分析を、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂における48時間の共インキュベーションの後、実施例16で記載されるように行った。

1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされ、かつ、標的細胞と共インキュベーションされる細胞傷害性T細胞の著しい活性化が、図27Aに示されるように達成された。1BiMABのIVT-mRNAによりトランスフェクションされたT細胞による標的細胞溶解が、図27Bにプロットされるように60%を超えていた。80 μ g/mlの1BiMAB-IVT-mRNAの影響は、より大きいRNA量により増大させることができなかった。

この実験から結論づけると、エフェクター細胞を理論的には、bi-scfvを産生し、かつ、分泌するレシピエント細胞として使用することができるであろう。

【0360】

実施例23: CLDN18.2陰性標的細胞を使用するルシフェラーゼ型細胞傷害性アッセイにおける1BiMAB-IVT-mRNAの標的特異性の調査

厳密な標的特異性が、望まれない有害影響を患者において回避するための重要な検討事項である。この予備的研究では、CLDN18.2陰性細胞株である奇形ガン細胞株PA-1(ATCC CRL-1572)が、IVT-mRNAとして導入される1BiMAB

B の非特異的な細胞溶解能を調べるために選ばれている。

使用される PA - 1 細胞株はレンチウイルスのルシフェラーゼベクターにより安定的に形質導入されており、したがって、ルシフェラーゼに基づく細胞傷害性アッセイにおいて適用することができた。PA - 1 / luc 標的細胞を、実施例 16 で記載されるようにエレクトロポレーションのために調製した。合計で 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の IVT - mRNA をサンプルあたりトランスフェクションした。使用される IVT - mRNA は、1 BiMAB、no. 25 および 6 RHU3 であった。no. 25 は、発現されない TAA PLAC - 1 を標的とし、6 RHU3 は PA - 1 / luc 細胞において高発現の標的 CLDN6 を標的とする。bi - scFv 変化体に関するさらなる情報については、表 7 および表 8 を参照のこと。no. 25 を、RNA トランスフェクションによって引き起こされる同じストレスレベルをすべての標的細胞サンプルについて保証するために、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の IVT - mRNA によるエレクトロポレーションサンプルにおけるフィルアップ用 IVT - mRNA として使用した。注意深く混合した後、細胞を、BTX ECM 830 エレクトロポレーター (Harvard Apparatus、Holliston、MA、米国) を用いて、0.4 cm のキュベットののための下記の条件を使用してトランスフェクションした：200 V、2 回のパルス、12 ms のパルス長さ、400 ms の間隔長さ。エレクトロポレーション後直ちに、キュベットを短時間氷上に置き、その後、細胞懸濁物を 15 ml のチューブにおける RT の温かい PA - 1 アッセイ培地 (10% の熱不活化 FCS、0.5% のペニシリン - ストレプトマイシン、1 \times NEAA、1.5 g/l の重炭酸ナトリウムおよび 1 mM のピルビン酸ナトリウムが補充される MEM 培地) (Gibco / Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ) に移した。トランスフェクションされた標的細胞を計数し、1 $\times 10^5$ 細胞/ml に調節した。

ヒトエフェクター細胞を実施例 16 で記載されるように単離した。ヒト細胞傷害性 T 細胞を、PBMC から、Pan T Cell Isolation Kit II (ヒト) (Miltenyi Biotec、Teterow、ドイツ) により製造者の指針に従って磁気活性化細胞分離 (MACS) によって単離した。T 細胞を PA - 1 アッセイ培地において 5 $\times 10^5$ 細胞/ml に調節した。

1 $\times 10^4$ 個の標的細胞を 96 ウエルプレートのウエルあたり播種し、ヒト細胞傷害性 T 細胞を 5 : 1 の E : T 比に加えた。ウエルあたりの最終体積が 100 μl であった。エフェクター細胞および標的細胞を含有するコントロールサンプルは、陰性コントロールとしての、no. 25 を分泌する標的細胞、陽性コントロールとしての 6 RHU3 タンパク質または 6 PHU3 タンパク質、および、1 BiMAB タンパク質を含んだ。タンパク質濃度を 100 ng/ml の最終濃度に設定し、no. 25 によりトランスフェクションされた標的細胞と一緒にして、同じ条件を使用された標的細胞について保証した。最小溶解コントロール (L_{min}) には、それぞれのエレクトロポレーションされた標的細胞サンプルが単独で含まれた。自然溶解コントロール (L_{max}) は、L 試験サンプルからの減算のための非処理の標的細胞およびエフェクター細胞 ($L_{\text{max}1}$)、または、 L_{min} からの減算のための単独での処理されていない標的細胞の ($L_{\text{max}2}$) からなった。それぞれのサンプルを三連で播種した。アッセイ分析を、37、5% CO_2 における 72 時間のインキュベーションの後で着手した。自然溶解コントロール (L_{max}) を、2% の最終濃度での Triton X - 100 により処理した。

分析のために、1 mg/ml のルシフェリン (BD Monolight、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) および 50 mM の HEPES を含有する水溶液の 50 μl をウエルあたり加え、続いて、プレートを 37 において暗所で 30 分間インキュベーションした。ルシフェラーゼを発現する生細胞によるルシフェリンの酸化から生じる発光をマイクロプレートリーダー (Infinite M200、Tecan、Mannedorf、スイス) で測定した。特異的な標的細胞溶解の百分率を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{\text{max}1}) / (L_{\text{min}} - L_{\text{max}2})] \times 100$ 。

図 28 は、特異的な標的細胞溶解の割合を示す。陰性コントロール no. 25 または 1

10

20

30

40

50

B i M A BによりトランスフェクションされるC L D N 1 8 . 2 陰性のP A - 1 / l u c 細胞は、著しい溶解を72時間のインキュベーションの後さえ示さない。同様に、100 ng / m l の1 B i M A Bタンパク質は著しい溶解を生じさせておらず、これに対して、T A Aを標的化する6 R H U 3のb i - s c F v分泌による溶解、または、100 ng / m l の6 P H U 3タンパク質による溶解は85% ~ 93%の間であった。24時間および48時間の時点と同様に分析した。これらの時点は、同等な結果を示す(データは示されず)。

【0361】

実施例24：哺乳動物細胞のI V T - R N Aトランスフェクションの後における1 B i M A Bタンパク質産生の定性的分析

タンパク質へのR N A翻訳を哺乳動物細胞において詳しく調べるために、細胞株B H K 2 1 (A T C C C R L - 1 3 0 0 1) を発現系として選んだ。2 × 1 0 ⁷ 個 / m l のB H K 2 1細胞を、すべての工程がR Tで行われたという違いを伴って実施例16で記載されるようにエレクトロポレーションによってトランスフェクションした。250 μ l の細胞懸濁物を0.4 cmのGene Pulser / MicroPulserキュベット (B i o - R a d , D r e i e i c h , ドイツ) に移し、40 μ g / m l の1 B i M A B I V T - m R N A またはI V T - レプリコンR N Aを加えた。エレクトロポレーション条件は下記の通りであった：300 V、16 msのパルス長さ、1回のパルス、400 msの間隔長さ。

エレクトロポレーションされた細胞をR Tでの培養培地 (R P M I 1 6 4 0 , 1 0 % の F C S) に再懸濁し、15 cmの培養ディッシュに移した。播種後5時間で、F C Sを含有する培地をF C S非含有培地によって取り換えた。実施例24aおよび実施例24bの場合には、細胞培養上清および細胞をエレクトロポレーション後18時間で別々に集めた。細胞ペレットを1 × L D S サンプル緩衝液 (カタログ番号N P 0 0 0 8 ; L i f e t e c h n o l o g i e s , D a r m s t a d t , ドイツ) において溶解し、72 で15分間加熱した。E L I S A分析のために、濃縮されていない上清およびおよそ50倍濃縮された上清を使用した。濃縮を、A m i c o n ウルトラ - 15遠心ろ過ユニット (M e r c k M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A , 米国) を用いて製造者のプロトコルに従って行った。実施例24c (I V T - m R N Aのみ) の場合には、上清をトランスフェクション後48時間で集め、上記で記載されるように40倍濃縮に供した。

【0362】

a. 上清を使用するE L I S A

E L I S A分析のために、ニッケル被覆プレート (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , B o n n , ドイツ) を、分析物をそのH i s タグにより捕捉するために使用した。最初に、プレートをウエルあたり200 μ l の洗浄緩衝液 (1 × P B S における0.01%のT w e e n - 2 0) により3回洗浄した。標準物として、精製された1 B i M A Bタンパク質を1 × P B S における1.75%のN a カゼイン (= 希釈液) に希釈した。希釈列は2倍ずつで2.34 ng / m l から37.50 ng / m l にまで及んだ。標準希釈物あたり100 μ l をそれぞれの濃度の三連でウエルに移した。したがって、100 μ l のサンプルが三連で移された。プレートを接着性フィルムにより密封し、37 で30分間インキュベーションした。その後、プレートをウエルあたり200 μ l の洗浄緩衝液により3回洗浄した。1 B i M A Bの検出のために、m C L D N 1 8 . 2 a b の V H - V L に特異的に結合し、したがって、1 B i M A Bにまた特異的に結合する抗イデオタイプモノクローナルI g G 8 B 1 F 3を使用した。8 B 1 F 3を1 μ g / m l の最終濃度に希釈液に混合した。100 μ l の抗イデオタイプ抗体溶液をそれぞれのウエルに移し、その後には、37 での30分のインキュベーション時間が続いた。続いて、プレートをウエルあたり200 μ l の洗浄緩衝液により3回洗浄し、100 μ l のA P コンジュゲート化抗マウス検出抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , W e s t G r o v e , P A , 米国) (希釈液で1 : 5 0 0希釈されたもの) をそれぞれのウエルに加え、その後、37 で30分のインキュベ

ションを行った。最後の洗浄工程（200 μ lの洗浄緩衝液、3回）の後、適切な基質緩衝液（1 Mのジエタノールアミン、0.5 mMのMgCl₂、0.01%のアジ化Na、pH9.8）における1.5 mg/mlの基質pNPPをそれぞれのウエルに加え、その後、インキュベーションを暗所においてRTで30分間行った。100 μ lの3 M KOHをそれぞれのウエルのために使用して、酵素反応を停止させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー（Infinite M200、Tecan、Mannedorf、スイス）を用いて測定した。二重波長分析のために、405 nmを測定波長として設定し、492 nmを参照波長として設定した。吸光度値を、参照波長を測定波長から引くことによって計算した。

図29Aにおいて、標準偏差を含む405 nmにおける平均吸光度値がプロットされる。1 BiMAB IVT-mRNAおよびIVT-レプリコンによりトランスフェクションされた細胞から得られる濃縮された上清は、bi-scfvをコードするIVT-RNAの翻訳を証明する著しいシグナルを引き起こした。模擬トランスフェクションされた細胞から得られる濃縮された上清はシグナルを何ら生じさせなかった。実際のタンパク質濃度は、IVT-mRNA構築物およびIVT-レプリコン構築物の異なる毒性ならびにわずかに異なるx倍濃縮物のために提案することができない。濃縮されていない上清における近似的タンパク質濃度の推定は、IVT-レプリコンサンプルについては1.5 ng/mlの範囲であり、IVT-mRNAサンプルについては2.4 ng/mlの範囲であった。

【0363】

b. 上清および細胞溶解物（IVT-mRNAサンプルおよびIVT-レプリコンサンプル）のウエスタンブロット分析

ウエスタンブロットによる分析のために、濃縮上清および細胞溶解物を、NuPAGE Novex 4-12% Bis-Trisゲル（Invitrogen/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ）で分離した。1 BiMABのIVT-mRNA、IVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされたBHK21細胞または非処理細胞の上清および細胞溶解物、ならびに、陽性コントロール（0.1 μ gの精製された1 BiMABタンパク質）を負荷した。ウエスタンブロット分析を標準的な手順（Current Protocols in Protein Science、2012）によって行った。簡単に記載すると、タンパク質をPVDFメンブロンにブロットし、ブロッキング処理をPBST/3%粉乳により行った後、メンブロンを、ブロッキング緩衝液において1:500で希釈される一次抗体Anti-HIS Epitope-Tag（Dianova GmbH、Hamburg、ドイツ）と4で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による繰り返された洗浄の後、メンブロンを、ブロッキング緩衝液において1:10000で希釈されるFc特異的な二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG抗体（Sigma Aldrich、ドイツ）と4で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による繰り返された洗浄の後、シグナルを、SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate（Pierce/Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国）によって可視化し、ImageQuant LAS 4000 Imager（GE Healthcare Life Sciences、Munich、ドイツ）によって記録した。1 BiMABのシグナルが、内部分子量標準と比較した場合、50 kDと60 kDとの間に検出された。

図29Bに示されるように、弱いシグナルが、IVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞（レーン2）およびIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされた細胞（レーン3）において検出されたが、これに対して、上清が非処理細胞由来するレーン4はシグナルを伴っていない。強いシグナルを、IVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞（レーン5）およびIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされた細胞（レーン6）の細胞溶解物により生じさせることができた

10

20

30

40

50

。非処理細胞に由来する細胞溶解物（レーン7）は再度ではあるが、シグナルを全くもたらさなかった。すべてのシグナルが、精製された1BiMABタンパク質コントロール（レーン8）と同じくらいの大きさで現れた。上清における弱いシグナル、および、それとともに、弱い1BiMAB分泌はおそらくは、トランスフェクション後のインキュベーション時間が比較的に短いためである。レプリコンRNAの毒性影響のために、より長いインキュベーション時間は調べることができなかった。

両方の分析は定性的であり、タンパク質濃度の決定のためには役立たない。

【0364】

c. 上清（IVT-mRNAサンプル）のウエスタンブロット分析

トランスフェクション後48時間で採取された上清をSDS-PAGEによって分離し、その後、ウエスタンブロット分析を実施例24bに記載されるように行った。図29Cに示されるように、IVT-mRNAから翻訳され、上清に分泌されたno.25および1BiMABがそれらのHisタグにより検出された。それに加えて、1BiMABの産生および分泌、同様にまた、bi-scfv特異性コントロールとして使用されているno.25の産生および分泌を証明することができた。

10

【0365】

実施例25：筋肉内RNA注入の後におけるインビボ翻訳された機能的な1BiMABタンパク質の検出

8週齢～16週齢でのメスおよびオスのNSGマウスを選択し、5匹のマウスからなる4つの群に分けた。40μlのRNA溶液をマウスおよび大腿筋につき注入した。40μlのRNA溶液は、1×PBS、5μgのD2キャップ化1BiMAB IVT-mRNAまたはIVT-レプリコン、2μgのD1キャップ化ルシフェラーゼIVT-mRNA、および、0μgまたは15μgのD1キャップ化EBK IVT-mRNAからなった。ワクシニアウイルスタンパク質（E3L、B18RおよびK3L）（EBK）をコードするEBK IVT-mRNAを共注入して、IFN応答を阻害し、かつ、PKR活性化をRNA翻訳増強のために打ち消した（特許出願PCT/EP2012/04673）。ルシフェラーゼシグナルを、Xenogen IVIS 2000を用いて注入後24時間でモニターして、シグナルを有しないマウスをサンプル集団から除いた。

20

血液を、注入の2日後、4日後および7日後に採取した。血清を集め、続いて-80で凍結した。強い発光シグナルを有するマウスの筋肉をRNA注入の4日後に解剖し、IHCのために組織固定し、または、ウエスタンブロット分析のために急速凍結した。

30

【0366】

細胞傷害性アッセイ

NSGマウスの血清をインビトロ細胞傷害性アッセイで分析した。ホタルルシフェラーゼおよびより良好な標的発現のためのヒトCLDN18.2が安定的に形質導入されたNugC4標的細胞を、最大感受性のための30対1のE:T比でのヒトT細胞（実施例16に記載されるように単離されたもの）とともに播種した。アッセイ培地は、10%の熱不活化FCS、0.5%のペニシリン-ストレプトマイシン、1×NEAAおよび1mMのピルビン酸ナトリウムが補充されるRPMI1640培地（Gibco/Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ）からなった。20μlの解凍された試験血清を試験サンプルウエルあたり加えた。標準物1BiMABタンパク質コントロールウエル、L_{min}ウエルおよびL_{max}ウエルを、処置されていないNSGマウスの20μlの血清により完成させた。ウエルたりの最終体積が100μlであった。L_{min}を二連で播種し、L_{max}を六連で播種し、試験サンプルを三連で播種した。37°Cおよび5%CO₂における48時間のインキュベーションの後、L_{max}ウエルを10μlの2%Triton X-100溶液と混合し、10分間インキュベーションした。すべての他のウエルには10μlのアッセイ培地を加えた。50μlのルシフェリン溶液（実施例23を参照のこと）を加え、プレートを、暗所における37°Cでの30分のインキュベーション工程の後、Infinite M200マイクロプレートリーダー（TECAN、Mannedorf、スイス）で測定した。特異的な標的細胞溶解の計

40

50

算を実施例 23 で記載されるように行った。

図 30 において、パーセント特異的溶解がプロットされる。著しい細胞傷害性影響がそれぞれの群において検出された。細胞溶解影響が、EBK および 1BiMAB IVT-mRNA が注入され、注入の 2 日後に集められるマウスの血清を含有するウエルにおいて 1.7 倍増大した。著しくより低い影響が、注入の 4 日後または 7 日後に集められるサンプルによって達成された。1BiMAB レプリコンサンプルの場合には、より遅い時点で集められる血清もまた、強い細胞溶解影響を生じさせた。

これらのデータにより、筋肉内注入の後における IVT-mRNA または IVT-レプリコンからの 1BiMAB のインビボ翻訳ならびに血流内への分泌が立証される。

【0367】

実施例 26 : CLDN6 および CD3 を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験
a. bi-scfv 構築物の配列起源、設計およびテンプレートベクターへのクローニング

ヒト T 細胞受容体成分 CD3 およびヒト腫瘍関連抗原 (TAA) に対して特異的である結合ドメインを含有する二重特異性のタンデム型単鎖抗体構築物 (bi-scfv) を調製した。それぞれの構築物のための対応する可変重鎖領域 (VH) および対応する可変軽鎖領域 (VL) を具体的には、5' 末端から 3' 末端に、下記の連続する順で配置した：

【化 4】

pST1-5'hAgKozak-V_H^{αCLDN6}-V_L^{αCLDN6}-V_H^{αCD3}-V_L^{αCD3}-His-2hBgUTR-A120 (6RHU5)

pST1-5'hAgKozak-V_H^{αCD3}-V_L^{αCD3}-V_H^{αCLDN6}-V_L^{αCLDN6}-His-2hBgUTR-A120 (6RHU3)

【0368】

表 9 には、本発明の過程で作製された、TAA CLDN6 に対して特異的であるすべての bi-scfv 構築物がまとめられる。CLDN18.2 特異的 bi-scfv 構築物 1BiMAB をコントロール抗体として使用した。これらの bi-scfv 構築物を、対応する抗体の VH 配列および VL 配列を使用して Gene Art AG (Gene Art / Life Technologies GmbH, Regensburg, ドイツ) による遺伝子合成によって作製した。コドン最適化、例えば、ヒト (Homo sapiens) (HS) またはハツカネズミ (Mus musculus) (MM) を Gene Art 社の Gene Optimizer (登録商標) ソフトウェアによって実行した。これらが表 9 に示される。特異性、モノクローナル抗体 (mAb) からの配列起源、コドン使用頻度、さらなる配列特徴、および、すべての適用されたドメインの参考文献に関する情報が表 10 にまとめられる。それぞれの CD3 抗体の可変ドメイン配列起源が表 10 に示される。ヒト TAA およびマウス TAA の大きい相同性のために、同じ抗 TAA VH 配列および VL 配列を、マウス特異的な抗 CD3 抗体クローン 145-2C11 の VH 配列、VL 配列との組合せでの場合を除いて、マウスアッセイのための bi-scfv 構築物の作製のために使用することができた。

DNA クローニングおよび発現ベクター構築を、当業者によって広く知られている標準的な手順 (Green / Sambrook, Molecular Cloning, 2012) に従って行った。簡単に記載すると、最初の bi-scfv DNA 配列には、5' 側での BsmBI 制限部位および 3' 側での XhoI 制限部位が pST1 プラスミドへのクローニングのために与えられた。分泌シグナル配列を bi-scfv の分泌のために 5' 末端において bi-scfv 配列の上流側に導入した。15 個 ~ 18 個のアミノ酸の柔軟なグリシン-セリンペプチドリンカーをコードする配列を、一方が CD3 に結合し、かつ、他方が TAA に結合する単鎖可変抗体フラグメント (scfv) を組み立てるための VH ドメインおよび VL ドメインをつなぎ合わせるために挿入した。二重特異性単鎖抗体を形成するために、これら 2 つの scfv ドメイン配列を、短いペプチドリンカー (GGGS) をコードする配列によってつないだ。このリンカー配列と一緒に、BamHI 制限部位を、今後予定されている bi-scfv 構築物のクローニングのための scfv ド

10

20

30

40

50

メイン交換のために導入した。簡単に記載すると、5'側のscFvドメインをBsmBIおよびBamHIの制限によって交換することができ、3'側のscFvドメインをBamHIおよびXhoIの制限によって交換することができた。C末端の6xHisタグが、翻訳されたタンパク質の検出分析のために役立った。6RHU3レプリコンベクターの作製のために、分泌シグナルおよび6xHisタグを含む完全な6RHU3配列を、K. Lundstromによって譲渡されたセムリキ森林ウイルスレプリコンベクター(pSFV)のサブゲノムプロモーターの3'側にサブクローン化した(Lundstrom, K. 他(2001)、Histochem. Cell Biol., 115(1)、83頁~91頁; Ehrengruher, M. U. 他(1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96(12)、7041頁~7046頁)。

10

すべての構築物をMWGの単回読み取り配列サービス(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, ドイツ)による配列決定によって確認し、正しい配列および100個を超えるアデニンのポリ(A)テールを有する構築物のみをインビトロRNA転写のために使用した。

構築物の概要については、図31Aもまた参照のこと。

【0369】

【表9】

表9: TAAおよびCD3に特異的な二重特異性単鎖抗体mRNAテンプレート構築物の要約

社内名称	TAA	特異性	5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	コドン使用頻度
1BiMAB	CLDN18.2	ヒト	mCLDN18.2ab	TR66	HS
6RHU5	CLDN6	ヒト	mCLDN6ab	TR66	HS
6RHU3	CLDN6	ヒト	TR66	mCLDN6ab	HS
6RMU5	CLDN6	マウス	mCLDN6ab	145-2C11	MM
6RMU3	CLDN6	マウス	145-2C11	mCLDN6ab	MM

20

Bi-scFvは二重特異性単鎖可変フラグメントを示す; HSはヒト(Homo sapiens)を示す; MMはハツカネズミ(Mus musculus)を示す; TAAは腫瘍関連抗原を示す; V_Hは可変重鎖ドメインを示す; V_Lは可変軽鎖ドメインを示す。

30

【0370】

【表 10】

表10:bi-scFv mRNAテンプレート構築物情報の要約

社内名称	CD3結合性成分			TAA結合性成分			5'-V _H -V _L	3'-V _H -V _L	短リンカー
	mAB 起源	種反応性	TAA	mAB 起源	種反応性	TAA			
1BiMAB	TR66	ヒト	CLDN18.2	mCLDN18.2ab	ヒト、マウス	mCLDN18.2ab	TR66	GGGGS	
6RHU5	TR66	ヒト	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	mCLDN6ab	TR66	SGGGGS	
6RHU3	TR66	ヒト	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	TR66	mCLDN6ab	SGGGGS	
6RMU5	145-2C11	マウス	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	mCLDN6ab	145-2C11	SGGGGS	
6RMU3	145-2C11	マウス	CLDN6	mCLDN6ab	ヒト、マウス	145-2C11	mCLDN6ab	SGGGGS	

10

社内名称	5'-長リンカー	3'-長リンカー	分泌シグナル	コドン使用頻度	抗-CD3 mAB 参考文献
1BiMAB	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RHU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RHU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MGWSCILFL VATATGVHS	HS	Lanzavecchia & Scheidegger, Eur J Immunol 1987
6RMU5	(GGGGS) ₃	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	MGWSCILFL VATATGVHS	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987
6RMU3	VE(GGSGGS) ₂ GGVD	(GGGGS) ₃	MNSGLQLVF FVLTCLKGIQQ	MM	Leo <i>et al.</i> , Proc Natl Acad Sci, 1987

20

HS、ヒト(Homo sapiens); mAB、モノクローナル抗体; MM、ハツカネズミ(Mus musculus); TAA、腫瘍関連抗原。

【0371】

b. I V T - R N A 合成

抗CLDN6特異的bi-scFvのIVTテンプレートを作製するために、プラスミドを、クラスIIsのエンドヌクレアーゼを使用してポリ(A)テールの下流側で線状化した。線状化されたテンプレートDNAを、どこか他のところで記載されるようにフェノール/クロロホルム抽出および酢酸ナトリウム沈澱によって精製した(Holtkamp, S. 他(2006)、Blood、108(13)、4009頁~4017頁)。

30

線状化されたDNAテンプレートを、MEGAscript Kits(Ambion/Life Technologies、Darmstadt、ドイツ)を製造者の指針に従って使用するインビトロ転写に供した: pST1テンプレートを、MEGAscript T7 Kitを用いて転写し、pSFVテンプレートをMEGAscript SP6 Kitを用いて転写した。キャップアナログとの反応のために、GTP濃度を1.5mMに下げ、6mMのARCA、beta-S-ARCA(D1)またはbeta-S-ARCA(D2)(これらは、どこか他のところで記載されるように合成された)(Grudzien, E. 他(2004)、RNA、10(9)、1479頁~1487頁; Kowalska, J. 他(2008)、RNA、14(6)、1119頁~1131頁; Stepinski, J. 他(2001)、RNA、7(10)、1486頁~1495頁)を反応液に加えた。IVT-RNAの精製を、MEGAclear Kit(Ambion/Life Technologies、Darmstadt、ドイツ)を用いてマニュアルに従って行った。IVT-RNAの濃度および品質を、分光光度法、および、2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies、Santa Clara、CA、米国)での分析によって評価した。

40

【0372】

実施例27: CLDN6特異的bi-scFvの1BiMABを分泌する標的細胞に標

50

的変更させられるT細胞の顕微鏡法分析

アッセイ設定は原理的には、実施例2 . aで記載される通りに行った。

標的細胞株として、高レベルのヒトCLDN6を内因的に発現する卵巣奇形ガン細胞株PA-1(ATCC CRL-1572)のサブクローン物を使用した。ヒト細胞傷害性T細胞を、新たに単離されたPBMCから、Pan T Cell Isolation Kit II(ヒト)(Miltenyi Biotec、Teterow、ドイツ)により製造者の指針に従ってMACSによって単離した。

PA-1標的細胞(これは、どのアッセイの前においてもFACS分析によってTAA発現について日常的に試験される)を、氷冷されたX-Vivo15培地(LONZA、Basel、スイス)により2回洗浄し、 2×10^7 細胞/mlの密度に再懸濁した。250 μ lの細胞懸濁物を、事前に冷却された0.4cmのGene Pulser/MicroPulserキュベット(Bio-Rad、Dreieich、ドイツ)に移し、20 μ g/mlのIVT-mRNAを加えた。BTX ECM 830エレクトロポレーター(Harvard Apparatus、Holliston、MA、米国)を使用する条件は、200V、12msのパルス長さ、2回のパルス、400msの間隔長さであった。使用されるIVT-mRNAは、6RHU5、6RHU3、no.25であった(詳細については表9および表10を参照のこと)。トランスフェクションされた標的細胞を計数し、 1×10^5 細胞/mlに調節した。 1×10^5 個の標的細胞を6ウエルプレートのウエルあたり播種し、ヒト細胞傷害性T細胞を5:1のE:T比に従って加えた。ウエルあたりの最終体積が2mlであった。コントロールサンプルは、単独でのトランスフェクション後の標的細胞を、エレクトロポレーション後の健全性を証明するために含み、また、コントロールbi-scfvによりトランスフェクションされた標的細胞を、エフェクター細胞を伴って含んだ。陽性コントロールとして、対応するCLDN6特異的bi-scfvタンパク質の6PHU5および6PHU3を50 μ g/mlの濃度で実行した。したがって、ヒトT細胞を伴う処理されていないPA-1細胞が使用された。組織培養プレートを続いて、37、5%CO₂においてインキュベーションした。6RHU5または6RHU3によりトランスフェクションされた標的細胞を含有するサンプルにおける標的細胞上でのT細胞クラスター化、免疫学的シナプスの形成および標的細胞の殺傷に關しての著しい影響が24時間後に認められ、これらの影響を、Nikon Eclipse TS100倒立顕微鏡(Nikon、日本)を用いて記録した。図32に示されるように、T細胞クラスター化または標的細胞溶解が、no.25によりトランスフェクションされた標的細胞を有するコントロールサンプルでは何ら認められず、このことは、T細胞の活性化を誘導するためのTAA発現に対する厳密な依存性を暗示していた。bi-scfvを伴わない模擬コントロールも同様に、T細胞のクラスター化を何ら示していない。代わりに、タンパク質コントロールでは、強いT細胞クラスター化および標的細胞溶解がもたらされた。

