

(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2017-511139

(P2017-511139A)

(43) 公表日 平成29年4月20日 (2017.4.20)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A C	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)		C 0 7 K 16/46		4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2016-560589 (P2016-560589)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成27年4月1日 (2015.4.1)		エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/057165		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02015/150447		T
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015.10.8)		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(31) 優先権主張番号	14163165.5		グレンツァーヘルストラッセ 1 2 4
(32) 優先日	平成26年4月2日 (2014.4.2)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	14179034.5	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成26年7月30日 (2014.7.30)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 多重特異性抗体

(57) 【要約】

本発明は、多重特異性抗体と、それらの製造および使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに
b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む、多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

多重特異性抗体。

【請求項 2】

- a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに
b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む多重特異性抗体であって、

a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

多重特異性抗体。

【請求項 3】

a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸が、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、請求項1または請求項2に記載の多重特異性抗体。

【請求項 4】

a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸が、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、123番目のアミノ酸が、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されており (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、213番目のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、請求項2に記載の多重特異性抗体。

【請求項 5】

b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸が、独立して、リ

ジン（K）、アルギニン（R）、またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb）に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸が、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、請求項1に記載の多重特異性抗体。

【請求項6】

a）に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸がリジン（K）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、123番目のアミノ酸がリジン（K）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつ

a）に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸がグルタミン酸（E）で置換されており（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、213番目のアミノ酸がグルタミン酸（E）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、

請求項2に記載の多重特異性抗体。

【請求項7】

a）に記載の抗体の第1重鎖の第1CH3ドメインおよびb）に記載の抗体の第2重鎖の第2CH3ドメインが、それぞれ、抗体CH3ドメイン間の元の境界面を含む境界面において接することを特徴とし、

該界面は多重特異性抗体の形成を促進するように改変されており、

前記改変は、

i) 一方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

アミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内のくぼみ内に配置されうる突起を生成するように、

改変されていること、

および

ii) 他方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

アミノ酸残基が、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内の突起が内部に配置されうるくぼみを生成するように、

改変されていること

を特徴とする、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項8】

より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基が、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、およびトリプトファン（W）からなる群より選択され、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基が、アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）、およびバリン（V）からなる群より選択されることを特徴とする、請求項7に記載の抗体。

【請求項9】

両CH3ドメイン間にジスルフィド架橋が形成されうるように、各CH3ドメインの対応する位置にアミノ酸としてシステイン（C）を導入することによって、両CH3ドメインがさらに改変されていることを特徴とする、請求項7または8に記載の抗体。

【請求項10】

A) SEQ ID NO:24の可変重鎖ドメイン（VH）およびSEQ ID NO:25の可変軽鎖ドメイン（VL）を含み、かつ

B) SEQ ID NO:26の可変重鎖ドメイン（VH）およびSEQ ID NO:27の可変軽鎖ドメイン（V

10

20

30

40

50

L) を含み、

ヒトTWEAKに特異的に結合し、かつヒトIL17に特異的に結合する、前記請求項のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 1】

以下の工程を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を調製するための方法：

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

10

をコードする核酸分子を含むベクターで宿主細胞を形質転換する工程であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R)、またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、工程、

20

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 該培養から該抗体分子を回収する工程。

【請求項 1 2】

請求項1～10のいずれか一項に記載の多重特異性抗体のアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項 1 3】

請求項12に記載の核酸を宿主細胞中で発現させる能力を有する請求項12に記載の核酸を含有する発現ベクター。

30

【請求項 1 4】

請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

【請求項 1 5】

請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体と少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規多重特異性抗体、それらの製造および使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

発明の背景

2種類以上の抗原に結合する能力を有する二重特異性抗体または多重特異性抗体などの改変タンパク質は、当技術分野において公知である。そのような多重特異性結合タンパク質は、細胞融合、化学的コンジュゲーション、または組換えDNA技法を使って作製することができる。

【0003】

近年、例えばIgG抗体フォーマットと一本鎖ドメインとの融合による四価二重特異性抗体などといった、多種多様な組換え多重特異性抗体フォーマットが開発されている (例え

50

ばColoma, M.J., et. al., Nature Biotech. 15 (1997) 159-163、WO 2001/077342、およびMorrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234を参照されたい)。

【0004】

他にも、2種類以上の抗原に結合する能力を有するダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、いくつかの一本鎖フォーマット (scFv、Bis-scFv) など、もはや抗体コア構造 (IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM) が保たれていない新しいフォーマットが、いくつか開発されている (Holliger, P., et. al., Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136、Fischer, N., and Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14、Shen, J., et. al., J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74、Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

10

【0005】

上述のフォーマットはいずれも、抗体コア (IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM) をさらにもう1つの結合タンパク質 (例えばscFv) に融合するために、あるいは例えば2つのFabフラグメントまたはscFvを融合するために、リンカーを使用する (Fischer, N., and Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。リンカーが二重特異性抗体のエンジニアリングにとって有利であることは明白だが、治療環境ではリンカーは問題も引き起こしうる。事実、これらの外来ペプチドは、リンカーそのものに対する免疫応答を引き出したり、タンパク質とリンカーとの間の接合部に対する免疫応答を引き出したりするかもしれない。そのうえ、これらのペプチドのフレキシブルな性質は、タンパク質分解的切断を受けやすくし、低い抗体安定性、凝集および免疫原性の増加に潜在的につながるかもしれない。加えて、例えば天然の抗体に対して高い類似度を維持することによってFc部分が媒介する補体依存性細胞傷害 (CDC) または抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) などといったエフェクター機能を保ちたい場合もありうる。

20

【0006】

したがって理想的には、(IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgMのような) 天然の抗体と全体的構造がよく似ており、ヒト配列からの逸脱が最小限である二重特異性抗体の開発を目指すべきである。

【0007】

1つのアプローチでは、天然の抗体によく似た二重特異性抗体が、その二重特異性抗体の所望の特異性を持つマウスモノクローナル抗体を発現する2つの異なるハイブリドーマ細胞株の体細胞融合に基づくクアドローマ技術 (Milstein, C, and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540参照) を使って生産された。結果として得られるハイブリッド-ハイブリドーマ (すなわちクアドローマ) 細胞株内では2つの異なる抗体の重鎖と軽鎖がランダムにペアリングするので、最大で10種類の異なる抗体種が生成するが、所望の機能的二重特異性抗体はそのうちの1つだけである。ミスペアリングした副生成物の存在と著しい生産収量の低減ゆえに、洗練された精製手法が必要になる (例えばMorrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234参照)。一般に、組換え発現技法を使ったとしても、これと同じ、ミスペアリングした副生成物の問題は残る。

30

【0008】

ミスペアリングした副生成物の問題を克服するための、「ノブ・イントゥ・ホール (knobs-into-holes)」として知られているアプローチでは、CH3ドメインに変異を導入して接触境界面を修飾することによって、2つの異なる抗体重鎖のペアリングを強制することを目指す。一方の鎖では、「ホール」を作り出すために、嵩高いアミノ酸が短い側鎖を持つアミノ酸で置き換えられた。逆に、他方のCH3ドメインには、「ノブ」を作り出すために、大きな側鎖を持つアミノ酸が導入された。これら2つの重鎖 (および2つの同一軽鎖、これらの軽鎖はどちらの重鎖にとっても適当である必要がある) を共発現させることにより、ホモ二量体形成 (「ホール-ホール」または「ノブ-ノブ」) と対比して高収率のヘテロ二量体形成 (「ノブ-ホール」) が観察された (Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621、およびWO 96/027011)。ファージディスプレイアプローチを使用して2つのCH3ドメインの相互作用面をリモデリングすることと、ヘテロ二量体を安定化する

40

50

ためにジスルフィド架橋を導入することによって、ヘテロ二量体のパーセンテージをさらに増加させることができた (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681、Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)。ノブ・イントゥ・ホール技術の新しいアプローチは、例えばEP 1 870 459 A1に記載されている。このフォーマットは非常に魅力的だと思われるが、臨床に向けた進歩を物語るデータはまだない。この戦略の重要な制約の1つは、ミスペアリングと不活性分子の形成を防止するために、2つの親抗体の軽鎖が同一であることを必要とする点である。したがってこの技法は、第1抗原および第2抗原に対する2つの抗体から出発して3種類または4種類の抗原に対する組換え三重特異性または四重特異性抗体を容易に開発する基礎としては、適当でない。というのも、これらの抗体の重鎖および/または同一軽鎖のいずれかをまず最適化する必要があり、次に、さらに第3抗原および第4抗原に対する抗原結合ペプチドを加える必要があるからである。

【0009】

WO 2006/093794は、ヘテロ二量体タンパク質結合組成物に関する。WO 99/37791には多目的抗体誘導体が記載されている。Morrison, S.L., et al., J. Immunol. 160 (1998) 2802-2808は、可変領域ドメインの交換がIgGの機能的特性に及ぼす影響に言及している。

【0010】

WO 2013/02362はヘテロ二量体化ポリペプチドに関する。WO 2013/12733は、ヘテロ二量体型Fc領域を含むポリペプチドに関する。WO 2012/131555は、改変ヘテロ二量体型免疫グロブリンに関する。EP 2647707は改変ヘテロ二量体型免疫グロブリンに関する。

【0011】

WO 2013/026835は、ドメイン交差 (crossover) が施された二重特異性Fc非含有抗体に関する。WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254およびSchaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191は、ドメイン交差が施された二価二重特異性IgG抗体に関する。

【0012】

WO2009/080252に記載された、軽鎖ミスペアリングを防止するために1つの結合にVH/VL入れ替え/交換が施された多重特異性抗体 (CrossMab^{VH-VL}) (Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191も参照されたい) は、第1抗原に対する軽鎖と第2抗原に対する間違った重鎖とのミスマッチによって引き起こされる副生成物を (そのようなドメインの交換を伴わないアプローチと比較して) 明確に低減する。しかしそれらの調製物は副生成物を全く含まないわけではない。主要な副生成物はペンス-ジョーンズ型相互作用に基づく-Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191のSupplementのFig. S1Iも参照されたい)。

【0013】

それゆえに、そのような副生成物をさらに低減して、例えば上述の二重特異性抗体の収率などを改良することは、今なお必要とされている。

【発明の概要】

【0014】

本発明は、

a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換さ

10

20

30

40

50

れているか（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、

多重特異性抗体に関する。

【0015】

本発明のさらにもう1つの態様は、以下の工程を含む、本発明の多重特異性抗体を調製するための方法である：

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに
b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターであって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されているか（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）

ベクターで、宿主細胞を形質転換する工程、

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 該培養から該抗体分子を回収する工程。

【0016】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明の多重特異性抗体のアミノ酸配列をコードする核酸である。

【0017】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明の核酸を宿主細胞中で発現させる能力を有する、本発明の核酸を含有する発現ベクターである。

【0018】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明のベクターを含む宿主細胞である。

【0019】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明の抗体の組成物、例えば薬学的組成物または診断用組成物である。

【0020】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明の抗体と少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物である。

【0021】

本発明のさらにもう1つの態様は、治療有効量の本発明の抗体を患者に投与することの特徴とする、治療を必要とする患者を処置するための方法である。

【0022】

本発明によれば、CH1ドメインおよびCLドメイン中の特別なアミノ酸位置に反対の電荷

10

20

30

40

50

を持つ荷電アミノ酸の置換を導入することによって、望ましくない主要ベンス-ジョーンズ型副生成物と比較した所望の多重特異性抗体の比を改善することができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】図1は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、かつ一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、本発明の多重特異性抗体のいくつかの例。図1A:一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他方の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。 10

【図1B】図1は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、かつ一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、本発明の多重特異性抗体のいくつかの例。図1B:一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。 20

【図1C】図1は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、かつ一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、本発明の多重特異性抗体のいくつかの例。図1C:一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他方の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異、および重鎖ヘテロ二量体化を強制するためのCH3/CH3ドメイン境界面の修飾（例えばノブ・イントゥ・ホール技術のような修飾、または例えば各々の反対電荷を持つ荷電アミノ酸による置換のような代替ヘテロ二量体化技術の修飾）。 30

【図2A】一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に変異を持たない多重特異性抗体の例（左側）、およびこの多重特異性抗体の主要副生成物（VL-VLベンス-ジョーンズ型ドメイン相互作用によるもの）-潜在的副生成物として考える他の変異体は、そのままの質量分析でも、そのFabフラグメントを分析することによるプラスミン消化またはLysC消化後の質量分析でも、検出されなかった。

【図2B】一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に変異を持たない多重特異性抗体の主要副生成物（VL-VLベンス-ジョーンズ型ドメイン相互作用によるもの）の起源。 40

【図3】図3A: CH1ドメインにおける野生型（wt）アミノ酸配列（2つのIgGアイソタイプが示されている）であり、147番目および213番目のアミノ酸（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）に下線が付され、強調されている。図3B: カッパアイソタイプのCLドメインにおける野生型（wt）アミノ酸配列であり、124番目および123番目のアミノ酸（ナンバリングはKabatに従う）に下線が付され、強調されている。図3C: ラムダアイソタイプのCLドメインにおける野生型（wt）アミノ酸配列であり、124番目および123番目のアミノ酸（ナンバリングはKabatに従う）に下線が付され、強調されている。

【図4A】CH1/CL境界面中の本発明の単一荷電アミノ酸置換による主要ベンス-ジョーンズ型副生成物の低減。VH/VLドメインの交換/入れ替えが施された本発明の抗Ang2-VEGF多 50

重特異性抗体 (CrossMab^{Vh-VL}) の例。野生型 (wt) および単一荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせの比較。1) CH1/CL境界面に特異的アミノ酸置換を持たない野生型 (wt) 抗Ang2-VEGF CrossMab^{Vh-VL} 多重特異性抗体、2) i) CLドメインの124番目およびCH1ドメインの147番目 (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う) に置換を持つか、またはii) CLドメインの124番目およびCH1ドメインの213番目 (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う) に置換を持つ、本発明の抗Ang2-VEGF多重特異性抗体、3) 異なる位置に置換を持つ、他の抗Ang2-VEGF CrossMab^{Vh-VL} 多重特異性抗体。

【図4B】図4Aに結果を示した多重特異性抗体の配列 (SEQ ID NO)。

【図5A】CH1/CL境界面中の異なる荷電アミノ酸置換による主要ベンス-ジョーンズ型副生成物の低減。VH/VLドメインの交換/入れ替えが施された本発明の抗Ang2-VEGF多重特異性抗体 (CrossMab^{Vh-VL}) の例。野生型 (wt) および荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせの比較。

10

【図5B】図5Aに結果を示した多重特異性抗体の配列 (SEQ ID NO)。

【図6A】CH1/CL境界面中の異なる荷電アミノ酸置換による主要ベンス-ジョーンズ型副生成物の低減。VH/VLドメインの交換/入れ替えが施された本発明の抗IL-17/TWEAK多重特異性抗体 (CrossMab^{Vh-VL}) の例。野生型 (wt) および荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせの比較。

【図6B】図6Aに結果を示した多重特異性抗体の配列 (SEQ ID NO)。

【図7A】図7は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の二価多重特異性抗体 (Fab-CrossFab^{VH-VL} フォーマットおよびCrossFab^{VH-VL}-Fab) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図7A: 一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他方の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

20

【図7B】図7は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の二価多重特異性抗体 (Fab-CrossFab^{VH-VL} フォーマットおよびCrossFab^{VH-VL}-Fab) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図7B: 一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

30

【図7C】図7は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の二価多重特異性抗体 (Fab-CrossFab^{VH-VL} フォーマットおよびCrossFab^{VH-VL}-Fab) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図7C: 一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替えと、同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異、そしてさらに他方の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

40

【図7D】図7は、一方の抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、一方のCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の二価多重特異

50

性抗体 (Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマットおよびCrossFab^{VH-VL}-Fab) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図7D: 一方の抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他方の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図8A】図8は、1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の三価多重特異性抗体 (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図8A: 1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図8B】図8は、1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の三価多重特異性抗体 (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図8B: 1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図8C】図8は、1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の三価多重特異性抗体 (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図8C: 1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図8D】図8は、1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の三価多重特異性抗体 (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。図8D: 1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図8E】図8は、1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の三価多重特異性抗体 (Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット) のいくつかの例。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独

10

20

30

40

50

立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。図8E:1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替えと、同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異、そしてさらに他の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【図9】1つの抗体結合アームにVH/VLドメインの入れ替えが施され、1つのCH1/CLドメイン境界面に特異的変異を持ち、Fcフラグメントを欠く、本発明の四価多重特異性抗体のいくつかの例（Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}フォーマット）。前記CLドメインの少なくとも124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつ、前記CH1ドメインの少なくとも147番目のアミノ酸または前記CH1ドメインの少なくとも213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。図9A:1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および他の抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。図9B:1つの抗体結合アームにおけるVH/VLドメインの入れ替え、および同じ抗体結合アームのCH1/CLドメイン境界面における特異的変異。

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明の詳細な説明

一方の結合アームにドメインの入れ替え/交換が施された多重特異性抗体（CrossMabVH-VL）は、W02009/080252およびSchaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191に詳述されている（これらは参考文献として本明細書に組み入れられる）。これらは、第1抗原に対する軽鎖と第2抗原に対する間違っただ重鎖とのミスマッチによって生じる副生成物を（そのようなドメインの交換を伴わないアプローチと比較して）明らかに低減する。しかし、それらの調製物は副生成物を全く含まないわけではない。主要副生成物はベンズ-ジョーンズ型相互作用に基づく-Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191のSupplementのFig. S1Iも参照されたい）。

【0025】

そこで、本発明者らは、CH1ドメインとCLドメイン中の特異的アミノ酸位置に反対の電荷を持つ荷電アミノ酸の置換を導入することにより、上述の副生成物をさらに低減して、上述の多重特異性抗体（すなわち、図1に示すように、VH/VLドメインの入れ替え/交換を1つの抗原特異性を持つ結合アームだけに含み、他の抗原特異性を持つ結合アーム（1つまたは複数）はVH/VLドメインの入れ替え/交換を含まずに野生型抗体ドメイン配置を持つ、多重特異性抗体）の収量を改良するアプローチを、ここに見いだした。

【0026】

それゆえに、本発明は、

a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに
b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む、多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸（ナンバリングはKabatに従う）は正荷電アミノ酸で置換されており、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）は負荷電アミノ酸で置換されているか、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸（ナンバリングはKabatに従う）は正荷電アミノ酸で置換されており、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）は負荷電アミノ酸で置換されている、

