(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2017-533705
(P2017-533705A)
(43)公表日　平成29年11月16日(2017.11.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 39 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-523213 (P2017-523213)
(86)(22)出願日　平成27年11月3日 (2015.11.3)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月28日 (2017.4.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/058719
(87)国際公開番号　WO2016/073406
(87)国際公開日　平成28年5月12日 (2016.5.12)
(31)優先権主張番号　62/075,571
(32)優先日　平成26年11月5日 (2014.11.5)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　594197872
イーライ　リリー　アンド　カンパニー
アメリカ合衆国　インディアナ州　４６２８５　インディアナポリス　リリー　コーポレイト　センター　（番地なし）
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＴＮＦ－／抗ＩＬ－２３二重特異性抗体

(57)【要約】
腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）およびインターロイキン－２３のｐ１９サブユニット（ＩＬ－２３ｐ１９）に結合し、ＴＮＦαおよびＩＬ－２３の両方に対する高親和性および強い同時中和特性を有すると特徴付けられる二重特異性抗体が提供される。本発明の二重特異性抗体は、クローン病および潰瘍性大腸炎などの、炎症性腸疾患、体軸性脊椎関節症、リウマチ性関節炎および乾癬性関節炎を含めた種々の自己免疫性疾患を治療するために有用である。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩＬ－２３のｐ１９サブユニット（ＩＬ２３ｐ１９）に結合する２つの単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にコンジュゲートした腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）に結合する免疫グロブリンＧ抗体（ＩｇＧ）を含む二重特異性抗体であって、
ａ．）前記ＩｇＧが、２つの重鎖（ＨＣ）および２つの軽鎖（ＬＣ）を含み、それぞれのＨＣが、重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ）１～３を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ１）を含み、それぞれのＬＣが、軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ）１～３を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ１）を含み、ＨＣＤＲ１のアミノ酸配列が、配列番号９であり、ＨＣＤＲ２のアミノ酸配列が、配列番号１０であり、ＨＣＤＲ３のアミノ酸配列が、配列番号１１であり、ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列が、配列番号１５であり、ＬＣＤＲ２のアミノ酸配列が、配列番号１６であり、ＬＣＤＲ３のアミノ酸配列が、配列番号１７であり、かつ
ｂ．）それぞれのｓｃＦｖが、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を含み、ＨＣＶＲ２がＨＣＤＲ４～６を含み、ＬＣＶＲ２がＬＣＤＲ４～６を含み、ＨＣＤＲ４のアミノ酸配列が、配列番号１２であり、ＨＣＤＲ５のアミノ酸配列が、配列番号１３であり、ＨＣＤＲ６のアミノ酸配列が、配列番号１４であり、ＬＣＤＲ４のアミノ酸配列が、配列番号１８であり、ＬＣＤＲ５のアミノ酸配列が、配列番号１９であり、ＬＣＤＲ６のアミノ酸配列が、配列番号２０であり、
それぞれのｓｃＦｖが、それぞれのＩｇＧ　ＨＣのＣ末端およびそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のＮ末端に共有結合しているポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して独立に前記ＩｇＧ抗体にコンジュゲートし、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２が、ＨＣＶＲ２のＣ末端および同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２に共有結合している、二重特異性抗体。
【請求項２】
それぞれのＨＣのＨＣＶＲ１のアミノ酸配列が、配列番号５であり、それぞれのＬＣのＬＣＶＲ１のアミノ酸配列が、配列番号７であり、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号６であり、それぞれのｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号８である、請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項３】
それぞれのＨＣのアミノ酸配列が、配列番号２３であり、それぞれのＬＣのアミノ酸配列が、配列番号２であり、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号６であり、それぞれのｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号８であり、Ｌ１のアミノ酸配列が、配列番号２１であり、Ｌ２のアミノ酸配列が、配列番号２２である、請求項１～２のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の１つのＨＣ、１つのｓｃＦｖ、１つのポリペプチドリンカーおよび１つの第２のポリペプチドリンカーを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ分子。
【請求項５】
前記コードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号１である、請求項４に記載のＤＮＡ分子。
【請求項６】
請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の１つのＬＣを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ分子。
【請求項７】
前記コードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号２である、請求項６に記載のＤＮＡ分子。
【請求項８】
請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の

（ｉ）１つのＨＣ、１つのｓｃＦｖ、１つのポリペプチドリンカーおよび１つの第２のポリペプチドリンカーを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列と、
（ｉｉ）１つのＬＣを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列と
を含むＤＮＡ分子。
【請求項９】
前記１つのＨＣ、１つのｓｃＦｖ、１つのポリペプチドリンカーおよび１つの第２のポリペプチドリンカーを含むコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号１であり、前記１つのＬＣを含むコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号２である、請求項８に記載のＤＮＡ分子。
【請求項１０】
請求項４～９のいずれか一項に記載のＤＮＡ分子を含む哺乳動物細胞。
【請求項１１】
前記細胞が、請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を発現することができる、請求項１０に記載の哺乳動物細胞。
【請求項１２】
ａ）前記二重特異性抗体が発現されるような条件下で請求項１０に記載の哺乳動物細胞を培養するステップと、
ｂ．）前記発現された二重特異性抗体を回収するステップと
を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を産生するためのプロセス。
【請求項１３】
請求項１２に記載のプロセスによって産生された二重特異性抗体。
【請求項１４】
請求項１～３のいずれか一項に記載の治療的有効量の二重特異性抗体をそれを必要とする患者に投与するステップを含む、潰瘍性大腸炎またはリウマチ性関節炎を治療する方法。
【請求項１５】
請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体および１種または複数の薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物。
【請求項１６】
潰瘍性大腸炎の治療のための薬物の製造における請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。
【請求項１７】
リウマチ性関節炎の治療のための薬物の製造における請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。
【請求項１８】
療法において使用するための請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項１９】
潰瘍性大腸炎の治療において使用するための請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項２０】
リウマチ性関節炎の治療において使用するための請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、医薬品の分野、具体的には腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）およびインターロイキン－２３（ＩＬ－２３）に対する二重特異性抗体の新規分野に属する。本発明の二重特異性抗体は、クローン病（ＣＤ）および潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、体軸性脊椎関節症（Ａｘｉａｌ　Ｓｐｏｎｄｙｌｏａｒｔｈｒｏｐａｔｈｙ）（ＡｘＳｐＡ）、リウマチ性

関節炎（ＲＡ）および乾癬性関節炎（ＰｓＡ）などの、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）を含めた自己免疫性疾患を治療することにおいて有用と期待されている。

【背景技術】

【０００２】

自己免疫性疾患は、その自らの組織に対する免疫反応の身体の産生から生じる。自己免疫性疾患は、しばしば慢性であり、衰弱性および生命にさえ関わる場合がある。一般にはＣＤおよびＵＣなどの障害の群を意味する、ＩＢＤは、腸管の炎症および上皮損傷によって病理学的に特徴付けられる一般的な慢性再発性自己免疫性疾患である。ＲＡ、ＡｘＳｐＡおよびＰｓＡなどの、慢性自己免疫性疾患の他の形態は、軸および／または末梢骨格に影響し得る。

【０００３】

インターロイキン２３（ＩＬ－２３）は、慢性炎症の誘発のために必要な様々な炎症性細胞の活性化において重要であると考えられているヘテロ二量体サイトカインである。ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－２２分泌の上流調節因子である、ＩＬ－２３は、ｐ４０サブユニットに共有結合的に対をなしたｐ１９サブユニット（ＩＬ２３ｐ１９）から構成される（ｐ４０サブユニットは、サイトカインＩＬ－１２と共有される）。さらに、ＩＬ－２３は、記憶／病原性Ｔ細胞炎症性反応の両方における重要な役割を果たすことならびに自然リンパ球炎症活性の調節における役割を果たすことに関係があるとされている。サイトカインＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－２２のＩＬ－２３調節が、ＩＢＤ、ＲＡおよび他の自己免疫性疾患を含めた炎症性疾患と関連することの証拠がある。

【０００４】

腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）は、単球およびマクロファージによって主に分泌される多面的ホモ三量体サイトカインであるが、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$末梢血Ｔリンパ球によって産生されることも既知である。ＴＮＦαは、可溶型および膜貫通型の両方で発現される（膜結合前駆体型は、メタロプロテイナーゼＴＮＦアルファ変換酵素（ＴＡＣＥ））によって可溶性ホモ三量体にタンパク質分解開裂され得る）。ＴＮＦαは、免疫細胞の調節において役割を果たし、全身性炎症、具体的には急性期炎症性反応において重要であると考えられている。過量のＴＮＦαは、ＲＡ、ＣＤおよび乾癬を含めた、自己免疫性疾患の種々の形態と関連付けられている。

【０００５】

ＩＢＤなどの自己免疫性疾患のための現在ＦＤＡに認可された治療には、しばしば急性炎症を治療するために用いられる、コルチコステロイド、およびバイオプロダクト（ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）が含まれ、その多く（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（登録商標）、ＥＮＢＲＥＬ（登録商標）およびＨＵＭＩＲＡ（登録商標）など）が、体内のＴＮＦαを標的とし、中和することを試みる。ＰｓＡの治療のための認可された別のバイオプロダクトには、サイトカインＩＬ－１２およびＩＬ－２３の共有されているｐ４０サブユニットを標的にすることを試みるＳＴＥＬＡＲＡ（登録商標）が含まれる。現在の治療は、患者の一部において症状を減少することおよび幾つかの自己免疫性疾患の進行を遅らせることに関する有効性を実証している。しかしながら、大部分の患者は、現在利用できる治療に非反応性である（例えば、緩解の誘発は、ＴＮＦα中和で治療されたＣＤ患者の３０～５０％でのみ発生し、ＴＮＦα中和に対する反応の消失は、治療後の１２か月に患者の２３から４６％で発生する）。したがって、ＩＢＤ（ＣＤおよびＵＣなど）、ＲＡ、ＡｘＳｐＡおよびＰｓＡを含めた、自己免疫性疾患の治療のための代替療法の必要性は依然として存在する。好ましくは、こうした代替療法は、現在利用できる治療に対して非反応性の患者の大部分において有効性を実証する能力があるであろう。

【０００６】

こうした代替療法に対する１つのアプローチには、２種の異なるバイオプロダクト（例えば、抗体）の同時投与が含まれ得る。同時投与は、２種の別個の製品の注入または２種の異なる抗体の同時配合の単回注入のいずれかを必要とする。２回の注入は、用量および

タイミングの柔軟性を可能にする一方で、患者に対しては服用遵守および痛みの両方について不都合である。さらには、同時配合は、用量のいくらかの柔軟性を提供し得る一方で、（比較的高濃度の）溶液において許容可能な粘度を有する配合条件を見出すことならびに２種の抗体の異なる分子特性が原因で両方の抗体の化学的および物理的安定性を可能にすることは、多くの場合かなり困難または不可能である。さらには、同時投与および同時配合は、患者および／または支払人コストを増加し得る２種の異なる薬剤療法の添加剤コストを必要とする。したがって、自己免疫性疾患の治療のための代替療法の必要性は依然として存在し、好ましくはこうした代替療法は、二重特異性抗体を含むであろう。

【０００７】

特許文献１は、ＴＮＦα標的に対する抗原結合部位およびＩＬ２３／ＩＬ１２標的に対する抗原結合部位（例えば、共有されているｐ４０サブユニット）との交差二重可変（「ＣＯＤＶ」）構造を有する抗体様結合タンパク質を開示している。特許文献２は、多発性硬化症などの自己免疫性疾患の治療において有用なＩＬ－２３のｐ１９サブユニットに対する抗体を開示している。特許文献３は、ヒトＴＮＦαに対するヒト抗体を開示している。特許文献４は、ＣＤ、ＲＡ、ＰｓＡ、ＡｘＳｐＡおよび乾癬のための抗ＴＮＦαおよび抗ＩＬ－２３ｐ４０抗体の同時投与、および同時配合の方法を開示している。これらの開示にもかかわらず、具体的にはＴＮＦαおよびＩＬ－２３のｐ１９サブユニットの両方に結合および中和する高親和性中和二重特異性抗体は、これらの出願のいずれにも記載されていなかった。

【０００８】

さらに、本発明の二重特異性抗体を構築するときの化学的および物理的安定性と関連する重大な問題に直面した。全て両方の標的抗原、ＴＮＦαおよびＩＬ－２３のｐ１９サブユニット、それぞれについて結合親和力を維持しながら、物理的に安定な分子を発現すること、単鎖フラグメント可変領域（ｓｃＦｖ）のＶＨ／ＶＬ境界面を安定化させること、熱および塩依存性の安定性を増加させること、凝集を減少させること、高濃度での溶解性を増加させること、ならびに二重特異性抗体の結合表面における静電気分布を再調整することなどの、無数の課題を十分に克服するために出発二重特異性抗体において多くの変更が必要とされた。

【０００９】

したがって、二重特異性抗体が、特にヒトＩＬ－２３のｐ１９サブユニットを標的にし、特に（共通のｐ４０サブユニットをＩＬ－２３と共有する）ＩＬ－１２を中和しない、ヒトＴＮＦαおよびヒトＩＬ－２３の両方を中和する単一の二重特異性抗体の必要性がまだ存在する。熱的に安定であり、物理的に安定であり、低凝集を示し、ヒトＴＮＦαおよびヒトＩＬ２３ｐ１９を中和する二重特異性抗体を提供することは、望ましい。ヒトＴＮＦαおよびヒトＩＬ２３ｐ１９の両方を中和し、それによって２種の異なる、別個の抗体の異なる分子特性を満足させなければならない配合条件を見つける難題を回避する単一の二重特異性抗体を含む医薬組成物を提供することも望ましい。本発明は、したがって上述の問題のうちの１つまたは複数に対処することを探る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】米国特許公報第２０１２／０２５１５４１（Ａ１）号
【特許文献２】米国特許第７，８７２，１０２号
【特許文献３】米国特許第６，０９０，３８２号
【特許文献４】国際公開第２０１１／０７０３３９号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明は、ＩＬ－２３のｐ１９サブユニット（ＩＬ２３ｐ１９）に結合する２つの単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にコンジュゲートした腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）