【0373】

実施例28:CLDN6を標的化するbi-scfv候補物の6RHU5および6RHU3によって誘導されるT細胞活性化

T細胞活性化を検出するために、また、これら2つのCLDN6特異的bi-scfv変化体の効率における違いを明確にするために、FACSに基づくT細胞活性化アッセイを行った。初期活性化マーカーCD69および後期活性化マーカーCD25を蛍光コンジュゲート化抗体による染色のために選択した。標的細胞およびT細胞の混合物におけるヒトT細胞の検出のために、すべてのT細胞によって発現されるCD3を染色した。

標的細胞およびエフェクター細胞を上記(実施例27)で記載されるように調製した。簡単に記載すると、CLDN6を内因的に発現するPA-1標的細胞を、20 μ g/mlの下記のIVT-mRNAを用いたエレクトロポレーションによってトランスフェクションした:6RHU5、6RHU3およびno.25。no.25(これは、発現されないTAAを標的化する)が特異性コントロールとして役立ち、処理されていない標的細胞が模擬コントロールとして役立った。陽性コントロールとして、50ng/mlの6PHU

5タンパク質を使用した。さらに、T細胞を、標的細胞を伴うことなく、6PHU5タンパク質を伴って、または、バックグラウンドの活性化の参照として、6PHU5タンパク質を伴うことなく播種した。それぞれのサンプルを6ウエルプレートに二連で播種し、37、5%CO₂においてインキュベーションした。24時間後および48時間後、T細胞をかき取りによって集め、5mlの丸底チューブ(BD Falcon、Heidelberg、ドイツ)に移した。細胞を遠心分離し、DPBSにより洗浄した。細胞染色のために、マウス抗ヒトCD3-FITC、マウス抗ヒトCD69-APCおよびマウス抗ヒトCD25-PE(すべての抗体が、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を使用した。細胞ペレットを、蛍光コンジュゲート化抗体を含有する50μlのFACS緩衝液(5%のFBSが補充されるDPBS)および2μlの7-AAD(BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)において再懸濁した。インキュベーションを暗所において4で20分間行った後、サンプルを4mlのDPBSにより洗浄し、細胞ペレットを200μlのFACS緩衝液に再懸濁した。サンプルを、FACS Canto IIフローサイトメーター(ともに、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)を用いた測定の期間中を通して氷上および暗所において保った。分析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、San Carlos、CA、米国)によって評価した。

図33Aおよび図33Bに示されるように、両方の変化体がT細胞活性化をもたらし、これに対して、陰性コントロールはどれもが、T細胞活性化マーカーのCD69またはCD25の著しい発現を示さなかった。

6RHU3に対する応答における総T細胞活性化が、6RHU5に対する応答の場合よりも、24時間後(A)では1.53倍大きく、48時間後(B)では1.35倍大きかった。これらの発見に基づいて、すべてのさらなる研究を、変化体6RHU3のみを用いて行った。

【0374】

実施例29：6RHU3によりトランスフェクションされた標的細胞との共インキュベーションによる濃度依存的なT細胞活性化

標的依存的なT細胞活性化を誘導するために必要である最小の6RHU3 IVT-mRNA濃度を求めるために、0.2μg/mlから20μg/mlまでのIVT-mRNAの希釈範囲をPA-1標的細胞にトランスフェクションした。すべてのサンプルをRNAエレクトロポレーションによる同じストレスレベルにさらすために、20μg/mlのIVT-mRNAの総濃度をトランスフェクションした。no.25(これは、発現されないTAAを標的化する)をフィルアップ用のIVT-mRNAとして使用した。したがって、0μg/mlの6RHU3は20μg/mlのno.25に対応する。エレクトロポレーションを実施例27に記載されるように行った。ヒトT細胞をエフェクター細胞として使用した。PBMCからの単離を製造者のマニュアルに従って行った(Pan T Cell Isolation Kit II、Miltenyi、Teterow、ドイツ)。エフェクター細胞および標的細胞を5:1の比率で混合した。T細胞を伴う非処理の標的細胞が模擬コントロールとして役立った。さらに、T細胞を、標的細胞を伴うことなく、6PHU5タンパク質を伴って、または、バックグラウンドの活性化の参照として、6PHU5タンパク質を伴うことなく播種した。陽性コントロールとして、処理されていない標的細胞をT細胞および50ng/mlの6PHU5タンパク質と混合した。すべてのサンプルを6ウエルプレートにおいて二連で調製した。

標的細胞およびエフェクター細胞を、37、5%CO₂において48時間にわたって共インキュベーションした。サンプルを、実施例28に記載されるようにフローサイトメトリー分析のために調製した。

図34において、活性化マーカーを発現するCD3陽性T細胞の割合がプロットされる。T細胞活性化がコントロールでは何ら認められなかった。著しいT細胞活性化の検出が、0.7μg/mlの6RHU3 IVT-mRNAの濃度で始まった。2.0μg/mlの6RHU3 IVT-mRNAに対する応答における影響が、50ng/mlの6P

10

20

30

40

50

HU5タンパク質コントロールによって媒介される影響と同程度であった。したがって、トランスフェクションされたIVT-mRNAからのタンパク質の翻訳および分泌は効率的なプロセスであるようである。

【0375】

実施例30：6RHU3についてのEC₅₀の決定

bi-scfvをコードするIVT-mRNA 6RHU3の50%最大有効用量を求めるために、6RHU3の力価測定列をインビトロルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。安定的にルシフェラーゼを発現するPA-1細胞を、実施例27で記載されるようにエレクトロポレーションによって一過性にトランスフェクションした。使用された6RHU3 IVT-mRNA濃度が、6つの希釈段階で0.004 μg/mlから13.3 μg/mlにまで及んだ。総IVT-mRNA濃度は常に13.3 μg/mlに設定し、no.25をフィルアップ用IVT-mRNAとして使用した。最小溶解コントロール(L_{min})として、すべてのトランスフェクションされた標的細胞サンプルを、エフェクター細胞を伴うことなく播種した。この手順によって、それぞれの個々のエレクトロポレーションサンプルのバックグラウンドでの死細胞が差し引かれ、T細胞媒介の溶解影響のみが得られることになる。

トランスフェクションされた標的細胞を、96ウエル形式において三連で、5:1のエフェクター対標的比でのヒトT細胞とともに播種し、37、5%CO₂においてインキュベーションした。自然発光カウント数に対して正規化するための最大溶解(L_{max})を、Triton X-100をルシフェリン添加の直前に、エフェクター細胞および処理されていない標的細胞を含有するコントロールウエルに加えることによって達成した。ルシフェリン溶液(ウエルあたり、1mg/mlのルシフェリン(BD Monolight、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ)および50mMのHEPESを含有する水溶液の50 μl)を加えた後、発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダーを用いて24時間後および48時間後に測定した。特異的な標的細胞溶解を下記の式によって計算した： $\% \text{特異的溶解} = [1 - (\text{発光試験サンプル} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min}} - \text{試験サンプル} - L_{\text{max}})] \times 100$ 。

図35は、6RHU3に対する応答における特異的な標的細胞溶解についての濃度依存的な曲線を示す。GraphPad Prismの式" $\log(\text{agonist})$ vs $\text{response-Variable slope}$ "をEC₅₀値の計算のために使用することにより、EC₅₀(24h) = 548.0 ng/ml、および、EC₅₀(48h) = 194.5 ng/mlが明らかにされた。このアッセイの結果は、他者によってもまた報告されるように(例えば、Lutterbuese, R他(2010)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、107(28)、12605頁~12610頁を参照のこと)、ドナーの免疫状態に従って変化するヒトT細胞の効力に強く依存する。したがって、結果がそれぞれのドナーにより異なる可能性がある。

【0376】

実施例31：6RHU3 IVT-mRNAトランスフェクションに対する応答におけるT細胞増殖

T細胞増殖はT細胞活性化の指標である。bi-scfvをコードするIVT-mRNA 1BiMABに対する応答における特異的なT細胞増殖をCLDN6陽性標的細胞の存在下で示すために、フローサイトメトリー分析を使用した。簡単に記載すると、実施例16で記載されるように単離された 1×10^7 個のヒトT細胞を、DPBSに溶解される1 μMのカルボキシフルオレセインジアセートスクシンイミジルエステル(Cell Trace CFSE、Invitrogen/Life Technologies GmbH、ドイツ)により暗所においてRTで5分間染色した。細胞をDPBS/5%FCSにより2回洗浄し、 2×10^6 細胞/mlにアッセイ培地において再懸濁した。標的細胞として、CLDN6を内因的に発現するPA-1、および、特異的試験のためにはCLDN6陰性乳ガン細胞株MDA-MB-231を選んだ。20 μg/mlのIVT-mRNA 6RHU3または非標的化コントロールをエレクトロポレーションのために使用

した。P A - 1のエレクトロポレーションを実施例27で記載されるように行った。M D A - M B - 231のエレクトロポレーションを、下記の条件を使用して行った：400 V、3 msのパルス長さ、1回のパルス、400 msの間隔長さ、0.4 cmのGene Pulser/MicroPulserキュベット（Bio-Rad、Dreieich、ドイツ）において。実施例27で記載されるような細胞傷害性アッセイを、トランスフェクションされた標的細胞と、エフェクター細胞としてのCFSE標識されたヒトT細胞とを用いて設定した。単独でのT細胞、および、トランスフェクションされていない標的細胞またはコントロールトランスフェクションされた標的細胞+T細胞を陰性コントロールとして使用した。5 μg/mlのOKT3（Bio X Cell、West Lebanon、NH、米国）および2 μg/mlの抗CD28（BioLegend、Fell、ドイツ）により刺激される単独でのT細胞が陽性コントロールとして役立った。5 ng/mlの濃度での6 PHU3タンパク質を、アッセイの妥当性を確認するために、トランスフェクションされていない標的細胞+T細胞に適用した。非標的化bi-scFvタンパク質1 BiMABと一緒にされるサンプルを特異性コントロールとして含めた。すべてのサンプルを96ウエルにおける0.2 mlのアッセイ培地の総体積において三連で設定した。72時間の共インキュベーションの後、T細胞を集め、5 mlの丸底チューブに採取し、洗浄し、ヒトT細胞を腫瘍細胞から区別するために2 μlの抗CD45-APCにより、また、200 μlのDPBSにおいて死細胞を対比染色するために0.25 μlのeFluor506（BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ）により4で30分間染色した。DPBSによる洗浄の後、細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、FACS Canto II（BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ）を用いて分析した。

T細胞の増殖が、CLDN6陽性標的細胞および抗CLDN6特異的bi-scFvの存在下のみにおける低下するCFSEシグナルによって検出された（図36もまた参照のこと）。陽性コントロールのほかに、49%~61%のT細胞増殖を、6 PHU3タンパク質との組合せでCLDN6陽性標的細胞の存在下で認めることができた。6 RHU3のIVT-mRNAによりトランスフェクションされた標的陽性細胞は、62%+/-2%をもたらした。CLDN6陰性標的細胞MDA-MB-231とインキュベーションされるT細胞は、どのような型においてであれ、同様にまた、陽性コントロールを除いて、標的細胞を伴わないT細胞において著しい増殖を示していない。

【0377】

実施例32：6 RHU3のIVT-RNAによる哺乳動物細胞のトランスフェクションの後におけるタンパク質産生の定性的分析

タンパク質へのRNA翻訳を哺乳動物細胞において詳しく調べるために、細胞株BHK21（ATCC CRL-13001）を発現系として選んだ。2 x 10⁷個/mlのBHK21細胞を、すべての工程がRTで行われたという違いを伴って実施例16で記載されるようにエレクトロポレーションによってトランスフェクションした。250 μlの細胞懸濁物を0.4 cmのGene Pulser/MicroPulserキュベット（Bio-Rad、Dreieich、ドイツ）に移し、40 μg/mlのno.25 IVT-mRNA、6 RHU3 IVT-mRNAまたは6 RHU3 IVT-レプリコンRNAを加えた。エレクトロポレーション条件は下記の通りであった：300 V、16 msのパルス長さ、1回のパルス、400 msの間隔長さ。

エレクトロポレーションされた細胞をRTでの培養培地（RPMI 1640、10%のFCS）に再懸濁し、15 cmの培養ディッシュに移した。播種後5時間で、FCSを含有する培地をFCS非含有培地によって取り換えた。実施例32aおよび実施例32bの場合には、エレクトロポレーション後18時間で、細胞培養上清および細胞を別々に集めた。細胞ペレットを1 x LDSサンプル緩衝液（カタログ番号NP0008；Life technologies、Darmstadt、ドイツ）において溶解し、72で15分間加熱した。ELISA分析のために、濃縮されていない上清およびおよそ50倍濃縮された上清を使用した。濃縮を、Amicon ウルトラ-15遠心ろ過ユニット（M

erck Millipore, Billerica, MA, 米国)を用いて製造者のプロトコルに従って行った。実施例32c (IVT-mRNAのみ)の場合には、上清をトランスフェクション後48時間で集め、上記で記載されるように40倍濃縮に供した。

【0378】

a. 上清を使用するELISA

ELISA分析のために、ニッケル被覆プレート(Thermo Fisher Scientific, Bonn, ドイツ)を、分析物をそのHisタグにより捕捉するために使用した。最初に、プレートをウエルあたり200 μ lの洗浄緩衝液(1xPBSにおける0.01%のTween-20)により3回洗浄した。標準物として、精製された6PHU3タンパク質を1xPBSにおける1.75%のNaカゼイン(=希釈液)に希釈した。希釈列は2倍ずつで2.34ng/mlから150ng/mlにまで及んだ。標準希釈物あたり100 μ lをそれぞれの濃度の三連でウエルに移した。したがって、100 μ lのサンプルが三連で移された。プレートを接着性フィルムにより密封し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションした。その後、プレートをウエルあたり200 μ lの洗浄緩衝液により3回洗浄した。6PHU3/6RHU3の検出のために、mCLDN6abのVH-VLに特異的に結合し、したがって、6PHU3/6RHU3にまた特異的に結合する抗イディオタイプのモノクローナルIgG 4F9を使用した。4F9を2.5 μ g/mlの最終濃度に希釈液に混合した。100 μ lの抗イディオタイプ抗体溶液をそれぞれのウエルに移し、その後には、37 $^{\circ}$ Cでの30分のインキュベーション時間が続いた。続いて、プレートをウエルあたり200 μ lの洗浄緩衝液により3回洗浄し、希釈液で1:500希釈されるAPコンジュゲート化抗マウス検出抗体(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, 米国)の100 μ lをそれぞれのウエルに加え、その後、37 $^{\circ}$ Cで30分のインキュベーションを行った。最後の洗浄工程(200 μ lの洗浄緩衝液、3回)の後、適切な基質緩衝液(1Mのジエタノールアミン、0.5mMのMgCl₂、0.01%のアジ化Na、pH 9.8)における1.5mg/mlの基質pNPPをそれぞれのウエルに加え、その後、インキュベーションを暗所においてRTで30分間行った。100 μ lの3M KOHをそれぞれのウエルのために使用して、酵素反応を停止させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー(Infinite M200, Tecan, Mannedorf, スイス)を用いて測定した。二重波長分析のために、405nmを測定波長として選び、492nmを参照波長として選んだ。吸光度値を、参照波長を測定波長から引くことによって計算した。

図37Aにおいて、標準偏差を含む平均吸光度値がプロットされる。6RHU3 IVT-mRNAおよびIVT-レプリコンによりトランスフェクションされた細胞から得られる濃縮された上清は、bi-scfvをコードするIVT-RNAの翻訳を証明する著しいシグナルをもたらした。模擬トランスフェクション細胞およびno.25コントロール(-ctrl)トランスフェクション細胞から得られる濃縮された上清は、予想されるように、シグナルを何ら生じさせなかった。実際のタンパク質濃度は、IVT-mRNA構築物およびIVT-レプリコン構築物の異なる毒性ならびにわずかに異なるx倍濃縮物のために提案することができない。濃縮されていない上清における近似的タンパク質濃度の推定は、IVT-レプリコンについては1.4ng/mlの範囲であり、IVT-mRNAサンプルについては5.9ng/mlの範囲であった。

【0379】

b. 上清および細胞溶解物(IVT-mRNAサンプルおよびIVT-レプリコンサンプル)のウェスタンブロット分析

ウェスタンブロットによる分析のために、濃縮上清および細胞溶解物を、NuPAGE Novex 4-12% Bis-Trisゲル(Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, ドイツ)で分離した。6RHU3のIVT-mRNA、IVT-レプリコンRNA、no.25のIVT-mRNAによりトランスフェクションされたBHK21細胞または非処理細胞の上清および細胞溶解

物、ならびに、陽性コントロール(0.1 µgの精製された6 PHU3タンパク質)を負荷した。ウエスタンブロット分析を標準的な手順(Current Protocols in Protein Science、2012)によって行った。簡単に記載すると、タンパク質をPVDfメンブランにブロットし、ブロッキング処理をPBST/3%粉乳により行った後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において1:500で希釈される一次抗体Anti-HIS Epitope-Tag(Dianova GmbH、Hamburg、ドイツ)と4で1時間インキュベーションした。ブロッキング緩衝液による繰り返された洗浄の後、メンブランを、ブロッキング緩衝液において1:10000で希釈されるFc特異的な二次のペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG抗体(Sigma Aldrich、ドイツ)と4で1時間インキュベーションした。再度、ブロッキング緩衝液による繰り返された洗浄の後、シグナルを、SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate(Pierce/Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国)によって可視化し、ImageQuant LAS 4000 Imager(GE Healthcare Life Sciences、Munich、ドイツ)によって記録した。6 PHU3のシグナルが、内部分子量標準と比較した場合、50 kDと60 kDとの間に検出された。

図37Bに示されるように、シグナルが、no.25のIVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞(レーン1)、6RHU3のIVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞(レーン4)、および、6RHU3のIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされた細胞(レーン5)において検出されたが、これに対して、上清が非処理細胞に由来するレーン6はシグナルを伴っていない。強いシグナルを、6RHU3のIVT-mRNAによりトランスフェクションされた細胞(レーン8)、および、6RHU3のIVT-レプリコンRNAによりトランスフェクションされた細胞(レーン9)の細胞溶解物により生じさせることができた。no.25によりトランスフェクションされた細胞に由来する細胞溶解物は非常に弱いシグナルをもたらした(レーン2)、非処理細胞(レーン10)はシグナルを全く示さなかった。精製された6PHU3タンパク質コントロール(レーン11)を検出することができた。上清における比較的弱いシグナル、および、それとともに、弱い6RHU3分泌はおそらくは、トランスフェクション後のインキュベーション時間が比較的短いためである。レプリコンRNAの毒性影響のために、より長いインキュベーション時間は調べることができなかった。

両方の分析(ELISAおよびウエスタンブロット)は定性的であり、タンパク質濃度の決定として役立たない。

【0380】

c. 上清(IVT-mRNAサンプル)のウエスタンブロット分析

トランスフェクション後48時間で採取された上清をSDS-PAGEによって分離し、その後、ウエスタンブロット分析を実施例32bに記載されるように行った。図37Cに示されるように、IVT-mRNAから翻訳され、上清に分泌されたno.25および6RHU3がそれらのHisタグにより検出された。それに加えて、6RHU3の産生および分泌、同様にまた、bi-scfv特異性コントロールとして使用されているno.25の産生および分泌を証明することができた。

【0381】

実施例33: 筋肉内RNA注入の後におけるインビボ翻訳された機能的なCLDN6特異的bi-scfvタンパク質の検出

8週齢~16週齢でのメスおよびオスのNSGマウスを選択し、5匹のマウスからなる4つの群に分けた。40 µlのRNA溶液をマウスおよび大腿筋につき注入した。40 µlのRNA溶液は、1xPBS、5 µgのD2キャップ化6RHU3 IVT-mRNAまたはIVT-レプリコン、2 µgのD1キャップ化ルシフェラーゼIVT-mRNA、および、0 µgまたは15 µgのD1キャップ化EBK IVT-mRNAからなった。ワクシニアウイルスタンパク質(E3L、B18RおよびK3L)(EBK)をコードす

るEBK I V T - m R N Aを共注入して、I F N応答を阻害し、かつ、P K R活性化をR N A翻訳増強のために打ち消した（特許出願P C T / E P 2 0 1 2 / 0 4 6 7 3）。ルシフェラーゼシグナルを、X e n o g e n I V I S 2 0 0 0を用いて注入後24時間でモニターして、シグナルを有しないマウスをサンプル集団から除いた。

血液を注入の7日後に採取した。血清を集め、続いて-80で凍結した。

【0382】

細胞傷害性アッセイ

N S Gマウスの血清をインビトロ細胞傷害性アッセイで分析した。ホタルルシフェラーゼが安定的に形質導入され、かつ、C L D N 6を内因的に発現するP A - 1標的細胞を、最大感受性のための30対1のE : T比でのヒトT細胞（実施例16で記載されるように単離されたもの）とともに播種した。アッセイ培地は、10%の熱不活化F C S、0.5%のペニシリン - ストレプトマイシン、1 x N E A Aおよび1 m Mのビルビン酸ナトリウムが補充されるR P M I 1 6 4 0培地（G i b c o / L i f e T e c h n o l o g i e s G m b H、D a r m s t a d t、ドイツ）からなった。20 μ lの解凍された試験血清を試験サンプルウエルあたり加えた。6 P H U 3タンパク質の標準物コントロールウエル、L m i n ウエルおよびL m a x ウエルを、処置されていないN S Gマウスの20 μ lの血清により完成させた。ウエルたりの最終体積が100 μ lであった。L m i nを二連で播種し、L m a xを六連で播種し、試験サンプルを三連で播種した。37、5% C O₂における48時間のインキュベーションの後、L m a xウエルを10 μ lの2% T r i t o n X - 1 0 0溶液と混合し、10分間インキュベーションした。すべての他のウエルには10 μ lのアッセイ培地を加えた。50 μ lのルシフェリン溶液（実施例23を参照のこと）を加え、プレートを、暗所における37での30分のインキュベーション工程の後、I n f i n i t e M 2 0 0マイクロプレートリーダー（T E C A N、M a n n e d o r f、スイス）で測定した。特異的な標的細胞溶解の計算を実施例23で記載されるように行った。

図38において、特異的溶解の割合がプロットされる。著しい細胞傷害性影響がそれぞれの群において検出された。C L D N 6特異的b i - s c F vタンパク質の濃度が、6 R H U 3 I V T - m R N Aの場合にはEBK共注入によって著しく増大した。

これらのデータにより、筋肉内注入の後におけるI V T - m R N AまたはI V T - レプリコンからの6 R H U 3のインビボ翻訳ならびに血流内への分泌が立証される。

【0383】

実施例34：C L D N 1 8 . 2またはC L D N 6およびC D 3を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

抗C L D N 1 8 . 2特異的および抗C L D N 6特異的なb i - s c F v抗体フラグメントのさらなる開発のために、元のタンパク質を最適化するための種々の局面を検討した。これらの局面は主として、組換えタンパク質産生のときに形成するかもしれない種々の折り畳み種、ジスルフィド異性体およびオリゴマーに関してのより大きい均質性を有する調製物を得ることに関連した。これらの改変は、b i - s c F vタンパク質の機能的活性に対して不利であってはならない。

【0384】

b i - s c F vタンパク質の抗C D 3結合ドメインにおける余分な（対形成していない）システイン残基の置換

I gドメインの一次配列の中に存在する対形成していないシステイン残基が、生じた抗体フラグメントの適正な折り畳みおよび安定性のために必須である鎖内および/または鎖間のジスルフィド結合の正しい形成を妨害することがあるか否かを詳しく調べるために、いくつかの合成構築物を作製した。そのような対形成していないシステインは、最終的なタンパク質産物の効力、均質性、生産性および安定性を損なう場合があるかもしれない。したがって、避けなければならない。ジスルフィド対形成に参与する"標準的な"一組のシステインに加えて、フリーのシステイン残基が可変ドメインに存在する可能性がある。

例えば、O K T 3抗体に由来するV Hドメインにおいて、C D R - H 3が始まる3残基

前には、H92位における保存されたシステインが存在しており、H22位との構造的なジスルフィド結合を形成する。しかし、この分子では、H100A位(CDR-H3)において、別のシステイン(Cys)が、H100AがH92に代わってH22とのジスルフィド結合を形成することに関与し、それにより、誤って折り畳まれた不溶性の非機能的な生成物を生じさせる誤った折り畳みを可能にし得るかもしれない。これらのシステイン残基のこの起こり得る誤った対形成を克服するために、フリーのシステインの部位特異的置換を行った(Kipriyanov, Protein Engineering, 10:445~453, 1997)。この単一置換によって、OKT3に由来するscFvの生産性および安定性の著しい増大が、全体的な結合活性を維持して達成された。

本研究で使用される抗CD3抗体TR66のVHドメイン(配列番号36)は、そのようなフリーのシステインを、配列番号36に示されるような一次配列のH103位において含有する。抗CD3抗体TR66のVHドメイン(配列番号36)と抗CD3抗体OKT3のVHドメインとの配列比較では、96.6%の配列相同性が示される。

これらの結果に従って、このフリーのシステインを抗CD3抗体TR66のVHドメインのCDR-H3の中においてセリン残基によって置換することを、CD3(配列番号94)を標的化するbi-scFvタンパク質のために、かつ、CLDN18.2またはCLDN6のどちらかのために行った。そのような置換の導入により、bi-scFvタンパク質の1-BiMAB-S(配列番号103)および6-PHU3-S(配列番号101)の設計がもたらされる(表11および表12をそれぞれ参照のこと)。

【0385】

抗CLDN6 bi-scFvタンパク質の余分な(対形成していない)システイン残基の置換

元の抗CLDN6抗体mCLDN6ab(その可変ドメインが、対応するbi-scFvタンパク質の6PHU3(配列番号45)および6PHU5(配列番号43)の組立てのために使用された)は、対形成していないシステイン残基を、対応する一次配列の46位においてVLドメインのCDR-L2の隣接領域の中に含有する。これは、VLの最初のアミノ酸が除かれている配列番号23の中の45位に対応する。種々の置換を、このフリーのシステインを下記の残基によって置換するために行った:

- ・セリン残基、この場合は、抗CD3抗体TR66のVHドメインにおける置換と同様である置換である(配列番号100)。

- ・ロイシン残基、この場合は、他の抗CLDN6抗体のアミノ酸配列との比較による置換である(配列番号97および配列番号98)。

- ・トリプトファン残基、この場合は、生殖系列データベースとのアミノ酸配列比較による置換である(配列番号99)。

【0386】

抗CLDN18.2 bi-scFvタンパク質におけるリンカー長さ、Vドメインの順序および人為的な相互接続ジスルフィド結合の評価

別の一例として、Arndt他(Biochemistry, 37:12918~12926, 1998)は、scFvフラグメントの非共有結合により連結されたオリゴマーの出現についての可能な説明として、いわゆるドメイン交換(domain swapping)を記載する。このモデルのもとでは、タンパク質状態は、VL/VH相互接続接点の常に生じる分子内交換および分子間交換のために、モノマー形態とダイマー/オリゴマー形態との間における可能な熱力学的平衡に供される。これらのオリゴマーは、既に細胞培養上清に存在している可能性があるかもしれない、精製プロセスの期間中に除かれなければならない。しかしながら、これらの分子種はまた、精製されたモノマー種の貯蔵の期間中に形成される可能性があるかもしれない。

タンパク質の好ましいエネルギー状態は、その全体的な設計(一次配列、リンカー長さ、VL/VH配向など)によって強く影響される。

WornおよびPluckthun(JMB, 305:989~1010, 1999)は、より大きい含有量のモノマー種を有する形態を、20残基以上のリンカーを使用する