多重特異性抗体に関する。

【0027】

10

20

30

40

50

本発明の考えによれば、本発明の抗体は、上記および下記のi) およびii) に示す修飾を、1つだけ含む。したがって、本発明の多重特異性抗体は、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおける、正荷電アミノ酸による124番目のアミノ酸の置換（ナンバリングはKabatに従う）、およびa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1における、負荷電アミノ酸による147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸の置換（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）

または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおける、正荷電アミノ酸による124番目のアミノ酸の置換（ナンバリングはKabatに従う）、およびb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1における、負荷電アミノ酸による147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸の置換（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）

のどちらかを含む。ただし、前記多重特異性抗体は、i) で言及した修飾とii) で言及した修飾の両方を含むことはないものとする。

【0028】

それゆえに、本発明は、

a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されているか（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、

多重特異性抗体に関する。

【0029】

本発明はさらに、

a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸（ナンバリングはKabatに従う）は正荷電アミノ酸で置換されており、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）は負荷電アミノ酸で置換されている、

多重特異性抗体に関する。

【0030】

本発明はさらに、

a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖お

よび第2重鎖

を含む多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

多重特異性抗体に関する。

【0031】

10

したがって、本発明の多重特異性抗体に含まれる、第2抗原に特異的に結合する第2抗体については、下記が当てはまる:

- ・軽鎖内では、可変軽鎖ドメインVLが、該抗体の可変重鎖ドメインVHで置き換えられており、かつ

- ・重鎖内では、可変重鎖ドメインVHが、該抗体の可変軽鎖ドメインVLで置き換えられており、かつ

- ・第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の定常ドメインCLおよびCH1は、互いに入れ替えられていない (無交換のままである)。

【0032】

20

したがって、本発明の多重特異性抗体に含まれる、第1抗原に特異的に結合する抗体については、下記が当てはまる:

- ・第1抗体に由来する第1軽鎖内では、軽鎖のドメインの連続的配置 (CL-VL) が無変更のままであり、かつ

- ・第1抗体に由来する第1重鎖では、重鎖のドメインの連続的配置 (例えばCH1-VHまたはCH3-CH2-CH1-VH) が無変更のままである (それゆえに、第1抗体に特異的に結合する抗体はドメインの交換を含まず、特にVH/VLの交換を含まない)。

【0033】

言い換えると、本発明の多重特異性抗体に含まれる、第1抗原に特異的に結合する抗体は、

- ・ (N末端からC末端の方向に) VL-CLという軽鎖ドメインの連続的配置を含む、該第1抗体に由来する第1軽鎖と、

- ・ (N末端からC末端の方向に) CH1-VHという重鎖ドメインの連続配置を含む (一態様では、第1重鎖はN末端からC末端の方向にCH3-CH2-CH1-VHという重鎖ドメインの連続的配置を含む)、第1抗体に由来する第1重鎖

を含む。

【0034】

本明細書にいう「抗体の軽鎖」は、N末端からC末端の方向に、抗体軽鎖可変ドメイン (VL) および抗体軽鎖定常ドメイン (CL) を含み、VL-CLと略記される、ポリペプチドである。

【0035】

40

本明細書にいう「抗体の重鎖」は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体定常重鎖ドメイン1 (CH1) を含むポリペプチドである。

【0036】

本発明の一態様において、多重特異性抗体の重鎖は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体定常重鎖ドメイン1 (CH1) を含み、重鎖定常ドメインCH2およびCH3を欠くので、VH-CH1と略記される。一態様において、本発明の多重特異性抗体は、少なくとも2つのFabフラグメントを含み、第1Fabフラグメントは第1抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、第2Fabフラグメントは第2抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、第2Fabフラグメントにおいて、第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとは互いに入れ替えられており、この多重特異性抗体はFcドメインを

50

欠き、さらに、

i) 第1Fabフラグメントの軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ第1Fabフラグメントの重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、または

ii) 第2Fabフラグメントの軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ第2Fabフラグメントの重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。

【0037】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は少なくとも2つのFabフラグメントを含み、第1Fabフラグメントは第1抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、第2Fabフラグメントは第2抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、第2Fabフラグメントにおいて、第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとは互いに入れ替えられており、この多重特異性抗体はFcドメインを欠き、さらに

i) 第1Fabフラグメントの軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつ第1Fabフラグメントの重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。

【0038】

本明細書にいう「Fabフラグメント」とは、可変VLドメインおよび軽鎖の定常ドメイン (CL) を含む軽鎖フラグメントと、可変VHドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン (CH1) とを含む抗体フラグメントを指す。この態様の多重特異性抗体は、少なくとも2つのFabフラグメントを含み、第2Fabフラグメントの重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域は交換されている。可変領域が交換されているので、該第2Fabフラグメントを、「クロス (cross)-Fabフラグメント」または「xFabフラグメント」または「交差 (crossover) Fabフラグメント」ともいう。Fab重鎖の可変領域とFab軽鎖の可変領域とが交換されている第2Fabフラグメントにおいて、交差Fab分子は、軽鎖可変領域 (VL) および重鎖定常領域 (CH1) で構成される修飾重鎖、ならびに重鎖可変領域 (VH) および軽鎖定常領域 (CL) で構成される修飾軽鎖を含む。この交差Fab分子をCrossFab^{VH/VL}ともいう。

【0039】

本明細書において「Fcドメイン」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。例えば天然抗体では、Fcドメインが、IgG、IgAおよびIgDアイソタイプでは抗体の2つの重鎖の第2定常ドメインおよび第3定常ドメインに由来する2つの同一タンパク質フラグメントで構成され、IgMおよびIgEのFcドメインは、各ポリペプチド鎖中の3つの重鎖定常ドメイン (CHドメイン2~4) を含有する。本明細書にいう「Fcドメインを欠く」とは、本発明の二重特異性抗体がCH2、CH3およびCH4ドメインを含まないこと、すなわち定常重鎖が1つまたは複数のCH1ドメインだけからなることを意味する。

【0040】

一態様では、第1Fabフラグメントと第2Fabフラグメントとが、ペプチドリンカーによってつながれる。本明細書において使用する用語「ペプチドリンカー」は、アミノ酸配列を持つペプチド、好ましくは合成由来のものを表す。一態様では、本発明の多重特異性抗体を形成させる目的でFabフラグメントの1つを他のFabフラグメントのC末端またはN末端に

つなげるために、ペプチドリンカーが使用される。好ましい一態様では、ペプチドリンカーが、少なくとも5アミノ酸長、一態様では5~100アミノ酸長、さらにもう1つの態様では10~50アミノ酸長のアミノ酸配列を持つペプチドである。一態様において、ペプチドリンカーは $(GxS)_n$ または $(GxS)_nG_m$ であり、ここでG=グリシン、S=セリン、および $(x=3, n=3, 4, 5$ または $6, \text{かつ } m=0, 1, 2$ または $3)$ または $(x=4, n=2, 3, 4$ または $5, \text{かつ } m=0, 1, 2$ または $3)$ であり、一態様では、 $x=4$ および $n=2$ または 3 であり、さらにもう1つの態様では、 $x=4$ および $n=2$ である。一態様において、ペプチドリンカーは $(G_4S)_2$ である。ペプチドリンカーは、第1Fabフラグメントと第2Fabフラグメントをつなぐために使用される。一態様では、第1Fabフラグメントが第2FabフラグメントのC末端またはN末端につながる。

10

【0041】

本発明のもう1つの好ましい態様において、抗体の重鎖は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖ドメイン1(CH1)、抗体重鎖定常ドメイン2(CH2)、および抗体重鎖定常ドメイン3(CH3)を含み、VH-CH1-CH2-CH3と略記される。

【0042】

多重特異性抗体が各重鎖にドメインVH-CH1-CH2-CH3を含む場合、本発明のさらなる一面は、該多重特異性抗体の第1CH3ドメインおよび第2CH3ドメインを、これらの第1CH3ドメインおよび第2CH3ドメインを含有する両重鎖のヘテロ二量体化が増加するように修飾することによって、望ましくない副生成物と比較した所望の多重特異性抗体の比をさらに改良することである。

20

【0043】

ヘテロ二量体化を強制するためのCH3修飾にはいくつかのアプローチが存在し、それらは例えばWO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291に詳述されている。典型的には、そのようなアプローチのいずれにおいても、第1CH3ドメインと第2CH3ドメインはどちらも、各CH3ドメイン(またはそれを含む重鎖)がもはや自分自身とはホモ二量体化することができず、他方の相補的改変CH3ドメインとのヘテロ二量体化を強制されるように(第1CH3ドメインと第2CH3ドメインとがヘテロ二量体化し、2つの第1CH3ドメイン間または2つの第2CH3ドメイン間のホモ二量体は形成されないように)、相補的に改変される。改良された重鎖ヘテロ二量体化へのこれらのさまざまなアプローチは、軽鎖ミスペアリングおよびベンス-ジョーンズ型副生成物を低減する本発明の多重特異性抗体における重鎖-軽鎖修飾(1つの結合アームにおけるVHおよびVLの交換/入れ替えならびにCH1/CL境界面における反対電荷を持つ荷電アミノ酸の置換の導入)と組み合わせられる、さまざまな代替選択肢であると考えられる。

30

【0044】

本発明の一態様(多重特異性抗体が重鎖にCH3ドメインを含む場合)では、ヘテロ二量体化をサポートするために、本発明の多重特異性抗体のCH3ドメインが、

- ・第1重鎖のCH3ドメインの少なくとも1つのアミノ酸を置換し、かつ
- ・第2重鎖のCH3ドメインの少なくとも1つのアミノ酸であって、多重特異性抗体の三次構造内で第1重鎖のCH3ドメインの前記少なくとも1つのアミノ酸に面しているアミノ酸を置換すること

40

によって改変され、第1重鎖および第2重鎖のCH3ドメイン内の各アミノ酸は、それぞれ

- ・反対の側鎖電荷を持つアミノ酸が対向する重鎖中に導入されるように置換されるか、または
- ・大きな側鎖体積および小さな側鎖体積を持つアミノ酸が対向する重鎖に導入されることにより、一方のCH3ドメインに大きな側鎖体積を持つアミノ酸によって突起が作り出され、その突起が、小さな側鎖体積を持つアミノ酸によって作り出された他方のCH3ドメイン内に位置するくぼみ内に配置されうるように置換される。

【0045】

50

本発明の好ましい一態様（多重特異性抗体が重鎖にCH3ドメインを含む場合）では、本発明の多重特異性抗体のCH3ドメインが、例えばWO 96/027011、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621、およびMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681、およびWO 98/050431などにいくつかの例と共に詳述されている「ノブ・イントゥ・ホール」技術によって改変される。この方法では、2つのCH3ドメインの相互作用面が、これら2つのCH3ドメインを含有する両重鎖のヘテロ二量体化が増加するように改変される。（2つの重鎖の）2つのCH3ドメインのそれぞれは「ノブ」であることができ、その際、他方は「ホール」である。ジスルフィド架橋の導入はヘテロ二量体をさらに安定化し（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681、Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35）、収量を増加させる。

10

【0046】

したがって本発明の一態様において、（各重鎖にCH3を含む）多重特異性抗体はさらに、以下の特徴を有する：

a) に記載の抗体の第1重鎖の第1CH3ドメインおよびb) に記載の抗体の第2重鎖の第2CH3ドメインが、それぞれ、前記抗体CH3ドメイン間の元の境界面を含む境界面において接し、

該境界面は多重特異性抗体の形成を促進するように改変されていて、前記改変は、

i) 一方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

20

アミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内のくぼみ中に配置されうる突起を生成するように、

改変されていること、

および

ii) 他方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

アミノ酸残基が、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内の突起が内部に配置されうるくぼみを生成するように、

30

改変されていること。

【0047】

本発明の一態様において、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基は、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）およびトリプトファン（W）からなる群より選択される。

【0048】

本発明の一態様において、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基は、アラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）およびバリン（V）からなる群より選択される。

【0049】

40

本発明の一局面において、両CH3ドメインは、両CH3ドメイン間にジスルフィド架橋が形成されうるように、各CH3ドメインの対応する位置にアミノ酸としてシステイン（C）を導入することによって、さらに改変されている。したがって本発明のこの局面によれば、導入したシステイン残基によって両CH3ドメイン間のジスルフィド架橋を形成させることができるように、一方の重鎖のCH3ドメインはさらに、多重特異性抗体内の他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、あるアミノ酸残基がシステイン（C）残基で置き換えられるように改変され、かつ他方の重鎖のCH3ドメインはさらに、多重特異性抗体内の前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、あるアミノ酸残基がシステイン（C）で置き換えられるように改変される。

50

【0050】

好ましい一態様において、多重特異性抗体は、「ノブ鎖」である一方のCH3ドメインにアミノ酸T366W変異を含み、かつ「ホール鎖」である他方のCH3ドメインにアミノ酸T366S、L368A、Y407V変異を含む。例えば「ホール鎖」のCH3ドメインにアミノ酸Y349C変異を導入し、「ノブ鎖」のCH3ドメインにアミノ酸E356C変異またはアミノ酸S354C変異を導入することなどによって、CH3ドメイン間の追加鎖間ジスルフィド架橋を使用することもできる (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681)。

【0051】

好ましい一態様において、多重特異性抗体（各重鎖にCH3ドメインを含むもの）は、一方のCH3ドメインにアミノ酸S354CおよびT366W変異を含み、2つのCH3ドメインのうちの他方にアミノ酸Y349C、T366S、L368AおよびY407V変異を含む（一方のCH3ドメインの追加アミノ酸S354C変異と他方のCH3ドメインの追加アミノ酸Y349C変異とが鎖間ジスルフィド架橋を形成する）（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。

10

【0052】

ヘテロ二量体化を強制するためのCH3修飾の他の技法は、本発明の代替選択肢であると考えられ、例えばWO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954およびWO 2013/096291に記載されている。

【0053】

一態様では、EP 1 870 459A1に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。このアプローチは、両重鎖間のCH3/CH3ドメイン境界面の特異的アミノ酸位置における反対の電荷を持つ荷電アミノ酸の置換/変異の導入に基づいている。該多重特異性抗体に関する好ましい一態様は、多重特異性抗体の一方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸R409DおよびK370E変異、ならびに他方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸D399KおよびE357K変異である（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。

20

【0054】

もう1つの態様において、多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸T366W変異と「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸T366S、L368AおよびY407V変異とを含み、さらに「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸R409DおよびK370E変異と「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸D399KおよびE357K変異とを含む。

30

【0055】

もう1つの態様において、多重特異性抗体は、一方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸S354CおよびT366W変異と他方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸Y349C、T366S、L368AおよびY407V変異とを含むか、または多重特異性抗体は、一方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸Y349CおよびT366W変異と他方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸S354C、T366S、L368AおよびY407V変異とを含み、さらに「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸R409DおよびK370E変異と「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるアミノ酸D399KおよびE357K変異とを含む。

【0056】

一態様では、WO2013/157953に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366K変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸L351D変異を含む。さらにもう1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはさらにアミノ酸L351K変異を含む。さらにもう1つの態様において、他方の重鎖のCH3ドメインはさらに、Y349E、Y349DおよびL368Eから選択されるアミノ酸変異（一態様ではL368E）を含む。

40

【0057】

一態様では、WO2012/058768に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸L351YおよびY407A変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366AおよびK409F変異を含む。さらにもう1つの態様において、他方の重鎖のCH3ドメインはさらに位置T411、D399、S400、F405、N390また

50

はK392にアミノ酸変異を含む。一態様において、該アミノ酸変異は

- a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411EおよびT411W、
- b) D399R、D399W、D399YおよびD399K、
- c) S400E、S400D、S400RおよびS400K、
- d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405VおよびF405W、
- e) N390R、N390KおよびN390D、
- f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392FおよびK392E

からなる群より選択される。

【0058】

さらにもう1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸L351YおよびY407A変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366VおよびK409F変異を含む。さらにもう1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸Y407A変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366AおよびK409F変異を含む。さらにもう1つの態様において、他方の重鎖のCH3ドメインはさらに、アミノ酸K392E、T411E、D399RおよびS400R変異を含む。

【0059】

一態様では、W02011/143545に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。一態様において、W02011/143545によるアミノ酸修飾は、重鎖のCH3ドメイン中、368番目および409番目からなる群より選択される位置に導入される。

【0060】

一態様では、やはり上述のノブ・イントゥ・ホール技術を使用するW02011/090762に記載のヘテロ二量体化アプローチを、別法として使用する。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366W変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸Y407A変異を含む。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸T366Y変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸Y407T変異を含む。

【0061】

一態様において、多重特異性抗体はIgG2アイソタイプであり、W02010/129304に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。

【0062】

一態様では、W02009/089004に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインは負荷電アミノ酸（一態様ではグルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D））によるK392またはN392のアミノ酸置換（さらにもう1つの態様ではK392DまたはN392D変異）を含み、他方の重鎖のCH3ドメインは正荷電アミノ酸（一態様ではリジン（K）またはアルギニン（R））によるD399、E356、D356、またはE357のアミノ酸置換（さらにもう1つの態様ではD399K、E356K、D356KまたはE357K置換、さらにもう1つの態様ではD399KまたはE356K変異）を含む。さらにもう1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはさらに、負荷電アミノ酸（一態様ではグルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D））によるK409またはR409のアミノ酸置換（さらにもう1つの態様ではK409DまたはR409D変異）を含む。さらにもう1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはさらに、またはもう1つの選択肢として、負荷電アミノ酸（一態様ではグルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D））によるK439および/またはK370のアミノ酸置換を含む。

【0063】

一態様では、W02007/147901に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。一態様において、一方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸K253E、D282KおよびK322D変異を含み、他方の重鎖のCH3ドメインはアミノ酸D239K、E240KおよびK292D変異を含む。

【0064】

一態様では、W02007/110205に記載のヘテロ二量体化アプローチを別法として使用する。

【0065】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する用語「結合部位」または「抗原結合部位」は、抗体分子の領域（1つまたは複数）であって、リガンド（例えば抗原またはその抗原フラグメント）が実際に結合し、かつ抗体に由来する領域を表す。抗原結合部位は、抗体重鎖可変ドメイン（VH）および/もしくは抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、またはVH/VLのペアを含む。

【0066】

所望の抗原に特異的に結合する抗原結合部位は、a) その抗原に対する公知の抗体に由来するか、またはb) 例えば抗原タンパク質もしくは核酸またはそれらのフラグメントなどを用いるデノボ免疫化法によって、またはファージディスプレイによって得られる、新しい抗体または抗体フラグメントに由来する。