に結合する免疫グロブリンＧ抗体（ＩｇＧ）を有する二重特異性抗体を提供する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＩｇＧは、それぞれ重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１～３を備えた重鎖可変領域（ＨＣＶＲ１）を有するＨＣおよびそれぞれ軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１～３を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ１）を有するＬＣである、２つの重鎖（ＨＣ）および２つの軽鎖（ＬＣ）を有する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣＤＲ１のアミノ酸配列は、配列番号９であり、ＨＣＤＲ２のアミノ酸配列は、配列番号１０であり、ＨＣＤＲ３のアミノ酸配列は、配列番号１１であり、ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列は、配列番号１５であり、ＬＣＤＲ２のアミノ酸配列は、配列番号１６であり、ＬＣＤＲ３のアミノ酸配列は、配列番号１７である。本発明の二重特異性抗体のｓｃＦｖは、ＨＣＤＲ４～６を備えた、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）、およびＬＣＤＲ４～６を備えた軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を有する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣＤＲ４のアミノ酸配列は、配列番号１２であり、ＨＣＤＲ５のアミノ酸配列は、配列番号１３であり、ＨＣＤＲ６のアミノ酸配列は、配列番号１４であり、ＬＣＤＲ４のアミノ酸配列は、配列番号１８であり、ＬＣＤＲ５のアミノ酸配列は、配列番号１９であり、ＬＣＤＲ６のアミノ酸配列は、配列番号２０である。さらには、本発明の二重特異性抗体は、それぞれのＩｇＧ　ＨＣのＣ末端およびそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のＮ末端に共有結合したポリペプチドリンカー（リンカー１（Ｌ１））を介して独立にＩｇＧ抗体にコンジュゲートしたそれぞれのｓｃＦｖを有する。さらには、本発明の二重特異性抗体は、ＨＣＶＲ２のＣ末端および同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している第２のポリペプチドリンカー（リンカー２（Ｌ２））を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２に共有結合しているそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２を有する。本発明の二重特異性抗体によれば、Ｌ１のアミノ酸配列は配列番号２１であり、Ｌ２のアミノ酸配列は配列番号２２である。

【００１２】

本発明は、ＩＬ２３ｐ１９に結合する２つのｓｃＦｖにコンジュゲートしたＴＮＦαに結合するＩｇＧであって、ＩｇＧが、それぞれ重鎖可変領域（ＨＣＶＲ１）を有する重鎖およびそれぞれ軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ１）を有する軽鎖である、２つの重鎖および２つの軽鎖を有する、二重特異性抗体も提供する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣＶＲ１のアミノ酸配列は、配列番号５であり、ＬＣＶＲ１のアミノ酸配列は、配列番号７である。さらには、それぞれのｓｃＦｖは、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を有する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣＶＲ２のアミノ酸配列は、配列番号６であり、ＬＣＶＲ２のアミノ酸配列は、配列番号８である。さらには、それぞれのｓｃＦｖは、それぞれのＩｇＧ　ＨＣのＣ末端およびそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のＮ末端に共有結合しているポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して独立にＩｇＧ抗体にコンジュゲートされている。さらには、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２は、ＨＣＶＲ２のＣ末端および同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２に共有結合している。

【００１３】

本発明は、ＩｇＧが２つのＨＣおよび２つのＬＣを有する、ＩＬ２３ｐ１９に結合する２つのｓｃＦｖにコンジュゲートしているＴＮＦαに結合するＩｇＧを有する二重特異性抗体をさらに提供する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号２３であり、ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号２である。さらには、それぞれのｓｃＦｖは、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を有する。本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣＶＲ２のアミノ酸配列は、配列番号６であり、ＬＣＶＲ２のアミノ酸配列は、配列番号８である。さらには、それぞれのｓｃＦｖは、それぞれのＩｇＧ　ＨＣのＣ末端およびそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のＮ末端に共有結合しているポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して独立にＩｇＧ抗体にコンジュゲートされている。さらには、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２は、ＨＣＶＲ２のＣ末端および同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２に共有結合している。本発明の二重特異性抗体によれ

ば、Ｌ１のアミノ酸配列は、配列番号２１であり、Ｌ２のアミノ酸配列は、配列番号２２である。

【００１４】

例示された本発明の二重特異性抗体の種々の領域およびリンカーの関係は、以下の通りである（アミノ酸の番号付けは、直線的番号付けを適用し、可変ドメインへのアミノ酸の割り当ては、ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇで利用可能なＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（登録商標）に基づき、ＣＤＲドメインへのアミノ酸の割り当ては、表１に反映されている通りよく知られているＫａｂａｔおよびＮｏｒｔｈ番号付け規則に基づく）。

【表１】

表1:本発明の例示された二重特異性抗体のアミノ酸領域

配列番号1			配列番号2		
HCVR1 TNFα	領域	位置	LCVR1 TNFα	領域	位置
	FRH1－1	1－22		FRL1－1	1－23
	HCDR1	23－35		LCDR1	24－34
	FRH1－2	36－49		FRL1－2	35－48
	HCDR2	50－66		LCDR2	49－56
	FRH1－3	67－96		FRL1－3	57－88
	HCDR3	97－110		LCDR3	89－97
	FRH1－4	111－121		FRL1－4	98－107
定常	CH	122－449	定常	CL	108－214
リンカー	L1	450－464			
HCVR2 IL－23	FRH2－1	465－486			
	HCDR4	487－499			
	FRH2－2	500－513			
	HCDR5	514－530			
	FRH2－3	531－560			
	HCDR6	561－568			
	FRH2－4	569－579			
リンカー	L2	580－599			
LCVR2 IL－23	FRL2－1	600－622			
	LCDR4	623－633			
	FRL2－2	634－647			
	LCDR5	648－655			
	FRL2－3	656－687			
	LCDR6	688－696			
	FRL2－4	697－706			

CDR	開始アミノ酸位置定義	末端アミノ酸位置定義
HCDR1	North	Kabat
HCDR2	Kabat	Kabat
HCDR3	North	Kabat
HCDR4	North	Kabat
HCDR5	Kabat	Kabat
HCDR6	North	Kabat
LCDR1	Kabat	Kabat
LCDR2	North	Kabat
LCDR3	Kabat	Kabat
LCDR4	Kabat	Kabat
LCDR5	North	Kabat
LCDR6	Kabat	Kabat

【００１５】

本発明は、ＨＣのそれぞれが、ＬＣのそれぞれと鎖間ジスルフィド結合を形成し、ＨＣ

のそれぞれが、もう一方のＨＣと鎖間ジスルフィド結合を形成し、ｓｃＦｖのそれぞれが、ＨＣＶＲ２とＬＣＶＲ２との間の鎖内ジスルフィド結合を形成する、二重特異性抗体をさらに提供する。表１に示されている例示された本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣのそれぞれおよびＬＣのそれぞれの鎖間ジスルフィド結合が、ＨＣの（配列番号１の）システイン残基１４８と、ＬＣの（配列番号２の）システイン残基２１４との間に形成し、ＨＣの（配列番号１の）システイン残基２３０ともう一方のＨＣのシステイン残基（配列番号１の）２３０との間に形成している第１の鎖間ジスルフィド結合、ＨＣの（配列番号１の）システイン残基２３３ともう一方のＨＣ（配列番号１の）システイン残基２３３との間に形成している第２の鎖間ジスルフィド結合である、少なくとも２つの鎖間ジスルフィド結合が２つのＨＣ間に形成し、ｓｃＦｖの鎖内ジスルフィド結合が、ＨＣＶＲ２の（配列番号１の）システイン残基５０８とＬＣＶＲ２の（配列番号１の）システイン残基６９９との間に形成される。

【００１６】

本発明の一部の実施形態によれば、ＨＣのグリコシル化を含む二重特異性抗体が提供される。表１に示されている例示された本発明の二重特異性抗体によれば、ＨＣのグリコシル化は、配列番号１のアスパラギン残基３０１において生じる。

【００１７】

本発明は、本発明の二重特異性抗体のＨＣ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ分子も提供する。本発明の実施形態によれば、コードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号１である。

【００１８】

本発明は、本発明の二重特異性抗体のＬＣを含む第２のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ分子も提供する。本発明の実施形態によれば、第２のコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号２である。

【００１９】

本発明は、本発明の二重特異性抗体のＨＣ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含み、本発明の二重特異性抗体のＬＣを含む第２のポリペプチド鎖をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ分子も提供する。本発明の実施形態によれば、ＨＣ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含むコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号１であり、配列番号３のＤＮＡ配列を含有する発現ベクターは、ポリペプチド鎖をコードする。同様に、本発明の実施形態によれば、第２のコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号２であり、配列番号４のＤＮＡ配列を含有する発現ベクターは、第２のポリペプチド鎖をコードする。

【００２０】

本発明は、細胞が、本発明の二重特異性抗体であって、ＩＬ２３ｐ１９に結合する２つのｓｃＦｖにコンジュゲートしたＴＮＦαに結合するＩｇＧを含む前記二重特異性抗体を発現することができる、本発明のＤＮＡ分子を含む哺乳動物細胞も提供する。

【００２１】

本発明は、細胞が、本発明の二重特異性抗体であって、ＩＬ２３ｐ１９に結合する２つのｓｃＦｖにコンジュゲートしたＴＮＦαに結合するＩｇＧを含む前記二重特異性抗体を発現することができる、本発明のＤＮＡ分子（１種または複数）で形質転換された哺乳動物細胞も提供する。

【００２２】

本発明は、本発明の二重特異性抗体を産生するプロセスであって、二重特異性抗体が発現されるような条件下で本発明の哺乳動物細胞を培養すること、および発現された二重特異性抗体を回収することを含むプロセスも提供する。本発明は、前記プロセスによって産生された本発明による二重特異性抗体も提供する。

【００２３】

本発明は、それを必要とする患者に有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含む自己免疫性疾患を治療する方法も提供する。

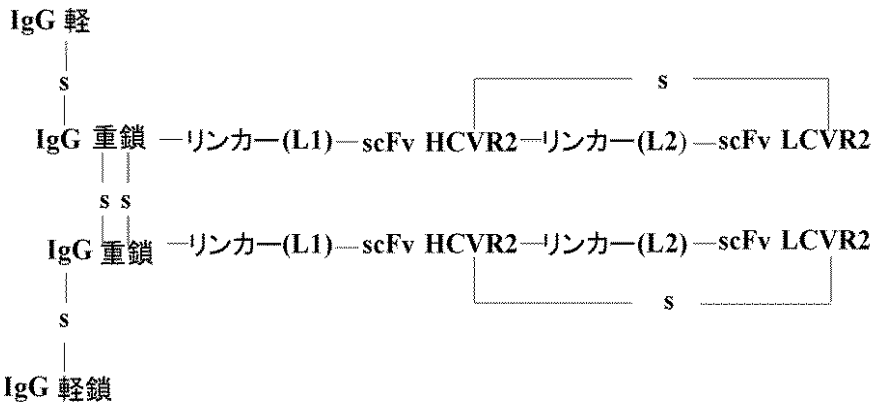
【００２４】
本発明は、それを必要とする患者に治療的有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含む、ＣＤおよびＵＣなどの、ＩＢＤを治療する方法も提供する。
【００２５】
本発明は、それを必要とする患者に治療的有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含むＲＡ、ＡｘＳｐＡおよびＰｓＡを治療する方法も提供する。
【００２６】
本発明は、療法において使用するための本発明の二重特異性抗体も提供する。
【００２７】
本発明は、ＣＤおよびＵＣなどの、ＩＢＤを含めた自己免疫性疾患の治療において使用するための本発明の二重特異性抗体も提供する。
【００２８】
本発明は、ＲＡ、ＡｘＳｐＡおよびＰｓＡを含めた自己免疫性疾患の治療において使用するための本発明の二重特異性抗体も提供する。
【００２９】
本発明は、本発明の二重特異性抗体および１種または複数の薬学的に許容可能な基材、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物も提供する。
【００３０】
本発明の別の実施形態は、潰瘍性大腸炎およびクローン病の治療のための薬物の製造における本発明の二重特異性抗体の使用を含む。
【００３１】
本発明のさらなる実施形態は、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、および体軸性脊椎関節症の治療のための薬物の製造における本発明の二重特異性抗体の使用を含む。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
定義
本明細書において使用される場合「二重特異性抗体」と言う語は、２つの単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にコンジュゲートした免疫グロブリンＧ抗体（ＩｇＧ）を含む分子を指す。本明細書でいう、本発明の二重特異性抗体は、ポリペプチドリンカー（Ｌ１）によってＩｇＧのＨＣのカルボキシ末端に共有結合した１つのｓｃＦｖおよびポリペプチドリンカー（Ｌ１）によってＩｇＧのもう一方のＨＣのカルボキシ末端に共有結合したもう一方のｓｃＦｖを含む。本発明の二重特異性抗体のＩｇＧおよびｓｃＦｖは、具体的には異なる抗原（それぞれ、ＴＮＦαおよびＩＬ－２３のｐ１９サブユニット）に結合する。
【００３３】
本明細書において使用される場合、「免疫グロブリンＧ抗体（ＩｇＧ）」と言う語は、ジスルフィド結合によって相互に接続した２つの重鎖（ＨＣ）および２つの軽鎖（ＬＣ）である、４つのポリペプチド鎖からなる免疫グロブリン分子を指す。４つのポリペプチド鎖のそれぞれのアミノ末端部分は、抗原認識の主な責任を負う約１００～１１０以上のアミノ酸の可変領域を含む。４つのポリペプチド鎖のそれぞれのカルボキシ末端部は、エフェクター機能の主な責任を負う定常領域を画定する。それぞれの重鎖のカルボキシ末端部は、ポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）のうちの１つに共有結合している。
【００３４】
本発明の二重特異性抗体のＩｇＧの軽鎖（ＬＣ）は、カッパまたはラムダに分類され、当技術分野において知られているような特定の定常領域によって特徴付けられる。本発明によるＩｇＧの重鎖（ＨＣ）は、アイソタイプを（例えば、ＩｇＧとして）定義する、ガンマに分類される。アイソタイプは、サブクラス（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、およびIgG_4）にさらに分割され得る。それぞれのＨＣタイプは、当技術分野において既知の特定の定常領域によって特徴付けられる。それぞれのＨＣは、Ｎ末端重鎖可変領域（「ＨＣＶＲ」）および重鎖定常領域（ＣＨ）からなる。本発明による、ＩｇＧのＣ

Ｈは、３つのドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３）からなる。ＩｇＧのそれぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）からなる。ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲ領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる、超可変性の領域、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より一定に保たれた点在する領域にさらに細分され得る。本発明によるＩｇＧのそれぞれのＨＣＶＲおよびＬＣＶＲは、アミノ末端からカルボキシ末端へ次の順序で配列した、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲから構成される：ＦＲ１－１、ＣＤＲ１、ＦＲ１－２、ＣＤＲ２、ＦＲ１－３、ＣＤＲ３、ＦＲ１－４。本明細書においてＨＣの３つのＣＤＲは、「ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３」と呼ばれ、ＬＣの３つのＣＤＲは、「ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３」と呼ばれる。ＣＤＲは、抗原との特異的な相互作用を形成する残基の大部分を含有する。特定の抗原に結合する抗体の機能的能力は、６つのＣＤＲによって大きく影響される。