10

20

30

40

50

ことによって得ることができたと述べた。Desplancq他(Protein Eng.、7:1027~1033、1994)は、可変ドメインの配向もまた、ダイマーおよび高分子形態の形成に対する影響を有する可能性があるかもしれないことを示した。同じ刊行物において、Desplancqは、25個または30個のアミノ酸(aa)のリンカーがそれらの特定の抗体についてモノマー/ダイマーの最良の比率を与えることを示した。VLのC末端とVHのN末端との距離がおよそ39~43であり、VHのC末端とVLのN末端との距離が32~34である(Pluckthun他、From PCR to fermentation(J. McCafferty、H. R. Hoogenboom&D. J. Christwell編)、書名:(IRL Press、203頁~252頁、1996))。類似する分子特性を得るために、VL-VHを配向させるためのリンカーはVH-VLリンカーよりも長くなければならない。Pluckthun他(From PCR to fermentation(J. McCafferty、H. R. Hoogenboom&D. J. Christwell編)、書名:(IRL Press、203頁~252頁、1996))は、VH/VLの配向においては15アミノ酸または20アミノ酸の長さを有するリンカーを使用し、VL/VHの配向においては20アミノ酸または25アミノ酸の長さを有するリンカーを使用することを推奨した。

モノマーの形成を強制させ、かつ、VH/VLドメイン相互作用を安定化させるための別の可能性が、相互接続ジスルフィド結合をこれら2つのドメインの間の接触面の中に操作することである。ジスルフィド架橋をH44-L100の位置(Kabat番号表記)において導入することが、scFvにおいては最も頻繁に使用されており、満足すべき結果が得られている(Brinkmann他、PNAS、90:7538~7542、1993;WornおよびPluckthun、Biochemistry、38:8739~8750、1999;Weatherill他、PEDS、25:321~329、2012)。この戦略が、全長のIgGに融合されるscFvを組み合わせるIgG様二重特異性抗体を安定化させるために首尾良く使用されている(Michaelson他、mAbs、1:128~141、2009;Schanzer他、Antimicrob. Agents Chemother.、55:2369~2378、2011)。

Weatherill他(PEDS、25:321~329、2012)は、ヒトscFvの(VH-(G4S)4-VLおよびVL-(G4S)4-VH)をVH44位とVL-100位との間のジスルフィド結合により安定化させた。そのうえ、この刊行物は、相互接続ジスルフィド結合を全く含有しないscFvとの可能なドメイン交換の問題に、異なる負荷体積および濃度での異なるSE-HPLC実験を行うことによって対処している。これらのアッセイは、安定化されていないscFvのためのサンプル負荷条件に依存して、異なる結果を与え、しかし、使用された条件に関係なく、ジスルフィドにより安定化された分子はモノマーのように溶出した。Zhao他(Int. J. Mol. Sci.、12:1~11、2011)は、同じ変異をscFvにおいて導入し、安定化された分子のより大きい安定性を37での20時間にわたる貯蔵の後で認めた。

全長IgGに融合されるscFvを使用する二重特異性形式のために、Schanzer他(Antimicrob. Agents Chemother.、55:2369~2378、2011)はリンカー長さおよび相互接続ジスルフィド結合の影響を比較した。Schanzer他は、元のscFvまたはscdFv(VH-(G4S)3-VL)を重鎖または軽鎖のC末端部分またはN末端部分のどちらかで融合した。異なるリンカー長さ(20個、25個および30個のアミノ酸)について、Schanzer他は元のscFvを重鎖または軽鎖のどちらかのC末端部分に融合した。異なるリンカー長さに関して得られた結果により、30aaのペプチドが、安定なモノマーを製造するためのより好ましいリンカーとして特定された。40での7日間の貯蔵の後における凝集物のレベルが、scFv₁₅については50%であり、scFv₂₀については18%であり、scFv₂₅については8%であり、scFv₃₀については6%であった。しかし、相互接続ジスルフィド結合により安定化されたジスルフィドscFv₁₅はscFv₃₀よりも

10

20

30

40

50

わずかに優れていた。同じ取り組みが Michaelson 他 (mAbs、1:128~141、2009) によって使用され、Michaelson 他は、15aa のリンカーを有する scFv を VH/VL 配向で含有するそれらの元の IgG 様二重特異性抗体 (これは 40% の凝集物を生じさせた) を、リンカー長さを scFv の 20aa に増大し、かつ、相互接続ジスルフィド結合を VH44 位と VL-100 位との間に導入することによって改善した。生じた分子は、4 で 3 ヶ月の後で安定であった 98% 超のモノマーをもたらした。著者らは、二重特異性形式に進む前に scFv 分子の改善に取り組むことを決定した。

抗 CLDN18.2 特異的 bi-scFv タンパク質の場合、ダイマーおよび高分子形態の形成が生じ得るか、また、抗クローニンおよび/または抗 CD3 の scFv 分子に関しては何が関係するかは知られていない。抗 CLDN18.2 特異的 bi-scFv タンパク質のための最適な全体的分子をそれぞれの別個の scFv について評価するために、下記の改変が評価されている：

- ・ドメイン配向
- ・リンカー長さ
- ・相互接続ジスルフィド結合の導入
- ・これら 3 つの改変の組合せ

【0387】

抗クローニン 18.2 結合ドメインについては、mCLDN18.2ab に由来する可変ドメイン (VH: 配列番号 8; VL: 配列番号 15) に加えて、mCLDN18.2ab1 に由来する配列 (VH: 配列番号 6; VL: 配列番号 11) が抗 CLDN18.2 特異的 bi-scFv タンパク質の構築のために使用されている。

節 A. a³2 個の抗 CLDN18.2 特異的 bi-scFv 構築物の配列起源、設計および発現ベクターへのクローニング"における表 11 はこれらの異なる構築物を記載する。

【0388】

A. CLDN18.2 および CD3 を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

a. 3 2 個の抗 CLDN18.2 特異的 bi-scFv 構築物の配列起源、設計および発現ベクターへのクローニング

本明細書中に示される二重特異性のタンデム型単鎖抗体構築物 bi-scFv は、第 1 の結合ドメインがヒト腫瘍関連抗原 (TAA) に対して特異的であり、これに対して、第 2 の結合ドメインがヒト T 細胞受容体 (CD3) の鎖に対して特異的である 2 つの異なる結合ドメインを含有する。この二重特異性分子のこれら 2 つの結合ドメインのそれぞれが、VH-VL 配向または VL-VH 配向のどちらかでの scFv 成分として配置される 2 つの抗体可変ドメインを含む。これらの抗体可変ドメインは、配向に依存して G4S サブユニットの 4 個または 5 個の反復からなる柔軟なグリシン-セリンペプチドリナーを介してつながれる。したがって、VH-VL 配向で配置される scFv 成分は 20 アミノ酸のリンカー (これは "LL4" と名づけられる) によってつながれ、VL-VH は 25 アミノ酸のリンカー (これは "LL5" と名づけられる) によってつながれる。他方で、これら 2 つの scFv 成分は、6 アミノ酸の長さの SG4S リンカー (これは "SL" と名づけられる) を介してつながれる。モノクローナル抗体 (mAb) からの配列起源に関する情報およびドメイン編成が表 11 にまとめられる。

変化体の 5504、5505、5506、5507、5512、5513、5514、5515、5520、5521、5522、5523、5528、5529、5530、5531、5536、5537、5538、5539、5544、5545、5546、5547、5552、5553、5554、5555、5560、5561、5562 および 5563 は、配列番号 95 による VH 抗 CD3 と、配列番号 96 による VL 抗 CD3 とを含む。

1-BiMAB-S の具体的な場合には、VH 抗 CD3 (配列番号 94) におけるセリンによるフリーのシステインの置換のみが、1-BiMAB 配列のアミノ酸配列 (配列番

10

20

30

40

50

号39)に対する比較において行われる。配列番号39は依然として、1 - BiMAB bi - scFvタンパク質の細胞培養上清中への分泌を哺乳動物での発現のときに媒介するN末端シグナル配列のアミノ酸配列を含有することには留意しなければならない。このシグナル配列は、細網小胞体の内腔においてシグナルペプチダーゼによって切断されるので、分泌された組換えタンパク質の一部ではない。

これらのbi - scFv構築物をコードする遺伝子を、コドン使用頻度をCHO細胞における発現のために最適化するためにGene Optimizer (登録商標)ソフトウェアを使用してGene Art (登録商標)遺伝子合成 (Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)により作製した。一般的な分泌シグナルのほかに、すべてのDNA構築物が、同じKozak配列およびHindIII制限を5'末端に含有する。3'末端において、BsiWIおよびXhoIの制限部位を、異なる発現ベクターへの柔軟なサブクローニングについて可能にするために加えた。優れたpCEP4の発現ベクター (Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ)へのサブクローニングが、HindIIIおよびXhoIの制限部位を使用して、Life Technologiesによって行われた。

【0389】

【表 1 1】

表 11: bi-scFv抗CLDN18.2構築物の要約

変化体識別	抗-CLDN18.2 起源	抗- CD3 起源	TR66の H103位に おける置換	ドメイン順序 (N末端からC末端に)	ドメイン編成*)	配列番号
1 BiMAB-S	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	See 1 BiMAB in Example 1	103
5504	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	66
5505	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	67
5506	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-VH-LL4-VL	68
5507	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VH-LL4-VL	69
5512	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds(VH-LL4-VL)	70
5513	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds(VH-LL4-VL)	71
5514	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds(VH-LL4-VL)	72
5515	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds(VH-LL4-VL)	73
5520	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-LL5-VH	74
5521	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	75
5522	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-VL-LL5-VH	76
5523	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VH-LL4-VL)-SL-VL-LL5-VH	77
5528	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds(VL-LL5-VH)	78
5529	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds(VL-LL5-VH)	79
5530	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VH-LL4-VL-SL-ds(VL-LL5-VH)	80
5531	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VH-LL4-VL-SL-ds(VL-LL5-VH)	81
5536	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH-LL4-VL	82
5537	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VH-LL4-VL	83
5538	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-VH-LL4-VL	84
5539	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VH-LL4-VL	85
5544	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds(VH-LL4-VL)	86
5545	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds(VH-LL4-VL)	87
5546	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds(VH-LL4-VL)	88
5547	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds(VH-LL4-VL)	89
5552	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-LL5-VH	--
5553	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VL-LL5-VH	--
5554	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-VL-LL5-VH	--
5555	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-(VL-LL5-VH)-SL-VL-LL5-VH	--
5560	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds(VL-LL5-VH)	90
5561	mCLDN18.2ab1	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds(VL-LL5-VH)	91
5562	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	VL-LL5-VH-SL-ds(VL-LL5-VH)	92
5563	mCLDN18.2ab	TR66	セリン	scFv-anti-CLDN18.2- scFv anti-CD3	ds-VL-LL5-VH-SL-ds(VL-LL5-VH)	93

*) LL4, (G4S)₄; LL5, (G4S)₅; SL, SG₄S

配列番号66～配列番号93は依然として、1-BiMAB bi-scFvタンパク質の細胞培養上清中への分泌を哺乳動物での発現のときに媒介するN末端シグナル配列のアミノ酸配列を含有することには留意しなければならない。このシグナル配列は、小胞体の内腔においてシグナルペプチダーゼによって切断されるので、分泌された組換えタンパク質の一部ではない。

【0391】

b. 一過性トランスフェクションによる32個の抗CLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質の産生および精製

懸濁に適合化されたCHO細胞を加湿CO₂振とう機において血清非含有培地で継代培養した。トランスフェクションの前日に、細胞を振とうフラスコにおいて血清非含有培地に播種した。トランスフェクションの当日に、細胞を遠心分離し(200×gで5分間)、振とうフラスコにおいて新鮮なDMEM培地(Invitrogen、41965-039)に再懸濁した。DNAおよびトランスフェクション試薬を細胞に加え、振とうによって穏やかに混合した。CO₂インキュベーターにおける静置インキュベーションの後、細胞を血清非含有の生育培地により希釈し、インキュベーション振とう機において発現のためにさらに培養した。細胞には、栄養要求に従って、CHO CD Efficient Feed(商標)C(Invitrogen、A13275)を与えた。bi-scFvタンパク質を、細胞の生存性が低下し始めた後で集めた。抗体構築物を、CaptureLセファロスによって精製した。タンパク質濃度を280nmにおける吸光度によって求めた。

10

20

【0392】

c. 32個の抗CLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質を用いたルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ

32個の抗CLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質の機能的スクリーニングのために、4点の力価測定点(5000ng/ml、1000ng/ml、200ng/mlおよび40ng/ml)を実施例2.cで記載されるようにインビトロルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。

実施例2.cで記載される安定なルシフェラーゼ発現NugC4細胞をヒトT細胞およびbi-scFvタンパク質とともに、または、L_{min}値を求めるために、bi-scFvタンパク質を伴うことなくインキュベーションした。生細胞の発光を、アッセイ設定後の24時間および48時間で、Infinite M200 Tecanプレートリーダーを用いて測定した。特異的な標的細胞溶解を、実施例2.cにおいて例示される式によって計算した。

30

【0393】

細胞傷害性結果(図39a、図39b、図39cおよび図39d)の定性的分析を、scFvの抗CD3 TR66結合ドメインに基づいて行うことによって、下記の所見を引き出すことができた。

ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイにおける最も良く機能する抗CLDN18.2特異的bi-scFvタンパク質は、抗CD3成分を、相互接続ジスルフィド架橋の有無によらず、"LL4"リンカーによってつながれるVH/VLドメイン配向で含有する(5504、5505、5506、5507、5536、5537、5538、5539、5512、5513、5514、5515、5544、5545、5546、5547; 図39aおよび図39b)。より低い細胞傷害性活性が、抗CD3成分を、ペプチドリンカー"LL5"を伴うVL/VHドメイン配向で含有し、かつ、相互接続ジスルフィド架橋を含有する変化体により得られる(5528、5529、5530、5531、5560、5561、5562、5563; 図39d)。最も低い細胞傷害性活性が、抗CD3成分を、相互接続ジスルフィド架橋を伴うことなくペプチドリンカー"LL5"を伴うVL/VHドメイン配向で含有する変化体により得られる(5520、5521、5522、5523、5552、5553、5554、5555; 図39c)。

40

【0394】

50

B. CLDN6およびCD3を標的化する二重特異性結合剤の作製および試験

a. bi-scFv構築物の配列起源、設計および発現ベクターへのクローニング

本明細書中に示される二重特異性のタンデム型単鎖抗体構築物 bi-scFv は、一方がヒト腫瘍関連抗原 (TAA) に対して特異的であり、これに対して、他方がヒト T 細胞受容体 (CD3) の鎖に対して特異的である 2 つの異なった結合ドメインを含有する。この二重特異性分子のこれら 2 つの結合ドメインのそれぞれが、VH-VL 配向または VL-VH 配向のどちらかでの scFv 成分として配置される 2 つの抗体可変ドメインを含む。これらの抗体可変ドメインは、柔軟なグリシン-セリンペプチドリンカーを介してつながれる。TAA を標的化する scFv 成分は VH-VL 配向で配置され、G4S サブユニットの 3 つの同一反復からなる 15 アミノ酸のリンカー (これは "LL3" と名づけられる) によってつながれる。CD3 を標的化する scFv 成分は、同様に VH-VL 配向で配置され、しかし、配列 G₄S (G₂S)₃G₃S を有する 18 アミノ酸のリンカー (これは LLV1 と名づけられる) によってつながれる。他方で、これら 2 つの scFv 成分は、6 アミノ酸の長さの SG4S リンカー (これは "SL" と名づけられる) を介してつながれる。モノクローナル抗体 (mAb) からの配列起源に関する情報およびドメイン編成が表 12 にまとめられる。変化体の 5454、5456、5458、5460、5462 および 5464 は、抗 CD3 結合ドメインのために、配列番号 95 による VH 抗 CD3 と、配列番号 96 による VL 抗 CD3 とを含む。変化体の 5454 および 5458 は配列番号 98 による VL 抗 CLDN6 を含み、変化体の 5456 および 5460 は配列番号 99 による VL 抗 CLDN6 を含み、変化体の 5462 および 5464 は配列番号 100 による VL 抗 CLDN6 を含む。

6PHU3-S (配列番号 101) の具体的な場合には、VH 抗 CD3 (配列番号 94) におけるセリン残基によるフリーのシステインの置換のみが、6PHU3 配列のアミノ酸配列 (配列番号 45) に対する比較において行われる。配列番号 45 は依然として、6PHU-3 bi-scFv タンパク質の細胞培養上清中への分泌を哺乳動物での発現のときに媒介する N 末端シグナル配列のアミノ酸配列を含有することには留意しなければならない。このシグナル配列は、小胞体の内腔においてシグナルペプチダーゼによって切断されるので、分泌された組換えタンパク質の一部ではない。そのうえ、6PHU3-SL (配列番号 102) については、対応する一次配列の 46 位での VL 抗 CLDN6 (配列番号 97) におけるフリーシステインのロイシン残基による置換が、6PHU3-S のアミノ酸配列に対する比較において行われる。これは、VL の最初のアミノ酸が除かれている配列番号 23 の中の 45 位に対応する。

【0395】

これらの bi-scFv 構築物をコードする遺伝子を、コドン使用頻度を CHO 細胞における発現のために最適化するために Gene Optimizer (登録商標) ソフトウェアを使用して Gene Art (登録商標) 遺伝子合成 (Life Technologies GmbH、Darmstadt、ドイツ) により作製した。一般的な分泌シグナルのほかに、すべての DNA 構築物が、同じ Kozak 配列および HindIII 制限を 5' 末端に含有する。3' 末端において、BsiWI および XhoI の制限部位を、異なる発現ベクターへの柔軟なサブクローニングについて可能にするために加えた。優れた pEE12.4 の発現ベクター (Lonza Group Ltd、Basel、スイス) へのサブクローニングを、HindIII および BsiWI の制限部位を使用する標準的な技術を使用して行った。

【0396】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 12: bi-scFv抗CLDN6構築物の要約

変化体識別	抗-CLDN6 起源	mCLDN6ab のL46位に おける置換	抗- CD3 起源	TR66のH103 位における 置換	ドメイン順序 (N末端から C末端に)	ドメイン編成*)	配列番号
5454	mCLDN6ab	Leucine	TR66	セリン	scFvanti-CLDN6- scFvanti-CD3	VH-LL3-VL-SL-VH-LLv1-VL	60
5456	mCLDN6ab	Tryptophan	TR66	セリン	scFvanti-CLDN6- scFvanti-CD3	VHLL3VL-SL-VH-LLv1-VL	61
5462	mCLDN6ab	Serine	TR66	セリン	scFvanti-CLDN6- scFvanti-CD3	VH-LL3-VL-SL-VH-LLv1-VL	62
6PHU3-S	mCLDN6ab	NA	TR66	セリン	scFvanti-CD3- scFvanti-CLDN6	See 6PHU3 in Example 9	101
6PHU3-SL	mCLDN6ab	Leucine	TR66	セリン	scFvanti-CD3- scFvanti-CLDN6	See 6PHU3 in Example 9	102
5458	mCLDN6ab	Leucine	TR66	セリン	scFvanti-CD3- scFvanti-CLDN6	VH-LLv1-VL-SL-VH-LL3-VL	63
5460	mCLDN6ab	Tryptophan	TR66	セリン	scFvanti-CD3- scFvanti-CLDN6	VH-LLv1-VL-SL-VH-LL3-VL	64
5464	mCLDN6ab	Serine	TR66	セリン	scFvanti-CD3- scFvanti-CLDN6	VH-LLv1-VL-SL-VH-LL3-VL	65

10

*) LL3, (G₄S)₃; LLv1, G₄S(G₂S)₃G₃S; SL, SG₄S

【 0 3 9 7】

20

b. 一過性トランスフェクションによる6個の抗CLDN6特異的bi-scFvタンパク質の産生および精製

懸濁に適合化されたCHO細胞を加湿CO₂振とう機において血清非含有培地で継代培養した。トランスフェクションの前日に、細胞を振とうフラスコにおいて血清非含有培地に播種した。トランスフェクションの当日に、細胞を遠心分離し(200×gで5分間)、振とうフラスコにおいて新鮮なDMEM培地(Invitrogen、41965-039)に再懸濁した。DNAおよびトランスフェクション試薬を細胞に加え、振とうによって穏やかに混合した。CO₂インキュベーターにおける静置インキュベーションの後、細胞を血清非含有の生育培地により希釈し、インキュベーション振とう機において発現のためにさらに培養した。細胞には、栄養要求に従って、CHO CD Efficient Feed(商標)C(Invitrogen、A13275)を与えた。bi-scFvタンパク質を、細胞の生存性が低下し始めた後で集めた。抗体構築物を、Captureセファロースを使用するFPLCによって精製した。タンパク質濃度を280nmにおける吸光度によって求めた。

30

【 0 3 9 8】

c. 6個の抗CLDN6特異的bi-scFvタンパク質のEC₅₀の決定

抗CLDN6特異的bi-scFvタンパク質の50%最大有効用量を求めるために、bi-scFvタンパク質の力価測定列を実施例13に記載されるようにインビトロルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。

安定的にルシフェラーゼを発現するPA-1細胞とヒトT細胞とを5:1のE:T比で、(10倍ずつで)2.5pg/mlから5μg/mlまでの範囲におけるbi-scFvタンパク質濃度とともに、または、L_{min}値を求めるために、抗CLDN6特異的bi-scFvタンパク質を伴うことなくインキュベーションした。

40

3回の独立したアッセイを、ヒトT細胞を調製するための異なるヒトドナーに関して行った。結果が図40に例示される。

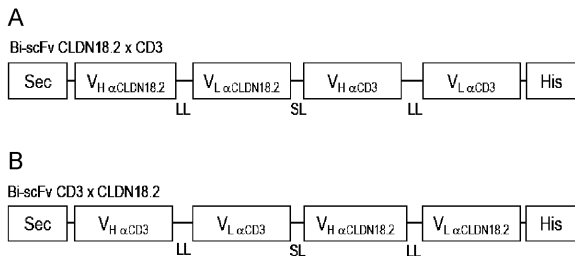
細胞傷害性結果の定量的比較を、セリン、ロイシンまたはトリプトファン of のいずれかによるCDR-L2の隣接領域の中におけるシステイン残基置換に基づいて、また、抗CLDN6結合ドメイン位置および抗CD3結合ドメイン位置に基づいて行うことによって、下記の所見を引き出すことができた。

ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイにおける最も良く機能する抗CLDN6特異的bi

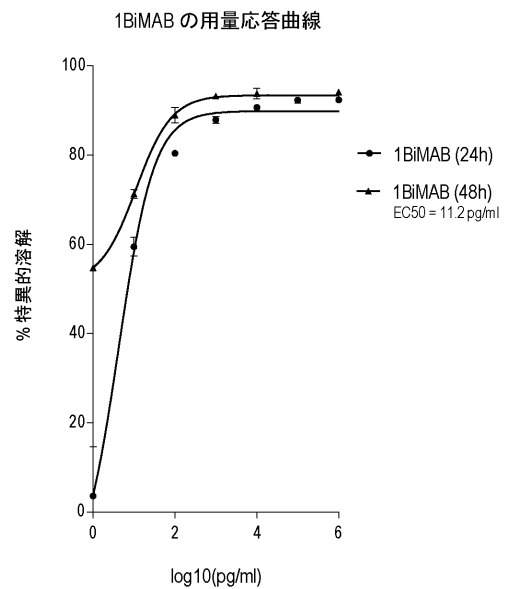
50

- s c F v タンパク質は、システインからトリプトファンへの置換を b i - s c F v タンパク質の N 末端部分における抗 C L D N 6 結合ドメインとともに含有する (変化体 5 4 5 6) 。わずかにより低い細胞傷害性活性が、抗 C L D N 6 を C 末端部分に含有する変化体で、システインのトリプトファンによる置換を有する変化体 (変化体 5 4 6 0) 、または、システインのセリンによる置換を有する変化体 (変化体 5 4 6 4) のどちらに関してでも得られる。システインのロイシンによる置換を含有する変化体で、抗 C L D N 6 を b i - s c F v タンパク質の N 末端部分 (変化体 5 4 5 4) または C 末端部分 (変化体 5 4 5 8) に有する変化体については、より低い細胞傷害性活性が前記変化体との比較で測定される。驚くべきことに、システインのセリンによる置換を含有する変化体で、抗 C L D N 6 を b i - s c F v タンパク質の N 末端部分に有する変化体 (変化体 5 4 6 2) が、最も低い細胞傷害性活性を有する。

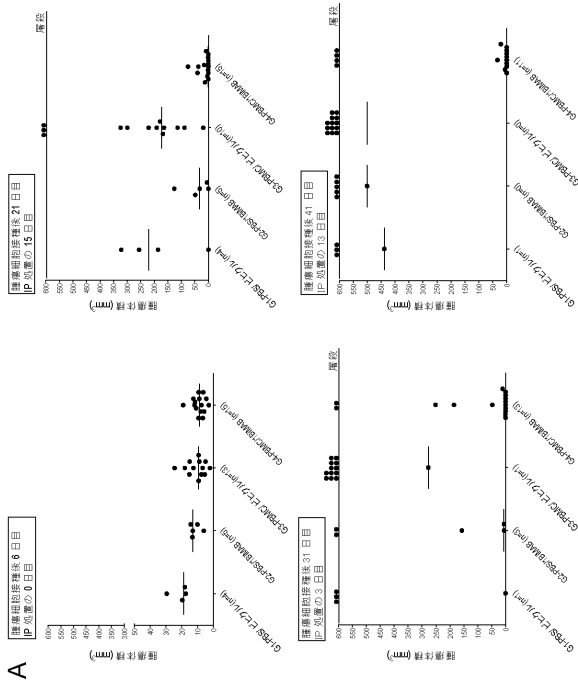
【 図 1 】



【 図 9 】

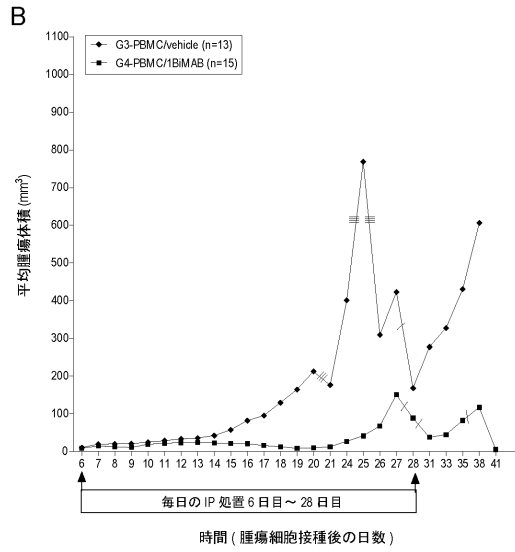


【図10A】



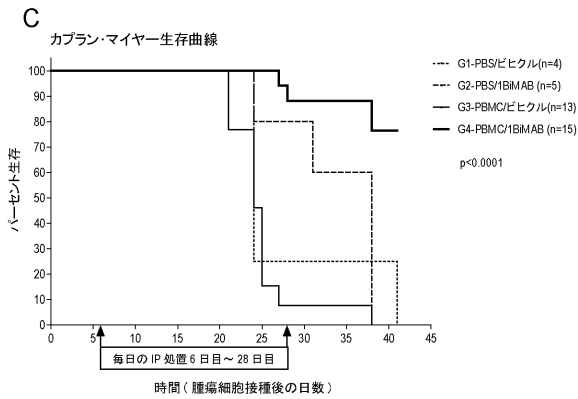
A

【図10B】



時間 (腫瘍細胞接種後の日数)

【図10C】



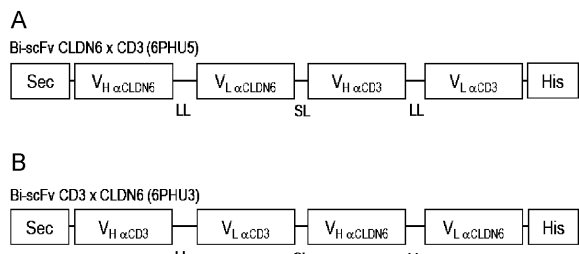
C

カプラン・マイヤー生存曲線

--- G1-PBS/ヒクル(n=4)
 - - - G2-PBS/1B1MAB (n=5)
 — G3-PBMC/ヒクル(n=13)
 — G4-PBMC/1B1MAB (n=15)
 p<0.0001

時間 (腫瘍細胞接種後の日数)

【図11】



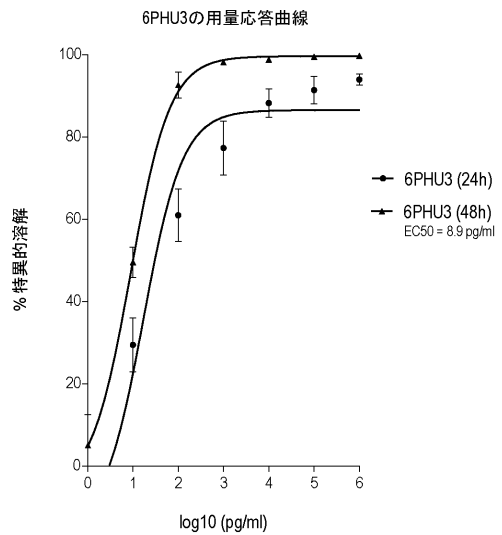
A

Bi-scFv CLDN6 x CD3 (6PHU5)