【0067】

10

本発明の抗体の抗原結合部位は、抗原に対する結合部位のアフィニティーにさまざまな程度に寄与する6つの相補性決定領域（CDR）を含有することができる。3つの重鎖可変ドメインCDR（CDRH1、CDRH2およびCDRH3）と、3つの軽鎖可変ドメインCDR（CDRL1、CDRL2およびCDRL3）がある。CDRおよびフレームワーク領域（FR）の範囲は、これらの領域が配列間の可変性に従って画定されている編集されたアミノ酸配列データベースとの比較によって決定される。本発明の範囲には、より少ないCDRで構成される（すなわち結合特異性が3つ、4つまたは5つのCDRによって決定される）機能的抗原結合部位も包含される。例えば、CDR6個の完全なセットに満たなくても、結合には十分な場合がある。場合によっては、VHドメインまたはVLドメインだけで十分であるだろう。

【0068】

20

抗体特異性とは、抗原上の特定エピトープに関する抗体の選択的認識を指す。例えば天然の抗体は単一特異性である。本明細書において使用する用語「単一特異性」抗体は、それぞれが同じ抗原の同じエピトープに結合する1つまたは複数の結合部位を有する抗体を表す。

【0069】

多重特異性抗体は、例えば二重特異性抗体、三重特異性抗体または四重特異性抗体である。二重特異性抗体は2つの異なる抗原結合特異性を有する抗体である。同様に三重特異性抗体は3つの異なる抗原結合特異性を有する抗体である。四重特異性抗体は4つの異なる抗原結合特異性を有する抗体である。本発明の好ましい一態様において、多重特異性抗体は二重特異性抗体である。

30

【0070】

抗体が2つ以上の特異性を有する場合、認識されるエピトープは単一の抗原に関連していても、2種類以上の抗原に関連していてもよい。

【0071】

本願において使用する用語「価」は、1つの抗体分子中に指定した数の結合部位が存在することを表す。例えば天然の抗体は2つの結合部位を有し、二価である。したがって用語「三価」は抗体分子中に3つの結合部位が存在することを表す。

【0072】

本発明の好ましい一態様において、本発明の抗体は、1種または複数種の免疫グロブリンクラスの免疫グロブリン定常領域を含む。免疫グロブリンクラスにはIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEアイソタイプが含まれ、IgGおよびIgAの場合はそれらのサブタイプも含まれる。好ましい一態様において本発明の抗体はIgGタイプ抗体の定常ドメイン構造を有する。

40

【0073】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一アミノ酸組成の抗体分子の調製物を指す。

【0074】

「キメラ抗体」という用語は、ある供給源または種に由来する可変領域、すなわち結合領域、および異なる供給源または種に由来する定常領域の少なくとも一部分を含む抗体を指し、通常は組換えDNA技法によって調製される。マウス可変領域とヒト定常領域とを含

50

むキメラ抗体は好ましい。本発明に包含される「キメラ抗体」の他の好ましい形態は、本発明の特性、とりわけClq結合および/またはFc受容体（FcR）結合に関わる特性が生じるように、元の抗体の定常領域に修飾または改変が加えられた定常領域を持つものである。そのようなキメラ抗体を、「クラススイッチ抗体」ともいう。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメントと免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントとを含む免疫グロブリン遺伝子の発現産物である。キメラ抗体を生産するための方法は、当技術分野において周知である従来の組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション技法を必要とする。例えばMorrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855、US 5,202,238およびUS 5,204,244を参照されたい。

【0075】

「ヒト化抗体」という用語は、フレームワークまたは「相補性決定領域」（CDR）が、親免疫グロブリンの特異性とは異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むように修飾されている抗体を指す。好ましい一態様では、マウスCDRをヒト抗体のフレームワーク領域に移植することで、「ヒト化抗体」が調製される。例えばRiechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327、およびNeuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270を参照されたい。本発明に包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、本発明の特性、とりわけClq結合および/またはFc受容体（FcR）結合に関わる特性が生じるように、元の抗体の定常領域にさらなる修飾または改変が加えられた定常領域を持つものである。

【0076】

本明細書において使用する用語「ヒト抗体」には、ヒト生殖系列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が含まれるものとする。ヒト抗体は当分野の技術水準において周知である（van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374）。ヒト抗体は、免疫化した時に、内在性免疫グロブリン生産を欠いた状態で、ヒト抗体の全レパートリーまたはその一部を生産する能力を有するトランスジェニック動物（例えばマウス）でも生産することができる。そのような生殖系列変異型マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの導入は、抗原チャレンジ時に、ヒト抗原の生産をもたらすであろう（例えばJakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555、Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258、Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照されたい）。ヒト抗体はファージディスプレイライブラリーでも生産することができる（Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388、Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597）。ヒトモノクローナル抗体の調製にはColeらの技法およびBoernerらの技法も利用することができる（Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、およびBoerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95）。本発明のキメラ抗体およびヒト化抗体について既に述べたように、本明細書において使用する用語「ヒト抗体」も、本発明の特性、とりわけClq結合および/またはFcR結合に関わる特性が生じるように、例えば「クラススイッチング」、すなわちFc部分の改変または変異（例えばIgG1からIgG4への改変もしくは変異および/またはIgG1/IgG4変異）などによって、定常領域に修飾が加えられた上述の抗体を含む。

【0077】

本明細書において使用する用語「組換えヒト抗体」は、組換え手段によって調製、発現、作出または単離される全てのヒト抗体、例えばNS0細胞またはCHO細胞などの宿主細胞から単離された抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体、または宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使って発現された抗体などを包含するものとする。そのような組換えヒト抗体は、再編成された形態の可変領域および定常領域を有する。本発明の組換えヒト抗体は、インビボ体細胞超変異を起こしている。したがって、組換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVH配列およびVL配列に由来しそれに関係するものの、インビボでは、ヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しないかもしれな

い。

【0078】

本明細書において使用する「可変ドメイン」（軽鎖の可変ドメイン（VL）、重鎖の可変ドメイン（VH））は、抗原への抗体の結合に直接関与する軽鎖と重鎖のペアのそれぞれを表す。可変ヒト軽鎖および可変ヒト重鎖のドメインは同じ全体的構造を有し、各ドメインは、幅広く保存された配列を持つ4つのフレームワーク（FR）領域を含み、それらが3つの「超可変領域」（または相補性決定領域、CDR）によってつながれている。フレームワーク領域は β シートコンフォメーションをとり、CDRはそれらの β シート構造をつなぐループを形成しうる。各鎖中のCDRは、その三次元構造がフレームワーク領域によって保持されており、他方の鎖からのCDRと共に全体として、抗原結合部位を形成する。抗体重鎖および抗体軽鎖のCDR3領域は抗体の結合特異性/アフィニティーに特に重要な役割を果たし、それゆえに、本発明のさらにもう1つの目的になる。

【0079】

本明細書において使用する場合、「超可変領域」または「抗体の抗原結合部分」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」からのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」領域、すなわち「FR」領域は、本明細書において定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖および重鎖は、N末端からC末端に向かって、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各鎖上のCDRは、上述のフレームワークアミノ酸によって分離されている。とりわけ重鎖のCDR3は抗原結合に最も貢献する領域である。CDR領域およびFR領域は、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)の標準的定義に従って決定される。

【0080】

本明細書において使用する用語「結合」、「特異的に結合する」、および「特異的に結合」は、インビトロアッセイにおける、好ましくは精製野生型抗原を使ったブラズモン共鳴アッセイ（BIAcore（登録商標）、GE-Healthcare、スウェーデン国ウプサラ）における、抗原のエピトープへの抗体の結合を指す。結合のアフィニティーは、用語 k_a （抗体の会合による抗体/抗原複合体の形成に関する速度定数）、 k_D （解離定数）、および K_D （ k_D/k_a ）によって定義される。一態様では、「結合」または「に特異的に結合する」は、 10^{-8} mol/lまたはそれ未満、一態様では 10^{-8} M $\sim 10^{-13}$ mol/lの結合アフィニティー（ K_D ）を意味する。したがって、本発明の多重特異性抗体は、それぞれが特異的である抗原に、 10^{-8} mol/lまたはそれ未満の結合アフィニティー（ K_D ）で、一態様では $10^{-8}\sim 10^{-13}$ mol/lの結合アフィニティー（ K_D ）で、特異的に結合する。一態様において、多重特異性抗体は、その抗原に、 $10^{-9}\sim 10^{-13}$ mol/lの結合アフィニティー（ K_D ）で特異的に結合する。

【0081】

Fc γ RIIIへの抗体の結合はBIAcore（登録商標）アッセイ（GE-Healthcare、スウェーデン国ウプサラ）で調べることができる。結合のアフィニティーは、用語 k_a （抗体の会合による抗体/抗原複合体の形成に関する速度定数）、 k_D （解離定数）、および K_D （ k_D/k_a ）によって定義される。

【0082】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合する能力を有する任意のポリペプチド決定基を包含する。一定の態様において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなどといった、分子の化学的に活性な表面基群を含み、また一定の態様では、特別な三次元構造特徴および/または特別な電荷特徴を有しうる。エピトープは、抗原のうち、抗体によって結合される領域である。

【0083】

一定の態様において、抗体がタンパク質および/または高分子の複雑な混合物中でそのターゲット抗原を優先的に認識する場合、その抗体は抗原に特異的に結合するという。

【0084】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、ヒトIgG1サブクラスであること、または変異L234AおよびL235A（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG1サブクラスであることを特徴とする。

【0085】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体はヒトIgG2サブクラスであることを特徴とする。

【0086】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体はヒトIgG3サブクラスであることを特徴とする。

【0087】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体はヒトIgG4サブクラスであること、または追加の変異S228P（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする。

【0088】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、ヒトIgG1またはヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする。

【0089】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、変異L234AおよびL235A（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG1サブクラスであることを特徴とする。

【0090】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、変異L234A、L235AおよびP329G（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG1サブクラスであることを特徴とする。

【0091】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、変異S228PおよびL235E（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする。

【0092】

さらにもう1つの態様において、本発明の多重特異性抗体は、変異S228P、L235EおよびP329G（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする。

【0093】

本発明の多重特異性抗体は、生物学的活性、薬理的活性、薬物動態特性または毒性などの改良された特徴を有することが、ここに明らかになった。本発明の多重特異性抗体は、例えばがんなどの疾患の処置に使用することができる。

【0094】

本願において使用する用語「定常領域」は、可変領域以外の抗体のドメイン全体を表す。定常領域は抗原の結合に直接的には関与しないが、さまざまなエフェクター機能を呈する。抗体は、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、クラスIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMに分類され、これらのうちのいくつかはさらに、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、IgA1およびIgA2などのサブクラスに分類される。異なる抗体クラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ばれる。5つの抗体クラスの全てに見いだすことができる軽鎖定常領域（CL）は κ （カッパ）および λ （ラムダ）と呼ばれる。本明細書において使用される「定常ドメイン」は、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のヒト抗体の定常重鎖領域および/または定常軽鎖カッパまたはラムダ領域に由来するヒト型である。そのような定常ドメインおよび領域は当分野の技術水準において周知であり、例えばKabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0095】

本明細書において、重鎖および軽鎖の全ての定常領域およびドメインのアミノ酸位置は、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載のKabatナンバリングシステムに従ってナンバリングされ、これを本明細書では「ナンバリングはKabatに従う」という。具体的に述べると、カッパアイソタイプおよびラムダアイソタイプの軽鎖定常ドメインCLには、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のKabatナンバリングシステム(647~660頁参照)を使用し、定常重鎖ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2およびCH3)には、Kabat EUインデックスナンバリングシステム(661~723頁参照)を使用する(本明細書では、「ナンバリングはKabat EUインデックスに従う」ということによって、これをさらに明確にする)。

【0096】

IgG4サブクラスの抗体は低減したFc受容体(FcγRIIIa)結合を示すが、他のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。ただし、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(Fc炭水化物の喪失)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434、およびHis435(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)は、改変を加えれば同様に低減したFc受容体結合をもたらす残基である(Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604、Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119、Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324、EP 0 307 434)。

【0097】

一態様において本発明の抗体は、IgG1抗体と比較して低減したFcR結合を有する。したがって、親抗体は、FcR結合に関して、IgG4サブクラスであるか、S228、L234、L235および/またはD265に変異を持つIgG1またはIgG2サブクラスであり、かつ/またはPVA236変異を含有する(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。一態様において、親抗体中の変異は、S228P、L234A、L235A、L235Eおよび/またはPVA236(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)である。もう1つの態様において、親抗体中の変異は、IgG4ではS228P、IgG1ではL234AおよびL235Aである(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)。

【0098】

抗体の定常領域はADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)およびCDC(補体依存性細胞傷害)に直接関与する。補体活性化(CDC)は大半のIgG抗体サブクラスの定常領域への補体因子C1qの結合によって開始される。抗体へのC1qの結合はいわゆる結合部位における明確なタンパク質-タンパク質相互作用によって引き起こされる。そのような定常領域結合部位は当分野の技術水準において公知であり、例えばLukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560、Bunkhouse, R. and Cobra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917、Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344、Thomason, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004、Idiocies, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184、Hearer, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168、Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324、およびEP 0 307 434に記載されている。そのような定常領域結合部位は、例えばアミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、およびP329(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)を特徴とする。

【0099】

「抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)」という用語は、エフェクター細胞の存在下での、本発明の抗体によるヒトターゲット細胞の溶解を指す。ADCCは、好ましくは、新鮮単離PBMC、または単球またはナチュラルキラー(NK)細胞のようなバフィーコートからの精製エフェクター細胞、または永久に増殖するNK細胞株などといったエフェクター細胞の存在下で、抗原発現細胞の調製物を本発明の抗体で処理することによって測定される。

【0100】

「補体依存性細胞傷害(CDC)」という用語は、大半のIgG抗体サブクラスのFc部分への補体因子C1qの結合によって開始されるプロセスを表す。抗体へのC1qの結合はいわゆる結

合部位における明確なタンパク質-タンパク質相互作用によって引き起こされる。そのようなFc部分結合部位は当分野の技術水準において公知である（上記参照）。そのようなFc部分結合部位は、例えばアミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、およびP329（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を特徴とする。サブクラスIgG1、IgG2、およびIgG3の抗体は、通常、C1qおよびC3結合を含む補体活性化を示すが、IgG4は補体系を活性化せず、C1qおよび/またはC3に結合しない。

【0101】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能は、Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180、およびUS 6,602,684に記載されているように、そのオリゴ糖成分を改変することによって強化することができる。最もよく使用される治療用抗体であるIgG1タイプの抗体は、保存されたN結合型グリコシル化部位を各CH2ドメイン中のAsn297に有する糖タンパク質である。Asn297に取り付けられた2つの複合型バイアンテナオリゴ糖はCH2ドメイン間に埋まっていて、ポリペプチド主鎖との広範な接触点を形成しており、それらの存在は抗体が抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）などのエフェクター機能を媒介するのに不可欠である（Lifely, M., R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822、Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76、Wright, A., and Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32）。Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180およびWO 99/54342では、バイセクト化（bisected）オリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである β (1,4) -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（「GnTIII」）のチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞における過剰発現によって、抗体のインビトロADCC活性は著しく増加することが示された。Asn297炭水化物の組成の改変またはその排除はFc γ RおよびC1qへの結合にも影響を及ぼす（Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180、Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294、Mimura, Y., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547、Radaev, S., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483、Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604、Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740、Simmons, L.C., et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147）。

【0102】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能を強化するための方法は、例えばWO 2005/018572、WO 2006/116260、WO 2006/114700、WO 2004/065540、WO 2005/011735、WO 2005/027966、WO 1997/028267、US 2006/0134709、US 2005/0054048、US 2005/0152894、WO 2003/035835、WO 2000/061739に報告されている。

【0103】

本発明の好ましい一態様において、多重特異性抗体は（もしそれがIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブクラスのFc部分、好ましくはIgG1またはIgG3サブクラスのFc部分を含むのであれば）Asn297において糖鎖でグリコシル化されており、該糖鎖内のフコースの量は65%以下である（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。もう1つの態様では、該糖鎖内のフコースの量が5%～65%、好ましくは20%～40%である。本発明において「Asn297」とは、Fc領域中の297番目付近に位置するアミノ酸アスパラギンを意味する。抗体の軽微な配列変動により、Asn297は297番目より数アミノ酸（通常は±3アミノ酸を越えない）上流または下流、すなわち294番目と300番目の間に位置する場合もある。本発明のグリコシル化抗体の一態様において、IgGサブクラスはヒトIgG1サブクラス、変異L234AおよびL235Aを持つヒトIgG1サブクラス、またはIgG3サブクラスである。さらにもう1つの態様において、該糖鎖内では、N-グリコリルノイラミン酸（NGNA）の量が1%以下であり、かつ/またはN末端アルファ-1,3-ガラクトースの量が1%以下である。糖鎖は、好ましくは、CHO細胞中で組換え発現させた抗体のAsn297に取り付けられたN結合型グリカンの特徴を呈する。

【0104】

「糖鎖がCHO細胞中で組換え発現させた抗体のAsn297に取り付けられたN結合型グリカン

の特徴を示す」という表現は、本発明の親抗体のAsn297における糖鎖が、フコース残基を除いて、無改変CHOにおいて発現した同じ抗体のものと同一、例えばWO 2006/103100に報告されたものと同じ、構造および糖残基配列を有することを表す。

【0105】

本願において使用する用語「NGNA」は、糖残基N-グリコシルノイラミン酸を表す。

【0106】

ヒトIgG1またはIgG3のグリコシル化は、最大2つのGal残基を末端に持つコアフコシル化バイアンテナ複合型オリゴ糖として、Asn297において起こる。IgG1サブクラスまたはIgG3サブクラスのヒト定常重鎖領域は、Kabat, E., A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)、およびBrueggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361、Love, T., W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527詳細に報告されている。これらの構造は、末端Gal残基の量に依存して、G0、G1 (α -1,6-または α -1,3-)、またはG2グリカン残基と呼ばれている(Raju, T., S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53)。抗体Fc部分のCHO型グリコシル化は、例えばRoutier, F., H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207に記載されている。非糖改変CHO宿主細胞で組換え発現された抗体は、通常は、Asn297が少なくとも85%の量でフコシル化される。抗体の修飾オリゴ糖は混成型または複合型でありうる。バイセクト化還元型/非フコシル化オリゴ糖は、好ましくは混成型である。もう1つの態様において、バイセクト化還元型/非フコシル化オリゴ糖は複合型である。