【００３５】

本明細書でいう、「単鎖可変フラグメント」（ｓｃＦｖ）と言う語は、ポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して接続された重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を含むポリペプチド鎖を指す。さらには、本明細書でいう（かつ次の図面において示されているような）、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２は、ａ．）そのＮ末端において、ポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介してＩｇＧの１つのＨＣのＣ末端に共有結合しており、かつｂ．）そのＣ末端において、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している。さらには、本発明のそれぞれのｓｃＦｖは、（図面において示されているように）同一のポリペプチド鎖のＨＣＶＲ２のシステイン残基とＬＣＶＲ２のシステイン残基との間に形成されたジスルフィド結合を含む。

【化１】



【００３６】

ｓｃＦｖのＨＣＶＲ２およびＬＣＶＲ２は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる、超可変性の領域、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より一定に保たれた散在する領域にさらに細分され得る。本発明によるＩｇＧのそれぞれのＨＣＶＲ２およびＬＣＶＲ２は、アミノ末端からカルボキシ末端へ次の順序で配列した、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからそれぞれ構成される：ＦＲ２－１、ＣＤＲ４、ＦＲ２－２、ＣＤＲ５、ＦＲ２－３、ＣＤＲ６、ＦＲ２－４。本明細書においてｓｃＦｖのＨＣＶＲ２の３つのＣＤＲは、「ＨＣＤＲ４、ＨＣＤＲ５およびＨＣＤＲ６」と呼ばれ、ｓｃＦｖのＬＣＶＲ２の３つのＣＤＲは、「ＬＣＤＲ４、ＬＣＤＲ５およびＬＣＤＲ６」と呼ばれる。ＣＤＲは、抗原との特異的な相互作用を形成する残基の大部分を含有する。特定の抗原に結合するｓｃＦｖの機能的能力は、６つのＣＤＲによって大きく影響される。

【００３７】

本発明によるＩｇＧおよびｓｃＦｖのそれぞれの軽鎖／重鎖対の可変領域は、それぞれ、二重特異性抗体の抗原結合部位を形成する。本発明によれば、ＩｇＧは、同一である（がｓｃＦｖの抗原結合部位とは異なる）２つの抗原結合部位を有し、それぞれのｓｃＦｖ

は、（もう一方のｓｃＦｖの抗原結合部位と同一である）抗原結合部位を有する。本明細書で使用する場合、「抗原結合部分」または「抗原結合部位」または「抗原結合領域」または「抗原結合フラグメント」は区別なく、抗原と相互作用し、二重特異性抗体に抗原に対しての特異性および親和性を与えるアミノ酸残基を含有する、可変領域内の、ＩｇＧまたはｓｃＦｖ分子のその部分を指す。本抗体部分は、抗原結合残基の適切な構造を維持するために必要なフレームワークアミノ酸残基を含む。好ましくは、本発明の二重特異性抗体のフレームワーク領域は、ヒト由来または実質的にヒト由来のものである。

【００３８】

本明細書において区別なく用いられるような、「親抗体（ｐａｒｅｎｔ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」または「親の抗体（ｐａｒｅｎｔａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」は、例えばアミノ酸置換および構造変化による、二重特異性抗体のＩｇＧおよびｓｃＦｖのうちの１つの調製において用いられるアミノ酸配列によってコードされた抗体である。親抗体は、ネズミ、キメラ、ヒト化またはヒト抗体であってよい。

【００３９】

語「Ｋａｂａｔ番号付け」または「Ｋａｂａｔ標識付け」は、本明細書において区別なく用いられる。当技術分野において認められている、これらの語は、抗体の重鎖および軽鎖可変領域における他のアミノ酸残基よりも可変である（すなわち、高度可変性の）アミノ酸残基の番号付けのシステムを指す（Ｋａｂａｔら、Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９０：３８２～９３（１９７１年）、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２（１９９１年））。

【００４０】

語「Ｎｏｒｔｈ番号付け」または「Ｎｏｒｔｈ標識付け」は、本明細書において区別なく用いられる。当技術分野において認められている、これらの語は、抗体の重鎖および軽鎖可変領域における他のアミノ酸残基よりも可変である（すなわち、高度可変性の）アミノ酸残基の番号付けのシステムを指し、少なくともある程度、（Ｎｏｒｔｈら、Ａ Ｎｅｗ Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ＣＤＲ Ｌｏｏｐ Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、４０６：２２８～２５６（２０１１年））に記載のような、多数の結晶構造での親和性伝播クラスタリングに基づく。

【００４１】

本明細書において区別なく用いられる、語「患者」、「対象」、および「個体」は、動物を指し、好ましくは語は、ヒトを指す。特定の実施形態において、対象、好ましくはヒトは、ＩＬ－２３およびＴＮＦαの両方のレベルの減少または生物活性の減少から恩恵を受けるであろう疾患または障害または状態（例えば、自己免疫障害）でさらに特徴付けられる。別の実施形態において対象、好ましくはヒトは、さらにＩＬ－２３およびＴＮＦαの両方のレベルの減少または生物活性の減少から恩恵を受けるであろう障害、疾患または状態を発症する危険にさらされていると特徴付けられる。

【００４２】

二重特異性抗体工学

本発明の二重特異性抗体を構築する際に化学的および物理的安定性と関連する重大な問題に直面した。直面した問題には、発現不十分から発現無し、不十分な精製回収、低い熱安定性、高い塩依存性凝集、ダイアボディ形成（および精製を通して減少するダイアボディにおける課題）、高い溶液粘度、低い結合親和性および交差反応性が含まれた。

【００４３】

例えば、本発明による二重特異性抗体を構築することにおける初期の試みには、親のＩＬ－２３抗体（米国特許第７，８７２，１０２号に記載されているＩＬ－２３抗体）がＩｇＧ抗体部分を含み、親のＴＮＦα抗体（アダリムマブ、例えば米国特許第６，０９０，３８２号を参照）が二重特異性抗体のｓｃＦｖ部分を含む構築物が含まれた。他の初期に

試みられた構築物には、ｓｃＦｖ部分を含む親のＩＬ－２３抗体が含まれた一方でＴＮＦα抗体は、二重特異性抗体のＩｇＧを含んでいた。さらには、初期の構築物には、それぞれ、重鎖および軽鎖の両方についてアミノ末端またはカルボキシル末端におけるものを含めて、種々の構造におけるＩｇＧ部分にコンジュゲートされているｓｃＦｖ部分が含まれた。同様に、初期の構築物には、ＨＣＶＲ２およびＬＣＶＲ２の配列においてさまざまであるｓｃＦｖ部分が含まれた（例えば、ＩｇＧ部分（ＣまたはＮ末端）－リンカー１－ＬＣＶＲ２またはＨＣＶＲ２－リンカー２－ＬＣＶＲ２またはＨＣＶＲ２のもう一方）。さらには、親のＩＬ－２３抗体構築物には、重鎖生殖系列フレームワークＶＨ５－５１および１－６９、ならびに軽鎖生殖系列フレームワークＶＫ０２、ＶＫ１２およびＶＫＢ３の組み合わせが含まれた。親のＴＮＦα抗体構築物には（ＩｇＧ部分を含む場合に）、定常領域（ＣＨ）内に（天然ＩｇＧ４からの）３つのアミノ酸変異を有するＩｇＧ４サブクラス構造が含まれた。初期の構築物は、ヒトＩｇＧ４－Ｆｃ哺乳動物発現ベクターにクローン化された。しかしながら、（上述のような）初期に産生された二重特異性構築物は、上述の１つまたは複数の化学的および／または物理的問題を示した。

【００４４】

二重特異性抗体の静電表面が計算され、帯電部分（ｃｈａｒｇｅｄ　ｐａｔｃｈｅｓ）が特定されて途絶された。広範なタンパク質安定性調査が行われ、構築された二重特異性抗体は熱安定特性ならびに（それぞれの親の抗体と比較して）ＴＮＦおよびＩＬ－２３結合特性に関してスクリーニングされた。

【００４５】

したがって化学的および物理的修正が、本発明の二重特異性抗体の化学的および物理的安定性を改善するためになされた。ｓｃＦｖ構成における、親のＩＬ－２３抗体への修正が、化学的および物理的安定性を改善するためにＨＣＤＲ４、ＨＣＤＲ５、ＬＣＤＲ４、ＬＣＤＲ５およびＬＣＤＲ６においてなされた。構築されたＨＣＶＲおよびＬＣＶＲは、次の式に従ってＩＬ－２３　ｓｃＦｖ構成内に組み合わせられた。ＴＮＦα　ＩｇＧ（Ｃ末端）－Ｌ１－ＨＣＶＲ２－Ｌ２－ＬＣＶＲ２。ＩＬ－２３　ｓｃＦｖの安定化のために、ジスルフィド結合が、ＩＬ－２３　ｓｃＦｖのＨＣＶＲ２（Ｇ５０８Ｃ）とＬＣＶＲ２（Ｇ６９９Ｃ）との間で改変された（アミノ酸の番号付けは、表１に示されている例示された二重特異性抗体に基づいて直線的番号付けを適用する）。さらに、二重特異性抗体のＩｇＧ部分における、親のＴＮＦα抗体が、溶解性および凝集の減少を含めた、改善された生化学的挙動のためにＩｇＧ１サブクラスに改変された。これらの化学的および物理的修正を含む、改変されたＩＬ－２３　ｓｃＦｖ構築物およびＴＮＦα　ＩｇＧ構築物が、ＩｇＧ１発現ベクターに挿入された。

【００４６】

ＩｇＧ１サブクラスとして、ＴＮＦα　ＩｇＧ、および６つのＣＤＲ変異体を有するＩＬ－２３　ｓｃＦｖを含有する二重特異性抗体は（親ＩＬ－２３抗体に対して：Ｋ２８ＰおよびＴ５４ＶにおけるＨＣＶＲ、ならびにＬ３０Ｇ、Ｌ５３Ｋ、Ｅ５４ＬおよびＭ９０ＱにおけるＬＣＶＲ、アミノ酸番号付けの割り当てはよく知られているＫａｂａｔ番号付け規則に基づく）（表１に反映されている例示された二重特異性抗体において示される通り：Ｋ４９２ＰおよびＴ５２２ＶにおけるＨＣＶＲ、ならびにＬ６２９Ｇ、Ｌ６５３Ｋ、Ｅ６５４ＬおよびＭ６８９ＱにおけるＬＣＶＲ、アミノ酸の番号付けは直線的番号付けに基づく）、初期の構築物において実証された発現、（親の分子と比較してＩＬ－２３に対する）親和性および熱安定性の課題を改善すると確認された。さらには、これらの変異は、カニクイザルにおけるクリアランス率の有意の減少をもたらした。上記の修正は、親の単一抗体の初期の特徴においては確認されなかった。

【００４７】

二重特異性抗体結合

本発明の二重特異性抗体は、ヒトＴＮＦαおよびヒトＩＬ２３ｐ１９の両方に結合し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで少なくとも１つのヒトＴＮＦα生物活性および少なくとも１つのヒトＩＬ－２３生物活性を中和する。本発明の二重特異性抗体は、ｉｎ

ｖｉｔｒｏでＴＮＦαの存在下および非存在下でＩＬ－２３の強力な阻害剤である。本発明の二重特異性抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＩＬ－２３の存在下または非存在下で可溶性および膜結合ＴＮＦαの両方の強力な阻害剤である。

【００４８】

本発明の二重特異性抗体は、３７℃で９６±３．５ｐＭの範囲のヒトＴＮＦαおよび１２１±８．５ｐＭの範囲のヒトＩＬ２３ｐ１９に対する結合親和性（K_D）を有するとさらに特徴付けられる。二重特異性抗体は、可溶性ならびに膜結合ＴＮＦαを実質上中和し、この中和は、飽和量のヒトＩＬ－２３の存在による影響を受けない。二重特異性抗体は、ヒトＩＬ－２３を実質上中和し、この中和は、飽和量のヒトＴＮＦαの存在による影響を受けない。

【００４９】

二重特異性抗体発現

それらが作動可能に結合している遺伝子の発現を指示することができる発現ベクターは、当技術分野においてよく知られている。発現ベクターは、宿主細胞からのポリペプチド（１種または複数）の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは非相同のシグナルペプチドであってよい。第１のポリペプチド鎖（ＨＣ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含む）および第２のポリペプチド鎖（ＬＣを含む）は、１つのベクターにおいてそれらが作動可能に結合している異なるプロモーターから独立に発現されてよくまたは、代わりに、第１のおよび第２のポリペプチド鎖は、２つのベクター（第１のポリペプチド鎖を発現しているベクターおよび第２のポリペプチド鎖を発現しているベクター）においてそれらが作動可能に結合している異なるプロモーターから独立に発現されてよい。

【００５０】

宿主細胞には、本発明の第１のポリペプチド鎖、第２のポリペプチド鎖または第１および第２のポリペプチド鎖の両方を発現している１種または複数の発現ベクターで安定的にまたは一過的に形質移入、形質転換、形質導入または感染された細胞が含まれる。本発明の二重特異性抗体を産生している宿主細胞株の生成および単離は、当技術分野において既知の標準技術を用いて達成してよい。哺乳動物細胞は、二重特異性抗体の発現のために好ましい宿主細胞である。特定の哺乳動物細胞は、ＨＥＫ２９３、ＮＳ０、ＤＧ－４４およびＣＨＯである。好ましくは、二重特異性抗体は、その中で宿主細胞が培養され、そこから二重特異性抗体が回収または精製され得る培地内に分泌される。

【００５１】

抗体の哺乳動物発現がグリコシル化を生じることは、当技術分野においてよく知られている。典型的には、グリコシル化は、高度に保存されたＮ－グリコシル化部位で抗体のＦｃ領域において生じる。Ｎ－グリカンは、典型的にはアスパラギンに付着する。例として、表１において示されている例示された二重特異性抗体のそれぞれのＨＣは、配列番号１のアスパラギン残基３０１においてグリコシル化される。

【００５２】

（本発明のＨＣ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含み、配列番号１のアミノ酸配列を有する）第１のポリペプチド鎖をコードする特定のＤＮＡポリヌクレオチド配列は、