B

Bi-scFv CD3 x CLDN6 (6PHU3)

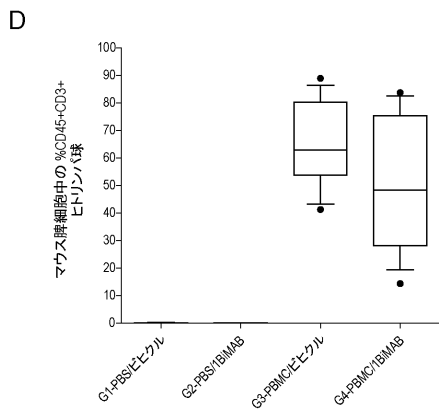
【図17】



6PHU3の用量応答曲線

● 6PHU3 (24h)
 ▲ 6PHU3 (48h)
 EC50 = 8.9 pg/ml

【図10D】

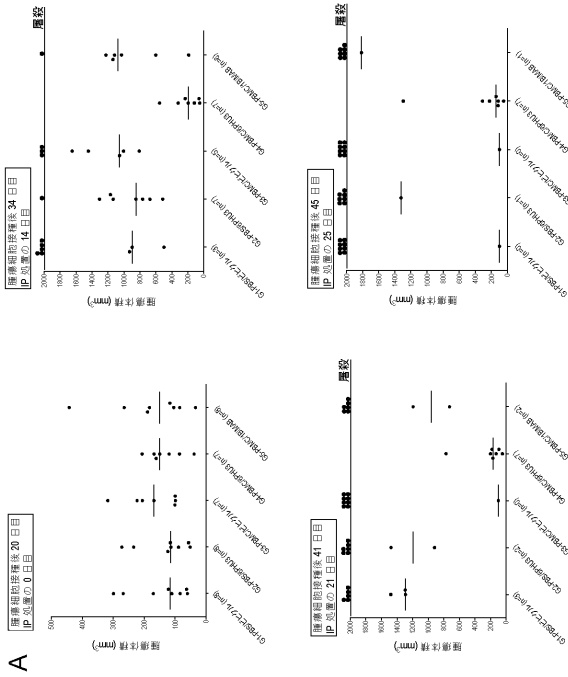


D

マウス脾細胞中の%CD45+CD3+ヒトリンパ球

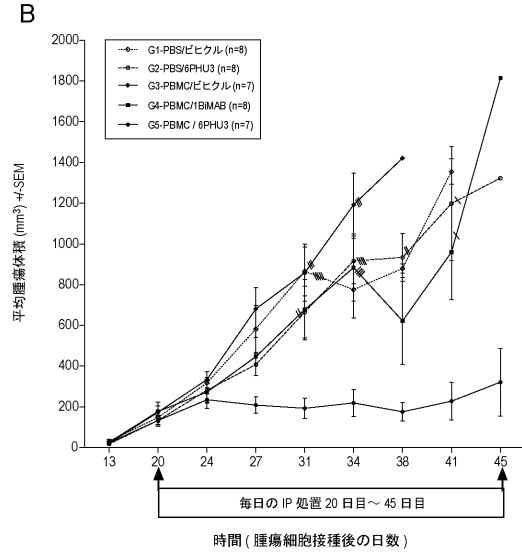
G1-PBS/ヒクル
 G2-PBS/1B1MAB
 G3-PBMC/ヒクル
 G4-PBMC/1B1MAB

【 図 1 8 A 】



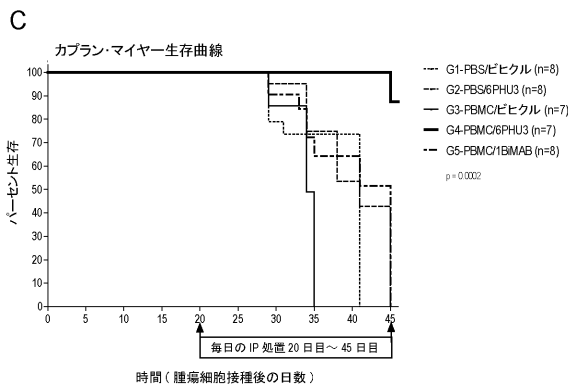
A

【 図 1 8 B 】



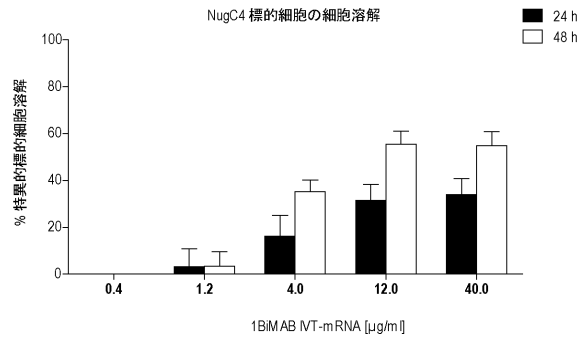
B

【 図 1 8 C 】

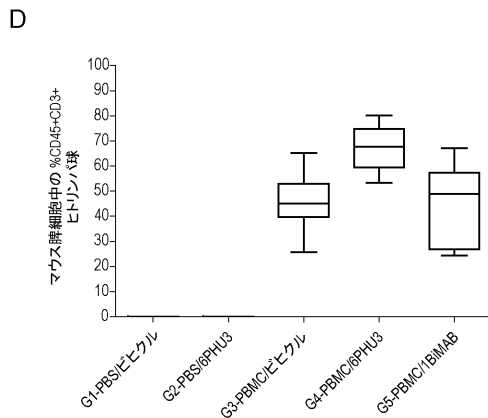


C

【 図 2 4 】

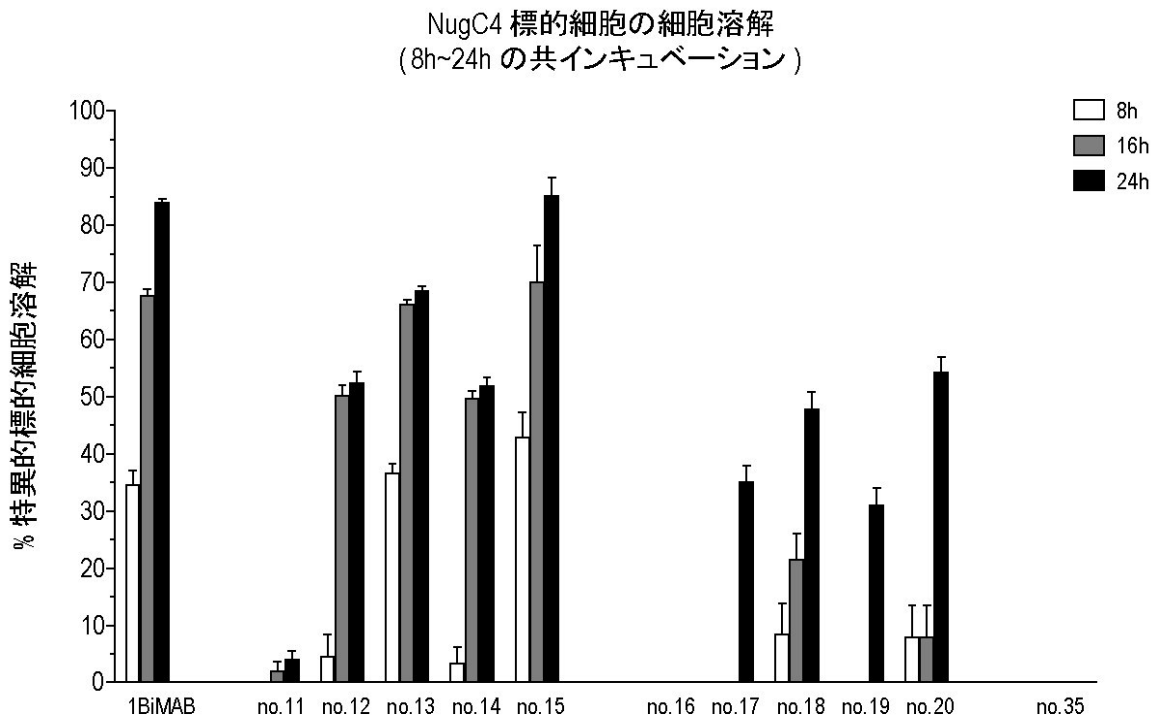


【 図 1 8 D 】

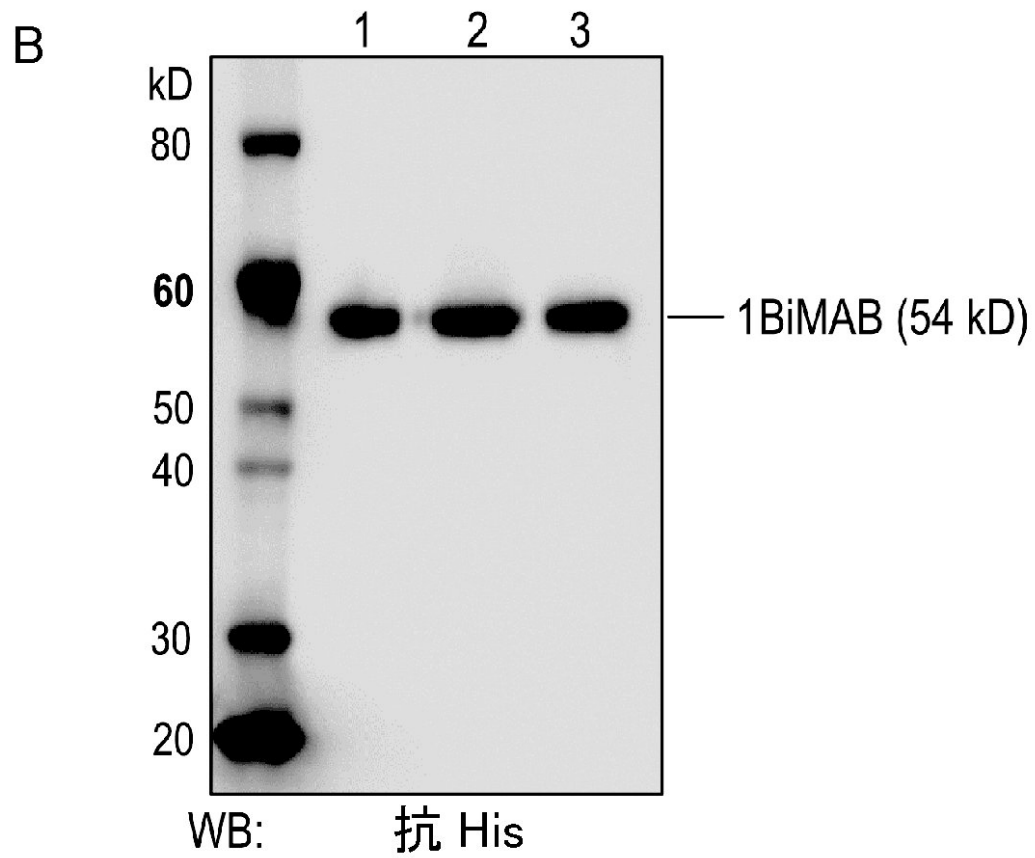
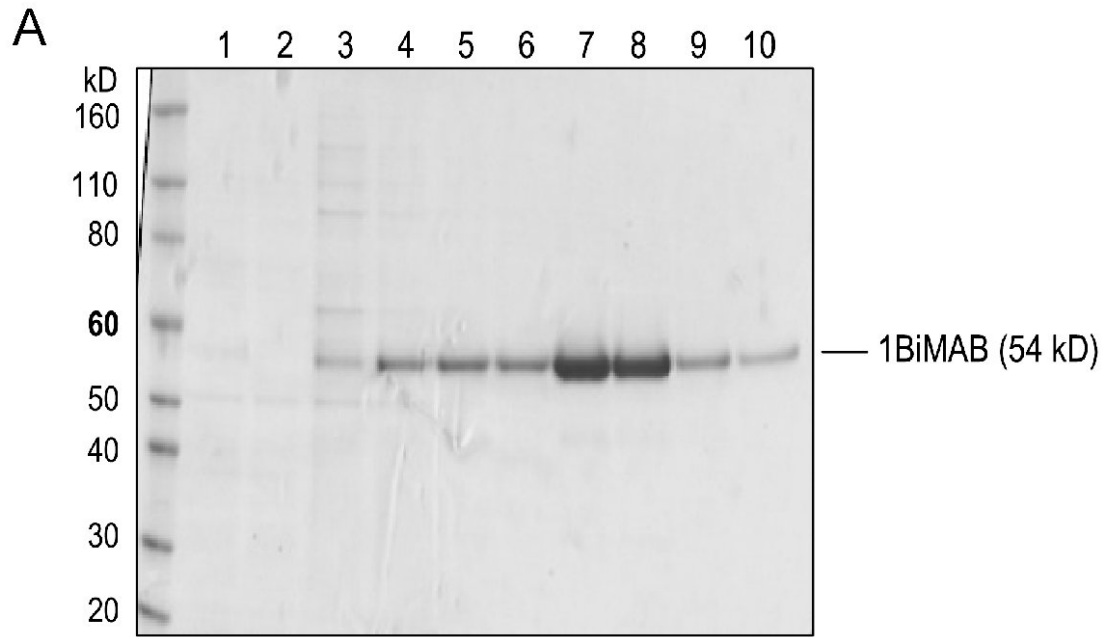


D

【 図 2 】



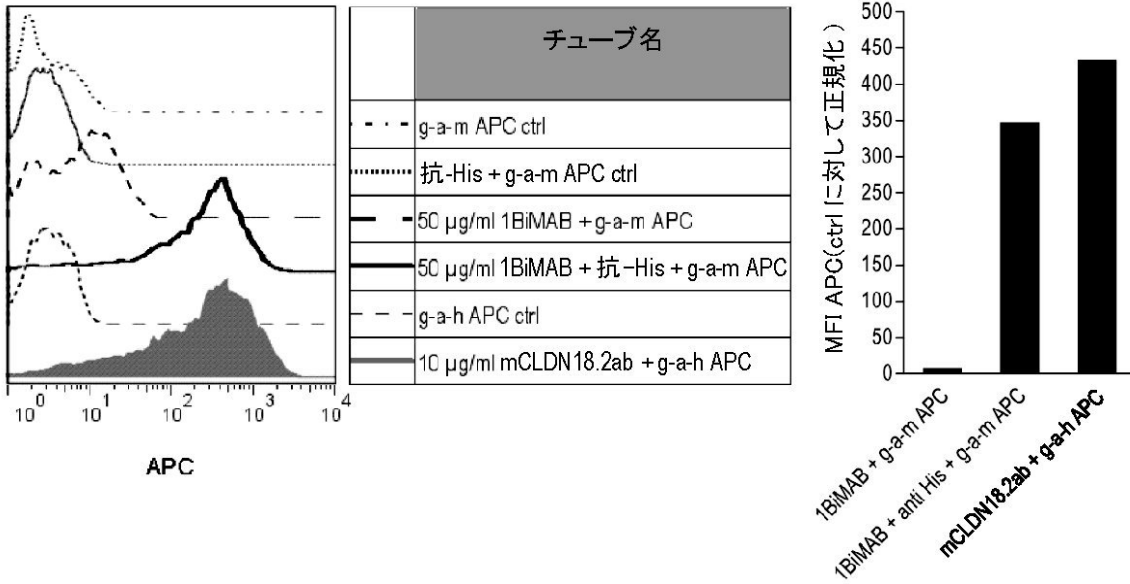
【 図 3 】



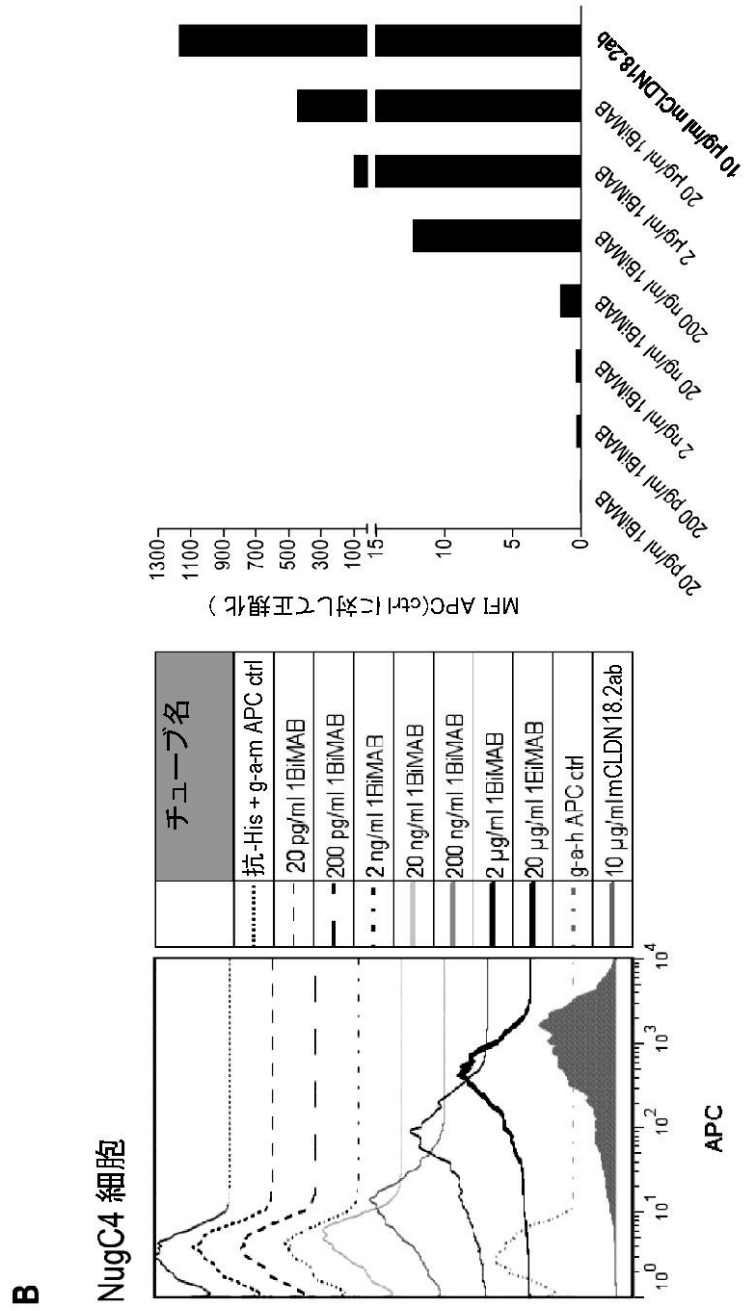
【 図 4 A 】

A

NugC4 細胞



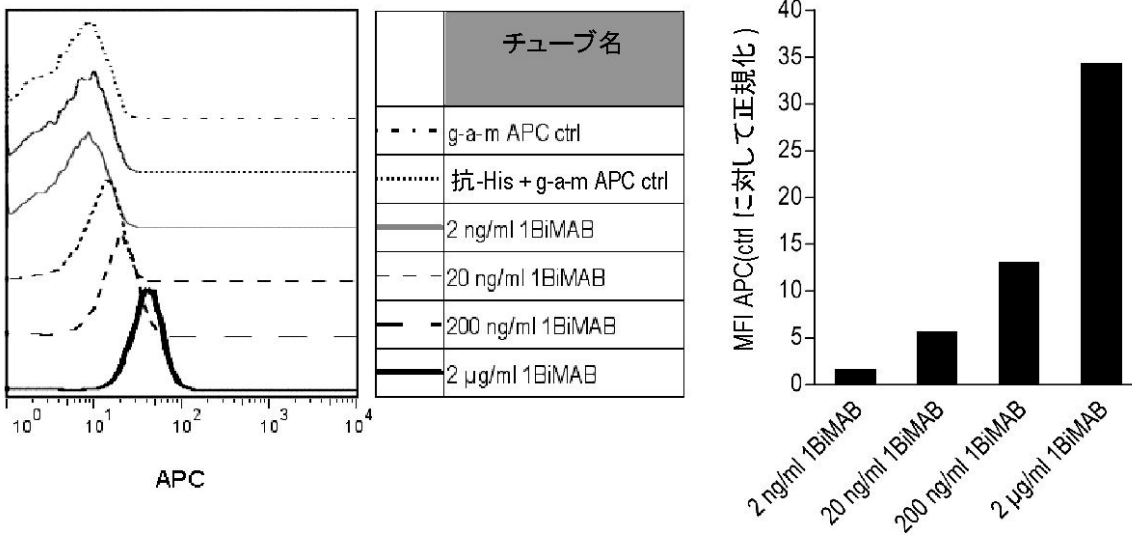
【 図 4 B 】



【 図 4 C 】

C

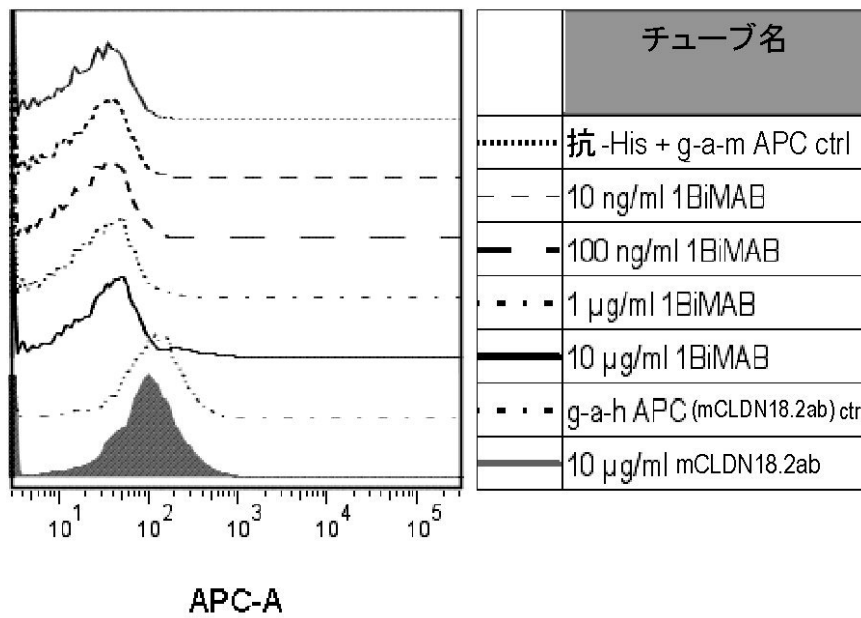
ヒト TL



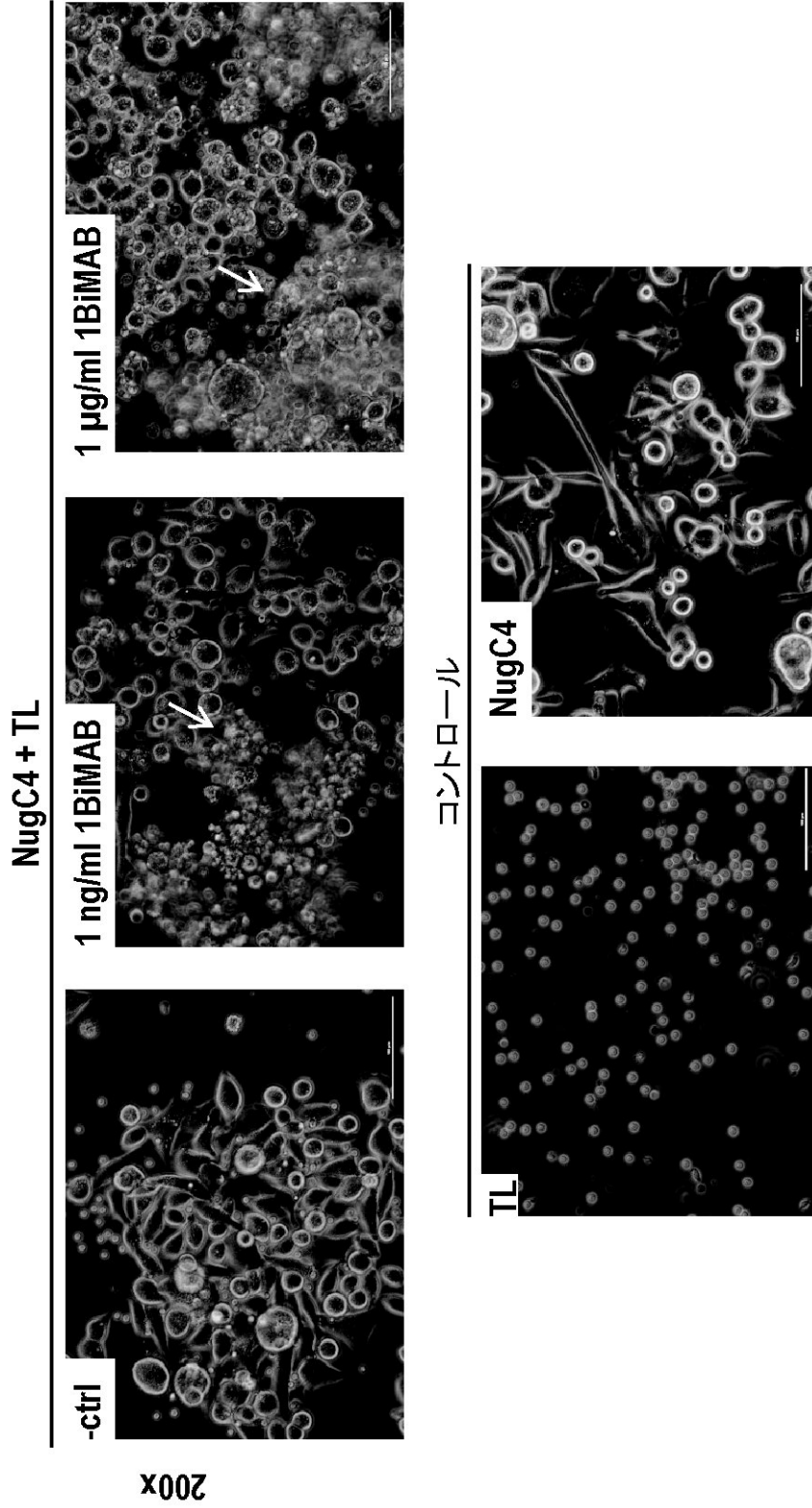
【 図 4 D 】

D

CLDN18.2 陰性細胞株 (PA-1)



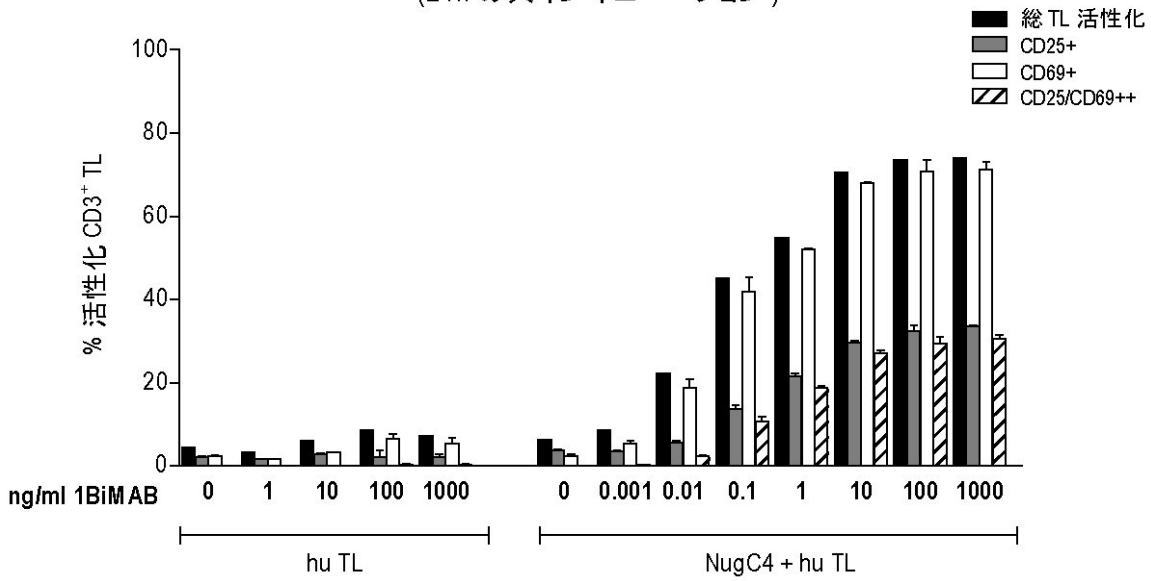
【 図 5 】



【図6】

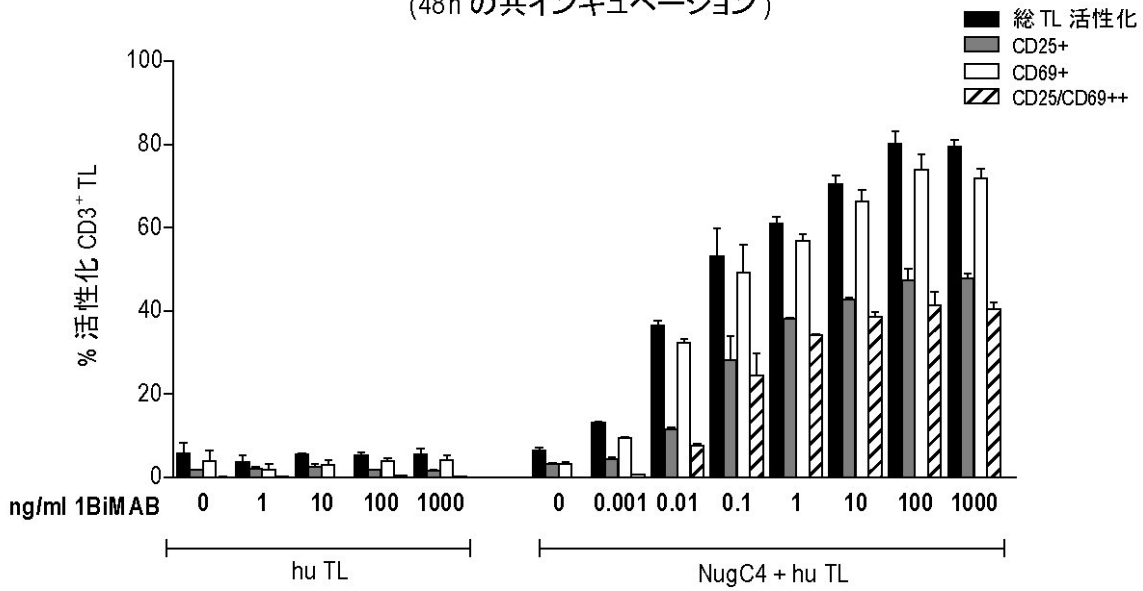
A

TLの活性化
(24hの共インキュベーション)