【0107】

本発明によれば、「フコースの量」とは、Asn297における糖鎖内の当該糖の量を意味する。これは、MALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に取り付けられた全ての糖構造（例えば複合型、混成型および高マンノース型構造）の和に関係し、平均値として算出される。フコースの相対量は、MALDI-TOFによってN-グリコシダーゼF処理試料中に同定される全ての糖構造（例えば、それぞれ複合型、混成型ならびにオリゴマンノース型および高マンノース型構造）に関係するフコース含有構造のパーセンテージである。

【0108】

本発明の抗体はさまざまな抗原に結合しうる。本発明の一態様において、第1抗原と第2抗原はどちらも活性化T細胞抗原ではない。本発明の一態様において、第1抗原と第2抗原はどちらもCD3ではない。一態様において、抗体は活性化T細胞抗原に特異的に結合しない。一態様において、抗体はCD3に特異的に結合しない。

【0109】

本発明の一態様において、第1抗原または第2抗原はヒトTWEAKである。本発明の一態様において、第1抗原または第2抗原はヒトIL17である。本発明の一態様において、第1抗原はヒトTWEAKであり、かつ第2抗原はヒトIL17である。本発明の一態様において、第1抗原はヒトIL17であり、かつ第2抗原はヒトTWEAKである。

【0110】

ヒトTWEAK (UniProtKB 043508、TNF関連弱アポトーシス誘導因子 (TNF-related weak inducer of apoptosis)) は、細胞表面会合II型膜貫通タンパク質である。TWEAKはChicheportiche, Y., et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 32401-32410、Marsters, S.A., et al., Curr. Biol. 8 (1998) 525-528、Lynch, C.N., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 8455-8459に記載されている。TWEAKの活性型は可溶性ホモ三量体である。ヒトTWEAKとマウスTWEAKは受容体結合ドメインにおいて93%の配列同一性を示す。TWEAK受容体Fn14 (線維芽細胞成長因子誘導性14kDaタンパク質) は、リガンド結合ドメイン中の単一システインリッチドメインからなる129aaのI型膜貫通タンパク質である。TWEAKのシグナリングはNF-KB経路活性化によって起こる。TWEAK mRNAはさまざまな組織で発現し、心臓、脳、骨格筋、および脾臓のような大半の主要臓器、脾臓、リンパ節、および胸腺のような免疫系に関係する組織に見いだされる。Fn14 mRNAは、心臓、脳、肺、胎盤、血管ECおよび平滑筋細胞に検出されている。TWEAKヌルおよびFn14ヌルノックアウトマウスは生存可能で

あり、健康であり、繁殖能力を有し、ナチュラルキラー細胞数が多く、強化された生得的炎症応答を示す。TWEAKは、アポトーシス、増殖、血管新生、虚血性半影、脳浮腫、多発性硬化症に關与する。

【0111】

ヒトIL-17 (IL17-A、CTLA-8、Swiss Prot Q16552、IL17ともいう) は、MSの病理発生と關係づけられたヘルパーT細胞のサブセット (Th17と呼ばれるもの) によって生産される炎症誘発性サイトカインである。IL-17Aは、他の炎症性サイトカイン、ケモカインおよび接着分子の誘導に役割を果たす。IL-17A中和抗体で動物を処置すると、自己免疫性脳脊髄炎の疾患発生率および重症度が減少する (Komiyama, Y. et al., J. Immunol. 177 (2006) 566-573)。IL-17AはMS患者の脳脊髄液において過剰発現している (Hellings, P.W. et al., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50、Matusevicius, D. et al., Multiple Sclerosis 5 (1999) 101-104、WO 2005/051422)。加えて、IL-17A中和抗体は、コラーゲン誘発性関節炎のマウスRAモデルの重症度および発生率を低減し、RA患者の炎症関節の滑液には高レベルのIL-17Aを検出することができる (Ziolkowska, M. et al., J. Immunol. 164 (2000) 2832-2838、Kotake, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 1345-1352、Hellings, P.W. et al., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50)。

【0112】

本発明の抗体は組換え手段によって生産される。したがって本発明の一局面は、本発明の抗体をコードする核酸であり、さらにもう1つの局面は、本発明の抗体をコードする核酸を含む細胞である。組換え生産のための方法は当分野の技術水準において広く公知であり、原核細胞および真核細胞におけるタンパク質発現と、それに続く抗体の単離および通常は薬学的に許容される純度への精製とを含む。宿主細胞において上述の抗体を発現させるには、各修飾軽鎖および修飾重鎖をコードする核酸を、標準的方法によって発現ベクターに挿入する。発現は、CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母、または大腸菌 (E.coli) 細胞のような適当な原核宿主細胞または真核宿主細胞において行われ、抗体はそれらの細胞 (溶解後の上清または細胞) から回収される。抗体を組換え生産するための一般的方法は当分野の技術水準において周知であり、例えば Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202、Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282、Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161、Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880の総説に記載されている。

【0113】

宿主細胞によって生産された抗体は、重鎖のC末端からの1つまたは複数 (特に1つまたは2つ) のアミノ酸の翻訳後切断を起こしうる。それゆえに、完全長重鎖をコードする特別な核酸分子の発現によって宿主細胞が生産した抗体は、完全長重鎖を含む場合も、完全長重鎖の切断変異体 (本明細書では切断変異体重鎖ともいう) を含む場合もありうる。これは、重鎖の最後の2つのC末端アミノ酸がグリシン (G446) およびリジン (K447) である場合 (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う) に当てはまりうる。

【0114】

したがって、CH3ドメインを含む重鎖のアミノ酸配列は、別段の表示がなければ、本明細書ではC末端グリシン-リジンジペプチドを除いて記載する。

【0115】

一態様において、本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、追加のC末端グリシン-リジンジペプチド (G446およびK447、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) を含む。一態様において、本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、追加のC末端グリシン残基 (G446、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) を含む。

【0116】

本明細書に記載する薬学的組成物などの本発明の組成物は、本発明の抗体の集団を含む。抗体の集団は、完全長重鎖を有する抗体および切断変異体重鎖を有する抗体を含みうる。抗体の集団は、抗体の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも

80%または少なくとも90%が切断変異体重鎖を有する、完全長重鎖を有する抗体と切断変異体重鎖を有する抗体との混合物からなりうる。

【0117】

一態様において、本発明の抗体の集団を含む組成物は、C末端グリシン-リジンジペプチド（G446およびK447、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う）が追加された本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体を含む。一態様において、本発明の抗体の集団を含む組成物は、C末端グリシン残基（G446、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う）が追加された本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体を含む。

【0118】

一態様において、そのような組成物は、本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体、C末端グリシン残基（G446、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う）が追加された本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体、およびC末端グリシン-リジンジペプチド（G446およびK447、ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う）が追加された本明細書に明示するCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体で構成される抗体の集団を含む。

【0119】

本発明の多重特異性抗体は、例えばプロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどといった従来の免疫グロブリン精製手法によって、培養培地から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNAおよびRNAは、従来の手法を使って容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞はそのようなDNAおよびRNAの供給源として役立ちうる。

【0120】

ひとたび単離されたら、DNAを発現ベクターに挿入することができ、次にそれを、本来は免疫グロブリンタンパク質を生産しないHEK293細胞、CHO細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞中にトランスフェクトすることで、宿主細胞において組換えモノクローナル抗体を合成させる。

【0121】

多重特異性抗体のアミノ酸配列変異体（variant）（すなわち変異型（mutant））は、抗体DNAに適切なヌクレオチド変化を導入することによって、またはヌクレオチド合成によって調製される。しかしそのような修飾は、例えば上述のように、極めて限られた範囲でしか行うことができない。例えばそれらの修飾は、IgGアイソタイプおよび抗原結合などといった上述の抗体の特徴を変化させないが、組換え生産の収量、タンパク質の安定性をさらに改善することができ、または精製を容易にすることができる。一定の態様では、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。

【0122】

アミノ酸は、共通する側鎖の特性に従ってグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性: Asp、Glu;
- (4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- (5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

【0123】

（表1）特有の特性を持つアミノ酸

10

20

30

40

アミノ酸	3文字	1文字	側鎖極性	側鎖電荷 (pH 7.4)
アラニン	Ala	A	非極性	中性
アルギニン	Arg	R	塩基性極性	陽性
アスパラギン	Asn	N	極性	中性
アスパラギン酸	Asp	D	酸性極性	陰性
システイン	Cys	C	非極性	中性
グルタミン酸	Glu	E	酸性極性	陰性
グルタミン	Gln	Q	極性	中性
グリシン	Gly	G	非極性	中性
ヒスチジン	His	H	塩基性極性	陽性 (10%) 中性 (90%)
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性
ロイシン	Leu	L	非極性	中性
リジン	Lys	K	塩基性極性	陽性
メチオニン	Met	M	非極性	中性
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性
プロリン	Pro	P	非極性	中性
セリン	Ser	S	極性	中性
スレオニン	Thr	T	極性	中性
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性
チロシン	Tyr	Y	極性	中性
バリン	Val	V	非極性	中性

10

20

30

【0124】

本願において使用する用語「宿主細胞」は、本発明の抗体を作製するために改変することができる任意の種類 of 細胞系を表す。一態様では、HEK293細胞およびCHO細胞を宿主細胞として使用する。本明細書において使用する表現「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」は可換的に使用され、このような名称はいずれも子孫を包含する。したがって「形質転換体」および「形質転換細胞」という単語は、初代対象細胞とそこから派生した培養物を、その継代数にかかわらず包含する。また、全ての子孫は、意図的な突然変異または偶発的な突然変異により、そのDNAの内容が正確には同一でないこともありうる」と理解される。元の形質転換細胞中で選択の対象としたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫は包含される。別個の指定が意図される部分は、その文脈から明らかになるであろう。

40

【0125】

NSO細胞における発現は、例えばBarnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123、Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270に記載されている。一過性発現は、例えばDurocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9に記載されている。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837、Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289、およびNorderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87に記載されている。好ましい一過性発現系 (HEK293) は、Schlaeger, E.-J.およびChristensen, K.により、Cytotechnology 30 (1999) 71-83に、そしてSchlaeger, E.-J.,

50

J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199に記載されている。

【0126】

原核生物に適した制御配列は、例えば、プロモーター、任意でオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサーおよびポリ阿德ニル化シグナルを利用することが知られている。

【0127】

核酸は、それがもう1つの核酸配列と機能的な関係に置かれている場合に、「作動的に連結されている」という。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、それが、あるポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現するのであれば、そのポリペプチドのDNAに作動的に連結されており、プロモーターまたはエンハンサーは、それがあるコード配列の転写に影響を及ぼすのであれば、その配列に作動的に連結されており、リボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にあるのであれば、コード配列に作動的に連結されている。一般に「作動的に連結されている」とは、連結されているDNA配列が連続していること、また分泌リーダーの場合には、連続しており、かつ読み枠が一致していることを意味する。ただしエンハンサーは連続している必要はない。連結は、都合のよい制限部位におけるライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合は、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたは合成オリゴヌクレオチドリンカーが、従来の慣例に従って使用される。

【0128】

細胞成分または他の夾雑物、例えば他の細胞核酸またはタンパク質を排除するために、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング (banding)、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当技術分野において周知の他の技法を含む標準的技法によって、抗体の精製が行われる。Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。例えば微生物タンパク質によるアフィニティークロマトグラフィー (例えばプロテインAアフィニティークロマトグラフィーまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー)、イオン交換クロマトグラフィー (例えばカチオン交換 (カルボキシメチル樹脂)、アニオン交換 (アミノエチル樹脂) および混合モード交換)、チオフィリック吸着 (例えばベータ-メルカプトエタノールおよび他のSHリガンドによるもの)、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー (例えばフェニルセファロース、アザ-アレノフィリック樹脂、またはm-アミノフェニルボロン酸によるもの)、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (例えばNi (II) アフィニティー材料およびCu (II) アフィニティー材料)、サイズ排除クロマトグラフィー、および電気泳動法 (ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など) といった、さまざまな方法が確立されており、タンパク質精製に広く使用されている (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

【0129】

本発明の一局面は、本発明の抗体を含む薬学的組成物である。本発明のもう1つの局面は、薬学的組成物を製造するための本発明の抗体の使用である。本発明のさらにもう1つの局面は、本発明の抗体を含む薬学的組成物を製造するための方法である。もう1つの局面において、本発明は、薬学的担体と一緒に製剤化された本発明の抗体を含む組成物、例えば薬学的組成物を提供する。

【0130】

本発明の一態様は、がんの処置において使用するための本発明の多重特異性抗体である。

【0131】

本発明のもう1つの局面は、がんの処置において使用するための該薬学的組成物である。

【0132】

本発明のもう1つの局面は、がん処置用の医薬を製造するための本発明の抗体の使用で

ある。

【0133】

本発明のもう1つの局面は、がんを患っている患者を処置する方法であって、そのような処置を必要とする患者に本発明の抗体を投与することによる方法である。

【0134】

本発明の一態様は、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性（psoratic）関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷の処置に使用するための本発明の多重特異性抗体である。

【0135】

本発明のもう1つの局面は、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷の処置に使用するための該薬学的組成物である。

【0136】

本発明のもう1つの局面は、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷を処置するための医薬を製造するための本発明の抗体の使用である。

【0137】

本発明のもう1つの局面は、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷を患っている患者を処置する方法であって、そのような処置を必要とする患者に本発明の抗体を投与することによる方法である。

【0138】

本明細書にいう「薬学的担体」には、生理学的に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などが含まれる。好ましくは、担体は静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄投与または表皮投与（例えば注射または注入によるもの）に適している。

【0139】

本発明の組成物は、当技術分野において公知のさまざまな方法で投与することができる。当業者には理解されるであろうが、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に依存してさまざまであるだろう。一定の投与経路によって本発明の化合物を投与するには、その不活化を防止するために、その化合物をある材料でコーティングするか、その化合物をある材料と共投与する必要があるかもしれない。例えば、化合物は適当な担体、例えばリポソームまたは希釈剤に入れて対象に投与することができる。薬学的に許容される希釈剤としては、食塩水および水性緩衝溶液が含まれる。薬学的担体には、滅菌注射用溶液または滅菌注射用懸濁液の即時調製のための滅菌水溶液または滅菌水性分散液、および滅菌粉末が含まれる。薬学的活性物質に対するそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。

【0140】

本明細書において使用する「非経口投与」および「非経口的に投与される」という表現は、通常は注射による、経腸投与および外用以外の投与様式を意味し、例えば静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0141】

本明細書において使用するがんという用語は、増殖性疾患、例えばリンパ腫、リンパ球性白血病、肺がん、非小細胞肺（NSCL）がん、気管支肺胞上皮（bronchioloalviolar）細

10

20

30

40

50

胞肺がん、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭部または頸部のがん、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門部のがん、胃がん（stomach cancer、gastric cancer）、大腸がん、乳がん、子宮がん、ファロピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸部癌、腔癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟部組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系（CNS）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形性神経膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、脳室上衣腫（ependymoma）、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫およびユーイング肉腫を指し、上記のがんのいずれかの難治性型、または上記のがんの1種または複数種の組み合わせを含む。

10

【0142】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤などの佐剤も含有しうる。微生物の存在の防止は、上記滅菌手法によっても、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含めることによっても、確実にすることができる。糖類、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含めることも望ましいだろう。加えて、注射用医薬形態の長時間にわたる吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどといった、吸収を遅延させる薬剤を含めることによってもたらしうる。

【0143】

選択した投与経路がなんであれ、適切な水和物型で使用する本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に公知の従来の方法によって、薬学的に許容される剤形に製剤化される。

20

【0144】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、特定の患者、組成物、および投与様式について、患者に対して有毒であることなく、所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分量が得られるように、変動させることができる。選択される投薬量レベルは、使用した本発明の特定組成物の活性、投与経路、投与時間、使用する特定化合物の排泄率、処置の継続時間、使用する特定組成物と併用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康、および過去の病歴などといった、医療分野において周知のさまざまな薬物動態因子に依存するであろう。

30

【0145】

組成物は、滅菌状態になればならず、その組成物を注射器で送達できる程度には流動性でなければならない。担体は、水その他、好ましくは、等張性食塩溶液である。

【0146】

適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合は要求される粒度を維持することによって、また界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、例えば糖類、マンニトールまたはソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に含めることが好ましい。

【0147】

本明細書において使用する用語「形質転換」は、宿主細胞中にベクター/核酸を導入するプロセスを指す。強力な細胞壁障壁を持たない細胞を宿主細胞として使用するのであれば、トランスフェクションは例えばGraham and Van der Eh, Virology 52 (1978) 546以降に記載のリン酸カルシウム沈殿法などによって行われる。ただし、核注入による方法やプロトプラスト融合による方法など、DNAを細胞中に導入するための他の方法も使用する。原核細胞または強固な細胞壁構造を含む細胞を使用する場合、トランスフェクションの一方法は、例えば、Cohen, F.N, et al., PNAS 69 (1972) 7110以下参照に記載の塩化カルシウムを使ったカルシウム処理である。

40

【0148】

本明細書にいう「発現」は、核酸がmRNAに転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNA（転写産物ともいう）が次にペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳

50

されるプロセスを指す。転写産物およびコードされているポリペプチドを遺伝子産物と総称する。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、真核細胞における発現はmRNAのスプライシングを含みうる。

【0149】

「ベクター」は、挿入された核酸分子を宿主細胞中に導入しかつ/または宿主細胞間で移動させる核酸分子、特に自己複製性の核酸分子である。この用語には、主として細胞中にDNAまたはRNAを挿入する（例えば染色体組込み）機能を果たすベクター、主としてDNAまたはRNAを複製する機能を果たすベクターの複製、およびDNAまたはRNAを転写および/または翻訳する機能を果たす発現ベクターが含まれる。上記の機能の2つ以上を提供するベクターも含まれる。

10

【0150】

「発現ベクター」は、適当な宿主細胞中に導入した時に、転写され、ポリペプチドへと翻訳されうるポリヌクレオチドである。「発現系」は通常、所望の発現産物を与えるように機能することができる発現ベクターを構成要素とする適切な宿主細胞を指す。

【0151】

以下に、本発明の具体的態様を列挙する：

1.a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

20

を含む、多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、

30

多重特異性抗体。

2.a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む、多重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、

40

多重特異性抗体。

3.a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213

50

番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

4.a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

5.a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、123番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されており (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、態様4に記載の多重特異性抗体

6.a)に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa)に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EU インデックスに従う）、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

7.b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

8.b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

9.b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、123番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されており（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、態様8に記載の多重特異性抗体