ａｔｇｇａｇａｃａｇａｃａｃａｃｔｃｃｔｇｃｔａｔｇｇｇｔａｃｔｇｃｔｇｃｔｃｔ
ｇｇｇｔｔｃｃａｇｇｃｔｃｃａｃｔｇｇｃｇａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｇａｇｔｃ
ｔｇｇｇｇｇａｇｇｃｔｔｇｇｔａｃａｇｃｃｔｇｇｇａｇｇｔｃｃｃｔｇａｇａｃｔｃ
ｔｃｃｔｇｔｇｃａｇｃｃｔｃｔｇｇａｔｔｃａｃｃｔｔｔｇａｔｇａｃｔａｔｇｃｃａ
ｔｇｃａｃｔｇｇｇｔｃｃｇｃｃａｇｇｃｔｃｃａｇｇｇａａｇｇｇｇｃｔｇｇａｇｔｇ
ｇｇｔｇｔｃａｇｃｔａｔｔａｃｔｔｇｇａａｔａｇｔｇｇｔｃａｃａｔａｇａｃｔａｃ
ｇｃａｇａｃｔｃｃｇｔｇｇａｇｇｇｃｃｇｇｔｔｃａｃｃａｔｃｔｃｃａｇａｇａｃａ
ａｔｇｃｃａａｇａａｃｔｃｃｃｔｇｔａｔｃｔｇｃａａａｔｇａａｃａｇｃｃｔｇａｇ
ａｇｃｃｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｃｇｔａｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａａａａｇｔｇａｇｃ
ｔａｃｃｔｇａｇｔａｃｔｇｃｃｔｃｃａｇｃｃｔｇｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｃｃａａｇ

gaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc
atcggtcttcccgctagcaccctcctccaagagcacctct
ggggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactact
tccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcc
tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccct
ccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaa
tcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
cccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcc
cagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctctt
ccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacc
cctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc
accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc
tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
ccctgcccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggt
cagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac
atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
actacaagaccacgcccccccgtgctggactccgacggctc
cttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg
aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct
gtctccgggtggcggaggctccgggggaggggggtagcgga
ggagggggatcccaggtgcagctggtgcagtctgggggctg
aggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaa
ggcttctggatatccattcactcgctatgttatgcactgg
gtgcgacaggcccctggacaatgccttgagtggatgggat
atattaatccttacaatgatggtgtgaactacaatgagaa
gttcaaaggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacg
agcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgagg
acacggccgtgtattactgtgcgagaaactgggacacagg
cctctgggggcaagggaccacggtcaccgtctcctcaggc
ggcggaggctctggcggaggtggtagtggtggcggtggat
cagggggaggcggatctgacatccagatgacccagtctcc
atcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatc
acttgcaaggcaagtgaccacattggcaaatttttaactt
ggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgat
ctatggtgcaaccagcaagctgactggggtcccatcaagg
ttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcacca
tcagcagtctgcaacctgaagatttgcaacttactactg
tcaacagtattggagtactccgttcacgttcggatgcggg
accaaggtggaaataaaa （配列番号３）

である。

【００５３】

（本発明のＬＣを含み配列番号２のアミノ酸配列を有する）第２のポリペプチド鎖をコードする特定のＤＮＡポリヌクレオチド配列は、

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctct

ｇｇｇｔｔｃｃａｇｇａｔｃｃａｃｔｇｇｃｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇｔｃ
ｔｃｃａｔｃｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｇｃａｔｃｔｇｔａｇｇａｇａｃａｇａｇｔｃａｃｃ
ａｔｃａｃｔｔｇｃｃｇｇｇｃｇａｇｔｃａｇｇｇｃａｔｔｃｇｃａａｔｔａｔｔｔａｇ
ｃｃｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａａａｃｃａｇｇｇａａａｇｃｔｃｃｔａａｇｃｔｃｃｔ
ｇａｔｃｔａｔｇｃｔｇｃａｔｃｃａｃｔｔｔｇｃａａｔｃａｇｇｇｇｔｃｃｃａｔｃｔ
ｃｇｇｔｔｃａｇｔｇｇｃａｇｔｇｇａｔｃｔｇｇｇａｃａｇａｔｔｔｃａｃｔｃｔｃａ
ｃｃａｔｃａｇｃａｇｃｃｔｇｃａｇｃｃｔｇａａｇａｔｇｔｔｇｃａａｃｔｔａｔｔａ
ｃｔｇｔｃａａｃｇｃｔａｔａａｃｃｇｔｇｃｃｃｃｔｔａｃａｃｇｔｔｃｇｇｃｃａａ
ｇｇｇａｃｃａａｇｇｔｇｇａａａｔｃａａａｃｇｇａｃｔｇｔｇｇｃｔｇｃａｃｃａｔ
ｃｔｇｔｃｔｔｃａｔｃｔｔｃｃｃｇｃｃａｔｃｔｇａｔｇａｇｃａｇｔｔｇａａａｔｃ
ｔｇｇａａｃｔｇｃｃｔｃｔｇｔｔｇｔｇｔｇｃｃｔｇｃｔｇａａｔａａｃｔｔｃｔａｔ
ｃｃｃａｇａｇａｇｇｃｃａａａｇｔａｃａｇｔｇｇａａｇｇｔｇｇａｔａａｃｇｃｃｃ
ｔｃｃａａｔｃｇｇｇｔａａｃｔｃｃｃａｇｇａｇａｇｔｇｔｃａｃａｇａｇｃａｇｇａ
ｃａｇｃａａｇｇａｃａｇｃａｃｃｔａｃａｇｃｃｔｃａｇｃａｇｃａｃｃｃｔｇａｃｇ
ｃｔｇａｇｃａａａｇｃａｇａｃｔａｃｇａｇａａａｃａｃａａａｇｔｃｔａｃｇｃｃｔ
ｇｃｇａａｇｔｃａｃｃｃａｔｃａｇｇｇｃｃｔｇａｇｃｔｃｇｃｃｃｇｔｃａｃａａａ
ｇａｇｃｔｔｃａａｃａｇｇｇｇａｇａｇｔｇｃ （配列番号４）

である。

【００５４】

その中に二重特異性抗体が分泌されている、培地は、従来技術によって精製してよい。例えば、培地は、従来の方法を用いるプロテインＡまたはＧカラムに適用し、そこから溶離してよい。可溶性凝集体およびマルチマーは、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含めた、一般的な技術によって有効に除去してよい。産生物は、例えば－７０℃で、直ちに凍結するか、または凍結乾燥してよい。

【００５５】

場合によっては、本発明の二重特異性抗体を産生するためのプロセスは、ダイアボディの形成をもたらし得る。ダイアボディは、ＨＣＶＲ２およびＬＣＶＲ２領域が単一のポリペプチド鎖上で発現されるｓｃＦｖの二価の構成であるが、同一のポリペプチド鎖の相補性ドメインと対をなしている可変ドメインの代わりに、可変ドメインがもう一方のポリペプチド鎖または異なる分子の相補性ドメインと対になる。例えば、二重特異性抗体が、２つの第１のポリペプチド（便宜のため、１Ａおよび１Ｂのそれぞれがｈｃ、ｓｃＦｖ、Ｌ１およびＬ２を含む、１Ａおよび１Ｂ）、および２つの第２のポリペプチド（便宜のため、２Ａおよび２Ｂのそれぞれがｌｃを含む、２Ａおよび２Ｂ）を含む場合、１ＡのＨＣＶＲ２は、１ＡのＬＣＶＲ２との対の代わりに１ＢのＬＣＶＲ２の相補性ドメインと対になる。本明細書に述べるように、上述の二重特異性抗体からダイアボディを精製することは有益で有り得る。ダイアボディ含有量は、細胞の発現後に１０％より大きくてよく、精製後に３％未満に減少してよい。

【００５６】

治療的使用

本明細書で使用する場合、「治療」および／または「治療すること」は、本明細書に記載された障害の進行を遅らせる、中断する、抑制する、制御する、または停止することが有り得る全てのプロセスを指すことが意図されるが、全ての障害症状の全体的な解消は必ずしも示さない。治療には、ＴＮＦαおよび／またはＩＬ－２３の減少したレベルあるいはＴＮＦαおよび／またはＩＬ－２３の減少した生物活性から利益を得るであろう、哺乳動物における、具体的にはヒトにおける疾患または状態の治療のための本発明の二重特異性抗体の投与が含まれ、（ａ）疾患のさらなる進行を阻害すること、すなわちその発病を抑制すること、ならびに（ｂ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患または障害の退行を生じさせることあるいはその症状または合併症を緩和することが含まれる。

【００５７】

本発明の二重特異性抗体は、ＩＢＤ（ＣＤおよびＵＣなど）、ＡｘＳｐＡ、ＲＡおよびＰｓＡを含めた、自己免疫性疾患を治療することが予期される。

【００５８】

医薬組成物

本発明の二重特異性抗体は、患者への投与に適した医薬組成物に組み込んでよい。本発明の二重特異性抗体は、単回または多回投与において単独でまたは薬学的に許容可能な担体および／もしくは希釈剤と共に患者に投与してよい。こうした医薬組成物は、選択された投与方法に適切であるように作られており、薬学的に許容可能な希釈剤、担体、および／または分散剤などの賦形剤、緩衝剤、界面活性剤、防腐剤、可溶化剤、等張化剤、安定剤および同類のものが必要に応じて用いられる。前記組成物は、例えば、一般に実務者に既知である配合技術の概論を提供する、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ、Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、第２２版、Ｌｏｙｄ Ｖ，Ｅｄ．、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ、２０１２年に開示されている従来技術に従って設計してよい。医薬組成物のために適した担体には、本発明の二重特異性抗体と組み合わせられた場合に、分子の活性を維持し、患者の免疫システムと非反応性である、任意の材料が含まれる。本発明の医薬組成物は、二重特異性抗体および１種または複数の薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む。

【００５９】

本発明の二重特異性抗体を含む医薬組成物は、標準の投与技術を用いて本明細書に述べるような疾患または障害のリスクがあるまたは示している患者に投与してよい。

【００６０】

本発明の医薬組成物は、本明細書において区別なく用いられるような、本発明の二重特異性抗体の「有効」または「治療的有効」量を含有する。有効量は、所望の治療結果を達成するために（投与の投薬量でおよび期間のためおよび手段のために）必要な量を指す。二重特異性抗体の有効量は、個体の疾患の状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の反応を引き出す抗体または抗体部分の能力などの因子に従って変わり得る。有効量は、治療的に有益な効果が、二重特異性抗体のいかなる毒性または有害作用にも上回る量でもある。

【実施例】

【００６１】

記述がない限り、実施例全体を通して参照されている例示された二重特異性抗体は、上表１に記述されている例示された本発明の二重特異性抗体を指す。

【００６２】

二重特異性抗体発現および精製

例示された二重特異性抗体を、本質的に以下のように発現および精製する。配列番号３（ＩｇＧ ＨＣ、ｓｃＦｖ ＨＣＶＲ２およびＬＣＶＲ２ならびにリンカーＬ１およびＬ２を含み、配列番号１のアミノ酸配列を有する、ポリペプチド鎖をコードする）および配列番号４（ＩｇＧ ＬＣを含み、配列番号２のアミノ酸配列を有する、第２のポリペプチド鎖をコードする）のＤＮＡを含有するグルタミンシンセターゼ（ＧＳ）発現ベクターを用いて電気穿孔法によって、チャイニーズハムスター細胞株、ＣＨＯ（ＧＳノックアウト、クローン１Ｄ３）を形質移入する。発現ベクターは、ＳＶ Ｅａｒｌｙ（シミアンウイルス４０Ｅ）プロモーターおよびＧＳのための遺伝子をコードする。ＧＳの発現は、ＣＨＯ細胞によって必要とされるアミノ酸、グルタミンの生化学的合成を可能にする。形質移入後、細胞は、５０μＭのＬ－メチオニンスルホキシイミン（ＭＳＸ）を用いるバルク選択（ｂｕｌｋ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ）を受ける。ＭＳＸによるＧＳの阻害を、選択の厳重さを増加するために利用する。宿主細胞ゲノムの転写活性領域への発現ベクターｃＤＮＡの組み込みを有する細胞は、内因性レベルのＧＳを発現する、ＣＨＯ野生型細胞に対抗して選択され得る。形質移入したプールを低密度で平板培養して安定発現細胞のクローン性に近い増殖（ｃｌｏｓｅ－ｔｏ－ｃｌｏｎａｌ ｏｕｔｇｒｏｗｔｈ）を可能にする。マスターウェルを、二重特異性抗体発現についてスクリーニングし次いで産生に用いるため

に無血清の、懸濁培養液中で拡大する。例示された二重特異性抗体がその中へ分泌された、浄化した培地を、リン酸緩衝食塩水（ｐＨ７．４）などの適合した緩衝液で平衡化したプロテインＡ親和性カラムに適用する。カラムを、非特異的な結合成分を除去するために洗う。結合した二重特異性抗体を、例えば、ｐＨ勾配（０．１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ６．８から０．１Ｍクエン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ２．５など）によって溶離してＴｒｉｓ、ｐＨ８緩衝液で中和する。二重特異性抗体画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたは分析用サイズ排除などによって、検出し次いでプールする。可溶性凝集体およびマルチマーは、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含めた一般的な技術によって実質上除去してよい。二重特異性抗体を、一般的な技術を用いて濃縮および／または除菌ろ過する。これらのクロマトグラフィーステップ後の例示された二重特異性抗体の純度は、９８．６％より大きい（モノマー）。二重特異性抗体は、－７０℃で直ちに凍結または４℃で数か月間貯蔵してよい。

【００６３】

二重特異性抗体溶解性および安定性分析

例示された二重特異性抗体を、１０ｍＭのクエン酸ｐＨ６．０に配合する。二重特異性抗体を、（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕ．Ｃ．フィルター、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９０３０２４を用いて）１ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬおよび１００ｍｇ／ｍＬに濃縮する。１ｍｇ／ｍＬに濃縮した試料を、４週間にわたって４および２５℃のうちの１つでインキュベートし、５０および１００ｍｇ／ｍＬに濃縮した試料を、２５または１５０ｍＭのＮａＣｌと共に４週間にわたって４および２５℃のうちの１つでインキュベートする。

【００６４】

インキュベーション後、試料を、ＴＳＫｇｅｌ　Ｓｕｐｅｒ　ＳＷ３０００（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　製品番号１８６７５）カラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で高分子量パーセント（％ＨＭＷ）について分析する。５０ｍＭのリン酸ナトリウム＋３５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．０を、０．４ｍＬ／分で１５分間実行する移動相として用いる。濃縮した抗体の５μＬ（５μｇ）の体積を、カラムに注入して２１４ｎｍで検出を測定する。高濃度試料については、１μＬ（５０μｇまたは１００μｇ）の体積をカラムに注入して２８０ｎｍで検出を測定する。クロマトグラムを、ＣｈｅｍＳｔａｔｉｏｎを用いて分析し高分子量（ＨＭＷ）％を、モノマーピーク前に溶離したピークのＡＵＣの総ＡＵＣに対する比率を用いて計算する。表２に結果を概説する。