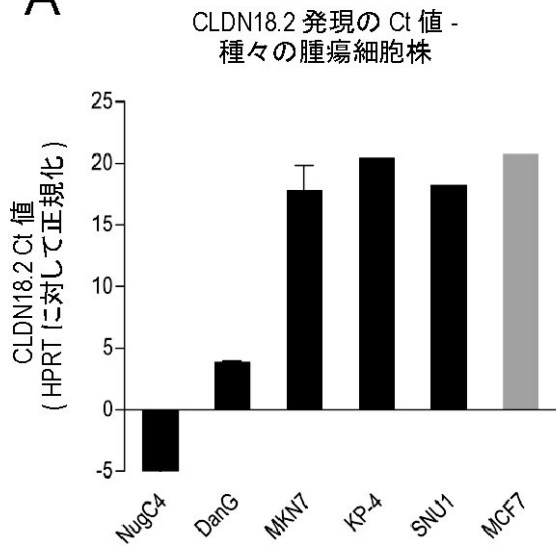
B

TLの活性化
(48hの共インキュベーション)



【図7】

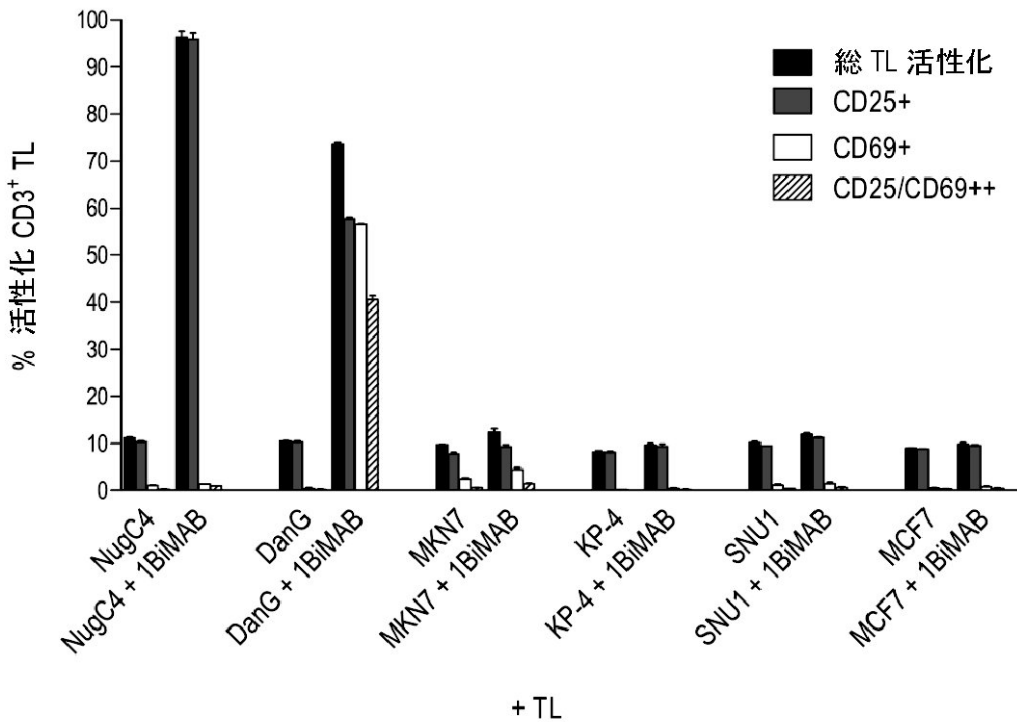
A



細胞株	ガンのタイプ
NugC4	胃のリンパ節ガン
DanG	膵臓ガン
MKN7	胃ガン
KP-4	膵臓ガン
SNU1	胃ガン
MCF7	乳ガン

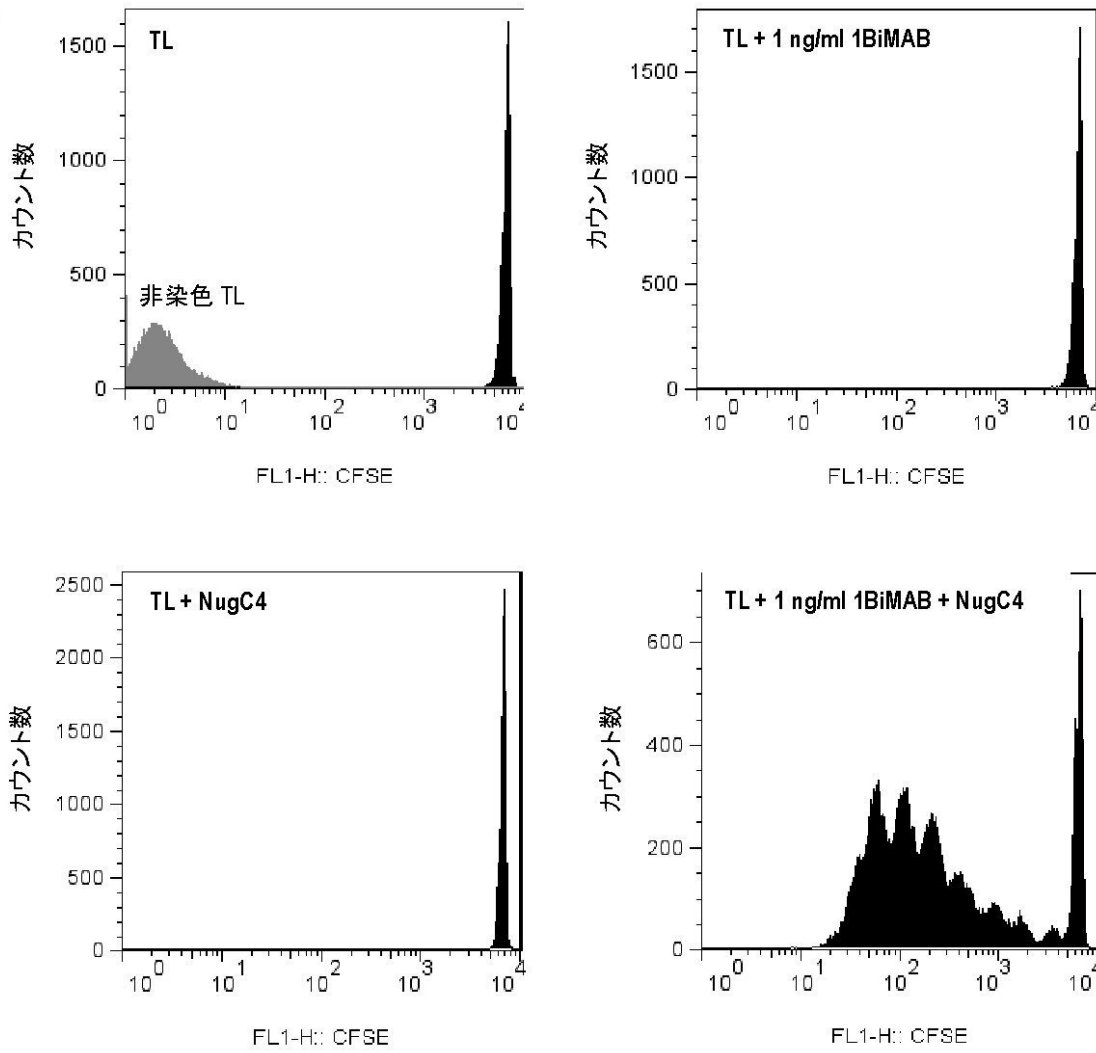
B

TL の活性化
(144h の共インキュベーション)

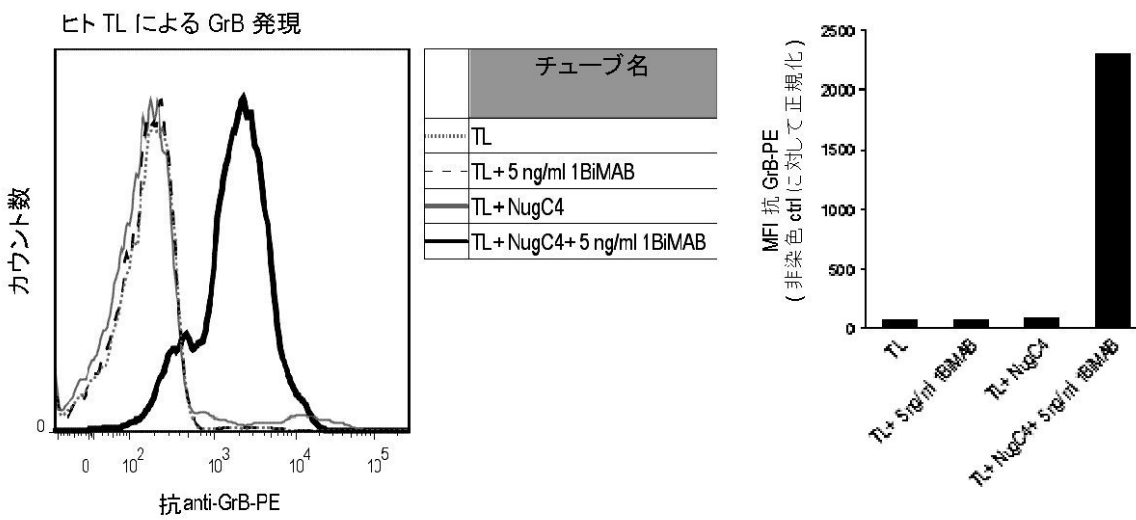


【 図 8 】

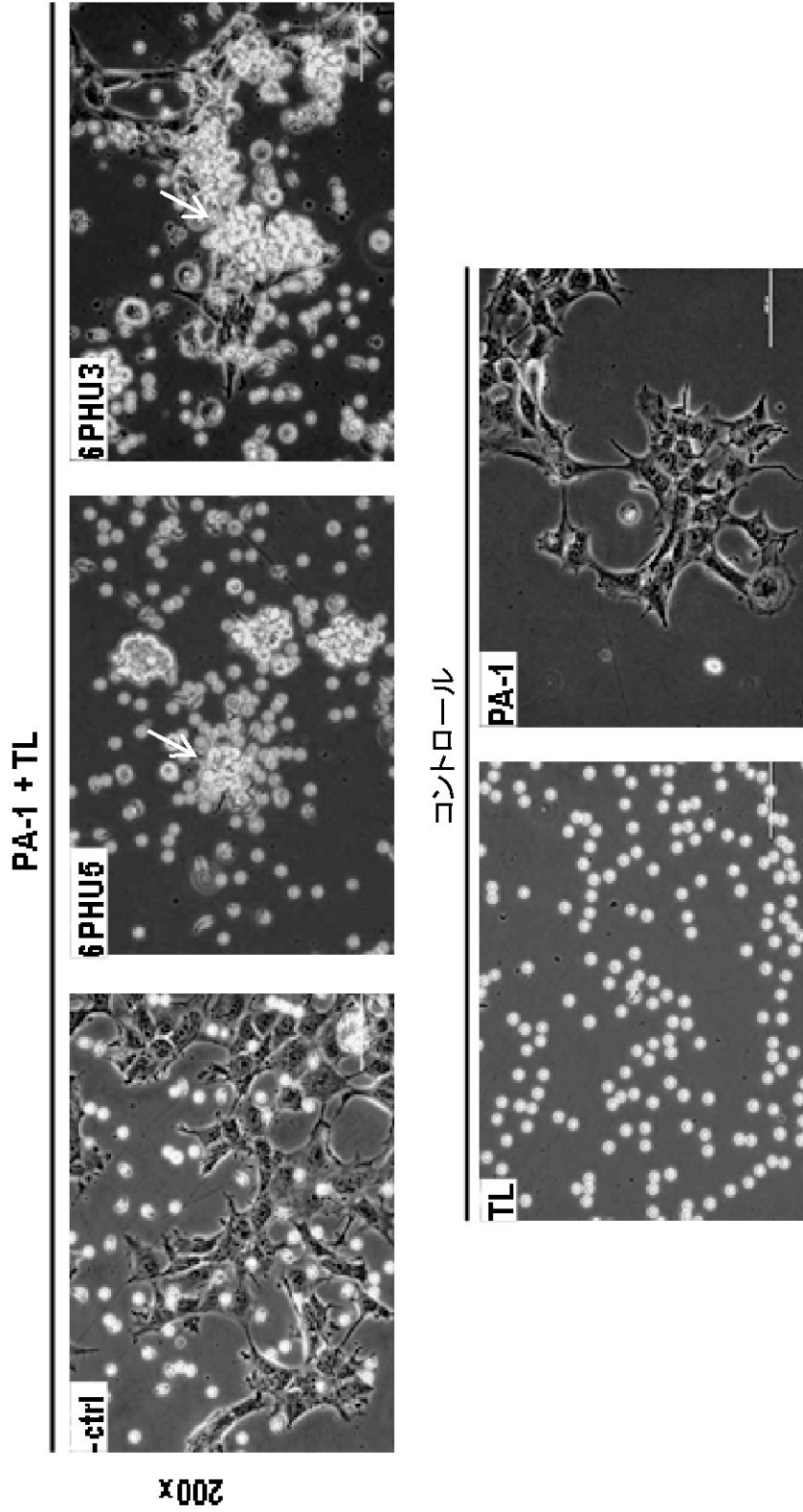
A



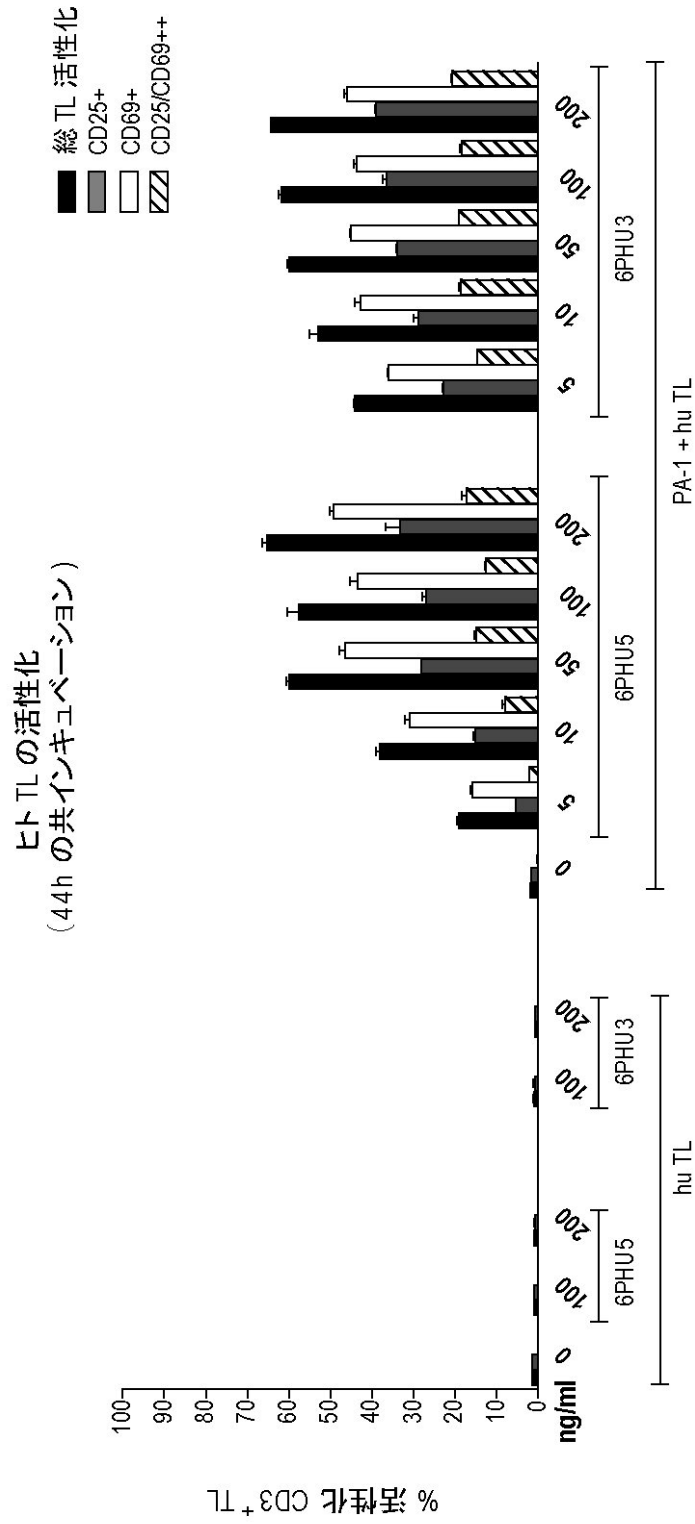
B



【 図 1 2 】

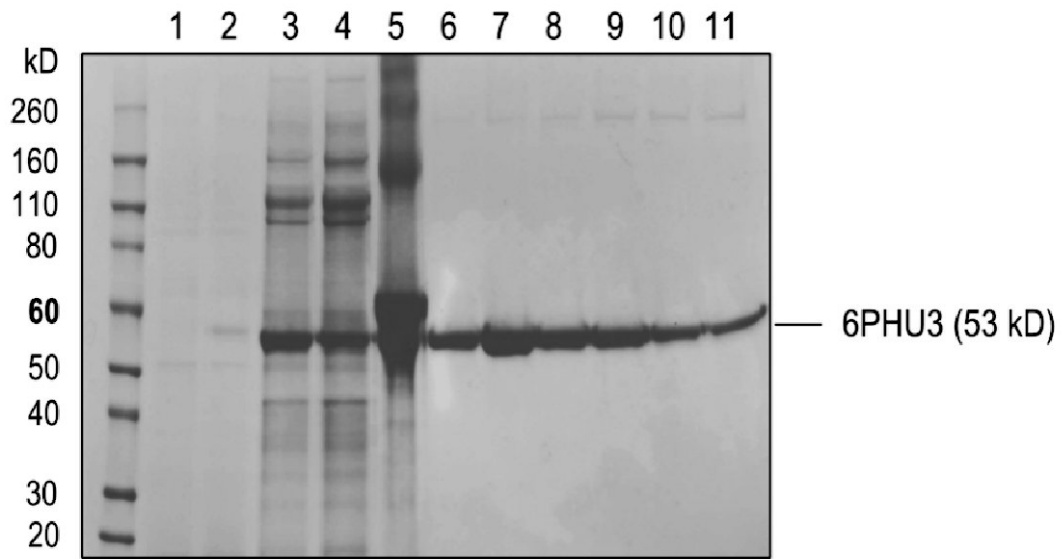


【 図 1 3 】

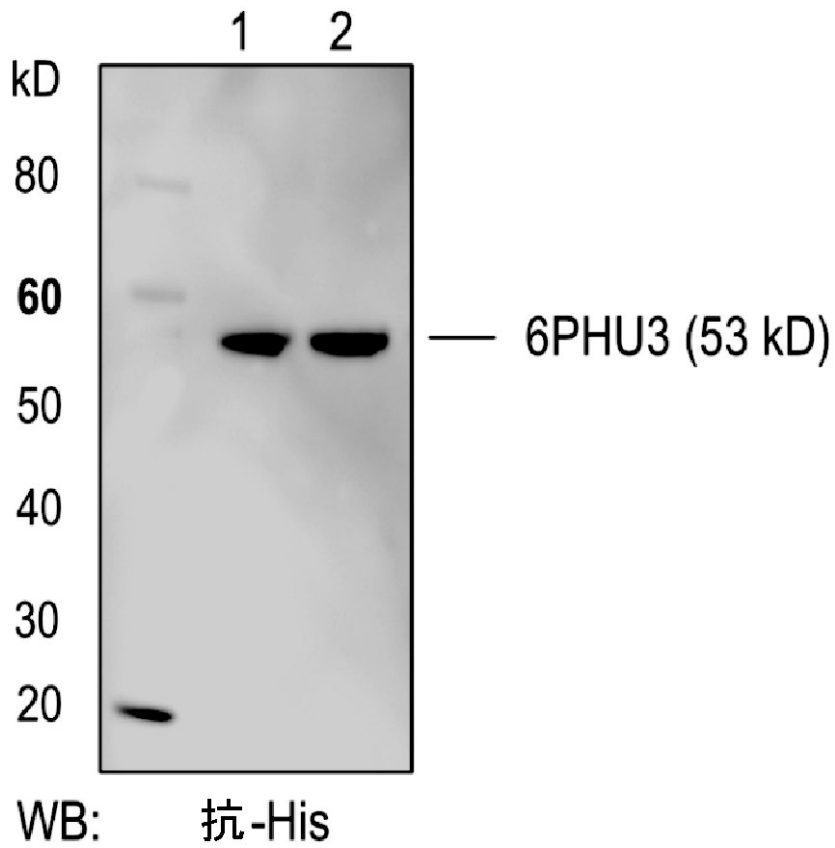


【 図 1 4 】

A



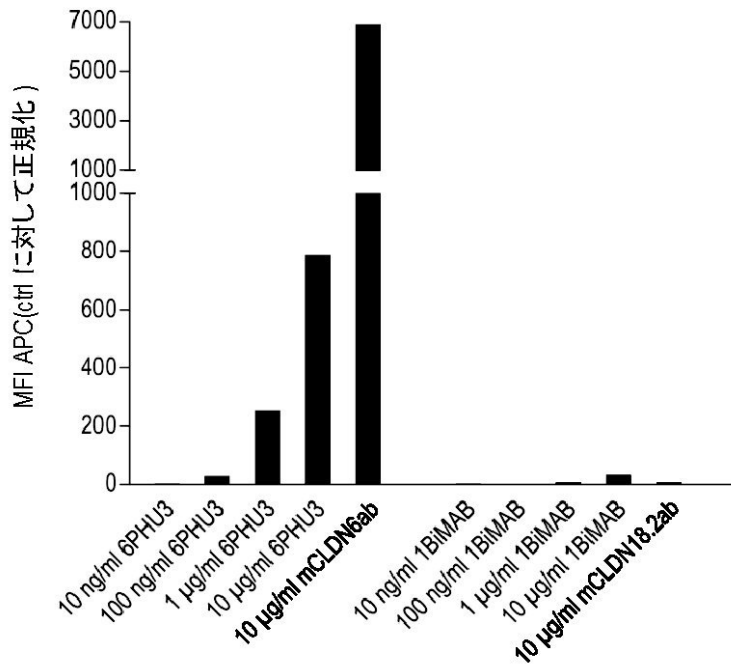
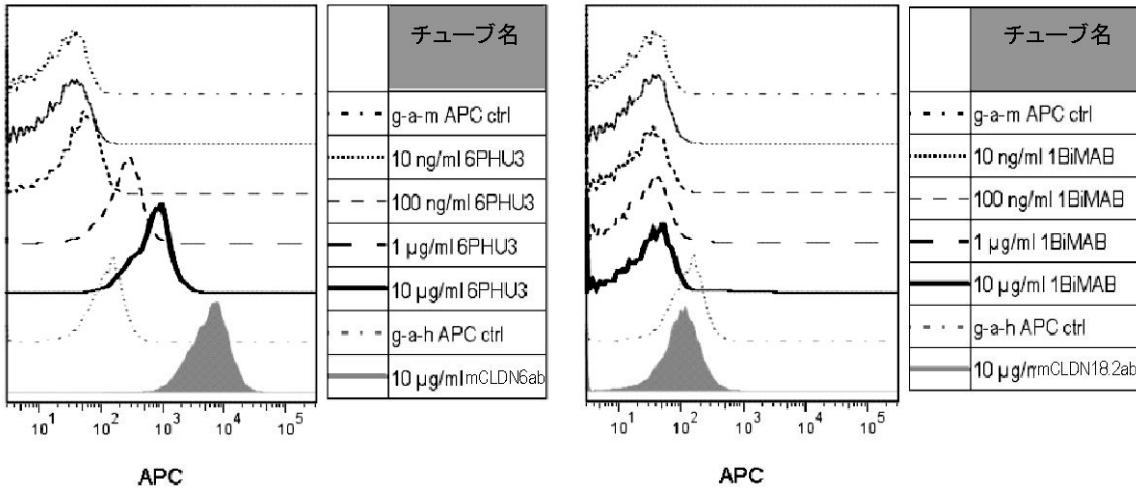
B



【図 15 A 1】

A

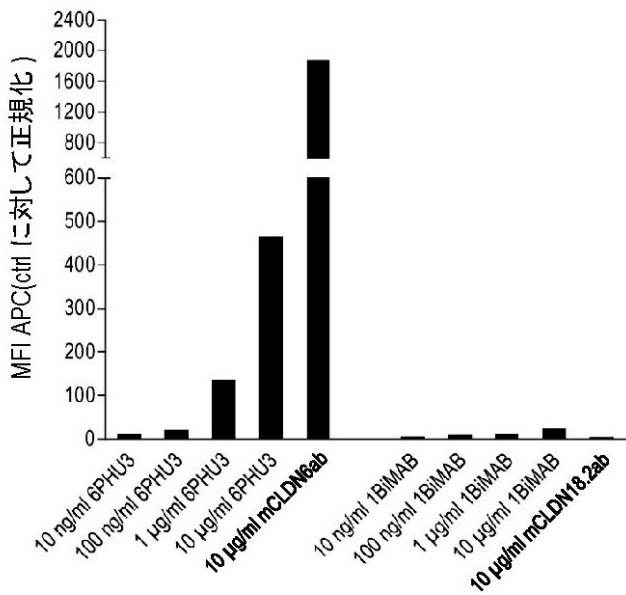
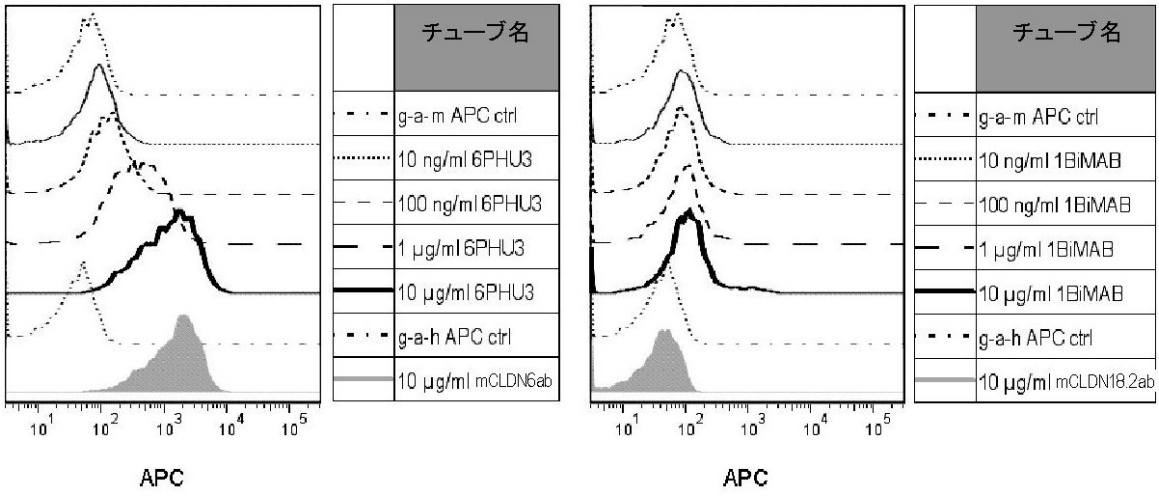
PA-1 細胞