10.b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバ

リングはKabat EUインデックスに従う)、態様1または態様2に記載の多重特異性抗体。

11.a)に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸はリジン(K)で置換されており(ナンバリングはKabatに従う)、123番目のアミノ酸はリジン(K)で置換されており(ナンバリングはKabatに従う)、かつ

a)に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸はグルタミン酸(E)で置換されており(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、213番目のアミノ酸はグルタミン酸(E)で置換されている(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

態様5に記載の多重特異性抗体。

12.b)に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸はリジン(K)で置換されており(ナンバリングはKabatに従う)、123番目のアミノ酸はリジン(K)で置換されており(ナンバリングはKabatに従う)、かつ

b)に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸はグルタミン酸(E)で置換されており(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、213番目のアミノ酸はグルタミン酸(E)で置換されている(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

態様9に記載の多重特異性抗体。

13.a)に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLおよびb)に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLがカップアイソタイプである、前記態様のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

14.a)に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLはラムダアイソタイプであり、かつb)に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLはカップアイソタイプである、態様1~12のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

15.a)に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLおよびb)に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLがラムダアイソタイプである、態様1~12のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

16.124番目のアミノ酸が、独立して、リジン(K)でもアルギニン(R)でもヒスチジン(H)でも置換されておらず、かつカップアイソタイプである、a)に記載の第1軽鎖またはb)に記載の第2軽鎖のいずれかの定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)で(好ましい一態様ではグルタミン酸(E)で)置換されている(ナンバリングはKabatに従う)、前記態様のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

17.a)に記載の抗体の第1重鎖の第1CH3ドメインおよびb)に記載の抗体の第2重鎖の第2CH3ドメインが、それぞれ、抗体CH3ドメイン間の元の境界面を含む境界面において接することを特徴とし、

該境界面は多重特異性抗体の形成を促進するように改変されており、

前記改変は、

i) 一方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

アミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内のくぼみ内に配置されうる突起を生成するように、

改変されていること、

および

ii) 他方の重鎖のCH3ドメインが、

多重特異性抗体内の前記一方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面と接する前記他方の重鎖のCH3ドメインの元の境界面内において、

アミノ酸残基が、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、前記他方の重鎖のCH3ドメインの境界面内に、前記一方の重鎖のCH3ドメインの境界面内の突起が内部に配置されうるくぼみを生成するように、

改変されていること、

10

20

30

40

50

を特徴とする、

前記態様のいずれか1つに記載の抗体。

18. より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基が、アルギニン (R)、フェニルアラニン (F)、チロシン (Y) およびトリプトファン (W) からなる群より選択され、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基が、アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T) およびバリン (V) からなる群より選択されることを特徴とする、態様17に記載の抗体。

19. 両CH3ドメイン間にジスルフィド架橋が形成されうるように、各CH3ドメインの対応する位置にアミノ酸としてシステイン (C) を導入することによって、両CH3ドメインがさらに改変されていることを特徴とする、態様17または態様18に記載の抗体。

20. 二重特異性である、前記態様のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

10

21. ヒトTWEAKに特異的に結合し、かつヒトIL17に特異的に結合する、前記態様のいずれか1つに記載の多重特異性抗体であって、

A) SEQ ID NO:24の可変重鎖ドメイン (VH) およびSEQ ID NO:25の可変軽鎖ドメイン (VL) を含み、かつ

B) SEQ ID NO:26の可変重鎖ドメイン (VH) およびSEQ ID NO:27の可変軽鎖ドメイン (VL) を含む、

多重特異性抗体。

22. a) SEQ ID NO:24の可変重鎖ドメイン (VH) およびSEQ ID NO:25の可変軽鎖ドメイン (VL) を含むヒトTWEAKに特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) SEQ ID NO:26の可変重鎖ドメイン (VH) およびSEQ ID NO:27の可変軽鎖ドメイン (VL) を含むヒトIL-17に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

20

を含む二重特異性抗体であって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で置換されており、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

二重特異性抗体。

30

23. a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、123番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されており (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、態様21に記載の二重特異性抗体。

24. がん、または炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷の処置に使用するための、態様21~23のいずれか1つに記載の抗体。

40

25. がん、または炎症性疾患、自己免疫疾患、関節リウマチ、乾癬性関節炎、筋疾患、例えば筋ジストロフィー、多発性硬化症、慢性腎臓疾患、骨疾患、例えば多発性骨髄腫における骨変性、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、および血管損傷を処置するための医薬を製造するための、態様21~23のいずれか1つに記載の抗体の使用。

26. ヒトIgG1またはヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする、態様1~23のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

27. 変異L234AおよびL235A (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う) を持つヒトIgG

50

1サブクラスであることを特徴とする、態様1～23および態様26のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

28. 変異L234A、L235AおよびP329G（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG1サブクラスであることを特徴とする、態様1～23および態様26～27のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

29. 変異S228PおよびL235E（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする、前記態様1～23および態様26のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

30. 変異S228P、L235EおよびP329G（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）を持つヒトIgG4サブクラスであることを特徴とする、態様1～23および態様26～29のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

10

31. 以下の工程を含む、態様1～23および態様26～30のいずれか1つに記載の多重特異性抗体を調製するための方法：

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターであって、

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されているか（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

20

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）で（好ましい一態様では、独立して、リジン（K）またはアルギニン（R）で）置換されており（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）で置換されている（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）

30

ベクターで、宿主細胞を形質転換する工程、

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 該培養から該抗体分子を回収する工程。

32. 態様1～23および態様26～30のいずれか1つに記載の多重特異性抗体のアミノ酸配列をコードする核酸。

33. 態様32に記載の核酸を宿主細胞中で発現させる能力を有する態様32に記載の核酸を含む発現ベクター。

34. 態様33に記載のベクターを含む宿主細胞。

35. 態様1～23および態様26～30のいずれか1つに記載の抗体を含む組成物。

36. 態様1～23および態様26～30のいずれか1つに記載の抗体と少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

40

37. 治療を必要とする患者を処置するための方法であって、治療有効量の態様1～23および態様26～30のいずれか1つに記載の抗体を、患者に投与することを特徴とする方法。

38. 以下の工程を含む、多重特異性抗体の副生成物を低減するための方法：

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターであって、多重特異性抗体の副生成物を低減するために以下の置換が含まれているベクターで、宿主細胞を形質転換する工程：

50

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 該培養から該抗体分子を回収する工程。

39. 以下の工程を含む、多重特異性抗体の副生成物を低減するための方法:

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターであって、以下の置換が含まれているベクターで、宿主細胞を形質転換する工程:

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されているか (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、または

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 副生成物プロファイルが低減している該抗体分子を該培養から回収する工程。

40. 以下の工程を含む、多重特異性抗体の副生成物を低減するための方法:

A) a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターであって、以下の置換が含まれているベクターで、宿主細胞を形質転換する工程:

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸は、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で (好ましい一態様では、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) で) 置換されており (ナンバリングはKabatに従う)、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸は、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換されている (ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)、

B) 該抗体分子の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程、および

C) 副生成物プロファイルが低減している該抗体分子を該培養から回収する工程。

41.a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

を含む多重特異性抗体の、副生成物の形成を低減するための（または副生成物プロファイルを低減するための）、以下の置換の使用:

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸を、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換し（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸を、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換すること（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）、または

10

ii) b) に記載の第2軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸を、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換し（ナンバリングはKabatに従う）、かつb) に記載の第2重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸を、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換すること（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。

42.a) 第1抗原に特異的に結合する第1抗体の第1軽鎖および第1重鎖、ならびに

b) 第2抗原に特異的に結合する第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖であって、第2抗体の第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとが互いに入れ替えられている、第2軽鎖および第2重鎖

20

を含む多重特異性抗体の、副生成物の形成を低減するための（または副生成物プロファイルを低減するための）、以下の置換の使用:

i) a) に記載の第1軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124番目のアミノ酸を、独立して、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) で（好ましい一態様では、独立して、リジン (K) またはアルギニン (R) で）置換し（ナンバリングはKabatに従う）、かつa) に記載の第1重鎖の定常ドメインCH1において、147番目のアミノ酸または213番目のアミノ酸を、独立して、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) で置換すること（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）。

30

43. 少なくとも2つのFabフラグメントを含み、第1Fabフラグメントが第1抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、かつ第2Fabフラグメントが第2抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含み、第2Fabフラグメントにおいて、第2軽鎖および第2重鎖中の可変ドメインVLとVHとは互いに入れ替えられており、かつFcドメインを欠く、態様1~16および態様20~23のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

44. 2~4つのFabフラグメントを含む、態様43に記載の多重特異性抗体。

45. ヒトAng-2およびVEGFに特異的に結合する、態様43または態様44に記載の多重特異性抗体。

46. 抗体を生産する方法であって、態様34の宿主細胞を、前記抗体が生産されるように培養する工程を含む方法。

40

47. 宿主細胞から抗体を回収する工程をさらに含む、態様46に記載の方法。

【0152】

本発明の理解を助けるために以下の実施例、配列表および図を提供するが、本発明の真の範囲は本願特許請求の範囲に記載される。記載する手順には、本発明の本旨から逸脱することなく、変更を加えることが可能であると、理解される。

【0153】

アミノ酸配列の説明

SEQ ID NO:1 野生型 (wt) <Ang-2> 軽鎖 (LC)

SEQ ID NO:2 野生型 (wt) <Ang-2> 重鎖 (HC)

SEQ ID NO:3 VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC)

50

SEQ ID NO:4	VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:5	Q124K置換を持つ<Ang-2> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:6	K147E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:7	K213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:8	E123K置換を持つ<Ang-2> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:9	Q124K置換およびE123K置換を持つ<Ang-2> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:10	K147E置換およびK213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:11	Q124R置換およびE123K置換を持つ<Ang-2> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:12	Q124E置換を持つ<VEGF> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:13	E124K置換およびE123K置換を持つ<Ang-2> 軽鎖 (LC)	10
SEQ ID NO:14	K147E置換およびK213D置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:15	野生型 (wt) <IL-17> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:16	野生型 (wt) <IL-17> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:17	VH-VL交換した野生型 (wt) <TWEAK> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:18	VH-VL交換した野生型 (wt) <TWEAK> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:19	Q124K置換およびE123R置換を持つ<IL-17> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:20	K147E置換およびK213E置換を持つ<IL-17> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:21	Q124E置換を持つ<TWEAK> 軽鎖 (LC)	
SEQ ID NO:22	K147E置換およびK213D置換を持つ<IL-17> 重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:23	Q124K置換およびE123K置換を持つ<IL-17> 軽鎖 (LC)	20
SEQ ID NO:24	<TWEAK> 305-HC4可変重鎖ドメインVH	
SEQ ID NO:25	<TWEAK> 305-LC2可変軽鎖ドメインVL	
SEQ ID NO:26	<IL-17> HC136可変重鎖ドメインVH	
SEQ ID NO:27	<IL-17> LC136可変軽鎖ドメインVL	
SEQ ID NO:28	VH-VL交換した野生型 (wt) <TWEAK> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:29	K147E置換およびK213E置換を持つ<IL-17> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:30	K147E置換およびK213D置換を持つ<IL-17> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	30
SEQ ID NO:31	野生型 (wt) <Ang-2> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:32	VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:33	K147E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:34	K213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:35	K147E置換およびK213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:36	K147E置換およびK213D置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	
SEQ ID NO:37	野生型 (wt) <IL-17> 重鎖 (HC) (末端GKジペプチドを含む)	40
SEQ ID NO:38	VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セリンリンカーを介してカップリングされた野生型 (wt) <Ang-2> 重鎖 (HC) 2つを含むFab ₂ -CrossFab重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:39	VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セリンリンカーを介してカップリングされたK147E置換およびK213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) 2つを含むFab ₂ -CrossFab重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:40	K147E置換およびK213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セリンリンカーを介してカップリングされた、VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 1つを含む、CrossFab-Fab重鎖 (HC)	
SEQ ID NO:41	K147E置換およびK213E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セ	50

リンリンカーを介してカップリングされた、VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 1つを含む、CrossFab-Fab重鎖 (HC)

SEQ ID NO:42 野生型 (wt) <Ang-2> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セリンリンカーによってカップリングされた、VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 2つの重鎖を含む、CrossFab₂-Fab重鎖 (HC)

SEQ ID NO:43 K147E置換およびK231E置換を持つ<Ang-2> 重鎖 (HC) 1つにグリシン-セリンリンカーを介してカップリングされた、VH-VL交換した野生型 (wt) <VEGF> 重鎖 (HC) 2つを含む、CrossFab₂-Fab重鎖 (HC)

SEQ ID NO:44 VH-VL交換した、K147E置換を持つ<VEGF> 重鎖 (HC)

SEQ ID NO:45 VH-VL交換した、Q124K置換を持つ<VEGF> 軽鎖 (LC)

SEQ ID NO:46 VH-VL交換した、K147E置換およびK213E置換を持つ<VEGF> 重鎖 (HC)

SEQ ID NO:47 VH-VL交換した、E123K置換およびQ124K置換を持つ<VEGF> 軽鎖 (LC)

【実施例】

【0154】

材料および一般的方法

ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に提供されている。抗体鎖のアミノ酸は、上に定義したようにKabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) によるナンバリングシステムに従ってナンバリングされ、言及される。

【0155】

組換えDNA技法

DNAの操作には、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているように、標準的方法を使用した。分子生物学用試薬は製造者の説明書に従って使用した。

【0156】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、化学合成によって作製されたオリゴヌクレオチドから調製した。唯一の制限エンドヌクレアーゼ切断部位に挟まれた600~1800bp長の遺伝子セグメントを、PCR増幅を含むオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーションによってアSEMBルし、次に、表示した制限部位、例えばKpnI/SacIまたはAscI/PacIによって、pPCRScript (Stratagene) 系pGA4クローニングベクターにクローニングした。サブクローニングされた遺伝子フラグメントのDNA配列はDNA配列決定によって確認した。遺伝子合成フラグメントは、Geneart (ドイツ・レーゲンスブルク) に、所与の仕様書に従って発注された。

【0157】

DNA配列決定

DNA配列は、MediGenomix GmbH (ドイツ・マルティンストリート) またはSequiserive GmbH (ドイツ・ファターシュテッテン) において行われた両鎖シーケンスによって決定された。

【0158】

DNAおよびタンパク質の配列解析ならびに配列データ管理

配列の生成、マッピング、解析、アノテーションおよび図解には、GCG (Genetics Computer Group、ウィスコンシン州マディソン) のソフトウェアパッケージ・バージョン10.2およびInfomaxのVector NTI Advanceスイート・バージョン8.0を使用した。

【0159】

発現ベクター

記載する抗体の発現には、CMV-イントロンAプロモーターを持つcDNA編成またはCMV-イントロンAプロモーターを持たないcDNA編成に基づくか、CMVプロモーターを持つゲノム編成に基づく、一過性発現（例えばHEK293 EBNAまたはHEK293-Fにおける一過性発現）細胞用の発現プラスミドの変異体を応用した。

【0160】

これらのベクターは、抗体発現カセットの他に、

- ・大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にする複製起点、および
 - ・大腸菌においてアンピシリン耐性を付与する β -ラクタマーゼ遺伝子
- を含有していた。

【0161】

抗体遺伝子の転写単位は、以下の要素で構成された：

- ・5'端のユニーク制限部位（1つまたは複数）
- ・ヒトサイトメガロウイルス由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ・次に、cDNA編成の場合はイントロンA配列、
- ・ヒト抗体遺伝子の5'-非翻訳領域、
- ・免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- ・cDNAとしての、または免疫グロブリンエクソン-イントロン編成を持つゲノム編成としての、ヒト抗体鎖（野生型またはドメイン交換されたもの）
- ・ポリアデニル化シグナル配列を含む3'非翻訳領域、および
- ・3'端のユニーク制限部位（1つまたは複数）。

【0162】

後述の抗体鎖を含む融合遺伝子は、PCRおよび/または遺伝子合成によって作製され、公知の組換え法および組換え技法により、例えば各ベクター中のユニーク制限部位を使った一致する核酸セグメントの接続によってアセンブルされた。サブクローニングされた核酸配列は、DNA配列決定によって検証した。一過性トランスフェクション用に、形質転換大腸菌培養物からのプラスミド調製によって、大量のプラスミドを調製した（Nucleobond A X、Macherey-Nagel）。

【0163】

細胞培養技法

Current Protocols in Cell Biology (2000) , Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.) , John Wiley & Sons, Inc.に記載されているように、標準的細胞培養技法を使用した。

【0164】

多重特異性抗体は、後述するように、付着培養したHEK293-EBNA細胞または懸濁培養したHEK29-F細胞において、各発現プラスミドの一過性共トランスフェクションによって発現させた。

【0165】

HEK293-EBNA系における一過性トランスフェクション

10%Ultra Low IgG FCS（ウシ胎児血清、Gibco（登録商標））、2mM L-グルタミン（Gibco（登録商標））、および250 μ g/mlジェネティシン（Gibco（登録商標））を補足したDMEM（ダルベッコ変法イーグル培地、Gibco（登録商標））中で培養した付着培養HEK293-EBNA細胞（エプスタイン・バーウイルス核抗原を発現するヒト胎児腎臓細胞株293; American type culture collection受託番号ATCC#CRL-10852、ロット959218）における各発現プラスミド（例えば重鎖および修飾重鎖、ならびに対応する軽鎖および修飾軽鎖をコードするもの）の一過性共トランスフェクションによって、多重特異性抗体を発現させた。トランスフェクションには、FuGENE（商標）6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals) を、FuGENE（商標）試薬（ μ l）対DNA（ μ g）の比率を4:1（3:1から6:1までの範囲）にして使用した。タンパク質は、（修飾および野生型）軽鎖および重鎖コードプラスミドのモル比を、それぞれ1:1（等モル）（1:2から2:1までの範囲）にして、各プラスミドから発現させた。3日目に、4mMのL-グルタミン、グルコース [Sigma] およびNAA [

Gibco（登録商標）]を細胞に供給した。トランスフェクション後の5～11日目に、多重特異性抗体を含有する細胞培養上清を、遠心分離によって収穫し、-20℃で保存した。例えばHEK293細胞などにおけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203に記載されている。