【表２】

表2:SE－HPLCによって測定した4週間にわたる開始対照からの高分子量種の割合の変化の概要

試料濃度	インキュベーション温度	SE－HPLCによるHMWの変化(%)
1 mg／mL	4° C	0
1 mg／mL	25° C	0.5
50 mg／mL	4° C	0.2
50 mg／mL	25° C	0.7
100 mg／mL	4° C	0.1
100 mg／mL	25° C	0.7

【００６５】

１ｍｇ／ｍＬまで濃縮した試料の試料分解も、Ｂｅｃｋｍａｎ－ＰＡ８００プラスシステムを用いて製造者の指示に従って毛管等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）分析で分析する。表３に結果を概説する。

【表３】

表3:cIEFによって測定した4週間にわたる試料分解の変化の概要

試料濃度	インキュベーション温度	試料分解%
1 mg／mL	4° C	0.7
1 mg／mL	25° C	1.7

【００６６】

１ｍｇ／ｍＬまで濃縮して４０℃で貯蔵した試料も、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｏｎ Ｔｒａｐ ＬＣ－ＭＳシステムを用いて製造者の指示に従って液体クロマトグラフィー質量分析法（ＬＣ－ＭＳ）分析でペプチ結合開裂の同定のために分析する。２％より大きいペプチド結合開裂を実証した二重特異性抗体の領域はなかった。第１のコードされたポリペプチド鎖（例示された二重特異性抗体の配列番号１）のヒンジ領域（１．８％）およびリンカーＬ１（１．１％）のみが、１％より大きいペプチド結合開裂を実証した。

【００６７】

例示された二重特異性抗体の溶解度を、１週間のインキュベーション期間後に４、－５および－１０℃で分析する。溶解度を、（Ａｍｉｃｏｎ Ｕ．Ｃ．フィルター、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９０３０２４を用いて）１００から１５０ｍｇ／ｍＬに濃縮して１５０ｍＭのＮａＣｌを含むｐＨ６．０の１０ｍＭのクエン酸中に配合した二重特異性抗体で評価する。例示された二重特異性抗体は、良好な溶解性を示し、インキュベーション期間後に相分離が無かった。

【００６８】

例示された二重特異性抗体の粘度を、室温で分析する。粘度を、（Ａｍｉｃｏｎ Ｕ．Ｃ．フィルター、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９０３０２４を用いて）１００ｍｇ／ｍＬに濃縮して１５０ｍＭのＮａＣｌを含むｐＨ６．０の１０ｍＭのクエン酸中に配合した二重特異性抗体で評価する。例示された二重特異性抗体は、１００ｍｇ／ｍＬで４．２ｃｐの、良好な粘度を示し、一方で他の初期に試みた構築物は、許容できない高粘度（＞９ｃＰ）を実証した。

【００６９】

親のＴＮＦα抗体および親のＩＬ－２３を含む二重特異性抗体での予備調査は、不十分な二重特異性抗体発現、二重特異性抗体分解／クリッピング、比較的高濃度における許容できない高溶液粘度および低親和性（親の抗体と比較して）が原因で不可能であった。しかしながら、本発明の例示された二重特異性抗体での予備調査は、二重特異性抗体の発現を含めた、予期しない有益な特性ならびに予期しない有益な化学的および物理的安定性および溶解特性を実証する。予備データによって実証されたように、本発明の二重特異性抗体は、低ＨＭＷ凝集、良好な溶解性、溶液中の良好な粘性、低分解レベルおよび低ペプチド結合開裂を含めた増加した物理的安定性を示し、ＴＮＦαおよびＩＬ－２３のｐ１９サブユニットの両方に関して親和性を維持する。

【００７０】

ＩＬ－２３およびＴＮＦαに対する二重特異性抗体結合親和性

ヒトＩＬ－２３およびヒトＴＮＦαに対する例示された二重特異性抗体の結合親和性および結合化学量論を、ＨＢＳ－ＥＰ＋（１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ ｐＨ７．４＋１５０ｍＭ ＮａＣｌ＋３ｍＭ ＥＤＴＡ＋０．０５％（ｗ／ｖ）界面活性剤Ｐ２０）ランニング緩衝液で初回刺激して分析温度を３７℃に設定したＢｉａｃｏｒｅ Ｔ１００計器上で表面プラズモン共鳴アッセイを用いて決定する。捕捉方法論を採用するために全４つのフローセル（Ｆｃ）上の（標準のＮＨＳ－ＥＤＣアミンカップリングを用いて生成した）固定化したプロテインＡを含有するＡ ＣＭ５チップ（Ｂｉａｃｏｒｅ Ｐ／Ｎ ＢＲ－１００５３０）を用いた。抗体試料を、ランニング緩衝液への希釈によって１０μｇ／ｍＬで調

製する。ヒトＩＬ－２３を、ランニング緩衝液への希釈によって２０．０、１０．０、５．０、２．５、１．２５、０．６２および０（ブランク）ｎＭの最終濃度で調製する。ヒトＴＮＦαを、ランニング緩衝液への希釈によって５０．０、２５．０、１２．５、６．２５、３．１２、１．５６、０．７８、０．３９、０．１９および０（ブランク）ｎＭの最終濃度で調製する。

【００７１】

それぞれの分析サイクルは、（１）別個のフローセル（Ｆｃ２およびＦｃ３）上に抗体試料を補足すること、（２）８０μＬ／分で２００秒間全てのＦｃについてそれぞれのヒトＩＬ－２３濃度の注入後１８００秒間緩衝液流に戻して解離相の監視、（３）５０μＬ／分で２５０秒間全てのＦｃについてそれぞれのヒトＴＮＦα濃度の注入後１２００秒間緩衝液流に戻して解離相の監視、（４）全ての細胞について８０μＬ／分で６０秒間、１０ｍＭのグリシン、ｐＨ１．５の注入でチップ表面の再生、および（５）ＨＢＳ－ＥＰ＋の１０μＬ（６０秒）注入でのチップ表面の平衡化からなる。データは、標準的な二重参照（ｄｏｕｂｌｅ－ｒｅｆｅｒｅｎｃｉｎｇ）を用いて処理してＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００評価ソフトウェアバージョン２．０．３を用いて１：１結合モデルに適合させ、会合速度（k_{on}、$M^{-1}s^{-1}$単位）、解離速度（k_{off}、s^{-1}単位）、およびR_{max}（ＲＵ単位）を決定する。平衡解離定数（K_D）は、$K_D = k_{off} / k_{on}$の関係から計算し、モル単位である。

【表４】

表4:37℃における例示された二重特異性抗体によるヒトIL－23およびヒトTNFαへの結合親和性

抗原	k_{on} 平均±標準偏差 $M^{-1}s^{-1}$	k_{off} 平均±標準偏差 $s^{-1}(10^{-4})$	K_D 平均±標準偏差 pM	n
ヒトIL－23	8.3(±0.8)x10^5	1.0±0.0	121±8.5	3
ヒトTNFα	4.1(±0.2)x10^6	4.0±0.2	96±3.5	3

【００７２】

これらの結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、３７℃でヒトＩＬ－２３およびヒトＴＮＦαに高親和性で結合することを実証する。

【００７３】

ＩＬ－２３およびＴＮＦαの同時結合

ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｔ１００計器を、ヒトＩＬ－２３およびヒトＴＮＦαが二重特異性抗体に同時に結合し得るかどうかを判定するために用いる。記述がない限り、全ての試薬および材料は、ＢＩＡｃｏｒｅ　ＡＢ（ウプサラ、スウェーデン）から購入する。全ての測定は、３７℃で実行する。ＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液（１５０ｍＭ塩化ナトリウム、３ｍＭＥＤＴＡ、０．０５％（ｗ／ｖ）界面活性剤Ｐ－２０、および１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）を、ランニング緩衝液および試料緩衝液として用いる。プロテインＡを、アミンカップリングキットを用いてＣＭ５センサーチップのフローセル１および２上に固定化する。例示された二重特異性抗体（１μｇ／ｍｌに希釈）を、フローセル２上に最初に捕捉し（８０μｌ／分で４秒注入、二重特異性抗体補足の９５．３反応単位（ΔＲＵ）を与える）、その後５分間１００ｎＭでヒトＴＮＦαの注入が続きＴＮＦα結合部位を飽和させる（３２．４ΔＲＵの結合シグナルが観察される）。フローセル１は、プロテインＡのみの対照である。ＴＮＦα（フローセル２）の結合後、１００ｎＭでヒトＩＬ－２３を次いで５分間注入し（５７．３ΔＲＵの）追加の結合シグナルが観察される。チップ表面を、次いで１０ｍＭグリシンｐＨ１．５を用いて再生する。最初にヒトＩＬ－２３その後ヒトＴＮＦαの逆の順序を用いることを除いて同一プロセスを繰り返す。これらの結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、二重特異性抗体に結合している２つのリガンドからの反応単位の増加（ＴＮＦαから初期３２．４ＲＵおよび次いでＩＬ－２３から追加の５７．３ＲＵ）によって示されるようにヒトＩＬ－２３およびヒトＴＮＦαに同時に結合

し得ることを実証する。

【００７４】

Ｋｉｔ２２５細胞からのｉｎ　ＶｉｔｒｏでのＩＬ－２３仲介Ｓｔａｔ３リン酸化の阻害

Ｋｉｔ２２５細胞は、ＩＬ－２３受容体を天然に発現するヒトＴ細胞リンパ球性白血病細胞株である。Ｋｉｔ２２５細胞のヒトＩＬ－２３とのインキュベーションは、市販のＥＬＩＳＡを用いて測定可能な、ＩＬ－２３Ｒ／ＪＡＫキナーゼによって仲介されたＳｔａｔ３のリン酸化の急速な増加をもたらす。

【００７５】

Ｋｉｔ２２５細胞を、アッセイ培地（１０％ＦＢＳ、１０ｎｇ／ｍｌヒトＩＬ－２、および１×ペニシリンプラスピューロマイシンを含有するＲＰＭＩ　１６４０）において慣例的に培養する。アッセイの日、細胞を採取し、大量の無血清ＲＰＭＩ　１６４０培地で洗い、次いで無血清ＲＰＭＩ　１６４０ｍｌ当り５×１０^{6}で再懸濁する。（１００μＬの）１ウェル当り５００，０００個のＫｉｔ２２５細胞を、Ｕ底の培養された９６ウェルプレートのウェルに加える。９６ウェルプレートを、インキュベーター内に置いて細胞を３７℃で３時間飢餓状態にする。

【００７６】

１：３希釈で、１００ｎＭから０．５ｐＭの例示された二重特異性抗体の用量範囲を評価する（二重特異性抗体のＭＷは、２００ｋＤａである）。例示された二重特異性抗体のそれぞれの試験濃度を、（２ｎｇ／ｍｌの）組換えヒトＩＬ－２３と共に３７℃で３０分間プレインキュベートする。アッセイ培地を、「培地単独」および「２ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２３を含む培地」対照のために用いる。ＩＬ－２３のｐ１９サブユニットを標的にする、ＩＬ－２３中和抗体（米国特許第７，８７２，１０２号に記載されている親のＩＬ－２３抗体）を、アッセイにおいて陽性対照として用いて、二重特異性抗体として同一のモル範囲で試験する。対照抗体も、（２ｎｇ／ｍｌの）組換えヒトＩＬ－２３と共に３７℃で３０分間プレインキュベートする。プレインキュベーション後、抗体／ＩＬ－２３混合物を、Ｋｉｔ２２５細胞に移して３７℃で１５分間インキュベートする。

【００７７】

アッセイの最後に、プレートを、遠心分離（４℃で２分間３０００ｒｐｍ）し次いで上清を破棄する。溶解緩衝液（１００μＬ、リン酸塩／プロテイナーゼ阻害剤を含有）を、細胞に加え次いで氷上で5分間インキュベートする。インキュベーション後、細胞を遠心分離する（４℃で5分間３０００ｒｐｍ）。遠心分離後、１００μＬの上清を、一晩のインキュベーション（４℃）のために（抗Ｓｔａｔ３抗体でプレコートした）９６ウェルプレートに移す。ＥＬＩＳＡによるＳｔａｔ３リン酸化の測定の日、９６ウェルプレートを、室温で温めてＳｔａｔ３リン酸化レベルを判定するためのＥＬＩＳＡ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｉｎｃ．、カタログ番号７１４６）を製造者の指示に従って実行する。ＥＬＩＳＡ反応後、９６ウェルプレートを、マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｓｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　１９０）上で４５０ｎｍで読み取る。結果を、二重特異性抗体または陽性対照のいずれかによってＩＬ－２３誘発性Ｓｔａｔ３リン酸化の５０％が阻害される（IC_{50}）濃度として表わし、データの４パラメーターシグモイドフィット（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ）を用いて計算する。

【００７８】

結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、濃度依存的様式でＫｉｔ２２５細胞におけるヒトＩＬ－２３誘発性Ｓｔａｔ３リン酸化を阻害したことを実証する。阻害は、（１５８±２６ｐＭの二重特異性抗体のIC_{50}に対して陽性対照ＩＬ－２３ｐ１９抗体については７５±７ｐＭ（３つの独立した実験からの平均IC_{50}±ＳＥＭ）で）陽性対照ＩＬ－２３ｐ１９抗体で観察されたものと同等である。陰性対照抗体は、試験したいかなる濃度においてもＫｉｔ２２５細胞におけるＳｔａｔ３リン酸化を阻害しなかった。本発明の例示された二重特異性抗体は、ＩＬ－２３を実質上中和した。

【００７９】

ｉｎ　ＶｉｔｒｏでのＬ９２９細胞における可溶性ＴＮＦα誘発性細胞毒性の阻害

Ｌ９２９細胞は、ＴＮＦ受容体を天然に発現するマウス線維肉腫細胞である。Ｌ９２９細胞のヒトＴＮＦαとのインキュベーションは、反応性酸素中間生成物の過度の形成が原因で急速な細胞死をもたらす。細胞死は、生存可能細胞におけるミトコンドリアのコハク酸デヒドロゲナーゼが、テトラゾリウム塩をマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒｉＭａｘ　１９０）で検出され得る、ホルマザン生成物に還元する、ＭＴＴ細胞毒性アッセイを用いて測定可能である。

【００８０】

２０ｎＭから１０ｐＭの用量範囲を評価する（二重特異性抗体のＭＷは、２００ｋＤａである）。例示された二重特異性抗体のそれぞれの試験濃度（１００μＬ）を、２００ｐｇ／ｍＬの組換えヒトＴＮＦαおよび６．２５μｇ／ｍＬのアクチノマイシン－Ｄを含有するウェルに加える。試験は、処置毎に重複するウェルにおいて実行する。ＴＮＦα抗体、ＩｇＧ１アイソタイプを有するアダリムマブ（親のＴＮＦα抗体、例えば米国特許第６，０９０，３８２号を参照）を、アッセイにおいて陽性対照として用いる。ヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体を、陰性対照として用いる。対照抗体を、例示された二重特異性抗体と同じモル用量範囲で試験する。抗体混合物を含有するプレートを、室温で６０分間インキュベートする。