【図 15 A 2】

A

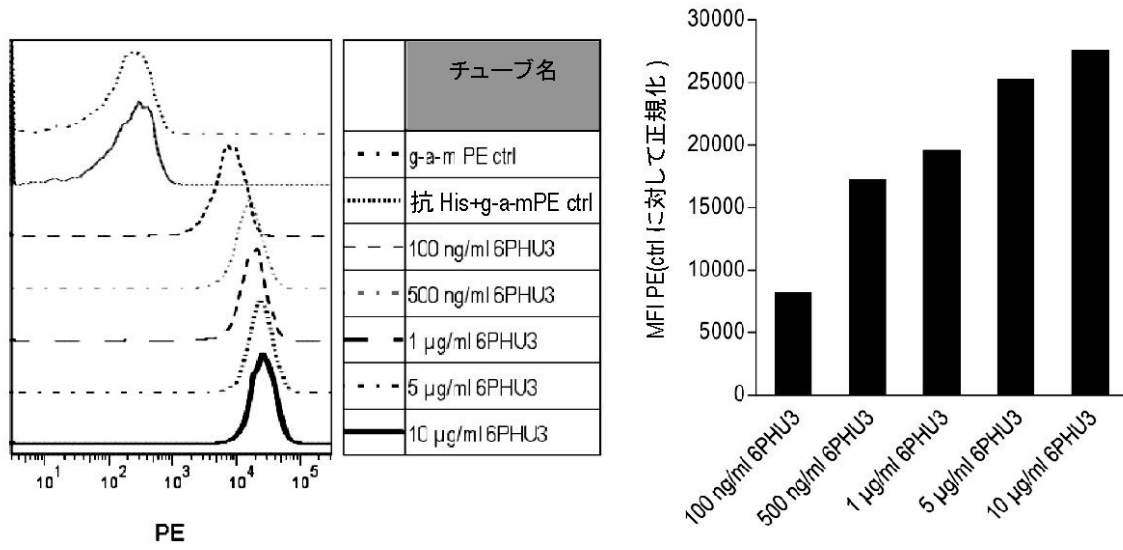
OV-90 細胞



【図15B】

B

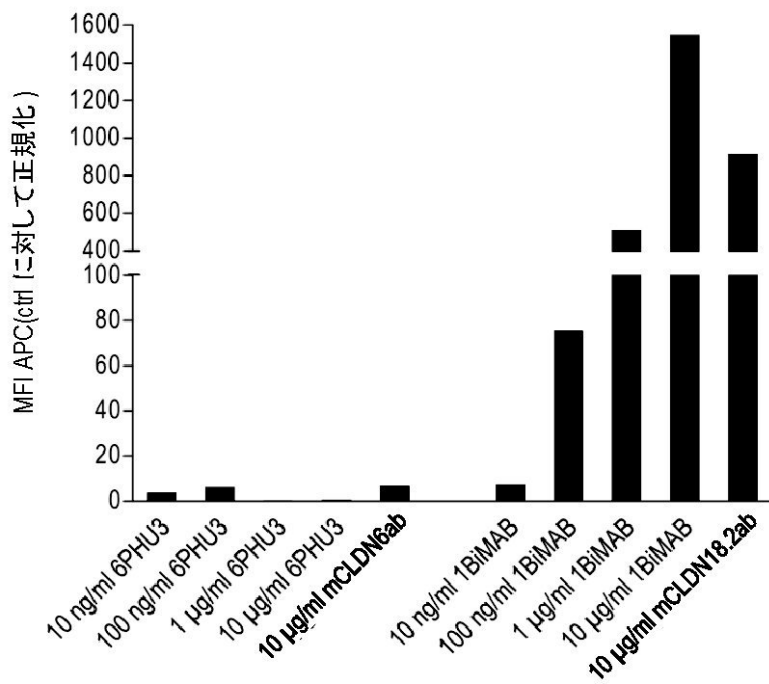
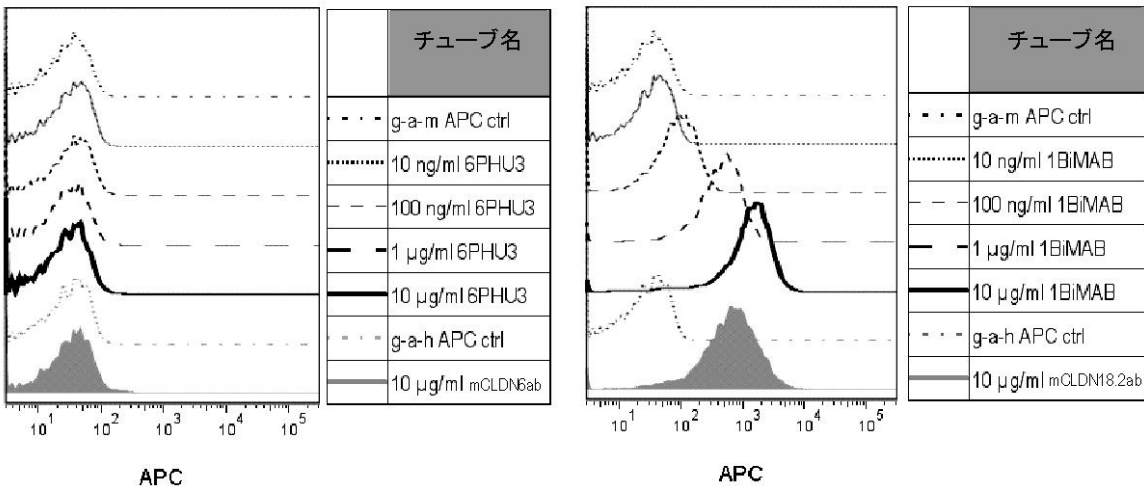
ヒトTL



【図15C】

C

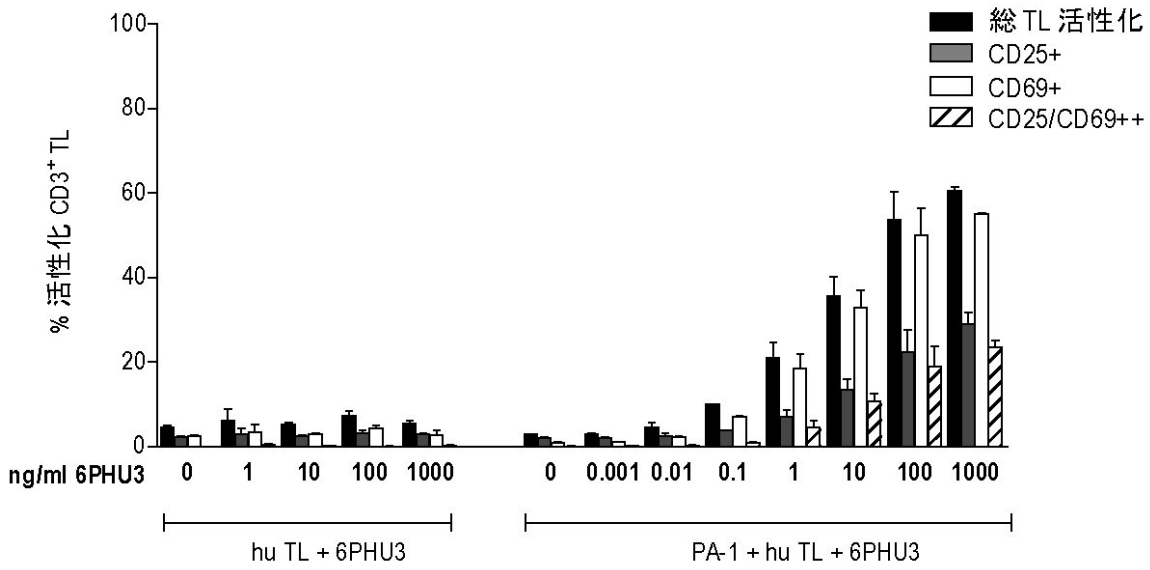
CLDN6 陰性細胞株 (NugC4)



【図 16】

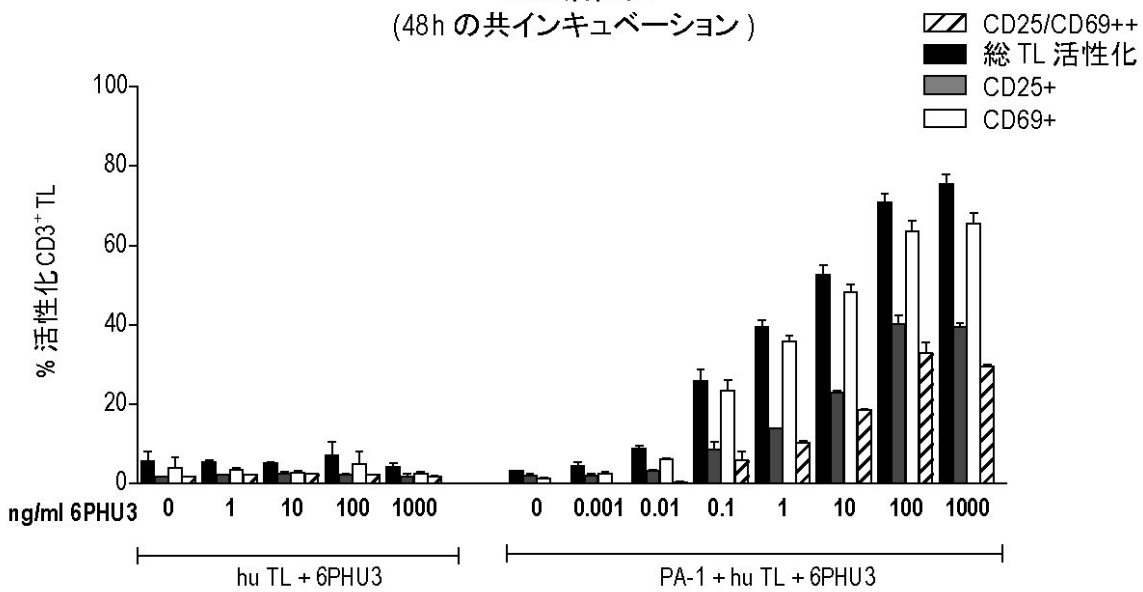
A

TL の活性化
(24h の共インキュベーション)



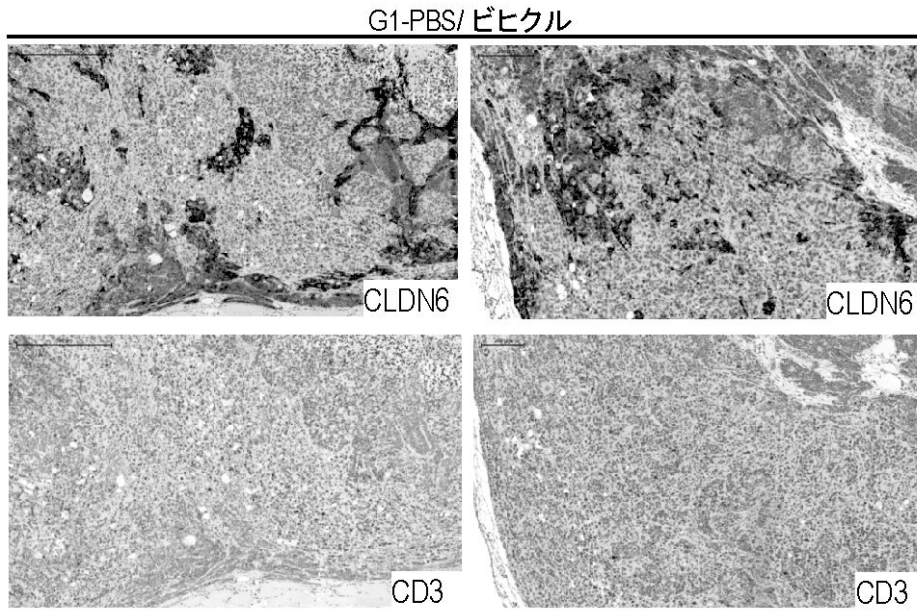
B

TL の活性化
(48h の共インキュベーション)

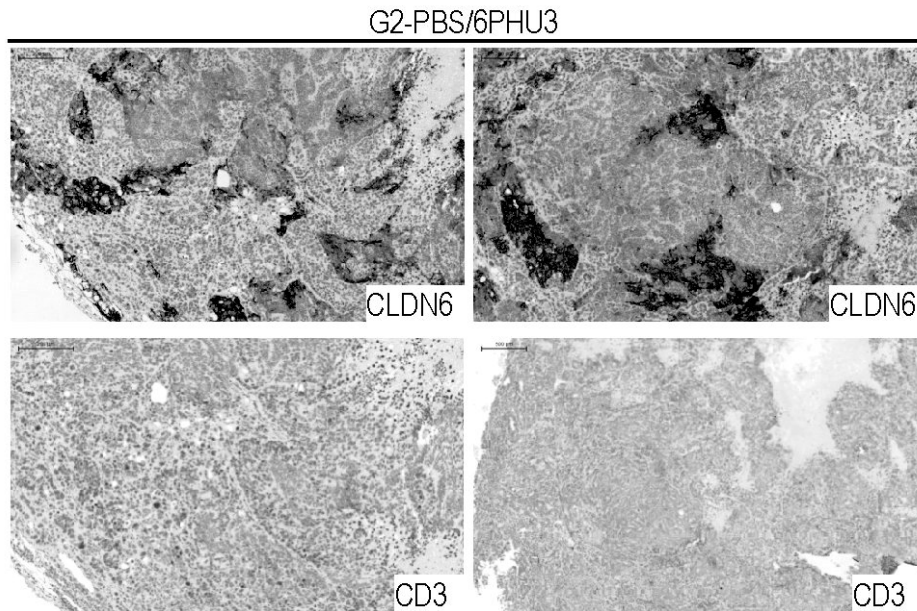


【図19AB】

A

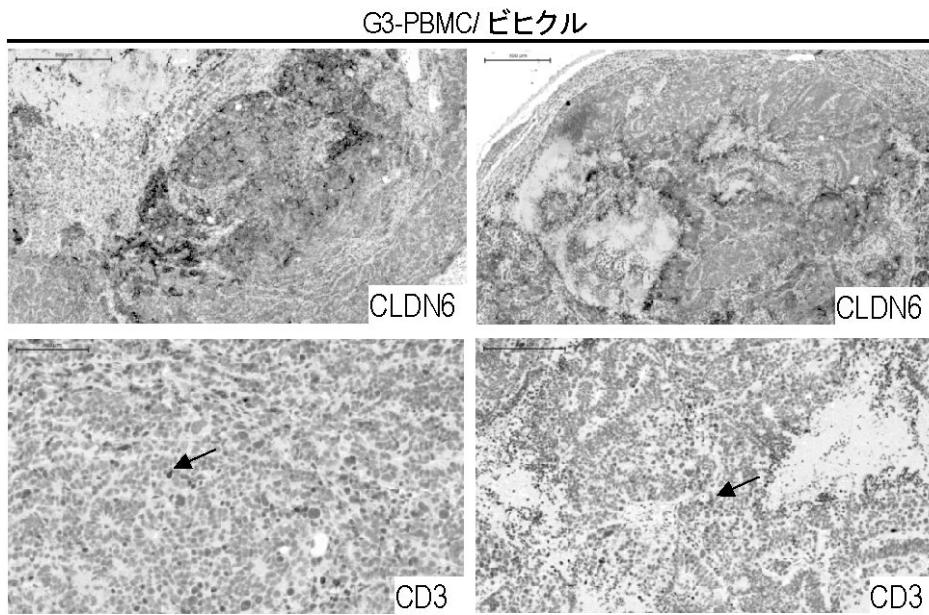


B

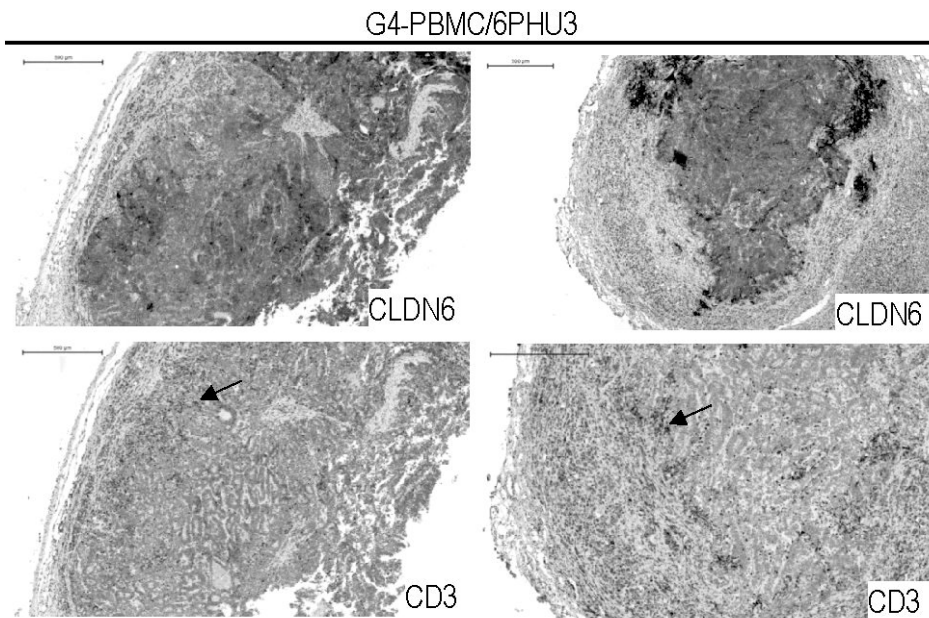


【図19CD】

C

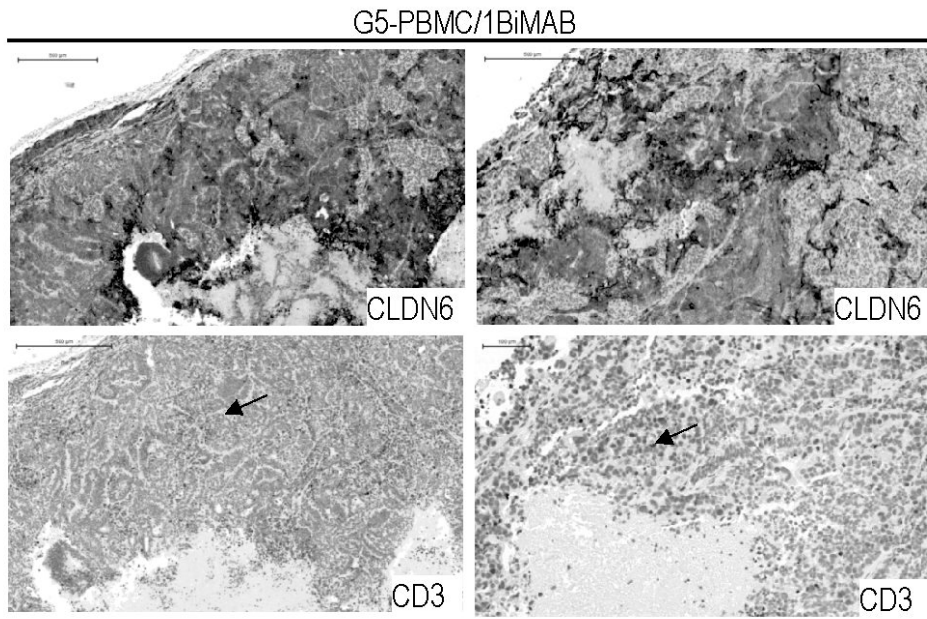


D



【 図 19 E 】

E



A

bi-scFv CLDN18.2 x CD3

Cap	hAgKozak	Sec	$V_{H\alpha\text{CLDN18.2}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CLDN18.2}}$	SL	$V_{H\alpha\text{CD3}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CD3}}$	His	2hBgUTR	A120
-----	----------	-----	------------------------------	----	------------------------------	----	-------------------------	----	-------------------------	-----	---------	------

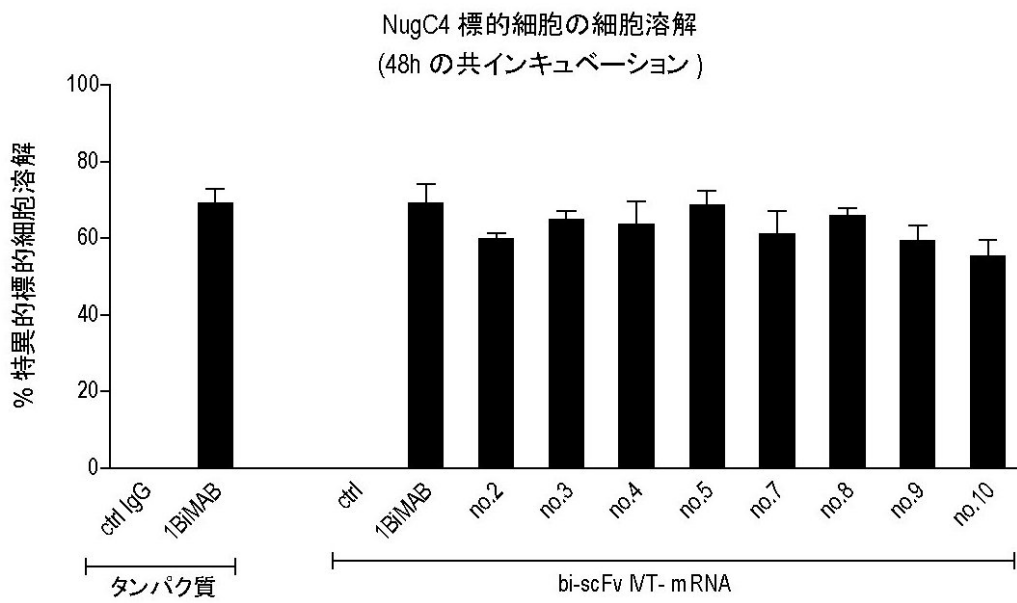
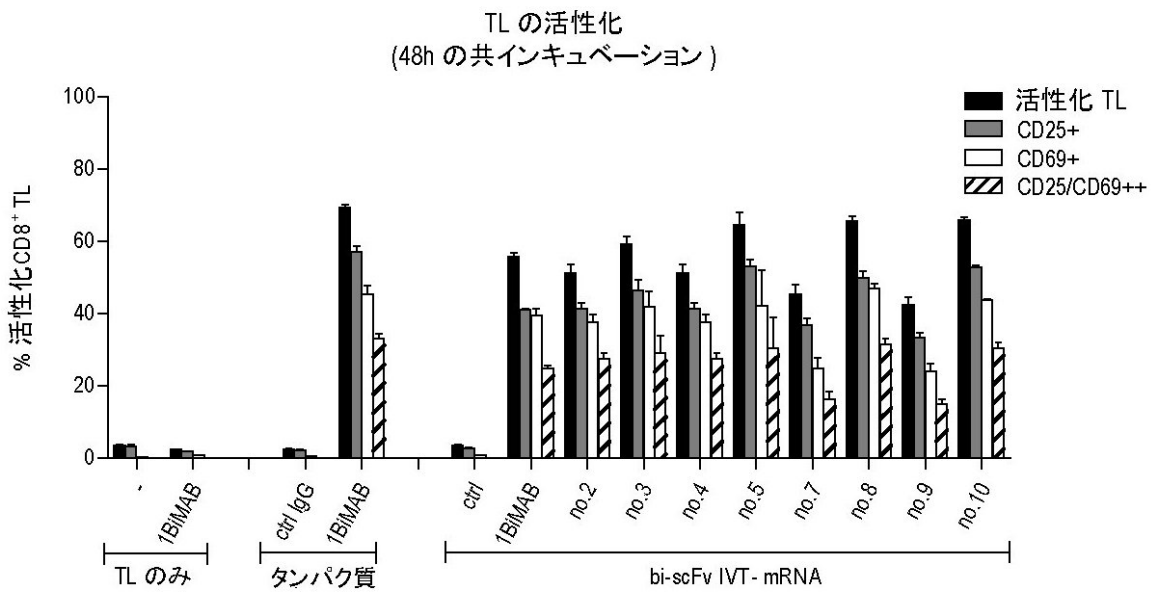
bi-scFv CD3 x CLDN18.2

Cap	hAgKozak	Sec	$V_{H\alpha\text{CD3}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CD3}}$	SL	$V_{H\alpha\text{CLDN18.2}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CLDN18.2}}$	His	2hBgUTR	A120
-----	----------	-----	-------------------------	----	-------------------------	----	------------------------------	----	------------------------------	-----	---------	------

B

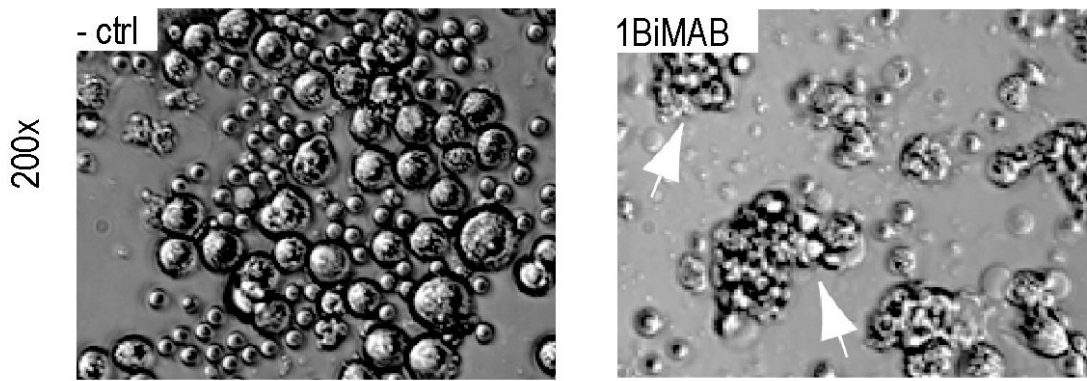
Cap	5'UTR	nsP1-4	sgP	Sec	$V_{H\alpha\text{CLDN18.2}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CLDN18.2}}$	SL	$V_{H\alpha\text{CD3}}$	LL	$V_{L\alpha\text{CD3}}$	His	3'UTR	A120
-----	-------	--------	-----	-----	------------------------------	----	------------------------------	----	-------------------------	----	-------------------------	-----	-------	------