【0166】

HEK293-F系における一過性トランスフェクション

HEK293-F系（Invitrogen）を製造者の説明書に従って使用し、各プラスミド（例えば重鎖および修飾重鎖、ならびに対応する軽鎖および修飾軽鎖をコードするもの）の一過性トランスフェクションによって、多重特異性抗体を作製した。簡単に述べると、振とうフラスコまたは攪拌発酵槽において無血清FreeStyle（商標）293発現培地（Invitrogen）中で懸濁培養したHEK293-F細胞（Invitrogen）に、4つの発現プラスミドと293fectin（商標）またはfectin（Invitrogen）との混合物で、トランスフェクションを行った。2L振とうフラスコ（Corning）の場合、HEK293-F細胞を 1.0×10^6 細胞/mLの密度で600mLに接種し、120rpm、8%CO₂でインキュベートした。翌日、細胞に、約 1.5×10^6 細胞/mLの細胞密度で、A)それぞれ重鎖または修飾重鎖および対応する等モル比の軽鎖をコードするプラスミドDNA（1μg/mL）計600μgを含む20mLのOpti-MEM（Invitrogen）とB) 20mLのOpti-MEM+1.2mLの293fectinまたはfectin（2μl/mL）との混合物約42mLを使って、トランスフェクションを行った。発酵中は、グルコース消費量に応じて、グルコース溶液を加えた。分泌された抗体を含有する上清を5～10日後に収穫し、抗体を上清から直接精製するか、上清を凍結して保存した。

【0167】

タンパク質量の決定

精製された抗体および誘導体のタンパク質濃度は、Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423に従い、アミノ酸配列に基づいて算出されるモル吸光係数を使用し、280nmにおける光学密度（OD）を決定することによって決定した。

【0168】

上清中の抗体濃度の決定

プロテインAアガロースビーズ（Roche）を用いる免疫沈降によって細胞培養上清中の抗体および誘導体の濃度を見積もった。60μlのプロテインAアガロースビーズをTBS-NP40（50mM Tris、pH7.5、150mM NaCl、1%Nonidet-P40）中で3回洗浄した。次に、1～15mLの細胞培養上清を、前もってTBS-NP40中で平衡化したプロテインAアガロースビーズに適用した。室温で1時間インキュベートした後、ビーズを、Ultrafree-MCフィルターカラム（Amicon）上、0.5mLのTBS-NP40で1回、0.5mLの2×リン酸緩衝食塩水（2×PBS、Roche）で2回、および0.5mLの100mMクエン酸Na pH5.0で手短に4回、洗浄した。35μlのNuPAGE（登録商標）LDS Sample Buffer（Invitrogen）を加えることによって、結合している抗体を溶出させた。試料の半分を、それぞれNuPAGE（登録商標）試料還元剤と混和するか、還元しないでおき、70℃で10分加熱した。その結果、5～30μlを4-12%NuPAGE（登録商標）Bis-Tris SDS-PAGE（Invitrogen）（非還元SDS-PAGEにはMOPS緩衝液を使用し、還元SDS-PAGEにはNuPAGE（登録商標）酸化防止ランニング緩衝液添加物（Invitrogen）を含むMES緩衝液を使用した）に適用し、クーマシーブルーで染色した。

【0169】

アフィニティーHPLCクロマトグラフィーによって細胞培養上清中の抗体および誘導体の濃度を定量的に測定した。簡単に述べると、Agilent HPLC 1100システムを使って、プロテインAに結合する抗体および誘導体を含有する細胞培養上清を、200mM KH₂PO₄、100mMクエン酸ナトリウム、pH7.4中のApplied Biosystems Poros A/20カラムに適用し、このマトリックスから200mM NaCl、100mMクエン酸、pH2.5で溶出させた。溶出したタンパク質をUV吸光度とピーク面積の積分によって定量した。精製標準IgG1抗体を標準とした。

【0170】

あるいは、サンドイッチIgG-ELISAによって細胞培養上清中の抗体および誘導体の濃度を測定した。簡単に述べると、StreptaWell High Bind Streptavidin A-96ウェルマイクロ

ロタイタープレート (Roche) を、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のビオチン化抗ヒトIgGキャプチャ分子F (ab') $2 < \text{h-Fc} \gamma > \text{BI}$ (Dianova) $100 \mu\text{L}$ / ウェルにより、室温で1時間、あるいは 4°C で終夜、コーティングした後、 $200 \mu\text{L}$ / ウェルのPBS、 0.05% Tween (PBST、Sigma) で、3回洗浄する。各抗体含有細胞培養上清のPBS (Sigma) における希釈系列 $100 \mu\text{L}$ / ウェルをウェルに加え、マイクロタイタープレート振とう器上、室温で1~2時間インキュベートした。ウェルを $200 \mu\text{L}$ / ウェルのPBSTで3回洗浄し、結合している抗体を、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のF (ab') $2 < \text{h-Fc} \gamma > \text{POD}$ (Dianova) $100 \mu\text{L}$ を検出抗体として、マイクロタイタープレート振とう器上、室温で1~2時間検出した。結合していない検出抗体を $200 \mu\text{L}$ / ウェルのPBSTで3回洗い流し、 $100 \mu\text{L}$ / ウェルのABTSを加えることによって、結合している検出抗体を検出した。吸光度の決定は 405nm の測定波長 (参照波長 492nm) においてTecan Fluor Spectrometerで行った。 10

【0171】

タンパク質精製

濾過した細胞培養上清から、標準的プロトコルを参照して、タンパク質を精製した。簡単に述べると、抗体をプロテインA Sepharoseカラム (GE healthcare) に適用し、PBSで洗浄した。抗体の溶出を $\text{pH}2.8$ で達成した後、直ちに試料を中和した。凝集したタンパク質は、PBSにおける、または 20mM ヒスチジン、 150mM NaCl $\text{pH}6.0$ におけるサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200、GE Healthcare) によって、単量体型抗体から分離した。単量体型抗体フラクションをプールし、(必要なら) 例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30MWCO) 遠心分離濃縮器を使って濃縮し、凍結し、 -20°C または -80°C で保存した。試料の一部を、例えばSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) または質量分析による、後続のタンパク質分析および分析的キャラクタリゼーション用に用意した。 20

【0172】

SDS-PAGE

NuPAGE (登録商標) Pre-Castゲルシステム (Invitrogen) を製造者の説明書に従って使用した。具体的には、 10% または $4-12\%$ NuPAGE (登録商標) Novex (登録商標) Bis-TRIS Pre-Castゲル ($\text{pH}6.4$)、およびNuPAGE (登録商標) MES (NuPAGE (登録商標) 酸化防止ランニング緩衝液添加物を含む還元ゲル) またはMOPS (非還元ゲル) ランニング緩衝液を使用した。 30

【0173】

分析用サイズ排除クロマトグラフィー

抗体の凝集状態およびオリゴマー状態を決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、HPLCクロマトグラフィーによって行った。簡単に述べると、プロテインA精製抗体を、Agilent HPLC 1100システムで、 300mM NaCl、 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{pH}7.5$ 中のTosoh TSKgel G3000SWカラムに適用するか、Dionex HPLCシステムで、 $2 \times \text{PBS}$ 中のSuperdex 200カラム (GE Healthcare) に適用した。溶出したタンパク質をUV吸光度およびピーク面積の積分によって定量した。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901を標準とした。 30

【0174】

質量分析

この項では、VH/VL交換が施された多重特異性抗体 (VH/VL CrossMab) の、その正しいアセンブリに重点をおいたキャラクタリゼーションを説明する。予想一次構造を、脱グリコシル化インタクトCrossMabおよび脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化CrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって分析した。 40

【0175】

VH/VL CrossMabを、 1mg/mL のタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、 37°C において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC (Roche) 消化は、 $100 \mu\text{g}$ の脱グリコシル化VH/VL CrossMabを使って、Tris緩衝液 $\text{pH}8$ 中、それぞれ室温で120時間、および 37°C で40分行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム (GE Healthcare) でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量 50

は、TriVersa NanoMateイオン源 (Advion) を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) でのESI-MSによって決定した。

【0176】

表面プラズモン共鳴 (SPR) (Biacore) を用いる、各抗原への多重特異性抗体の結合および結合アフィニティーの決定

作製した抗体の各抗原 (例えばANG2およびVEGF) への結合は、表面プラズモン共鳴により、Biacore計器 (GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン国ウプサラ) を使って調べられる。簡単に述べると、アフィニティー測定のために、各抗原に対して抗体を提示するために、ヤギ抗ヒトIgG、JIR109-005-098抗体を、アミンカップリングによってCM5チップ上に固定化する。結合は、HBS緩衝液 (HBS-P (10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween 20、pH7.4) 中、25℃ (あるいは37℃) で測定される。抗原 (R&D Systemsまたは自社精製物) をさまざまな濃度で溶液として加えた。80秒~3分の抗原注入によって会合を測定し、チップ表面をHBS緩衝液で3~10分洗浄することによって解離を測定し、1:1ラングミュア結合モデルを使ってKD値を見積もった。システム固有のベースラインドリフトを補正するため、およびノイズ信号を低減するために、陰性対照データ (例えば緩衝液曲線) を試料曲線から差し引く。センサーグラムの解析およびアフィニティーデータの計算には、各Biacore Evaluation Softwareを使用した。

【0177】

実施例1A

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の生産および発現

最初の実施例では、一般的方法の項で述べたように、古典的な分子生物学的技法によって、ヒトアンジオポエチン-2 (ANG2) およびヒトVEGFに結合する多重特異性抗体を作製した。この多重特異性抗体を、上述のように、HEK293細胞において一過性に発現させる。これらの各多重特異性抗体の一般スキームを図1A~Cに示す。比較のために、CH1/CL境界面に置換を持たない野生型 (wt) VH/VLドメイン交換/入れ替え抗体も調製した。CH1/CL境界面のごく近傍にある他の代替置換 (例えばEP2647707で言及されているもの) も比較のために使用した。表2aに示すアミノ酸配列をコードする核酸を含有するプラスミドを使って多重特異性抗体を発現させた。

【0178】

(表2a) VH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施された抗Ang2-VEGF多重特異性抗体Ang2VEGF-0273、Ang2VEGF-0396、Ang2VEGF-0397、Ang2VEGF-0394、Ang2VEGF-0395の軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) のアミノ酸配列:野生型 (wt) および単一荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせ

抗体	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

10

【0179】

全てのコンストラクトに、第1CH3ドメイン中の典型的ノブ（T366W）置換および第2CH3ドメイン中の対応するホール置換（T366S、L368AおよびY407V）（ならびに2つの追加導入システイン残基S354C/Y349'C）（上記の各対応重鎖（HC）配列中に含まれるもの）を施す、ノブ・イントゥ・ホール・ヘテロ二量体化技術を使用した。

20

【0180】

実施例1B

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え（CrossMab^{Vh-VL}）が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2（ANG2）およびVEGFに結合する多重特異性抗体の精製およびキャラクタリゼーション

上で発現させた多重特異性抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより、上清から精製した。多重特異性抗体は全て、良好な収量で生産することができ、安定である。

30

【0181】

得られた生成物を、質量分析によってその実体について特徴づけ、またSDS-PAGEによる純度、単量体含量および安定性などの分析的特性について特徴づけた。

【0182】

質量分析

予想一次構造を、脱グリコシル化インタクトCrossMabおよび脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化CrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）によって分析した。

【0183】

VH/VL CrossMabを、1mg/mlのタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、37℃において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC（Roche）消化は、100 μgの脱グリコシル化VH/VL CrossMabを使って、Tris緩衝液pH8中、それぞれ室温で120時間、および37℃で40分行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム（GE Healthcare）でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量は、TriVersa NanoMateイオン源（Advion）を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム（Bruker Daltonik）でのESI-MSによって決定した。

40

【0184】

結果を表2bおよび図4aに示す。

【0185】

（表2b）CH1/CL境界面における本発明の単一荷電アミノ酸置換による主要ペンス-ジ

50

ヨーンズ型副生成物の低減

	CL ANG-2 (124番目)	CL ANG-2 (123番目)	CH1 ANG-2 (147番目)	CH1 ANG-2 (213番目)	CH1 VEGF	CL VEGF	主要副産物 (ペンスー ジョーンズ型 ミスペアリング) MSによる%
Ang2VEGF -0273	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt	<u>~20</u>
Ang2VEGF -0396	Q124K	wt	K147E	wt	wt	wt	<u>~3</u>
Ang2VEGF -0397	Q124K	wt	wt	K213E	wt	wt	<u>~3</u>
Ang2VEGF -0394	wt	E123K	K147E	wt	wt	wt	<u>~15</u>
Ang2VEGF -0395	wt	E123K	wt	K213E	wt	wt	<u>~15</u>

10

【0186】

20

表2bおよび図4aの結果は、本発明に従って/本発明について説明したように、CH1ドメインおよびCLドメインにおいて単一荷電アミノ酸を反対電荷で置換すること（CL:Q124KとCH1:K147Eのペア;またはCL:Q124KとCH1:K213Eのペア）により、そのような置換を持たない野生型多重特異性抗体と比較した場合に、主要副生成物（ペンスー-ジョーンズ型ミスペアリング）が強く低減することを示している（約17%の低減）。ごく近傍における他の置換（CL:Q123KとCH1:K147Eのペア、またはCL:Q123KとCH1:K213Eのペア）では、そのような置換を持たない野生型多重特異性抗体と比較して、主要副生成物はわずかし低減しない（約5%の低減）。

【0187】

30

実施例1C

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え（CrossMab^{V_H-V_L}）が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2（ANG2）およびVEGFに結合する多重特異性抗体の抗原結合特性

先の実施例1Aおよび1Bの多重特異性抗体の各ターゲット抗原、すなわちANG2およびVEGFへの結合を、Biacore（登録商標）によって評価した。

【0188】

以下の手順に従ってVEGF結合を評価した:

ヒトVEGFA-121への表示の抗体の結合を、表面プラズモン共鳴により、BIACORE（登録商標）T200計器（GE Healthcare）を使って調べた。10000（RU）前後の抗His抗体（1μg/mlの抗His抗体;注文コード:28995056; GE Healthcare Bio-Sciences AB、スウェーデン）を、GE Healthcareが供給するアミンカップリングキットを使用することによって、SシリーズCM5チップ（GE Healthcare BR-1005-30）にpH5.0でカップリングした。固定化手順中は、HBS-N（10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、GE Healthcare）をランニング緩衝液として使用した。続く速度論的キャラクタリゼーションでは、試料緩衝液およびランニング緩衝液をpH7.4のPBS-T（0.05%Tween 20を含む10mMリン酸緩衝食塩水）とした。フローセルを25℃に、また試料ブロックを12℃に設定し、速度論的キャラクタリゼーションに先だってランニング緩衝液で2回プライミングした。

40

【0189】

0.5μg/ml溶液を5μl/分の流量で30秒間注入することによってVEGFA-121-Hisをキャプチャした。会合は、1000nMから開始する1:3の段階希釈液で、さまざまな溶液濃度の表示

50

の抗体を、30 μ l/分の流量で180秒間注入することによって測定した。解離相は600秒まで監視し、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることによって誘発した。流速30 μ l/分のグリシンpH1.5溶液で60秒間洗浄することによって表面を再生した。抗His抗体表面から得られる応答を差し引くことによってバルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引く（二重参照）。 K_D および他の速度論的パラメータの算出にはラングミュア1:1モデルを使用した。

【0190】

以下の手順に従ってAng-2結合を評価した：

ヒトAng-2-RBD-Fcへの表示の抗体の結合を、表面プラズモン共鳴により、BIAcore（登録商標）T200計器（GE Healthcare）を使って調べた。8000（RU）前後のヤギ抗ヒトF（ab'）₂（10 μ g/ml抗ヒトF（ab'）₂；注文コード：28958325；GE Healthcare Bio-Sciences AB、スウェーデン）を、GE Healthcareが供給するアミンカップリングキットを使用することによって、SシリーズCM5チップ（GE Healthcare BR-1005-30）にpH5.0でカップリングした。固定化手順中は、HBS-N（10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、GE Healthcare）をランニング緩衝液として使用した。続く速度論的キャラクタリゼーションでは、試料緩衝液およびランニング緩衝液をpH7.4のPBS-T（0.05%Tween 20を含む10mMリン酸緩衝食塩水）とした。フローセルを25℃に、また試料ブロックを12℃に設定し、速度論的キャラクタリゼーションに先だってランニング緩衝液で2回プライミングした。

【0191】

5nM溶液を5 μ l/分の流量で25秒間注入することによって二重特異性抗体をキャプチャした。会合は、100nMから開始する1:3の段階希釈液で、さまざまな溶液濃度のヒトAng2-RBD-Fcを、30 μ l/分の流量で120秒間注入することによって測定した。解離相は180秒まで監視し、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることによって誘発した。流速30 μ l/分のグリシンpH2.1溶液で60秒間洗浄することによって表面を再生した。ヤギ抗ヒトF（ab'）₂表面から得られる応答を差し引くことによってバルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引く（二重参照）。見掛けの K_D の算出にはラングミュア1:1モデルを使用した。

【0192】

比較例として、VH/VLドメインの交換/入れ替えは含むが、荷電アミノ酸置換を欠いている、Ang2およびVEGFに特異的に結合する参照抗体（表2bのAng2VEGF-0273抗体）を並行して評価した。

【0193】

結果を表2cおよび表2dに示す。

【0194】

（表2c）VEGFに対する表示の抗体のアフィニティー

試料	K_D (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0396	3
Ang2VEGF-0397	4
Ang2VEGF-0394	3
Ang2VEGF-0395	4

【0195】

（表2d）Ang2に対する表示の抗体のアフィニティー

試料	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0396	17
Ang2VEGF-0397	14
Ang2VEGF-0394	12
Ang2VEGF-0395	15

10

【0196】

試験した抗体は全て、両方のターゲット、すなわちAng2およびVEGFに特異的に結合し、ナノモル域の抗原アフィニティを呈する。

【0197】

実施例1D

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の安定性

20

抗体コンストラクトの安定性を評価するために、以下の手順に従って熱安定性ならびに凝集開始温度を評価した。

【0198】

表示の抗体の試料を20mMヒスチジン/塩化ヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0中に1mg/mLの濃度で調製し、10 μ Lマイクロキュベットアレイに移し、試料を0.1°C/分の速度で25°Cから90°Cまで加熱しながら、静的光散乱データおよび266nmレーザーによる励起後の蛍光データをOptim1000計器 (Avacta Inc.) で記録した。

【0199】

凝集開始温度 (T_{agg}) は散乱光が増加しはじめる温度と定義される。融解温度 (T_m) は蛍光強度対波長グラフにおける変曲点と定義される。

30

【0200】

結果を表2eに示す。

【0201】

(表2e) 表示の抗体の凝集開始温度 (T_{agg}) および融解温度 (T_m)