【００８１】

Ｌ９２９細胞を、アッセイ培地（１ｘＤＭＥＭ　Ｃｅｌｌｇｒｏ、１０％ＦＢＳ、１％Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ、１％ＭＥＭ必須アミノ酸、１％Ｌ－グルタミン、１％ピルビン酸ナトリウム）において慣例的に培養する。アッセイの日、細胞を、１ｘＰＢＳ（Ca^{++}またはMg^{++}無し）ですすいで０．２５％トリプシン＋ＥＤＴＡで培養フラスコから分離する。トリプシンを、アッセイ培地で不活性化する。Ｌ９２９細胞を、室温で５分間２１５ｘｇで遠心分離する。細胞ペレットを、アッセイ培地に再懸濁する。細胞密度を、血球計で測定して、１０，０００個のＬ９２９細胞（１００μＬ中）を、９６ウェルプレートに加え組織培養インキュベーター（３７℃、９５％相対湿度、５％CO_2）内に一晩置く。抗体／ＴＮＦα／アクチノマイシン－Ｄ混合物を、Ｌ９２９接着細胞と共に９６ウェルプレートに移して１８時間インキュベートする（３７℃、９５％相対湿度、５％CO_2）。アッセイ培地を除去してＭＴＴ基質混合物をウェル（１２０μＬ）に加える。プレートを、３７℃、９５％相対湿度、５％CO_2に３時間置く。細胞死を、プレートを４９０ｎｍでマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　１９０）上で読み取ることによって判定する。結果を、二重特異性抗体または陽性対照抗体のいずれかによってＴＮＦα誘発性反応の５０％が阻害される濃度（IC_{50}）として表わし（３つの独立した実験の平均±ＳＥＭ）、データの４パラメーターシグモイドフィット（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ）を用いて計算する。

【００８２】

結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、２３３±２０ｐＭのIC_{50}で濃度依存的様式でＬ９２９細胞のヒトＴＮＦα誘発性殺傷を阻害したことを実証する。この阻害は、陽性対照抗体、アダリムマブ（IC_{50}＝２５０±２４ｐＭ）で観察されたものと同等であった一方で、陰性対照抗体は、ヒトＴＮＦαを阻害しなかった。本発明の例示された二重特異性は、ヒトＴＮＦαを実質上中和した。

【００８３】

ｉｎ　ＶｉｔｒｏでのＬ９２９細胞における膜結合ヒトＴＮＦα誘発性細胞毒性の阻害

膜結合ＴＮＦαを阻害する二重特異性抗体の能力を調査するために、ＴＮＦα開裂の非存在下で細胞表面上の生理活性ＴＮＦαの発現を可能にすることがあらかじめ実証されている（Ｍｕｅｌｌｅｒら１９９９年）一式の突然変異体を用いてＴＮＦαの既知の開裂部位を不活性化する。開裂不可能なＴＮＦα構築物を、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞に安定に形質移入する。これらの細胞は、フローサイトメトリーによって示されるように膜結合ＴＮＦαを発現する。Ｌ９２９細胞のヒト開裂不可能結合ＴＮＦαを発現しているＣＨＯ細胞とのインキュベーションは、急速なＬ９２９細胞死をもたらす。

【００８４】
膜結合ヒトＴＮＦαを発現しているＣＨＯ細胞を、選択培地において慣例的に維持する（ＡＭ２００１培地、ＭＳＸを含まない内部ＣＨＯ増殖培地、８ｍＭグルタミン、ＧＳ追加、５００μｇ／ｍＬのＧ４１８と共にＨＴ追加）。アッセイの日、細胞を計数し、１ｘＰＢＳ（Ca^{++}またはMg^{++}なし）ですすぎ、２１５ｘｇで５分間遠心分離してアクチノマイシン－Ｄ（６．２５μｇ／ｍＬ最終濃度）と共にＬ９２９アッセイ培地中に５０，０００細胞／ｍＬで再懸濁する。細胞懸濁液の５００個の細胞（１０μＬ中）を、３７℃、９５％相対湿度、５％CO_2で６０分間インキュベートした抗体混合物のそれぞれの濃度に加える。抗体、膜結合ヒトＴＮＦαＣＨＯ細胞、アクチノマイシン－Ｄ混合物を含有する混合物を、Ｌ９２９接着細胞と共に９６ウェルプレートに移して３７℃、９５％相対湿度、５％CO_2で１８時間インキュベートする。細胞死を、可溶性ＴＮＦαＬ９２９アッセイについて上述したＭＴＴ細胞毒性アッセイを用いて測定する。結果を、二重特異性抗体または陽性対照抗体のいずれかによってＴＮＦα誘発性反応の５０％が阻害される濃度（IC_{50}）として表わす（３つの独立した実験の平均±ＳＥＭ）。

【００８５】
結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、７５５±２９７ｐＭのIC_{50}で濃度依存的様式でヒト開裂不可能膜結合ＴＮＦαＣＨＯ細胞によってＬ９２９細胞の殺傷を阻害したことを実証する。この阻害は、陽性対照抗体（ＩｇＧ１アイソタイプを有するアダリムマブ、IC_{50}＝５８１±２０１ｐＭ）で観察されたものと同等であった一方で、陰性対照抗体は、ヒトＴＮＦαを阻害しなかった。本発明の例示された二重特異性抗体は、膜結合ヒトＴＮＦαを実質上中和した。

【００８６】
ｉｎ　ＶｉｖｏでのヒトＩＬ－２３誘発性ｍＩＬ－２２産生の阻害
ヒトＩＬ－２３の投与は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの正常Ｂａｌｂ　Ｃマウスにおけるマウス
ＩＬ－２２（ｍＩＬ－２２）の発現を誘発する。ｍＩＬ－２２のこのヒトＩＬ－２３誘発性発現は、ｉｎ　ｖｉｖｏで、本発明の二重特異性抗体によってブロックされる（これはマウスＩＬ－２３またはマウスＴＮＦαと交差反応しない）。

【００８７】
正常Ｂａｌｂ　Ｃマウス（Ｎ＝８）に、５０ｎｍｏｌｅ／ｋｇの例示された二重特異性抗体（分子量２００ｋＤａ）または陰性対照抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体、５０ｎｍｏｌｅ／ｋｇ、分子量１５０ｋＤａ）のいずれかを腹腔内に注入する。注入の３日後、マウスを５０ｎｍｏｌ／ｋｇのヒトＩＬ－２３の腹腔内注入によって攻撃する。ＩＬ－２３攻撃の５時間後にマウスをと殺して血漿を収集する。収集した血漿を、マウスＩＬ－２２発現について、製造業者の説明に従って、市販のＥＬＩＳＡ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号８８－７４２２－８６）によって分析する。

【表５】

表5:in vivoでのヒトIL－23誘発性mIL－22産生の阻害(陰性対照抗体との比較)

	二重特異性抗体＋IL－23	ナイーブマウス	陰性対照抗体(ヒトIgG1アイソタイプ抗体)＋IL－23
mIL22レベル(pg／mL)	1.3±2.6	0±0	132±51

【００８８】
結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、ｍＩＬ－２２発現におけるヒトＩＬ－２３誘発性増加をブロックすることを実証する。この阻害は、ナイーブマウスにおいて観察されたマウスＩＬ－２２レベルと同等である一方で（ｐ＜０．０００１、ＡＮＯＶＡに続いてＴｕｋｅｙの多重比較試験）、陰性対照抗体は、ｍＩＬ－２２の発現におけるヒトＩＬ－２３誘発性増加を阻害しなかった。本発明の二重特異性抗体は、ヒトＩＬ－２３を実質上中和した。

【００８９】

ｉｎ　ＶｉｖｏでのＣＸＣＬ１のヒトＴＮＦα誘発性産生の阻害

ヒトＴＮＦαの投与は、ｉｎ　ｖｉｖｏで、通常Ｂａｌｂ　Ｃマウスにおける血漿中のマウスＣＸＣＬ１レベルの急速かつ一過的な増加を誘発する。このマウスＣＸＣＬ１レベルのヒトＴＮＦα誘発性増加は、ｉｎ　ｖｉｖｏで、本発明の例示された二重特異性抗体によってブロックされる（これはマウスＩＬ－２３またはマウスＴＮＦαと交差反応しない）。

【００９０】

通常Ｂａｌｂ　Ｃマウス（Ｎ＝８）に、腹腔内に（ａ）１８ｎｍｏｌｅ／ｋｇの二重特異性抗体、（ｂ）１８ｎｍｏｌｅ／ｋｇの陽性対照抗ＴＮＦα抗体（ＩｇＧ１アイソタイプを有するアダリムマブ）、または（ｃ）１８ｎｍｏｌｅ／ｋｇの陰性対照抗体（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体）のいずれかを注入する。注入の３日後、マウスを、１８ｎｍｏｌ／ｋｇのヒトＴＮＦαの腹腔内注入によって攻撃する。ＴＮＦα攻撃の２時間後にマウスをと殺して血漿を収集する。収集した血漿を、マウスＣＸＣＬ１レベルについて、製造業者の説明に従って、市販のＭＳＤアッセイ（Ｍａｓｏｌ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、カタログ番号Ｋ１５２ＱＴＧ－１）によって分析する。

【表６】

表6:in vivoでのヒトTNFα誘発性CXCL1産生の阻害(陰性対照抗体との比較)

	二重特異性抗体＋TNFα	陽性対照抗体(抗TNFα抗体)＋TNFα	陰性対照抗体(ヒトIgG1アイソタイプ抗体)＋TNFα	ナイーブマウス
CXCL1レベル(pg／mL)	622±147	633±162	2420±850	16±4.4

【００９１】

結果は、本発明の例示された二重特異性抗体が、陰性対照抗体を受けた動物と比較してヒトＴＮＦα誘発性ＣＸＣＬ１産生を有意に阻害することを実証する（ｐ＜０．０００１、ＡＮＯＶＡに続いてＴｕｋｅｙの多重比較試験）。二重特異性抗体でのＣＸＣＬ１産生の減少は、陽性対照抗体で観察されたものと同等であった。したがって、本発明の例示された二重特異性抗体は、マウスにおいてヒトＴＮＦαによって誘発された生物学的効果を実質上中和した。

【００９２】

親のＩＬ－２３抗体との抗体クリアランスの比較

二重特異性抗体の血清薬物動態を親のＩＬ－２３抗体（米国特許第７，８７２，１０２号に記載されているＩＬ－２３抗体）の血清薬物動態と比較するために、オスのカニクイザルに、５ｍｇ／ｋｇの例示された二重特異性抗体（静脈内（Ｎ＝２）、または皮下（Ｎ＝２））または５ｍｇ／ｋｇの親のＩＬ－２３抗体（静脈内（Ｎ＝３））のいずれかを投与する。例示された二重特異性抗体は、１０ｍＭのクエン酸（ｐＨ６．０）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．０２％Ｔｗｅｅｎ８０の溶液において調製する。親のＩＬ－２３抗体は、リン酸緩衝生理食塩水の溶液（ｐＨ約７．４）において調製する。

【００９３】

投与に先立って、約１．５ｍＬの血液を、それぞれのカニクイザルから収集する。投与後、血液（約１．５ｍＬ）を、投与後１（静脈内のみ）、６、１２、２４、４８、７２、９６、１６８、２４０、３３６、４３２、５０４、６００および６７２時間で収集する。血液試料を、大腿静脈から（例えば、抗凝血剤を含有しない）血清分離管内に静脈内で収集して血清に加工する。

【００９４】

血清試料を、ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｆ（ａｂ’）２フラグメントヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ

．）をＥＬＩＳＡプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標）Ｉｍｍｕｌｏｎ（登録商標）４ＨＢＸ）上にコートされた補足試薬として利用するトータルヒトＩｇＧＥＬＩＳＡによって分析する。血清試料（１００μＬ）を、ＥＬＩＳＡプレートの個々のウェルに加えて２５℃で６０分間インキュベートする。インキュベーション後、１００μＬ（１０，０００倍希釈）のマウス抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ－ＨＲＰ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を、例示された二重特異性抗体の検出のためにＥＬＩＳＡプレートのウェルに加えて１００μＬ（１０，０００倍希釈）のマウス抗ヒトIgG_4　Ｆｃ－ＨＲＰ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を、親のＩＬ－２３抗体の検出のためにＥＬＩＳＡプレートのウェルに加える。非結合酵素は、洗浄によって除去して１００μＬのＴＭＢマイクロウェルペルオキシダーゼ基質システム（ＫＰＬ）を、ＥＬＩＳＡプレートの個々のウェルに加える。１００μＬのＴＭＢ停止液（ＫＰＬ）の添加によって発色を止めてウェルの光学密度を、波長補正を６３０ｎｍに設定して４５０ｎｍで測定する。

【００９５】

それぞれ、例示された二重特異性抗体および親のＩＬ－２３抗体の両方の標準曲線を、それぞれ、既知の量の例示された二重特異性抗体および親のＩＬ－２３抗体の１００％カニクイザル血清（ＢｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎＩＶＴ）への希釈、続いてＰＢＳ中のブロッカーカゼイン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（商標）Ｐｉｅｒｃｅ（商標））の５倍希釈によって生成する。親のＩＬ－２３抗体の標準曲線範囲は、１．９５～１２５ｎｇ／ｍＬ（それぞれ、５０ｎｇ／ｍＬおよび５ｎｇ／ｍＬの定量化の上限および下限を有する）であり、例示された二重特異性抗体の標準曲線範囲は、１５．６３～１０００ｎｇ／ｍＬ（それぞれ、４５０ｎｇ／ｍＬおよび５０ｎｇ／ｍＬの定量化の上限および下限を有する）である。

【００９６】

薬物動態学的パラメーター（クリアランス値）を、免疫反応性対ゼロ（抗体の投与）から投与後１６８時間（例示された二重特異性抗体）または投与後６７２時間（親のＩＬ－２３抗体）までの時間プロファイルを用いて計算しＰｈｏｅｎｉｘ（ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ６．３、Ｃｏｎｎｅｃｔ１．３）を用いて非コンパートメント解析によって決定する。表８に結果を概説する。

【表７】

表8:単一IVまたは皮下投与後のカニクイザルにおける例示された二重特異性抗体および親のIL－23抗体の抗体クリアランス

投与された抗体	IVクリアランス (mL／時／kg)	皮下クリアランス (mL／時／kg)
例示された二重特異性抗体	0.23	0.34
親のIL－23抗体	1.17±0.06	該当なし