【 図 2 1 】

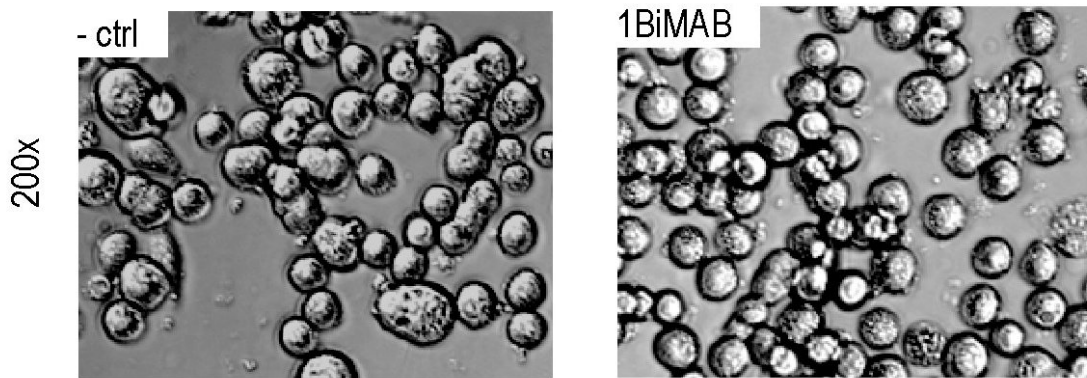


【 図 2 2 】

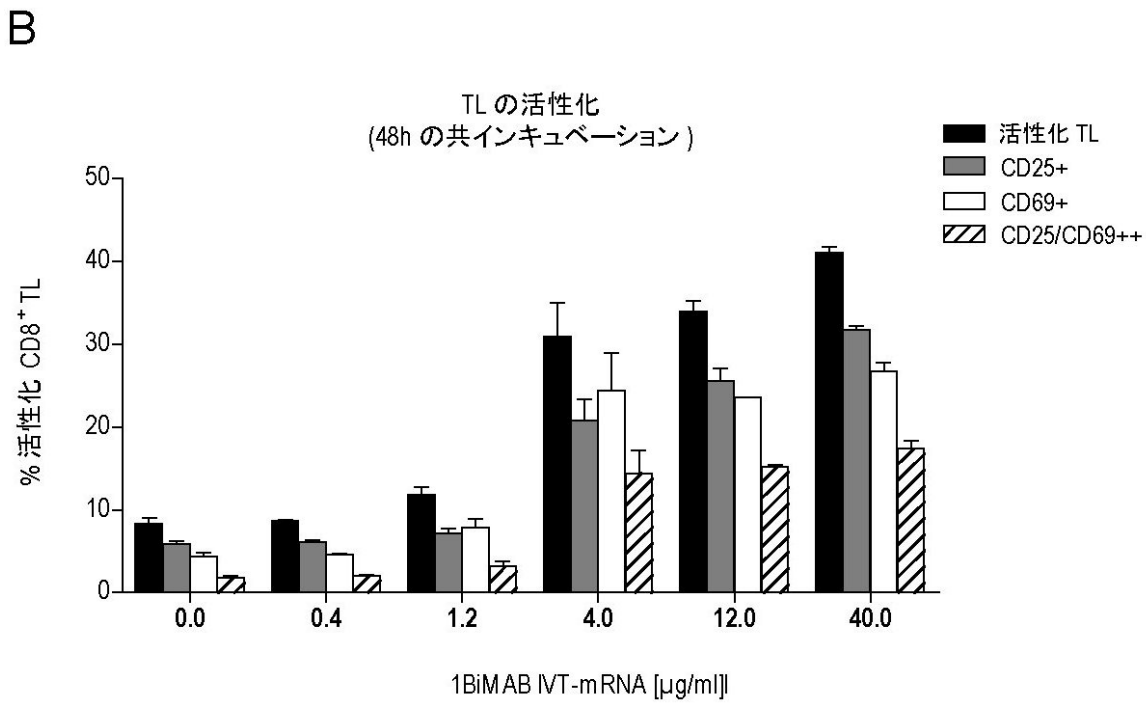
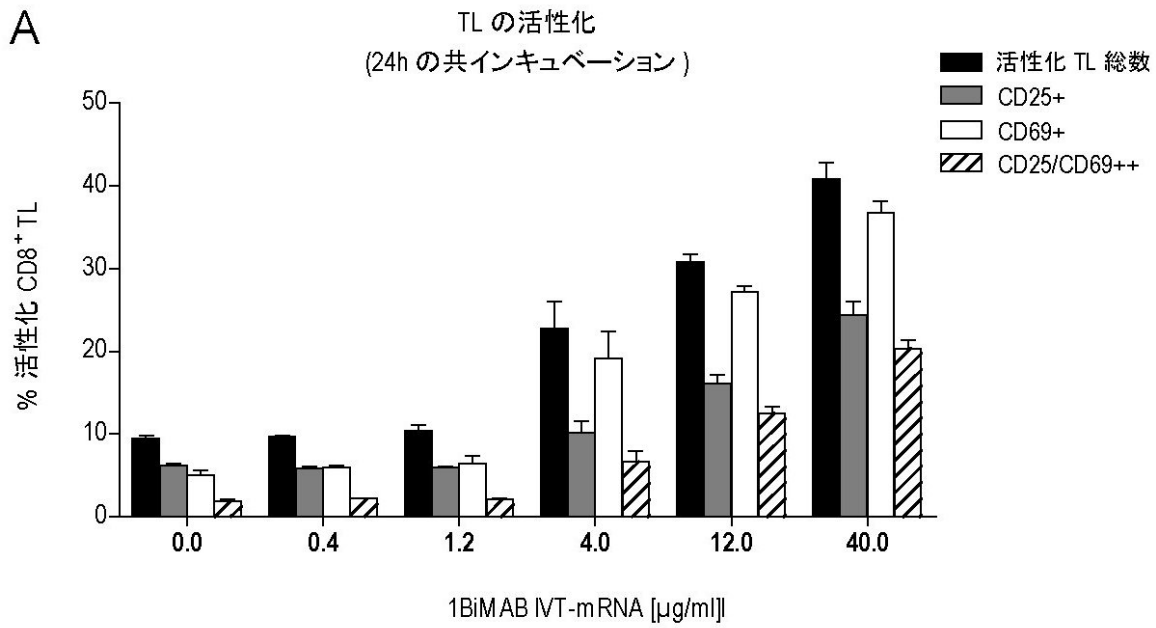
IVT-mRNA トランスフェクション NugC4+hu TL



IVT-mRNA トランスフェクション NugC4 のみのコントロール

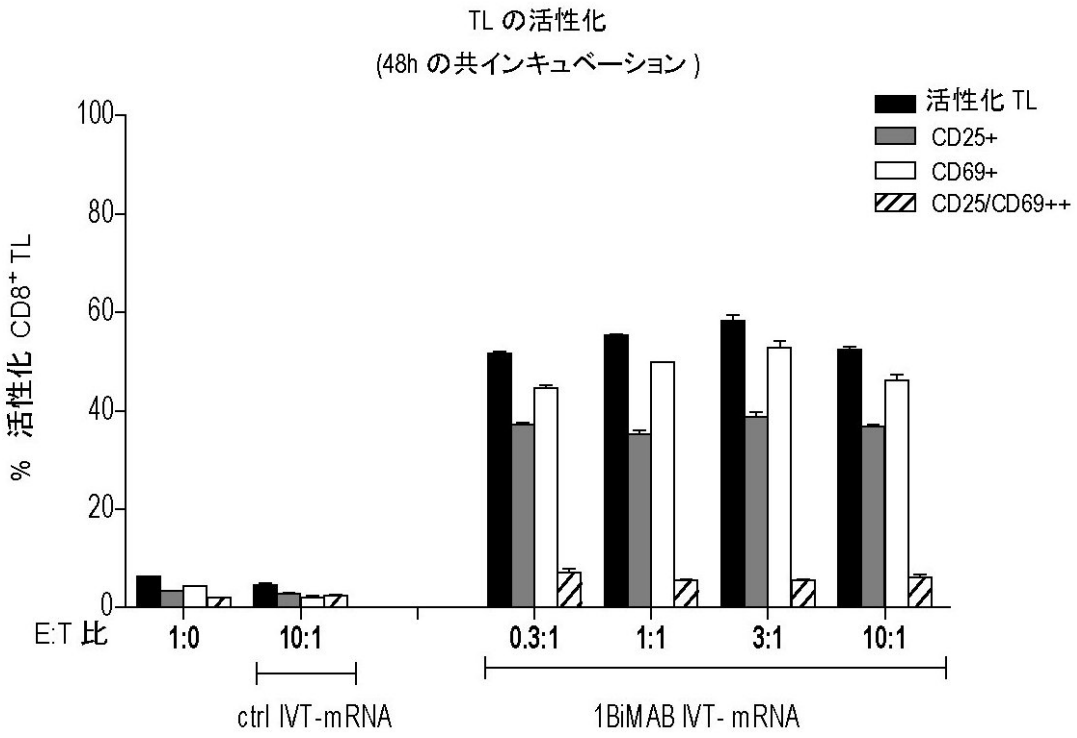


【 図 2 3 】

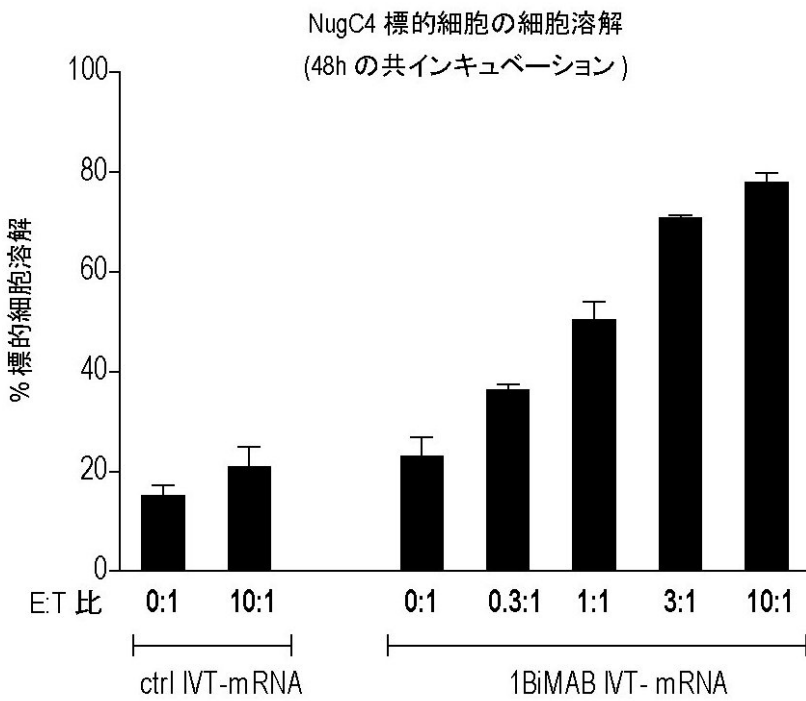


【図 26】

A

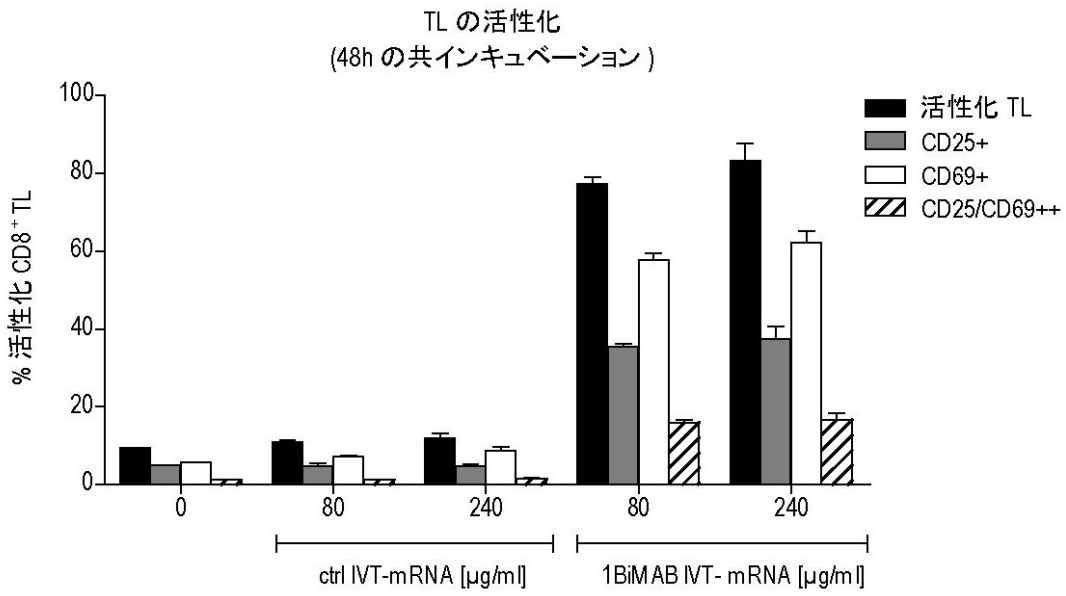


B

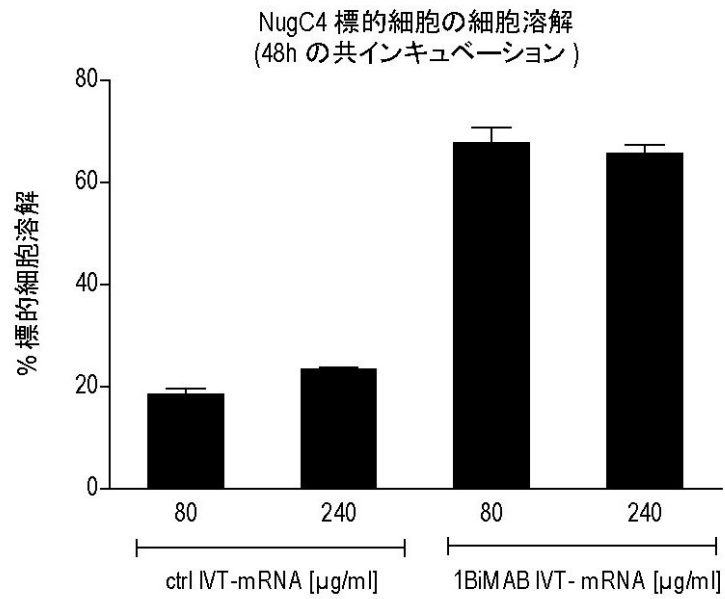


【 図 2 7 】

A

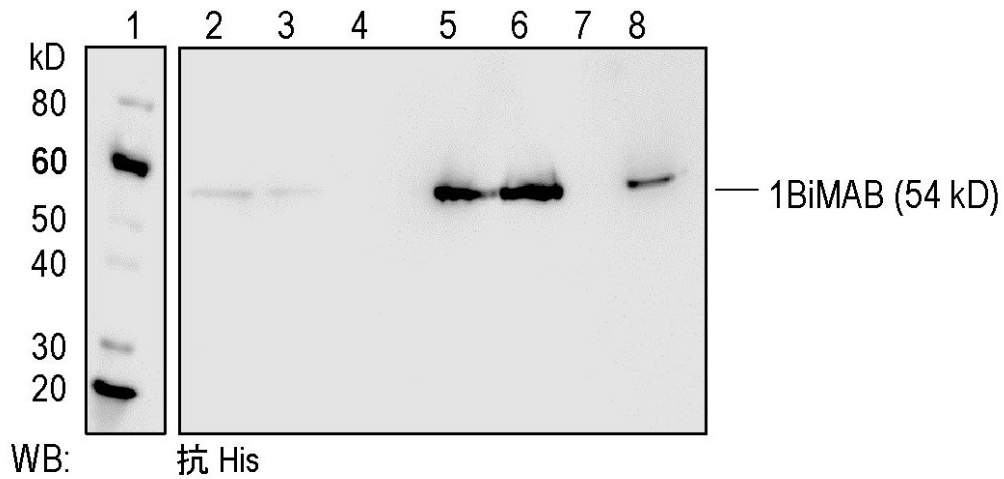


B



【図 29 B】

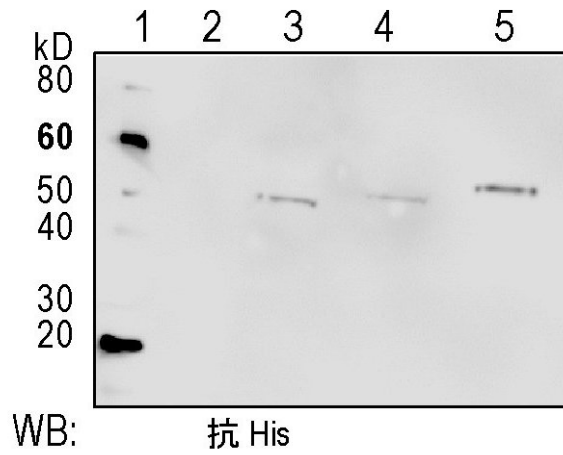
B



レーン	サンプル
1	タンパク質標準物
2	SN 中の 1BiMAB IVT-mRNA
3	SN 中の 1BiMAB IVT-レプリコン
4	模擬 ctrl SN
5	細胞溶解物中の 1BiMAB IVT-mRNA
6	細胞溶解物中の 1BiMAB IVT-レプリコン
7	模擬 ctrl 細胞溶解物
8	0.1 μ g の精製 1BiMAB タンパク質

【図 29C】

C



レーン	サンプル
1	タンパク質標準物
2	模擬 ctrl SN
3	SN 中の ctrl BiMAB
4	SN 中の 1BiMAB
5	0.1 μ g の精製 1BiMAB タンパク質

【 3 1 】

A

bi-scFv CLDN6 x CD3



bi-scFv CD3 x CLDN6

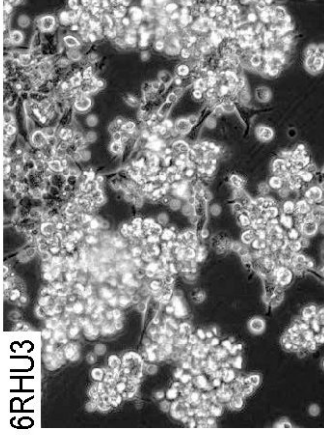
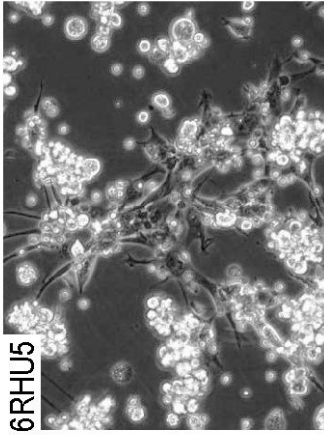
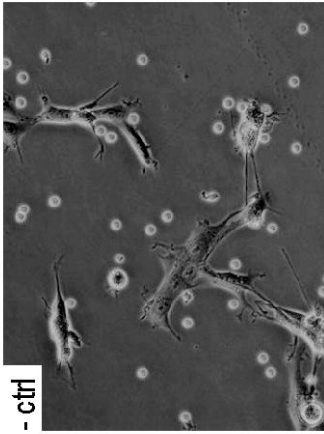


B

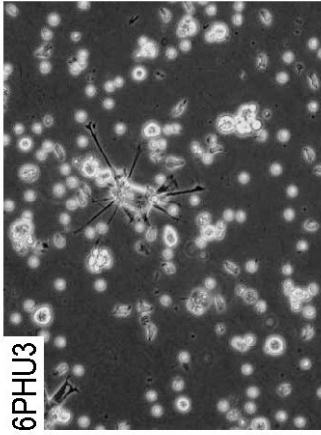
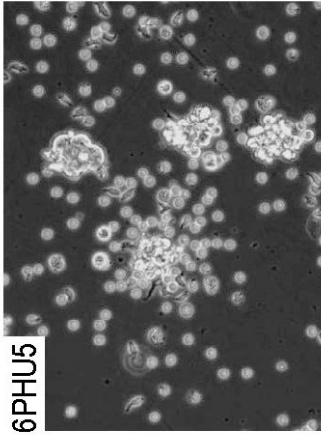
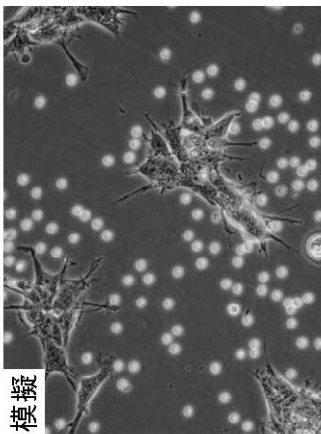


【 図 3 2 】

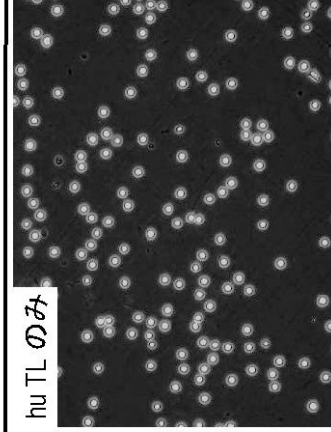
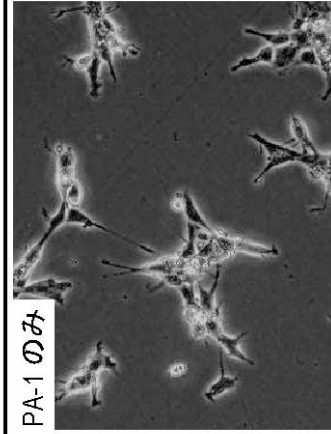
bi-scFv IVT-mRNA トランスフェクション PA-1+hu TL



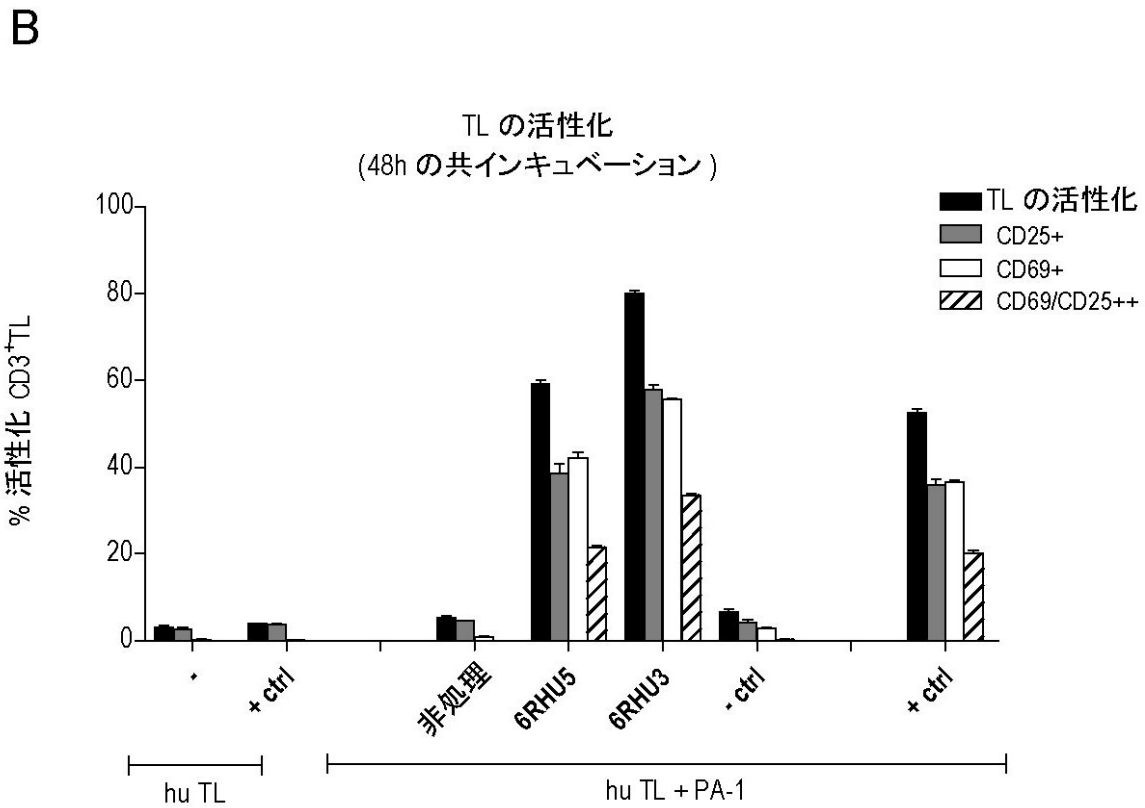
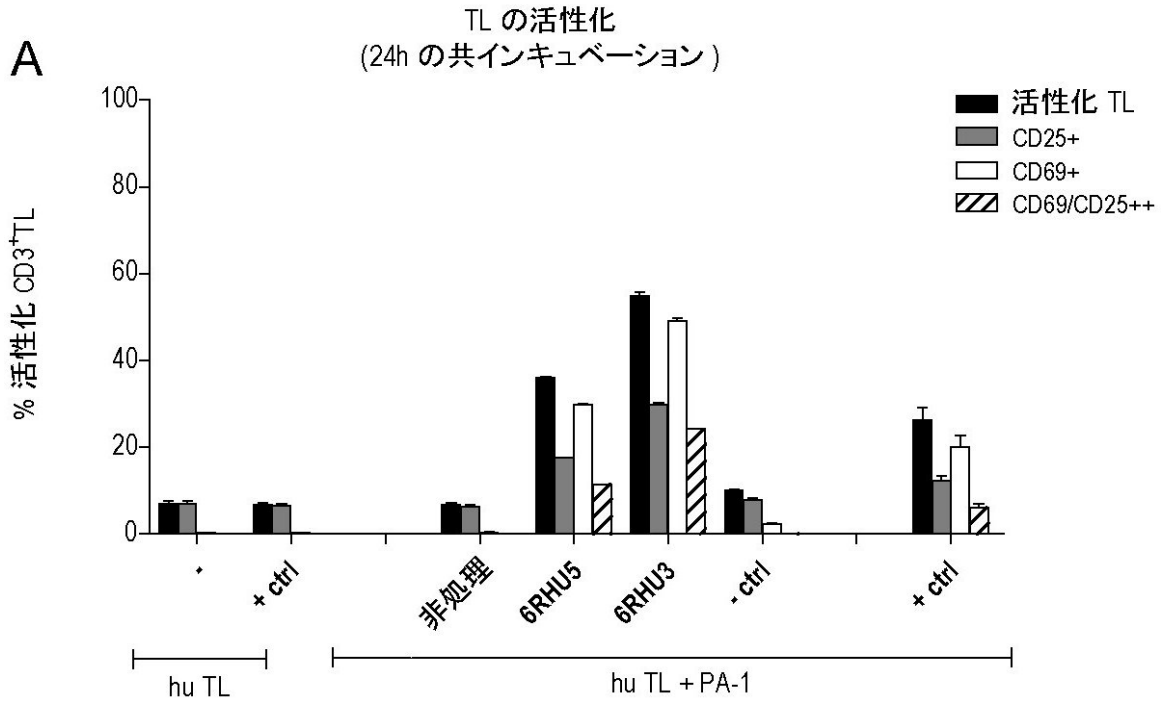
PA-1+hu TL bi-scFv タンパク質コントロール



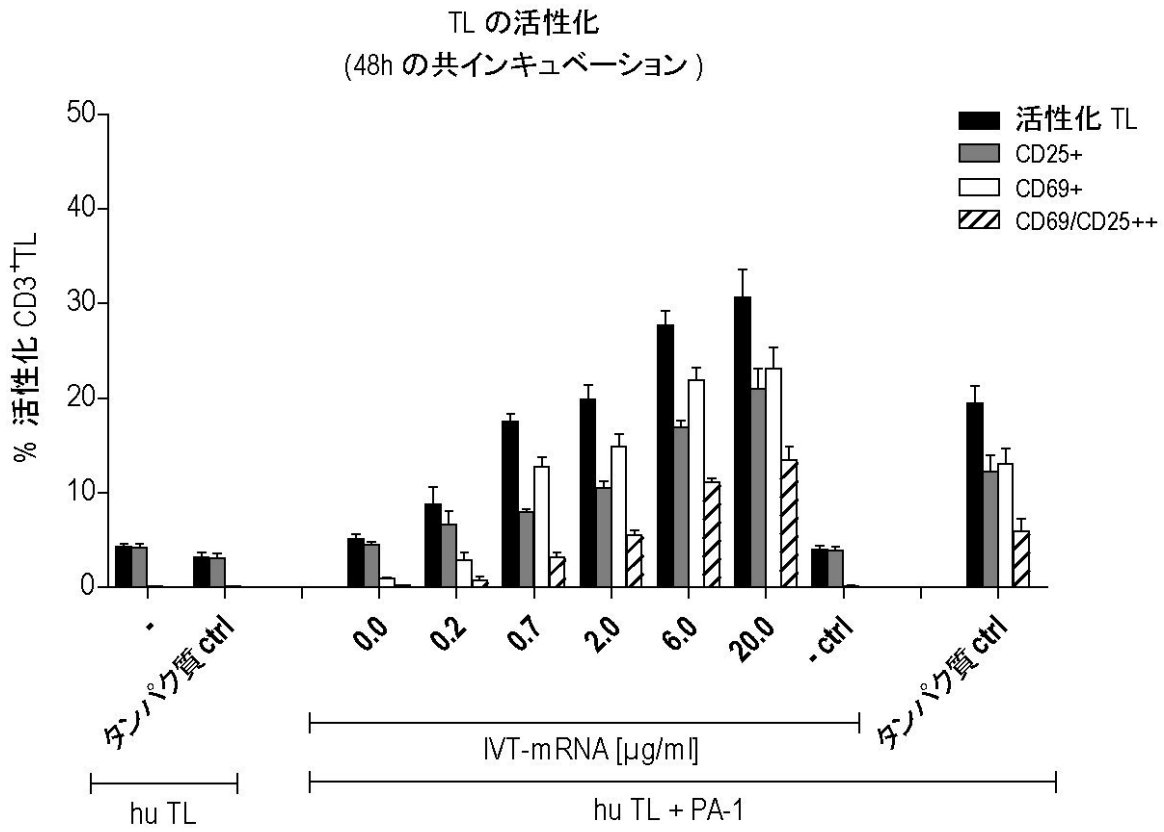
コントロール



【 図 3 3 】

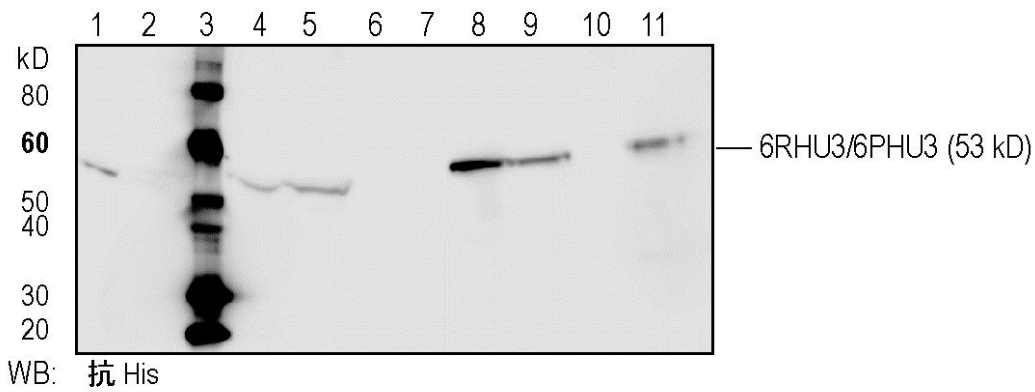


【 図 3 4 】



【図 3 7 B】

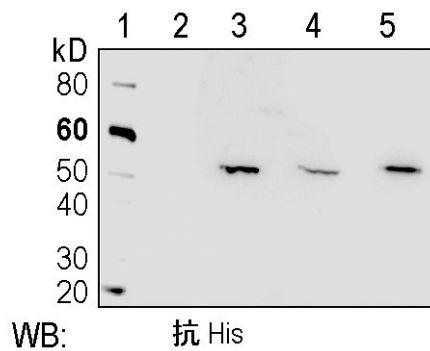
B



レーン	サンプル
1	SN 中の No.25
2	細胞溶解物中の No.25
3	タンパク質標準
4	SN 中の 6RHU3 IVT-mRNA
5	SN 中の 6RHU3 IVT- レプリコン
6	模擬 ctrl SN
7	-
8	細胞溶解物中の 6RHU3 IVT-mRNA
9	細胞溶解物中の 6RHU3 IVT- レプリコン
10	模擬 ctrl 細胞溶解物
11	0.1 μ g の精製 6PHU3 タンパク質