試料	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0396	56,9	62,0
Ang2VEGF-0397	56,0	61,7
Ang2VEGF-0394	56,9	62,2
Ang2VEGF-0395	56,8	62,1

40

【0202】

実施例1E

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合す

50

る多重特異性抗体の生産収量

表示した多重特異性抗体の生産収量をプロテインA精製 (ProtA) 後に評価した。結果を表2fに示す。

【0203】

(表2e) 表示の抗体の生産収量 [mg/L上清]

試料	ProtA
Ang2VEGF-0273	65
Ang2VEGF-0396	80.8
Ang2VEGF-0397	68.4
Ang2VEGF-0394	79.2
Ang2VEGF-0395	93.6

10

【0204】

実施例2A

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{V_H-V_L}) が施され、CH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の生産および発現

20

最初の実施例では、一般的方法の項で述べたように、古典的な分子生物学的技法によって、ヒトアンジオポエチン-2 (ANG2) およびヒトVEGFに結合する多重特異性抗体を作製した。この多重特異性抗体を、上述のように、HEK293細胞において一過性に発現させる。これらの各多重特異性抗体の一般スキームを図1A~Cに示す。比較のために、CH1/CL境界面に置換を持たない野生型 (wt) VH/VLドメイン交換/入れ替え抗体も調製した。表3aに示すアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使って多重特異性抗体を発現させた。

【0205】

30

(表3a) VH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{V_H-V_L}) が施された抗Ang2-VEGF多重特異性抗体Ang2VEGF-0273、Ang2VEGF-0274、Ang2VEGF-0282、Ang2VEGF-0283、Ang2VEGF-0284、Ang2VEGF-0285、Ang2VEGF-0286の軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) のアミノ酸配列:野生型 (wt) および荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせ

抗体	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

10

【0206】

20

全てのコンストラクトにノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用して、第1C H3ドメイン中の典型的ノブ（T366W）置換および第2CH3ドメイン中の対応するホール置換（T366S、L368AおよびY407V）（ならびに2つの追加導入システイン残基S354C/Y349'C）（上記の各対応重鎖（HC）配列中に含まれるもの）を施した。

【0207】

実施例2B

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え（CrossMab^{Vh-VL}）が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2（ANG2）およびVEGFに結合する多重特異性抗体の精製およびキャラクタリゼーション

上で発現させた多重特異性抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより、上清から精製した。多重特異性抗体は全て、良好な収量で生産することができ、安定である。

30

【0208】

得られた生成物を、質量分析によってその実体について特徴づけ、またSDS-PAGEによる純度、単量体含量および安定性などの分析的特性について特徴づけた。

【0209】

質量分析

予想一次構造を、脱グリコシル化インタクトCrossMabおよび脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化CrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）によって分析した。

40

【0210】

VH/VL CrossMabを、1mg/mlのタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、37℃において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC（Roche）消化は、100 μgの脱グリコシル化VH/VL CrossMabを使って、Tris緩衝液pH8中、それぞれ室温で120時間、および37℃で40分行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム（GE Healthcare）でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量は、TriVersa NanoMateイオン源（Advion）を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム（Bruker Daltonik）でのESI-MSによって決定した。

【0211】

結果を表3bおよび図5aに示す。

50

【0212】

(表3b) CH1/CL境界面における本発明の単一荷電アミノ酸置換による主要ベンス-ジョーンズ型副生成物の低減

	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	主要副産物 (ベンス- ジョーンズ型 ミスペアリング) MSによる%
Ang2VEGF- 0273	wt: Q124 (カップ)	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
Ang2VEGF- 0274	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	0
Ang2VEGF- 0282	Q124R	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
Ang2VEGF- 0283	E124K (ラムダ)	E123K	K147E	K213E	wt	wt:	0
Ang2VEGF- 0284	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	wt	0
Ang2VEGF- 0285	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	Q124E	0
Ang2VEGF- 0286	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0

【0213】

表3bおよび図5aの結果は、本発明に従って/本発明について説明したように、CH1ドメインおよびCLドメインにおいて荷電アミノ酸を反対電荷で二重置換すること (CL:Q124K/E123KおよびCH1:K147E/K213E、CL:Q124R/E123KおよびCH1:K147E/K213E、CL:Q124R/E123KおよびCH1:K147E/K213D) により、そのような置換を持たない野生型多重特異性抗体と比較した場合に、主要副生成物 (ベンス-ジョーンズ型ミスペアリング) が完全に除去されることを示している。これは、発現にも副生成物プロファイルにも影響しない他方の結合アームのCLドメイン中のさらなる単一置換Q124Eに依存しない。

【0214】

実施例2C

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMAb^{V^h-V^L}) が施され、CH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の抗原結合特性

先の実施例2Aおよび2Bの多重特異性抗体の各ターゲット抗原、すなわちANG2およびVEGFへの結合を、実施例1Cで概説したように、Biacore (登録商標) によって評価した。

【0215】

比較例として、VH/VLドメインの交換/入れ替えは含むが、荷電アミノ酸置換を欠いている、Ang2およびVEGFに特異的に結合する参照抗体 (表2bのAng2VEGF-0273抗体) を並行して評価した。

【0216】

結果を表3cおよび表3dに示す。

【 0 2 1 7 】

(表 3 c) VEGFに対する表示の抗体のアフィニティー

試料	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0274	3
Ang2VEGF-0282	4
Ang2VEGF-0283	4
Ang2VEGF-0284	4
Ang2VEGF-0285	4
Ang2VEGF-0286	4

10

【 0 2 1 8 】

(表 3 d) Ang2に対する表示の抗体のアフィニティー

試料	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0274	17
Ang2VEGF-0282	14
Ang2VEGF-0283	15
Ang2VEGF-0284	13
Ang2VEGF-0285	14
Ang2VEGF-0286	12

20

30

【 0 2 1 9 】

試験した抗体は全て、両方のターゲット、すなわちAng2およびVEGFに特異的に結合し、ナノモル域の抗原アフィニティーを呈する。

40

【 0 2 2 0 】

実施例2D

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMAb^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に単一荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の安定性

抗体コンストラクトの安定性を評価するために、実施例1Dで概説したように、熱安定性および凝集開始温度を評価した。

【 0 2 2 1 】

結果を表3eに示す。

【 0 2 2 2 】

50

(表 3 e) 表示の抗体の凝集開始温度 (T_{agg}) および融解温度 (T_m)

試料	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0274	53,5	58,9
Ang2VEGF-0282	56,9	61,4
Ang2VEGF-0283	56,3	61,0
Ang2VEGF-0284	56,3	61,1
Ang2VEGF-0285	56,3	61,1
Ang2VEGF-0286	56,3	61,6

10

【 0 2 2 3 】

実施例3A

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、IL-17およびTWEAKに結合する多重特異性抗体の生産および発現

20

最初の実施例では、一般的方法の項で述べたように、古典的な分子生物学的技法によって、ヒトIL-17およびヒトTWEAKに結合する多重特異性抗体を作製し、上述のように、HEK293細胞において一過性に発現させた。これらの各多重特異性抗体の一般スキームを図1A～Cに示す。比較のために、CH1/CL境界面に置換を持たない野生型 (wt) VH/VLドメイン交換/入れ替え抗体も調製した。表4aに示すアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使って多重特異性抗体を発現させた。

【 0 2 2 4 】

(表 4 a) VH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施された抗TWEAK-IL17多重特異性抗体TweakIL17-0096、TweakIL17-0097、TweakIL17-0098、TweakIL17-0099、TweakIL17-0100、TweakIL17-0101の軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) のアミノ酸配列:野生型 (wt) および荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせ

30

抗体	LC IL17	HC IL17	HC TWEAK	LC TWEAK
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

40

【 0 2 2 5 】

全てのコンストラクトにノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用して、第1C H3ドメイン中の典型的ノブ (T366W) 置換および第2CH3ドメイン中の対応するホール置換 (T366S、L368AおよびY407V) (ならびに2つの追加導入システイン残基S354C/Y349'C) (上記の各対応重鎖 (HC) 配列中に含まれるもの) を施した。

【 0 2 2 6 】

実施例3B

50

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替えが施され (CrossMab^{VH-VL})、CH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、IL-17およびTWEAKに結合する多重特異性抗体の精製およびキャラクタリゼーション

上で発現させた多重特異性抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより、上清から精製した。多重特異性抗体は全て、良好な収量で生産することができ、安定である。

【0227】

得られた生成物を、質量分析によってその実体について特徴づけ、またSDS-PAGEによる純度、単量体含量および安定性などの分析的特性について特徴づけた。

【0228】

質量分析

予想一次構造を、脱グリコシル化インタクトCrossMabおよび脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化CrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって分析した。

【0229】

VH/VL CrossMabを、1mg/mlのタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、37℃において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC (Roche) 消化は、100 μgの脱グリコシル化VH/VL CrossMabを使って、Tris緩衝液pH8中、それぞれ室温で120時間、および37℃で40分行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム (GE Healthcare) でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量は、TriVersa NanoMateイオン源 (Advion) を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) でのESI-MSによって決定した。

【0230】

結果を表4bおよび図6aに示す。

【0231】

(表4b) CH1/CL境界面における本発明の単一荷電アミノ酸置換による主要ペンス-ジョーンズ型副生成物の低減

	CL IL17 (124番目)	CL IL17 (123番目)	CH1 IL17 (147番目)	CH1 IL17 (213番目)	CH1 TWEAK	CL TWEAK (124番目)	主要副産物 (ペンス- ジョーンズ型 ミスペアリング) MSによる%
TweakIL17-0096	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
TweakIL17-0097	Q124K	E123R	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0098	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	wt	0
TweakIL17-0099	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	Q124E	0
TweakIL17-0100	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17-0101	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	未検

【0232】

表2bおよび図6aの結果は、本発明に従って/本発明について説明したようにCH1ドメインおよびCLドメインにおいて荷電アミノ酸を反対電荷で二重置換すること (CL:Q124K/E123R

およびCH1:K147E/K213E、CL:Q124K/E123RおよびCH1:K147E/K213D、CL:Q124K/E123KおよびCH1:K147E/K213E)により、そのような置換を持たない野生型多重特異性抗体と比較した場合に、主要副生成物(ペンス-ジョーンズ型ミスペアリング)が完全に除去されることを示している。これは、発現にも副生成物プロファイルにも影響しない他方の結合アームのCLドメイン中のさらなる単一置換Q124Eに依存しない。

【0233】

実施例4A

Fcフラグメントを欠き、1つの結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替えを含み、かつCH1/CL境界面に1つまたは複数の荷電アミノ酸置換を含む、Ang2およびVEGFに結合する二価および三価多重特異性抗体の生産および発現

さらなる一実施例では、一般的方法の項で述べたように、古典的な分子生物学的技法によって、ヒトAng2およびヒトVEGFに結合する多重特異性抗体を作製し、上述のように、HEK293細胞において一過性に発現させた。生成した抗体は、VEGFに特異的に結合する結合アーム中に、VH/VLドメインの交換が施されたFabフラグメントを含み、Ang2に特異的に結合するもう1つの結合アームに、ドメインの交換が施されていないFabフラグメントを含んでおり、同時に、当該多重特異性抗体はFcフラグメントを欠いていた。したがって、第1軽鎖はヒトAng2に特異的に結合する抗体に由来し、N末端からC末端の方向にドメインVL-CLを含む。第1(抗Ang2)抗体の重鎖と第2(抗VEGF)抗体の重鎖は、グリシン-セリンペプチドリンカーによって接続される。VEGFに特異的に結合する抗体の重鎖では、元の可変ドメインVHが、その抗VEGF抗体に由来する可変ドメインVLで置き換えられている。したがって、抗Ang2の重鎖と抗VEGF抗体の重鎖とを含むポリペプチドは、N末端からC末端の方向に、ドメインVH(Ang2)-CH1(Ang2)リンカー-VL(VEGF)-CH1(VEGF)を含む。ヒトVEGFに特異的に結合する軽鎖では、元の可変ドメインVLがその抗VEGF抗体の可変ドメインVHで置き換えられている。したがって、抗VEGF抗体の修飾軽鎖は、N末端からC末端の方向に、ドメインVH-CLを含む。CH1/CL境界面中の異なるアミノ酸の置換を表5bに示す。

【0234】

この実施例では、3種類の一般構造を持つ多重特異性抗体を作製した:

i) CrossFabV_H-V_L-(Fab)フォーマットの二価多重特異性Ang2-VEGF二重特異性抗体(図7Dに示す一般構造);

ii) (CrossFabV_H-V_L)₂-Fabフォーマットの三価多重特異性Ang2-VEGF二重特異性抗体(図8C(neu)に示す一般構造);

iii) (Fab)₂-CrossFabV_H-V_Lフォーマットの三価多重特異性Ang2-VEGF二重特異性抗体(図8Dに示す一般構造)。

【0235】

比較のために、CH1/CL境界面に置換を持たない野生型(wt)VH/VLドメイン交換/入れ替え抗体を調製した。表5aに示すアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使って多重特異性抗体を発現させる。

【0236】

(図5a)VH/VLドメインの交換/入れ替えが施された抗Ang2-VEGF多重特異性抗体の軽鎖(LC)および重鎖(HC)のアミノ酸配列:野生型(「非荷電」)および荷電アミノ酸置換(「荷電」)の異なる組み合わせ

抗体	LC Ang2	HC	LC VEGF
xFab-Fab<ANG2-VEGF>- 非荷電 (Ang2VEGF-0452)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>- 荷電 (Ang2VEGF-0447)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>- 非荷電 (Ang2VEGF-0453)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>- 荷電 (Ang2VEGF-0448)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>- 非荷電	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 4
Fab2-xFab<ANG2-VEGF>- 荷電	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 4

【 0 2 3 7 】

(図 5 b) 表5aで述べた本発明の抗体中のCH1/CL境界面におけるアミノ酸置換

10

20

	Ang2				VEGF	
	CL (124番目)	CL (123番目)	CH1 (147番目)	CH1 (213番目)	CH1	CL (124番目)
xFab- Fab<ANG2- VEGF>- 非荷電 (Ang2VEGF- 0452)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab- Fab<ANG2- VEGF>-荷電 (Ang2VEGF- 0447)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
xFab ₂ - Fab<ANG2- VEGF>- 非荷電 (Ang2VEGF- 0453)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab ₂ - Fab<ANG2- VEGF>-荷電 (Ang2VEGF- 0448)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
Fab2- xFab<ANG2- VEGF>- 非荷電	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
Fab2- xFab<ANG2- VEGF>-荷電	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt

【0238】

実施例4B:

Fcフラグメントを欠き、1つの結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替えを含み、かつCH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を含む、ANG2およびVEGFに結合する二価および三価多重特異性抗体の生産および発現

分泌されたタンパク質を、アフィニティー精製を使用する標準的手順によって精製した。

【0239】

アフィニティー精製後の生産収量および分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって決定した抗体分子の分率を表5cに示す。

【0240】

(表5c) アフィニティー精製後の生産収量および所望の抗体の分率

抗体	収量 [mg/L]	分析用SECによる 抗体の分率 [%]
Ang2VEGF-0452	37.8	64.1
Ang2VEGF-0447	26.7	88.5
Ang2VEGF-0453	4.2	88.5
Ang2VEGF-0448	9.7	92.4

【0241】

質量分析: 予想一次構造を、脱グリコシル化インタクト抗体および脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化抗体のエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって分析した。

【0242】

VH/VL Fab-CrossFabコンストラクトを1mg/mlのタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、37℃において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC (Roche) 消化は、100 µgの脱グリコシル化VH/VL Fab-CrossFabを使って、Tris緩衝液pH8中、それぞれ室温で120時間、および37℃で40分を行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム (GE Healthcare) でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量は、TriVersa NanoMateイオン源 (Advion) を装備したmaXis 4G UH R-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) でのESI-MSによって決定した。

【0243】

用意された材料と本発明者らのMS法との間にはオーバーラップする質量範囲があるので、より大きな質量範囲で潜在的副生成物を見るために、試料を2つの異なる方法で取得した。高質量範囲 (1000~4000m/z) で作業する際には、本方法にCID電圧 (この場合は90のcCID) を含め、低質量範囲 (600~2000) での測定にはCIDを使用しない。CIDの適用により、質量分析計においてインソースフラグメンテーションに順に現れるフラグメント (fragments which appear in order to in source fragmentation in the mass spectrometer) を取得する確率が高い。

【0244】

結果を表5dに示す。

【0245】

(表5d) 所望の主要分子に対して相対的に定量した、MS分析による表示の抗体の副生成物

抗体	MSによる副生成物の分率 [%]	副生成物
Ang2VEGF-0452	6 %	2つのAng2VL-CL軽鎖を持つミスペアした副生成物
Ang2VEGF-0447	0	検出されず
Ang2VEGF-0453	4.4 %; 35.7%	3つのAng VL-CL軽鎖を持つミスペアした副生成物 2つのAng VL-CL軽鎖と1つのVEGF VH-CL鎖とを持つミスペアした副生成物
Ang2VEGF-0448	0	検出されず

【0246】

実施例4C:

Fcフラグメントを欠き、1つの結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替えを含み、かつCH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を含む、ANG2およびVEGFに結合する二価および三価多重特異性抗体の抗原結合特性

各々のターゲット抗原、すなわちANG2およびVEGFへの前記実施例4Aおよび4Bの多重特異性抗体の結合をBiacore (登録商標) によって評価した。

【0247】

以下の手順に従ってVEGF結合を評価した:

ヒトVEGFA-121への表示した抗体の結合は、表面プラズモン共鳴により、BIACORE (登録

商標) T200 計器 (GE Healthcare) を使って調べた。GE Healthcareによって供給されるアミンカップリングキットを使用することによって、目標50RUのVEFGA-121-Hisを、SシリーズC1チップ (GE Healthcare BR-1005-35) に、pH5.0でカップリングした。固定化手順中は、HBS-N (10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、GE Healthcare) をランニング緩衝液として使用した。続く速度論的キャラクタリゼーションでは、試料緩衝液およびランニング緩衝液をpH7.4のPBS-T (0.05% Tween 20を含む10mMリン酸緩衝食塩水) とした。フローセルを25℃に、また試料ブロックを12℃に設定し、速度論的キャラクタリゼーションに先だってランニング緩衝液で2回プライミングした。

【0248】

会合は、100nMから開始する1:3の段階希釈液で、さまざまな溶液濃度の表示の抗体を、30 μ l/分の流量で180秒間注入することによって測定した。解離相は300秒まで監視し、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることによって誘発した。流速30 μ l/分の0.85% H_3PO_4 (リン酸) 溶液で30秒間洗浄することによって表面を再生した。抗His抗体表面から得られる応答を差し引くことによってバルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引く (二重参照)。 K_D および他の速度論的パラメータの算出にはラングミュア1:1モデルを使用した。