【００９７】

結果は、例示された二重特異性抗体が、カニクイザルにおいて親のＩＬ－２３抗体と比較して約５倍減少した抗体クリアランスを有することを実証する。

【００９８】

抗ＣＤ４０抗体誘発性ネズミ大腸炎モデルにおけるネズミＩＬ－２３およびネズミＴＮＦαの二重中和

本発明の二重特異性抗体は、ネズミＩＬ－２３（ｍＩＬ２３）またはネズミＴＮＦα（ｍＴＮＦα）に結合しない。したがって、齧歯類モデルにおいてＴＮＦαおよびＩＬ－２３を二重標的にする治療的可能性を試験するために、代理二重特異性抗体（代理二重特異性）を生成する。代理二重特異性は、改変キメラ抗ＴＮＦα　ｍＩｇＧ２ａ抗体（本発明の二重特異性抗体のＩｇＧがヒトにおいて標的にするように、マウスにおいて、同等のｍ

ＴＮＦαエピトープを標的にするアダリムマブの改変キメラ代理抗体）でできており、抗ＴＮＦα　ＩｇＧ２ａ抗体および（本発明の二重特異性抗体のｓｃＦｖがヒトにおいて標的にするように、マウスにおいて、同等のＩＬ２３ｐ１９エピトープを標的にする代理ネズミ抗体から改変された）改変抗ＩＬ－２３ｐ１９　ｓｃＦｖの重鎖の両方のＣ末端で融合している。代理二重特異性のｍＩＬ２３およびｍＴＮＦαに対する結合親和性を、それぞれ、１．５１ｎＭおよび０．０８ｎＭになる、表面プラズモン共鳴を用いて測定する。

【００９９】

大腸炎に関する二重標的ＴＮＦαおよびＩＬ－２３の治療的可能性を、抗ＣＤ４０抗体誘発性ネズミ大腸炎モデルにおいて代理二重特異性の治療効果（大腸重量対長さ）を抗ＴＮＦα単一抗体単独および抗ＩＬ－２３単一抗体単独の治療効果と比較することによって試験する。Ｒａｇ１ノックアウトマウスは、ネズミ抗ＣＤ４０抗体の注入時に、消耗性疾患、下痢および肛門炎症を含めた胃腸の症状、ならびに注入後４日以内の最大１０～２０％の体重減少に繋がる重篤な、急性大腸炎を発症する。

【０１００】

二重標的ＴＮＦαおよびＩＬ－２３の治療的可能性を判定するために、抗ＣＤ４０抗体の注入の３日前に、Ｒａｇ１ノックアウトマウスに（ａ）代理二重特異性（１．４ｍｇ／ｋｇ）、（ｂ）抗ＴＮＦα抗体（１ｍｇ／ｋｇ）、（ｃ）抗ＩＬ－２３抗体（０．３ｍｇ／ｋｇ）、または（ｄ）対照ＩｇＧ２ａ抗体（１ｍｇ／ｋｇ）のうちの１つを投与する（これらの抗体注入の用量は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの抗体暴露の同様レベルを生じる）。注入３日後、マウスに、１マウス当り２００μｇのネズミ抗ＣＤ４０抗体を投与する。抗ＣＤ４０抗体の投与４日後、マウスをと殺して大腸重量および長さを測定する（大腸炎症の大きさとして決定される大腸重量の長さに対する比は、抗ＣＤ４０抗体を投与していないマウスより大きい）。

【表８】

表9:比率の変化(大腸重量:長さ)

	代理二重特異性抗体	抗IL－23抗体	抗TNFα抗体	ネズミ IgG2a抗体
大腸重量:長さの変化(mg／mm)	2.68±0.09	3.27±0.09	3.18±0.09	4±0.098

【０１０１】

結果は、代理二重特異性抗体によるＴＮＦαおよびＩＬ－２３の二重ブロッキングが、抗ＩＬ－２３抗体および抗ＴＮＦα抗体療法単独と比較して大腸炎を阻害するために優れていることを実証する（抗ＩＬ－２３抗体単独と比較してｐ＜０．０００１、抗ＴＮＦ抗体単独と比較してｐ＜０．０００４、ＡＢＯＶＡに続いてダネットの検定法を用いる対照との比較）。代理二重特異性での大腸炎の阻害は、対照マウス（抗ＣＤ４０　抗体を投与されていない）で観察されたものと同等であった。したがって、代理二重特異性によるＴＮＦおよびＩＬ－２３の二重ブロッキングは、マウスにおける大腸炎を実質上阻害する。

【０１０２】

ネズミＧＰＩ誘発性リウマチ性関節炎モデルにおけるネズミＩＬ－２およびネズミＴＮＦαの二重中和

ＤＢＡ／１マウスは、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ（ＧＰＩ）の投与時に、足における急速な浮腫によって特徴付けられるリウマチ性関節炎を発症する。ＧＰＩは、解糖系におけるタンパク質であり、ＧＰＩに対する自己抗体は、ヒトリウマチ性関節炎患者ならびにネズミモデルの両方において実証されている。ＴＮＦαまたはＴｈ１７経路単独を標的にする療法は、ネズミモデルにおける関節腫脹を減少することにおける有効性を実証している（Ｍａｔｓｕｍｏｔｏ　２００８年、Ｉｗａｎａｍｉ　２００８年）。

【０１０３】

早期治療方式において投与された場合の（上述の、代理二重特異性抗体による）ネズミ

ＩＬ－２３およびネズミＴＮＦαの二重中和の有効性を実証するために、ＤＢＡ／１マウスに、４００μｇの組換えヒトＧＰＩおよび完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）（１：１ｖ／ｖ、尾の付け根における２つの皮下注入部位）を注入する。ＧＰＩの投与の８日後、マウスに、（週２回の腹腔内注入によって）（ａ）対照ネズミＩｇＧ２ａ抗体（９０μｇ）、（ｂ）代理二重特異性（４．２μｇ）＋対照ネズミＩｇＧ２ａ抗体（８７μｇ）、（ｃ）代理二重特異性（１２．６μｇ）＋対照ネズミＩｇＧ２ａ抗体（８１μｇ）、または（ｄ）代理二重特異性（４２μｇ）＋対照ネズミＩｇＧ２ａ抗体（６０μｇ）のうちの１つを投与する。ＧＰＩの投与３週後（２１日目）、マウスを安楽死させる。

【０１０４】

ＧＰＩの投与の日（０日目）およびそれ以降の２、４、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１６、１８、および２１日目に開始し、それぞれの足を、０～３採点システムに基づいて間接膨張の重症度について採点する（０＝正常、１＝紅斑および主要な間接のわずかな膨潤、２＝主要な間接の中程度から重篤な膨潤、ならびに３＝足全体の重篤な膨潤）。臨床スコアは、（最大スコアが１２である）全４足の合計スコアに相当する。曲線下の面積（ＡＵＣ）を、１日目から２１日目（調査の終わり）までの時間にわたる臨床スコアに関してトラペゾイド法によって計算する。臨床スコアＡＵＣデータ（表１０に平均±ＳＥＭとして示す）を、治療群に関してｏｎｅ－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡモデルに適合する。当該比較の試験ｐ値を、モデルベースのＴ試験から導く。

【表９】

表10:(種々の用量の)代理二重特異性抗体または対照抗体で治療したGPI誘発性関節炎マウスに関する臨床スコア(モデルベースのT試験からp＜0.05)

	対照抗体のみ	代理二重特異性(4.2μg)＋対照抗体(87μg)	代理二重特異性(12.6μg)＋対照抗体(81μg)	代理二重特異性(42μg)＋C対照抗体(60μg)
臨床スコアAUC	105.3±8.4	72.8±14.5	32.9±10.4	33.6±8.9

【０１０５】

結果は、代理二重特異性抗体によるＴＮＦおよびＩＬ－２３の二重ブロッキングが、濃度依存的様式でリウマチ性関節炎の間接膨張を減少することを実証する。（対照抗体または代理二重特異性のうちの１つで治療開始後）９日目に代理二重特異性抗体（ｓｕｒｒｏｇａｔｅ　ｂｉｓｅｐｃｉｆｉｃ　Ａｂ）で治療したマウスの平均臨床スコアは、対照抗体で治療したマウスよりも低い。代理二重特異性で治療したマウスの全３つの用量に関する臨床スコアＡＵＣが対照抗体で治療したマウスよりも有意に低く、最大臨床スコアは、代理二重特異性によって用量依存的に弱められる（１２．６μｇおよび４２μｇの代理二重特異性濃度は、最大パーセントの弱化を達成する）。

【０１０６】

ネズミＧＰＩ誘発性リウマチ性関節炎モデルにおけるネズミＩＬ－２３およびネズミＴＮＦαの二重中和のネズミＩＬ－２３単独およびネズミＴＮＦα単独の中和との比較

早期治療方式において投与された場合の、（代理二重特異性抗体による）ネズミＩＬ－２３およびネズミＴＮＦαの二重中和の有効性を単一のネズミＩＬ－２３および単一のネズミＴＮＦα治療と比較するために、ＤＢＡ／１マウスに、４００μｇの組換えヒトＧＰＩおよびＣＦＡ（１：１ｖ／ｖ、尾の付け根における２つの皮下注入部位）を注入する。ＧＰＩの投与の８日後、マウスに、（週２回の腹腔内注入によって）（ａ）対照ネズミＩｇＧ２ａ抗体（３０μｇ）、（ｂ）ネズミ抗ＩＬ－２３抗体（３０μｇ、本発明の二重特異性抗体のｓｃＦｖのように、マウスにおいて、同等のＩＬ２３ｐ１９エピトープを標的にする改変代理ネズミ抗体）、（ｃ）ネズミ抗ＴＮＦα抗体（３０μｇ、ヒトにおける本発明の二重特異性抗体標的のＩｇＧのように、マウスにおいて、同等のｍＴＮＦαエピトープを標的にするアダリムマブの改変キメラ代理抗体）、または（ｄ）代理二重特異性（

上述の、４２μｇ）のうちの１つを投与する。ＧＰＩの投与１２日後（１２日目）、マウスを安楽死させる。

【０１０７】

ＧＰＩの投与の日（０日目）およびそれ以降の２、４、７、８、９、１０、１１および１２日目に開始し、それぞれの足を、０～３採点システムに基づいて間接膨張の重症度について採点する（０＝正常、１＝紅斑および主要な間接のわずかな膨潤、２＝主要な間接の中程度から重篤な膨潤、ならびに３＝足全体の重篤な膨潤）。臨床スコアは、（最大スコアが１２である）全４足の合計スコアに相当する。曲線下の面積（ＡＵＣ）を、８日目（抗体で免疫化）から２１日目（調査の終わり）までの時間にわたる臨床スコアに関してトラペゾイド法によって計算する。臨床スコアＡＵＣデータ（表１１に平均±ＳＥＭとして示す）を、治療群に関してｏｎｅ－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡモデルに適合する。当該比較の試験ｐ値を、モデルベースのＴ試験から導く。８から１２日目までのそれぞれの個々のマウスに関する臨床スコアを、治療群、測定日およびそれらの相互作用の因子と共に反復測定モデルに適合する。自己回帰構造モデルも（日数にわたって反復して測定した同一の動物の相関性を説明するために）適用する。それぞれについての相乗効果を、Ｂｌｉｓｓ試験に関する相互作用の対比を構築することによって評価する。

【表１０】

表11:代理二重特異性抗体、ネズミ抗IL－23抗体、ネズミ抗TNFα抗体、または対照抗体で治療したGPI誘発性関節炎マウスに関する臨床スコア(モデルベースのT試験からp＜0.05)

	対照mIgG2a抗体	抗IL－23抗体	抗TNFα抗体	代理二重特異性
臨床スコアAUC	19.7±3.6	18.4±2.1	19.6±4.1	6.1±3.2

【０１０８】

結果は、代理二重特異性抗体によるＴＮＦαおよびＩＬ－２３の二重ブロッキングが、リウマチ性関節炎の間接膨張の減少に関して抗ＩＬ－２３抗体および抗ＴＮＦα抗体療法単独と比較して優れていることを実証する。（代理二重特異性、抗ＩＬ－２３抗体、抗ＴＮＦα抗体または対照抗体のうちの１つで治療開始後）９日目の代理二重特異性で治療したマウスの平均臨床スコアは、他の治療群より低い。したがって、代理二重特異性による、ＴＮＦαおよびＩＬ－２３の二重ブロッキングは、マウスにおけるリウマチ性関節炎の間接膨張を実質上減少する。

【０１０９】

配列

例示された第１のコードされたポリペプチド；ＩｇＧ　ＨＣ、Ｌ１、ｓＣＦｖ　ＨＣＶＲ２、Ｌ２、およびｓＣＦｖ　ＬＣＶＲ２（配列番号１）

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧ　ＬＶＱＰＧＲＳＬＲＬ　ＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤ　ＤＹＡＭＨＷＶＲＱＡ　ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡ　ＩＴＷＮＳＧＨＩＤＹ
ＡＤＳＶＥＧＲＦＴＩ　ＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹ　ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤ　ＴＡＶＹＹＣＡ
ＫＶＳ　ＹＬＳＴＡＳＳＬＤＹ　ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦ　ＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳ　ＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶ　ＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ　ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧ　ＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶ　ＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ　ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰ　ＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥ　ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣ　ＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫ　ＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴ　ＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶ　ＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ　ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮ　ＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹ
ＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬ　ＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ　ＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫ　ＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩ　ＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰ　ＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤ
ＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴ　ＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤ　ＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱ　ＰＥＮＮＹＫＴ

TPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG GGGSGGG
GSG GGGSQVQLVQ SGAEVKKPGS
SVKVSCKASG YPFTRYVMHW VRQAPGQCLE WMGYINP
YND GVNYNEKFKG RVTITADEST
STAYMELSSL RSEDTAVYYC ARNWDTGLWG QGTTVTV
SSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSD
IQMTQSPSSL SASVGDRVTI TCKASDHIGK FLTWYQQ
KPG KAPKLLIYGA TSKLTGVPSR
FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCQQY WSTPFTF
GCG TKVEIK

例示された第２のコードされたポリペプチド、ＩｇＧ ＬＣ（配列番号２）

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIR NYLAWYQ
QKP GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQR YNRAPYT
FGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSG
NSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