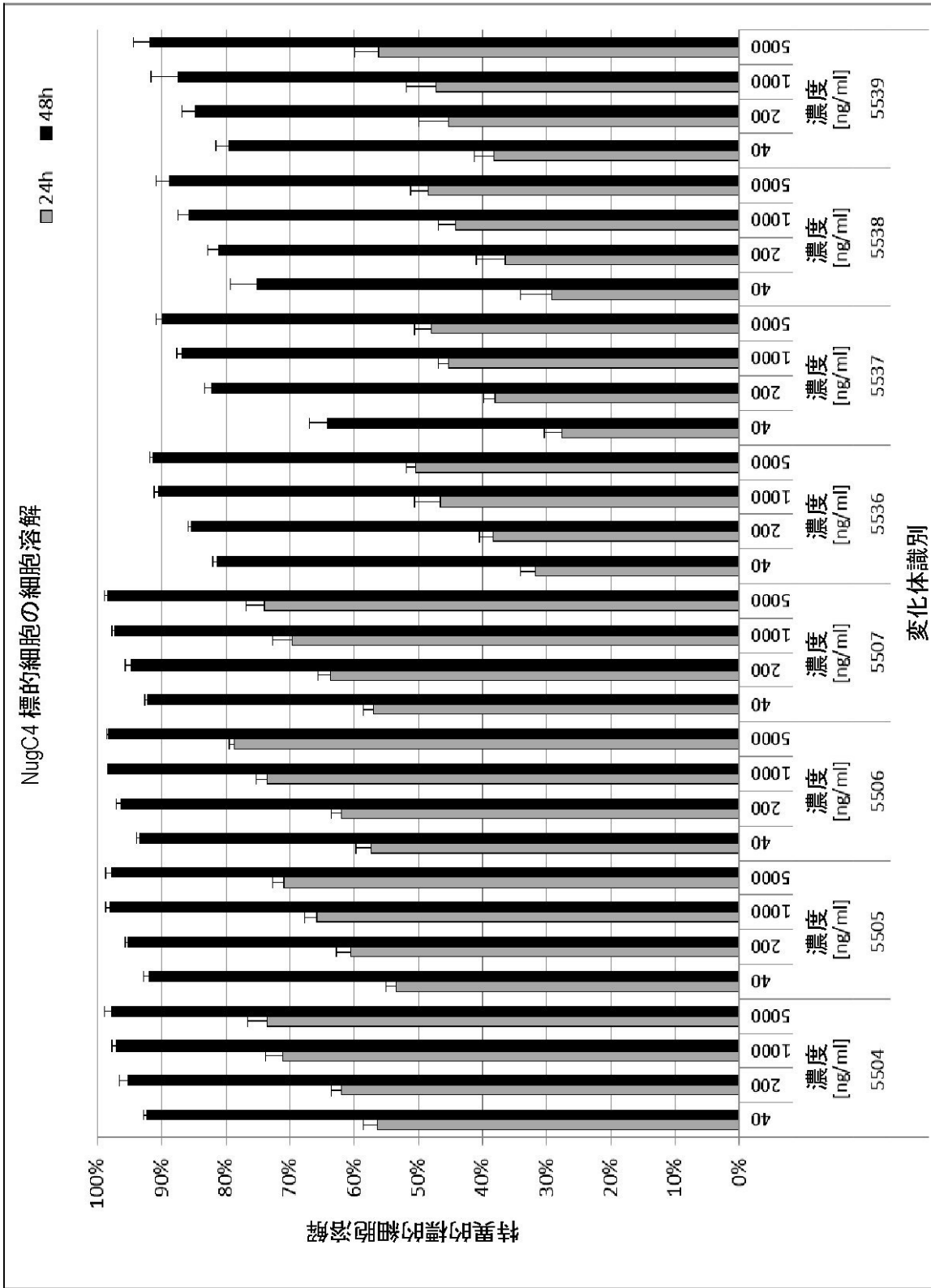
【図 3 7 C】

C

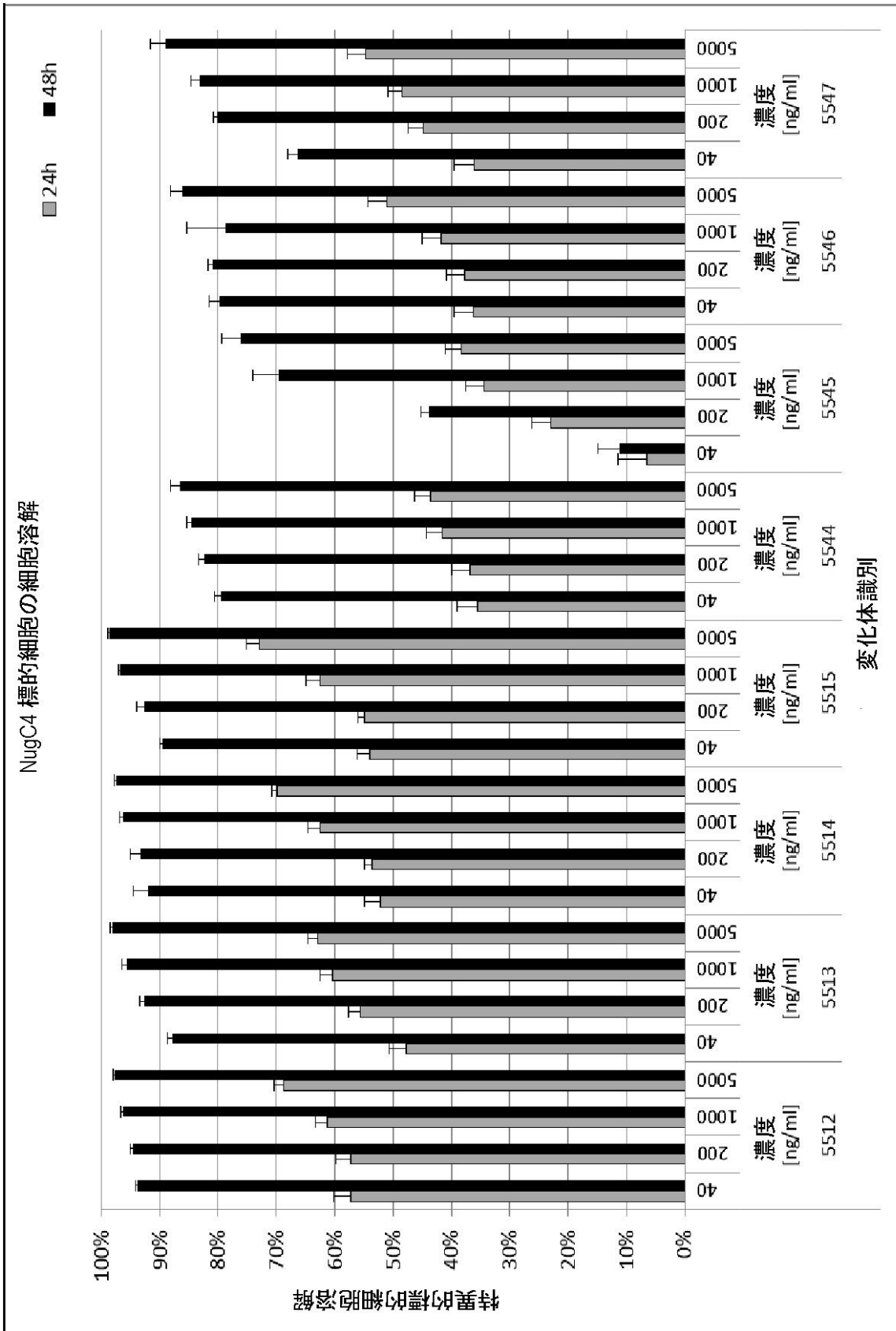


レーン	サンプル
1	タンパク質標準
2	模擬 ctrl SN
3	SN 中の ctrl BiMAB
4	SN 中の 6RHU3
5	0.1 μ g の精製 6PHU3 タンパク

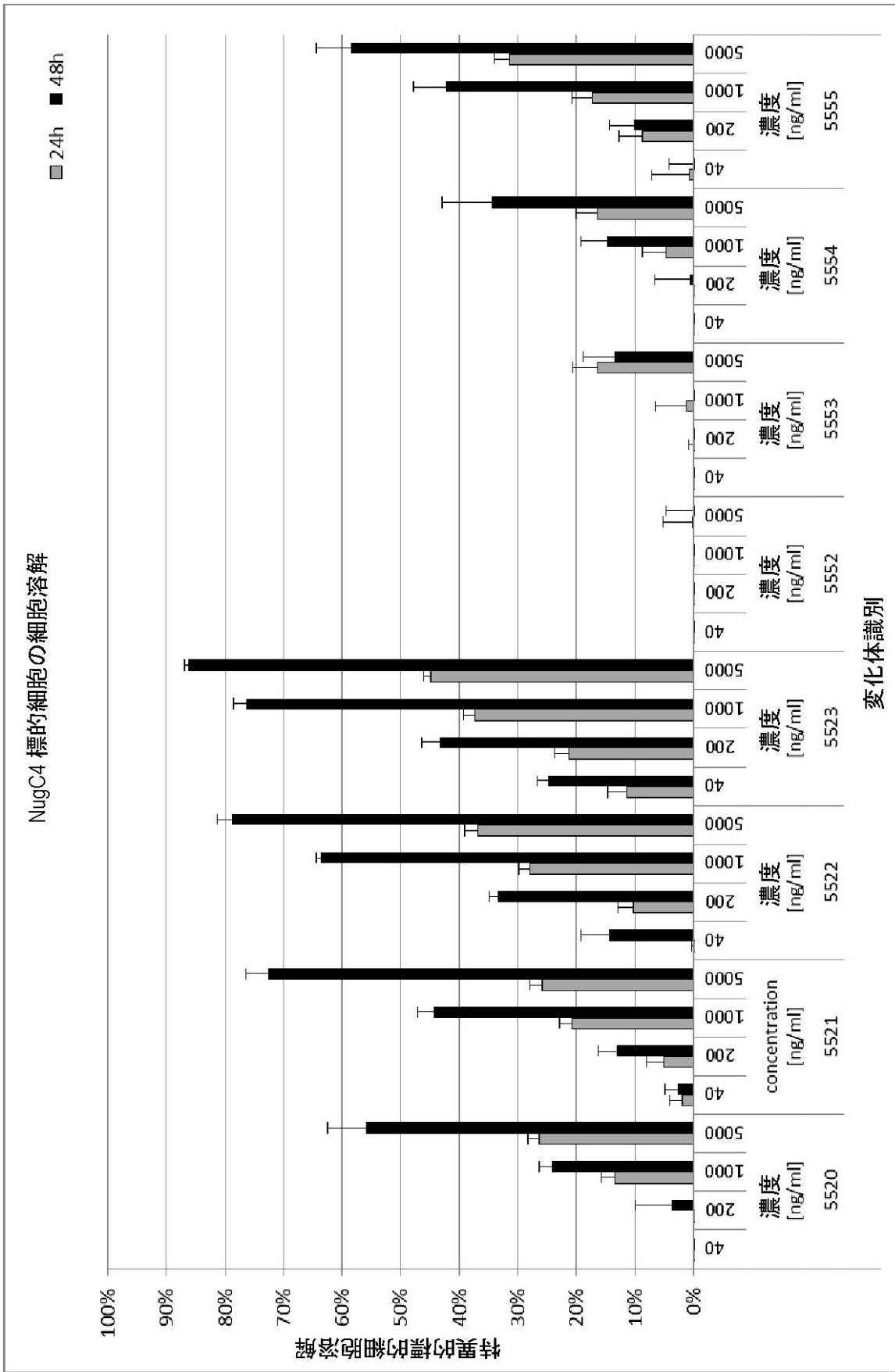
【 図 3 9 A 】



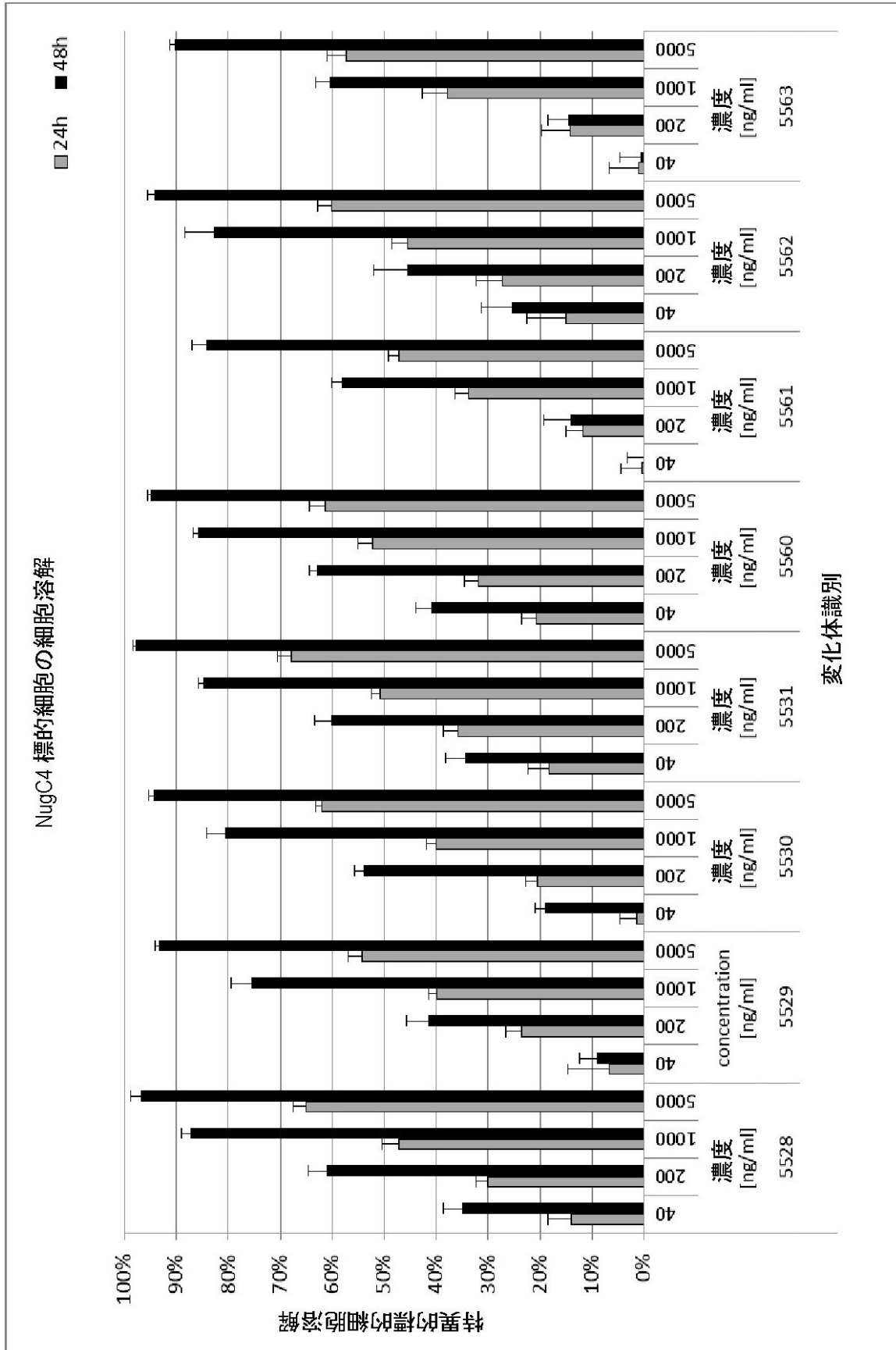
【図 39B】



【 図 3 9 C 】



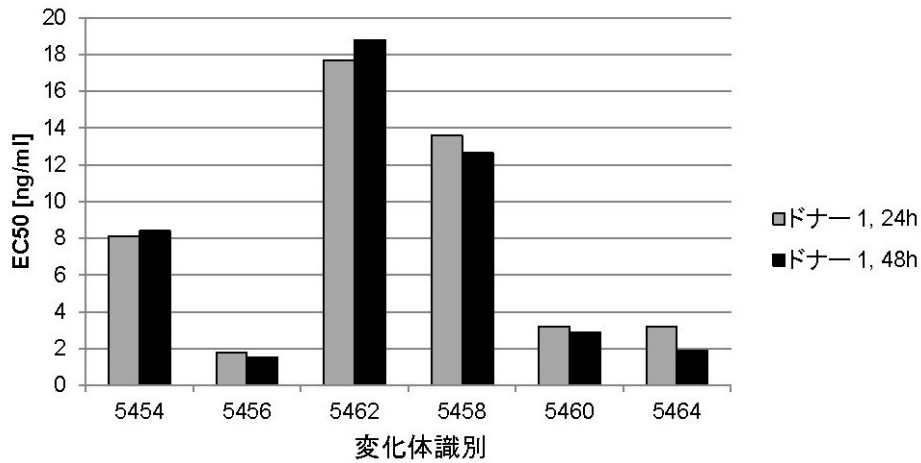
【図 3 9 D】



【 図 4 0 】

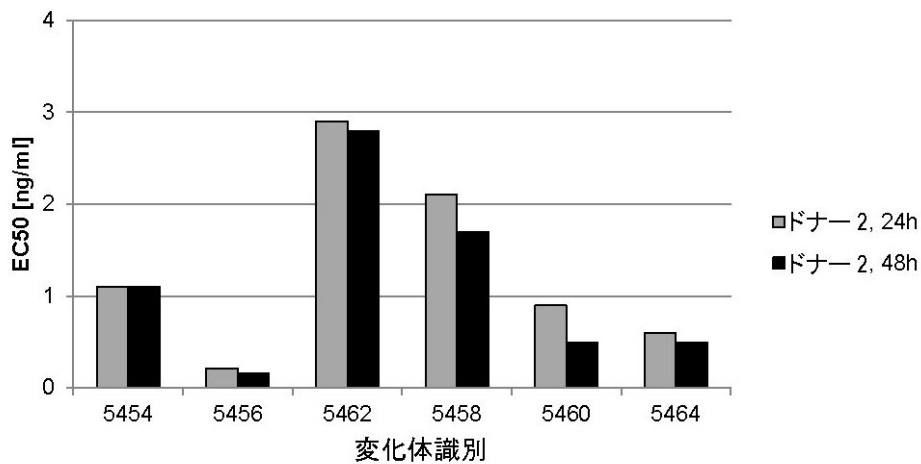
A

抗 CLDN6bi-scFv タンパク質を用いるルシフェラーゼ
細胞傷害性アッセイで得られる EC50 値のアッセイ内比較



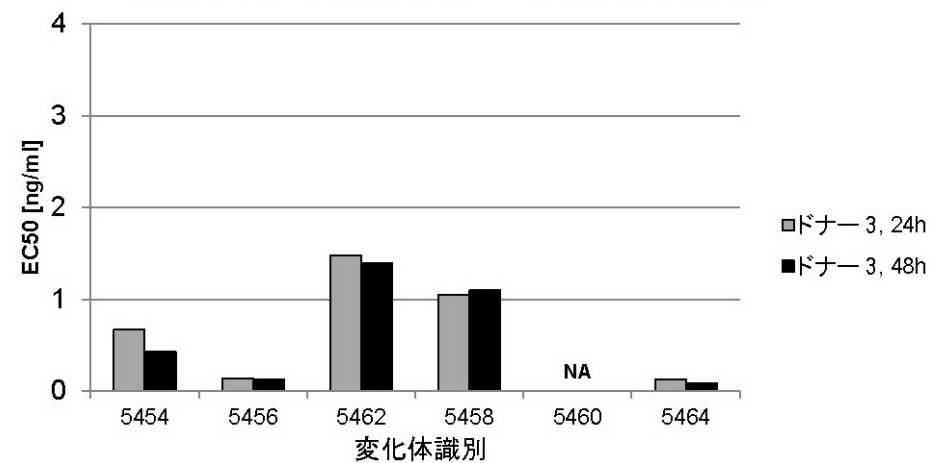
B

抗 CLDN6bi-scFv タンパク質を用いるルシフェラーゼ
細胞傷害性アッセイで得られる EC50 値のアッセイ内比較



C

抗 CLDN6bi-scFv タンパク質を用いるルシフェラーゼ
細胞傷害性アッセイで得られる EC50 値のアッセイ内比較



【 配 列 表 】

2016500059000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/003399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAHIN UGUR ET AL: "Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 23, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 7624-7634, XP002588324, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1547 the whole document ----- -/--	1-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 February 2014		Date of mailing of the international search report 13/02/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, Inge

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/003399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHAD MAY ET AL: "Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 84, no. 9, 25 July 2012 (2012-07-25), pages 1105-1112, XP055071310, ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/j.bcp.2012.07.011 page 1108 - page 1109</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-38
Y	<p>KERSTIN FORTMÜLLER ET AL: "Effective targeting of prostate cancer by lymphocytes redirected by a PSMA * CD3 bispecific single-chain diabody", PROSTATE, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 71, no. 6, 14 October 2010 (2010-10-14), pages 588-596, XP002648688, ISSN: 0270-4137, DOI: 10.1002/PROS.21274 [retrieved on 2010-10-13] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-38
Y	<p>PENNA ET AL: "Antitumor x anti-CD3 bifunctional antibodies redirect T-cells activated in vivo with staphylococcal enterotoxin B to neutralize pulmonary metastases.", CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 10, 1 May 1994 (1994-05-01), pages 2738-2743, XP055071351, ISSN: 0008-5472 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-38
Y	<p>THORSTEN KLAMP ET AL: "Highly Specific Auto-Antibodies against Claudin-18 Isoform 2 Induced by a Chimeric HBcAg Virus-Like Particle Vaccine Kill Tumor Cells and Inhibit the Growth of Lung Metastases", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US; BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 71, no. 2, 15 January 2011 (2011-01-15), pages 516-527, XP002678744, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2292 [retrieved on 2011-01-11] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-38

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/003399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M LAL-NAG ET AL: "Claudin-6: a novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer", ONCOGENESIS, vol. 1, no. 11, 1 November 2012 (2012-11-01), page e33, XP055071624, DOI: 10.1038/oncsis.2012.32 abstract -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/003399

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
	G 0 1 N 33/531	A

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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

(71) 出願人 504346260

ガニメド ファーマシューティカルズ アーゲー

ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アン デア ゴルトグルーベ 1 2

An der Goldgrube 12 55131 Mainz Germany

(71) 出願人 515123258

トロン - トランスラショナル オンコロジー アン デア ウニヴェリジテーツメディツィン

デア ヨハネス グーテンベルク - ウニヴェルシテート マインツ ゲマインニューツィゲ ゲー
エムベーハー

TRON - Translationale Onkologie an der Univer
sitaetsmedizin der Johannes Gutenberg - Univer
sitaet Mainz gemeinnuetzige GmbH

ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ フライリグラートシュトラッセ 1 2

Freiligrathstr. 12 55131 Mainz Germany

(74) 代理人 100110928

弁理士 速水 進治

(72) 発明者 サヒン, ウグル

ドイツ連邦共和国 5 5 1 1 6 マインツ フィリップ - フォン - ツァベルン - ブラッツ 1

(72) 発明者 テューレヒ, エズレム

ドイツ連邦共和国 5 5 1 1 6 マインツ フィリップ - フォン - ツァベルン - ブラッツ 1

(72) 発明者 シュタドラー, クリステアアーネ

ドイツ連邦共和国 6 4 6 2 5 ベンスハイム フリッツ - バッキアス - シュトラッセ 1 3

(72) 発明者 ホラント, ユリア

ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 2 マインツ アグネス - カール - シュトラッセ 3

(72) 発明者 ベーア - マハムッド, ハヤツ

ドイツ連邦共和国 6 5 1 9 7 ヴィースバーデン リューデスハイマー シュトラッセ 2 3

(72) 発明者 バイセルト, ティム

ドイツ連邦共和国 6 4 5 2 1 グロース - ゲーラウ エーディット - シュタイン - ヴェーク 4

(72) 発明者 プリューム, ラウラ

ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 2 マインツ フリッツ - コール - シュトラッセ 3 デー

(72) 発明者 ル ガール, ファブリス

ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 2 マインツ ゴンスバッハブリック 2 9

(72)発明者 イエンドレッキ, アルネ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 4 6 マインツ - コストハイム ハウプトシュトラッセ 1 6 3

(72)発明者 フィードラー, マルクス

ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレ アン デア ザーレ クロイツヴォルヴェルク 6 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA12 DA02 EA04 GA11

4B065 AA90X AB01 AB04 BA01 CA44

4C084 AA13 NA14 ZB262

4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	一种治疗表达密蛋白的癌症疾病的药剂		
公开(公告)号	JP2016500059A	公开(公告)日	2016-01-07
申请号	JP2015542186	申请日	2013-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	加尼梅德药物公司 特隆变压器RATIONAL肿瘤安德森Auni帆迪哲媒体寻德古腾堡海胆威赛施他特茨杰玛酒店新梓格格EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	生物NA-科技股份有限公司 Ganimedo制药公司 特隆 - 变压器RATIONAL肿瘤德海胆帆迪哲媒体寻德古腾堡 - 海胆维西利亚施他恩茨杰玛酒店新梓获得有限公司		
[标]发明人	サヒンウグル テューレヒエズレム シュタドラークリスティアーネ ホラントユリア ベアーアマムッドハヤツ バイセルトティム プリュームラウラ ルギャルフアブリス イエンドレツキアルネ フィードラーマルクス		
发明人	サヒン, ウグル テューレヒ, エズレム シュタドラー, クリスティアーネ ホラント, ユリア ベアー-マムッド, ハヤツ バイセルト, ティム プリューム, ラウラ ルギャル, ファブリス イエンドレツキ, アルネ フィードラー, マルクス		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/15 A61K39/395 A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7105 G01N33/531		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/04 C07K16/28 C07K16/2809 C07K2317/31 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/74 A61K39/39558 C07K16/30 A61K2039/505		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N1/15 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7105 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA01 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	速水SusumuOsamu		
优先权	PCT/EP2012/004712 2012-11-13 WO PCT/EP2013/002270 2013-07-30 WO		

摘要(译)

本发明提供了一种结合剂，其含有对CD3具有特异性的结合域，该结合域允许与T细胞结合，以及对与肿瘤相关的claudin分子具有特异性的结合域，以及提供了使用结合剂或编码结合剂的核酸来治疗癌症的方法。

(21) 出願番号 特願2015-542186 (P2015-542186)
(86) (22) 出願日 平成25年11月12日 (2013.11.12)
(85) 翻訳文提出日 平成27年7月13日 (2015.7.13)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/003399
(87) 国際公開番号 WO2014/075788
(87) 国際公開日 平成26年5月22日 (2014.5.22)
(31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/004712
(32) 優先日 平成24年11月13日 (2012.11.13)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 PCT/EP2013/002270
(32) 優先日 平成25年7月30日 (2013.7.30)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509146023
バイオエヌテック アーゲー
BioNTech AG
ドイツ連邦共和国 55131 マインツ
アン テル ゴールドグルーベ 12
An der Goldgrube 12
55131 Mainz German
y