例示された第１のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列（配列番号３）

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctct
gggttccaggctccactggcgaggtgcagctggtggagtc
tgggggaggcttggtacagcctgggaggtccctgagactc
tcctgtgcagcctctggattcacctttgatgactatgccca
tgcactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtg
ggtgtcagctattacttggaatagtggtcacatagactac
gcagactccgtggagggccggttcaccatctccagagaca
atgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctgag
agccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagtgagc
tacctgagtactgcctccagcctggactactggggccaag
gaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc
atcggtcttccccgctagcaccctcctccaagagcacctct
gggggcacagcgggccctgggctgcctggtcaaggactact
tccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcc
tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccct
ccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaa
tcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgag
cccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcc
cagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttc
cccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccc
ctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgga
ggtgcataatgccaagacaaagccgcggggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc
accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatc
tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca

ccctgccccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggt
cagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac
atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaca
actacaagaccacgcccccccgtgctggactccgacggctc
cttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg
aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct
gtctccgggtggcggaggctccgggggggaggggggtagcgga
ggaggggggatcccaggtgcagctggtgcagtctgggggctg
aggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaa
ggcttctggatatccattcactcgctatgttatgcactgg
gtgcgacaggcccctggacaatgccttgagtggatgggat
atattaatccttacaatgatggtgtgaactacaatgagaa
gttcaaaggcagagtcacgattaccgcggacgaatccacg
agcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgagg
acacggccgtgtattactgtgcgagaaactgggacacagg
cctctgggggcaagggaccacggtcaccgtctcctcaggc
ggcggaggctctggcggaggtggtagtggtggcggtggat
cagggggaggcggatctgacatccagatgacccagtctcc
atcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatc
acttgcaaggcaagtgaccacattggcaaatttttaactt
ggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgat
ctatggtgcaaccagcaagctgactggggtcccatcaagg
ttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcacca
tcagcagtctgcaacctgaagatttgcaacttactactg
tcaacagtattggagtactccgttcacgttcggatgcggg
accaaggtggaaatcaaa

例示された第２のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列（配列番号４）

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctct
gggttccaggatccactggcgacatccagatgacccagtc
tccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
atcacttgccgggcgagtcagggcattcgcaattatttag
cctggtatcagcagaaaccagggaaagctcctaagctcct
gatctatgctgcatccactttgcaatcaggggtcccatct
cggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctca
ccatcagcagcctgcagcctgaagatgttgcaacttatta
ctgtcaacgctataaccgtgcccccttacacgttcggccaa
gggaccaaggtggaaatcaaacggactgtggctgcaccat
ctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatc
tggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat
cccagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccc
tccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcagga
cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacg
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct
gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaacaggggagagtgc

例示されたＩｇＧ重鎖可変領域１（配列番号５）

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧ　ＬＶＱＰＧＲＳＬＲＬ　ＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤ　ＤＹＡＭＨＷＶ

ＲＱＡ ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡ ＩＴＷＮＳＧＨＩＤＹ ＡＤＳＶＥＧＲＦＴＩ ＳＲＤ
ＮＡＫＮＳＬＹ ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤ ＴＡＶＹＹＣＡＫＶＳ ＹＬＳＴＡＳＳＬＤＹ
ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ Ｓ

例示されたｓｃＦｖ重鎖可変領域２（配列番号６）
ＱＶＱＬＶＱ ＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳ ＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧ ＹＰＦＴＲＹＶＭＨＷ
ＶＲＱＡＰＧＱＣＬＥ ＷＭＧＹＩＮＰＹＮＤ ＧＶＮＹＮＥＫＦＫＧ ＲＶＴＩＴＡＤ
ＥＳＴ ＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬ ＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣ ＡＲＮＷＤＴＧＬＷＧ ＱＧＴ
ＴＶＴＶＳＳ

例示されたＩｇＧ軽鎖可変領域１（配列番号７）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳ ＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴ ＩＴＣＲＡＳＱＧＩＲ ＮＹＬＡＷＹＱ
ＱＫＰ ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＡ ＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤ ＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ ＥＤＶＡＴＹＹＣＱＲ ＹＮＲＡＰＹＴ
ＦＧＱ ＧＴＫＶＥＩＫ

例示されたｓｃＦｖ軽鎖可変領域２（配列番号８）
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬ ＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩ ＴＣＫＡＳＤＨＩＧＫ ＦＬＴＷＹＱ
ＱＫＰＧ ＫＡＰＫＬＬＩＹＧＡ ＴＳＫＬＴＧＶＰＳＲ ＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦ ＴＬ
ＴＩＳＳＬＱＰＥ ＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹ ＷＳＴＰＦＴＦＧＣＧ ＴＫＶＥＩＫ

例示されたＨＣＤＲ１（配列番号９）
ＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＡＭＨ

例示されたＨＣＤＲ２（配列番号１０）
ＡＩＴＷＮＳＧＨＩＤＹＡＤＳＶＥＧ

例示されたＨＣＤＲ３（配列番号１１）
ＡＫＶＳＹＬＳＴＡＳＳＬＤＹ

例示されたＨＣＤＲ４（配列番号１２）
ＫＡＳＧＹＰＦＴＲＹＶＭＨ

例示されたＨＣＤＲ５（配列番号１３）
ＹＩＮＰＹＮＤＧＶＮＹＮＥＫＦＫＧ

例示されたＨＣＤＲ６（配列番号１４）
ＡＲＮＷＤＴＧＬ

例示されたＬＣＤＲ１（配列番号１５）
ＲＡＳＱＧＩＲＮＹＬＡ

例示されたＬＣＤＲ２（配列番号１６）
ＹＡＡＳＴＬＱＳ

例示されたＬＣＤＲ３（配列番号１７）
ＱＲＹＮＲＡＰＹＴ

例示されたＬＣＤＲ４（配列番号１８）
ＫＡＳＤＨＩＧＫＦＬＴ

例示されたＬＣＤＲ５（配列番号１９）
ＹＧＡＴＳＫＬＴ

例示されたＬＣＤＲ６（配列番号２０）
ＱＱＹＷＳＴＰＦＴ

例示されたポリペプチドリンカー１（配列番号２１）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ

例示されたポリペプチドリンカー２（配列番号２２）
ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ

例示されたＩｇＧ重鎖（配列番号２３）
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＤＤＹＡＭＨＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＳＡＩＴＷＮＳＧＨＩＤＹ
ＡＤＳＶＥＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＫＶＳ
ＹＬＳＴＡＳＳＬＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳ
ＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥ
ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ
ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹ
ＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩ
ＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤ
ＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲ
ＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰ

【配列表】
2017533705000001.app

【手続補正書】
【提出日】平成29年4月28日(2017.4.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩＬ－２３のｐ１９サブユニット（ＩＬ２３ｐ１９）に結合する２つの単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）にコンジュゲートした腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦα）に結合する免疫グロブリンＧ抗体（ＩｇＧ）を含む二重特異性抗体であって、
ａ．）前記ＩｇＧが、２つの重鎖（ＨＣ）および２つの軽鎖（ＬＣ）を含み、それぞれのＨＣが、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ１）を含み、それぞれのＬＣが、軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ１）を含み、ＨＣＶＲ１のアミノ酸配列が、配列番号５であり、ＬＣＶＲ１のアミノ酸配列が、配列番号７であり、かつ
ｂ．）それぞれのｓｃＦｖが、重鎖可変領域（ＨＣＶＲ２）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ２）を含み、ＨＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号６であり、ＬＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号８であり、

それぞれのｓｃＦｖが、それぞれのＩｇＧ　ＨＣのＣ末端およびそれぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のＮ末端に共有結合しているポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して独立に前記ＩｇＧ抗体にコンジュゲートし、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２が、ＨＣＶＲ２のＣ末端および同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のＮ末端に共有結合している第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して同一のｓｃＦｖのＬＣＶＲ２に共有結合しており、Ｌ１のアミノ酸配列が、配列番号２１であり、Ｌ２のアミノ酸配列が、配列番号２２である、二重特異性抗体。

【請求項２】

それぞれのＨＣのアミノ酸配列が、配列番号２３であり、それぞれのＬＣのアミノ酸配列が、配列番号２であり、それぞれのｓｃＦｖのＨＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号６であり、それぞれのｓｃＦｖのＬＣＶＲ２のアミノ酸配列が、配列番号８であり、Ｌ１のアミノ酸配列が、配列番号２１であり、Ｌ２のアミノ酸配列が、配列番号２２である、請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項３】

請求項１または２に記載の二重特異性抗体の

（ｉ）１つのＨＣ、１つのｓｃＦｖ、１つのポリペプチドリンカーおよび１つの第２のポリペプチドリンカーを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列と、

（ｉｉ）１つのＬＣを含むポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列と

を含むＤＮＡ分子。

【請求項４】

前記１つのＨＣ、１つのｓｃＦｖ、１つのポリペプチドリンカーおよび１つの第２のポリペプチドリンカーを含むコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号１であり、前記１つのＬＣを含むコードされたポリペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列番号２である、請求項３に記載のＤＮＡ分子。

【請求項５】

請求項３または４に記載のＤＮＡ分子を含む哺乳動物細胞。

【請求項６】

前記細胞が、請求項１または２に記載の二重特異性抗体を発現することができる、請求項５に記載の哺乳動物細胞。

【請求項７】

ａ）前記二重特異性抗体が発現されるような条件下で請求項５に記載の哺乳動物細胞を培養するステップと、

ｂ．）前記発現された二重特異性抗体を回収するステップと

を含む、請求項１または２に記載の二重特異性抗体を製造するための方法。

【請求項８】

請求項７に記載の方法によって製造された二重特異性抗体。

【請求項９】

請求項１または２に記載の二重特異性抗体および１種または複数の薬学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項１０】

潰瘍性大腸炎の治療のための薬物の製造における請求項１または２に記載の二重特異性抗体の使用。

【請求項１１】

リウマチ性関節炎の治療のための薬物の製造における請求項１または２に記載の二重特異性抗体の使用。

【請求項１２】

療法において使用するための請求項９に記載の医薬組成物。

【請求項１３】

潰瘍性大腸炎の治療のための請求項９に記載の医薬組成物。

【請求項１４】

リウマチ性関節炎の治療のための請求項９に記載の医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/058719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24 C07K16/28 A61K39/395 A61K39/00
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 G01N A61K

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, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/121140 A1 (FACET BIOTECH CORP [US]; HARDING FIONA A [US]; AKAMATSU YOSHIKO [US];) 21 October 2010 (2010-10-21) paragraph [0026] - paragraph [0028]; claims 68, 80	1-20
Y	WO 2008/106131 A2 (SCHERING CORP [US]; BOWMAN EDWARD PAUL [US]; CUA DANIEL J [US]; KASTEL) 4 September 2008 (2008-09-04) claims 16,22,25	1-20
Y	WO 2011/070339 A1 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]; WILLIAMS RICHARD OWEN [GB]) 16 June 2011 (2011-06-16) claims 1-16	1-20

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
18 January 2016	29/01/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Klee, Barbara

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/058719

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/147019 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; LEWIS KATHERINE E [US]; PRESNELL SCOTT R [US];) 21 December 2007 (2007-12-21) claims 3,72	1-20
Y	WO 2009/120922 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; SIVAKUMAR PALLAVUR V [US]; GILBERTSON DEBRA G [] 1 October 2009 (2009-10-01) [0038], [0166-0180,0184], [0349]; page 144 - page 155; claims 65, 93,98; figure 2c	1-20

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/058719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010121140 A1	21-10-2010	AU 2010236256 A1	03-11-2011
		CA 2758964 A1	21-10-2010
		CN 102439040 A	02-05-2012
		CO 6450656 A2	31-05-2012
		CR 20110526 A	09-02-2012
		DO P2011000316 A	29-02-2012
		EC SP11011450 A	30-03-2012
		EP 2419448 A1	22-02-2012
		EP 2918602 A1	16-09-2015
		JP 5795759 B2	14-10-2015
		JP 2012524071 A	11-10-2012
		KR 20110138412 A	27-12-2011
		NZ 595687 A	29-11-2013
		PE 08352012 A1	23-07-2012
		RU 2011145428 A	27-05-2013
		SG 175181 A1	28-11-2011
		TW 201041592 A	01-12-2010
		US 2010266613 A1	21-10-2010
		US 2012135005 A1	31-05-2012
		US 2014212424 A1	31-07-2014
		WO 2010121140 A1	21-10-2010
WO 2008106131 A2	04-09-2008	AU 2008219681 A1	04-09-2008
		BR PI0807987 A2	24-06-2014
		CA 2679400 A1	04-09-2008
		CN 101668531 A	10-03-2010
		CN 103933573 A	23-07-2014
		EP 2056838 A2	13-05-2009
		EP 2417974 A1	15-02-2012
		EP 2425838 A2	07-03-2012
		JP 5337055 B2	06-11-2013
		JP 2010520197 A	10-06-2010
		JP 2012251002 A	20-12-2012
		NZ 579297 A	30-03-2012
		NZ 597915 A	30-08-2013
		US 2010135998 A1	03-06-2010
		US 2012156699 A1	21-06-2012
		US 2013287775 A1	31-10-2013
		WO 2008106131 A2	04-09-2008
		ZA 200905962 A	26-05-2010
WO 2011070339 A1	16-06-2011	NONE	
WO 2007147019 A2	21-12-2007	AU 2007260787 A1	21-12-2007
		CA 2655372 A1	21-12-2007
		EP 2044118 A2	08-04-2009
		JP 2009540018 A	19-11-2009
		US 2008095775 A1	24-04-2008
		US 2011059087 A1	10-03-2011
		US 2012295310 A1	22-11-2012
		WO 2007147019 A2	21-12-2007
WO 2009120922 A2	01-10-2009	AU 2009228158 A1	01-10-2009
		AU 2014202867 A1	19-06-2014
		CA 2716882 A1	01-10-2009
		DK 2274008 T3	12-05-2014
		EP 2274008 A2	19-01-2011
		EP 2604279 A1	19-06-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/058719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2604280 A2	19-06-2013
		ES 2456296 T3	21-04-2014
		HR P20140244 T1	11-04-2014
		IL 207618 A	30-11-2014
		JP 5425180 B2	26-02-2014
		JP 2011518546 A	30-06-2011
		JP 2014073129 A	24-04-2014
		PT 2274008 E	12-05-2014
		SI 2274008 T1	29-08-2014
		US 2011177074 A1	21-07-2011
		WO 2009120922 A2	01-10-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	***1/04***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	***29/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ	
Ａ６１Ｐ	***19/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
			Ａ６１Ｐ	19/02		
			Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	

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

(72)発明者 キャサリン・ビー・バイドラー
アメリカ合衆国４６２０６－６２８８インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス６２８８、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
(72)発明者 ローン・エル・ミリカン・ジュニア
アメリカ合衆国４６２０６－６２８８インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス６２８８、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
(72)発明者 ソンチン・ナ
アメリカ合衆国４６２０６－６２８８インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス６２８８、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
(72)発明者 ヌンソン・ソ
アメリカ合衆国４６２０６－６２８８インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス６２８８、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

Ｆターム(参考) 4B064 AG26 CA10 CA19 CE12 DA01
4B065 AA90X AB01 BA02 BA03 BB32 BC01 CA24 CA44
4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 CC23 DD23 DD33 DD62 EE01
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA42 DA75 EA20 FA72 FA74 GA26