【0249】

以下の手順に従ってAng-2結合を評価した:

ヒトAng-2-RBD-Fcへの表示の抗体の結合を、表面プラズモン共鳴により、BIAcore (登録商標) T200計器 (GE Healthcare) を使って調べた。8000 (RU) 前後のヤギ抗ヒトF (ab')₂ (10 μ g/ml抗ヒトF (ab')₂; 注文コード:28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB、スウェーデン) を、GE Healthcareが供給するアミンカップリングキットを使用することによって、SシリーズCM5チップ (GE Healthcare BR-1005-30) にpH5.0でカップリングした。固定化手順中は、HBS-N (10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、GE Healthcare) をランニング緩衝液として使用した。続く速度論的キャラクタリゼーションでは、試料緩衝液およびランニング緩衝液をpH7.4のPBS-T (0.05% Tween 20を含む10mMリン酸緩衝食塩水) とした。フローセルを25℃に、また試料ブロックを12℃に設定し、速度論的キャラクタリゼーションに先だってランニング緩衝液で2回プライミングした。

【0250】

5nM溶液を5 μ l/分の流量で25秒間注入することによって二重特異性抗体をキャプチャした。会合は、100nMから開始する1:3の段階希釈液で、さまざまな溶液濃度の表示の抗体を、30 μ l/分の流量で120秒間注入することによって測定した。解離相は180秒まで監視し、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることによって誘発した。流速30 μ l/分のグリシンpH2.1溶液で60秒間洗浄することによって表面を再生した。ヤギ抗ヒトF (ab')₂ 表面から得られる応答を差し引くことによってバルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引く (二重参照)。見掛けの K_D および他の速度論的パラメータの算出にはラングミュア1:1モデルを使用した。

【0251】

結果を表5eおよび表5fに示す。

【0252】

(表5e) VEGFに対する表示の抗体のアフィニティー

抗体	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	0.35
Ang2VEGF-0447	0.36
Ang2VEGF-0453	0.22
Ang2VEGF-0448	0.18

【0253】

(表5f) Ang2に対する表示の抗体のアフィニティー

10

20

30

40

50

抗体	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	3
Ang2VEGF-0447	3
Ang2VEGF-0453	5
Ang2VEGF-0448	4

【0254】

Fc非含有抗体のCH1/CL境界面に導入した変異によって抗原結合が損なわれることはなかった。

【0255】

実施例5A:

VEGF結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、VEGF結合アームのCH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の生産および発現

さらにもう1つの実施例として、ヒトアンジオポエチン-2 (ANG2) およびヒトVEGFに結合する多重特異性抗体を、一般的方法の項で述べたように、古典的な分子生物学的技法によって作製した。この多重特異性抗体を、上述のように、HEK293細胞において一過性に発現させる。これらの各多重特異性抗体の一般スキームを、異なる荷電アミノ酸による置換がVH/VLドメインの交換/入れ替えを含む結合アームのCH1/CL境界面内に存在することを示している図1Bに示す。比較のために、CH1/CL境界面に置換を持たない野生型 (wt) VH/VLドメイン交換/入れ替え抗体も調製した。表6aに示すアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使って多重特異性抗体を発現させた。

【0256】

(表6a) VH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施された抗Ang2-VEGF多重特異性抗体Ang2VEGF-0273、Ang2VEGF-0425、およびAng2VEGF-0424の軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) のアミノ酸配列:野生型 (wt) および荷電アミノ酸置換の異なる組み合わせ

抗体	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0425	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Ang2VEGF-0424	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47

【0257】

全てのコンストラクトにノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用して、第1C H3ドメイン中の典型的ノブ (T366W) 置換および第2CH3ドメイン中の対応するホール置換 (T366S、L368AおよびY407V) (ならびに2つの追加導入システイン残基S354C/Y349C) (上記の各対応重鎖 (HC) 配列中に含まれるもの) を施した。

【0258】

実施例5B

一方の結合アームにVH/VLドメインの交換/入れ替え (CrossMab^{Vh-VL}) が施され、CH1/CL境界面に異なる荷電アミノ酸置換を持つ、アンジオポエチン-2 (ANG2) およびVEGFに結合する多重特異性抗体の精製およびキャラクタリゼーション

上で発現させた多重特異性抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーとの組み合わせにより、上清から精製した。多重特異性抗体は全て、良好な収量で生産することができ、安定である。

【0259】

得られた生成物を、質量分析によってその実体について特徴づけ、またSDS-PAGEによる純度、単量体含量および安定性などの分析的特性について特徴づけた。

【0260】

質量分析

予想一次構造を、脱グリコシル化インタクトCrossMabおよび脱グリコシル化/プラスミン消化あるいは脱グリコシル化/制限LysC消化CrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって分析した。

【0261】

VH/VL CrossMabを、1mg/mlのタンパク質濃度で、リン酸緩衝液またはTris緩衝液中、37℃において最大17時間、N-グリコシダーゼFによって脱グリコシル化した。プラスミン消化または制限LysC (Roche) 消化は、100 μgの脱グリコシル化VH/VL CrossMabを使って、Tris緩衝液pH8中、それぞれ室温で120時間、および37℃で40分行った。質量分析に先だって、Sephadex G25カラム (GE Healthcare) でのHPLCによって、試料を脱塩した。総質量は、TriVersa NanoMateイオン源 (Advion) を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) でのESI-MSによって決定した。

【0262】

結果を表6bに示す。

【0263】

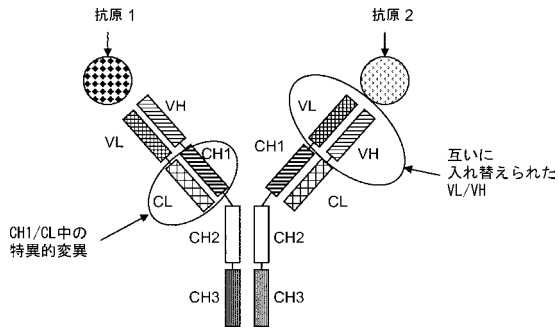
(表6b) VH/VLドメインの交換/入れ替えを含む結合アーム内のCH1/CL境界面における単一荷電アミノ酸置換による副生成物プロファイル (主要ベンス-ジョーンズ型副生成物)

	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	所望の分子	主要副生成物 (ベンス- ジョーンズ型 ミスペアリング) MSによる%
Ang2VEGF-0273	wt (カッパ)	wt	wt K147 K213	wt E123 Q124	<i>n.d.</i>	~20%
Ang2VEGF-0425	wt	wt	K147E	Q124K	72%	22%
Ang2VEGF-0424	wt	wt	K147E K213E	E123K Q124K	64%	26 %

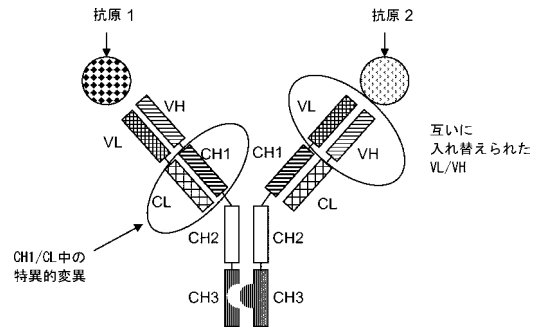
【0264】

表6bの結果は、VH/VLドメインの交換/入れ替えを含む結合アーム内に位置するCH1/CL境界面におけるアミノ酸置換を持つAng2VEGF-二重特異性抗体では、副生成物プロファイル (ベンス-ジョーンズ型ミスペアリングを含む) が改善されえなかったことを実証している。

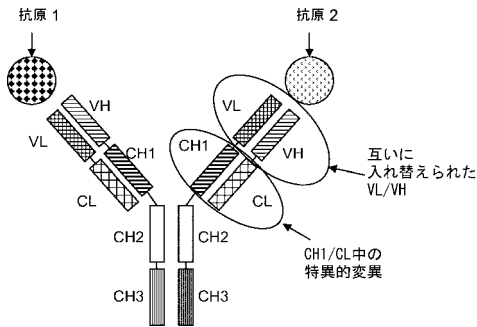
【図 1 A】



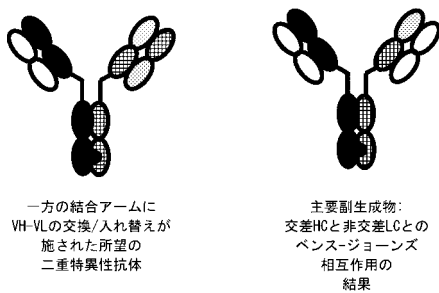
【図 1 C】



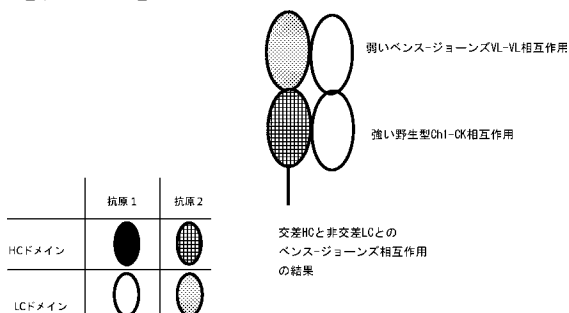
【 図 1 B 】



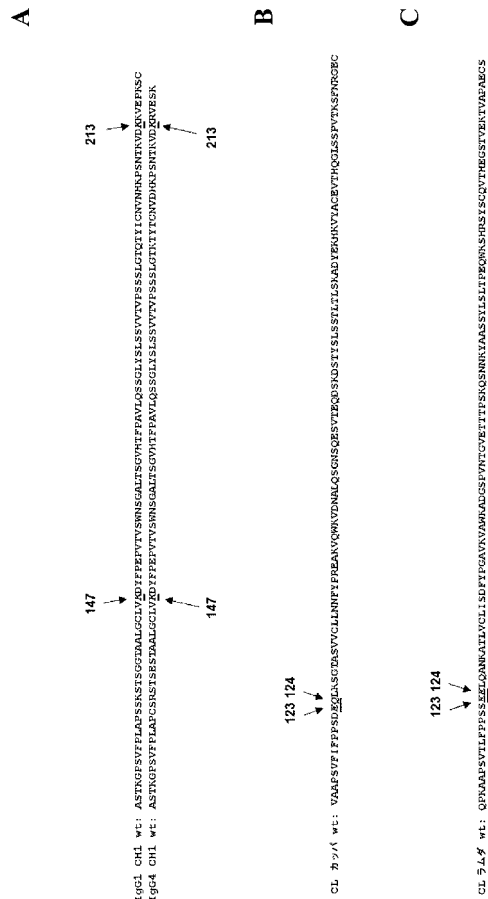
【图 2 A】



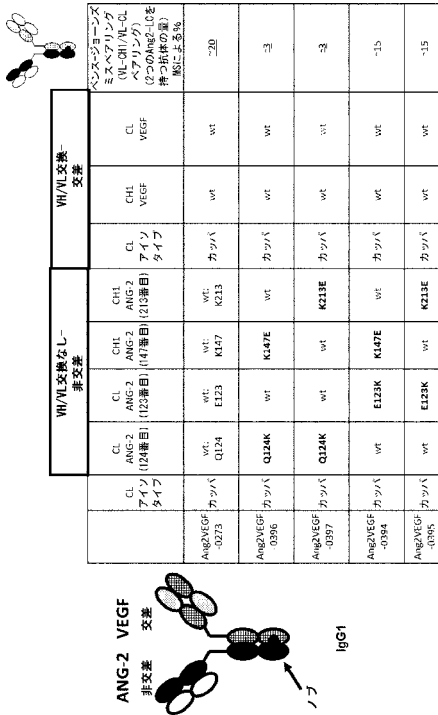
【図 2 B】



【図 3】

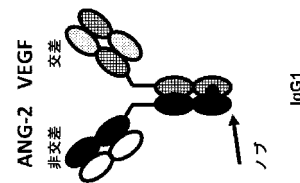


【図 4 A】

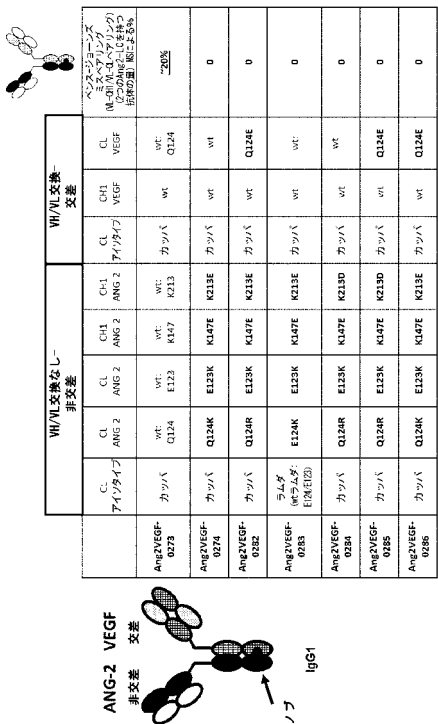


【図 4 B】

WH/VI 交換なし 非交換		WH/VI 交換 交換	
LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
ANG2VEGF-0273	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
ANG2VEGF-0336	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
ANG2VEGF-0337	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
ANG2VEGF-0334	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
ANG2VEGF-0395	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4

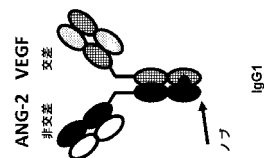


【図 5 A】



【図 5 B】

WH/VL 交換なし 非交差	WH/VL 交換 交差
Ang2VVEGf-0273	Ang2VVEGf-0274
Ang2VVEGf-0282	Ang2VVEGf-0283
Ang2VVEGf-0284	Ang2VVEGf-0285
Ang2VVEGf-0286	

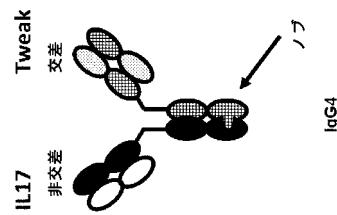


【図 6 A】

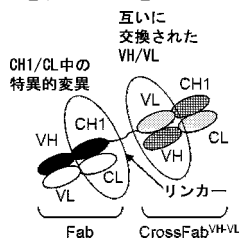
IL17 非変異	VH/VL交換なし-非変異				VH/VL交換-変異				ベンズ ジスチレン 基スプレッティング (VH-CH1/VL-CL ヘテロリンク) (2つのIL17L14を 持つIL17L14を 持つIL17L14の量 に依存する)
	CL IL17 (12番目)	CH1 IL17 (13番目)	CL IL17 (14番目)	CH1 IL17 (15番目)	CL TWEAK (12番目)	CH1 TWEAK (13番目)	CL TWEAK (14番目)	CH1 TWEAK (15番目)	
Tweakil 17-0096	WT: Q124	WT: E123	WT: K147	WT: K213	WT: Q124	WT: K147	WT: Q124	WT: K213	20%
Tweakil 17-0097	WT: Q124K	WT: E123R	WT: K147E	WT: K213E	WT: Q124K	WT: K147E	WT: Q124K	WT: K213E	0
Tweakil 17-0098	WT: Q124K	WT: E123R	WT: K147E	WT: K213D	WT: Q124K	WT: K147E	WT: Q124K	WT: K213D	0
Tweakil 17-0099	WT: Q124K	WT: E123R	WT: K147E	WT: K213D	WT: Q124K	WT: K147E	WT: Q124K	WT: K213D	0
Tweakil 17-0100	WT: Q124K	WT: E123K	WT: K147E	WT: K213E	WT: Q124K	WT: K147E	WT: Q124K	WT: K213E	0
Tweakil 17-0101	WT: Q124K	WT: E123K	WT: K147E	WT: K213E	WT: Q124K	WT: K147E	WT: Q124K	WT: K213E	変異

【図 6 B】

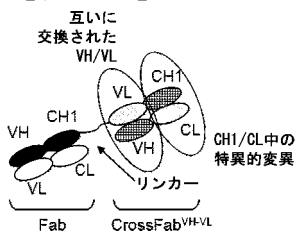
VH/VL交換なし - 非変異	VH/VL交換 - 変異	
	LC IL17	LC Tweak
Tweakil17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17
Tweakil17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 17
Tweakil17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 17
Tweakil17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 17
Tweakil17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 17
Tweakil17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 17



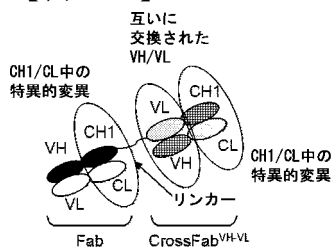
【図 7 A】



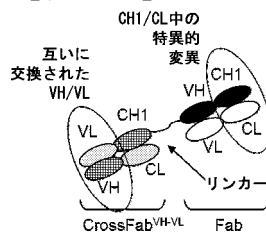
【図 7 B】



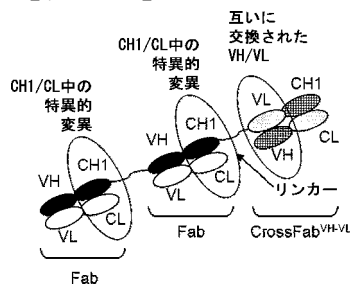
【図 7 C】



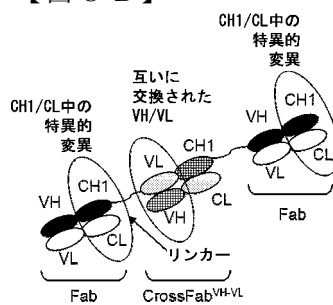
【図 7 D】



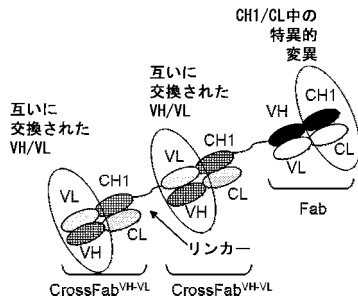
【図 8 A】



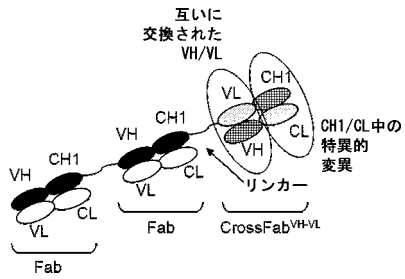
【図 8 B】



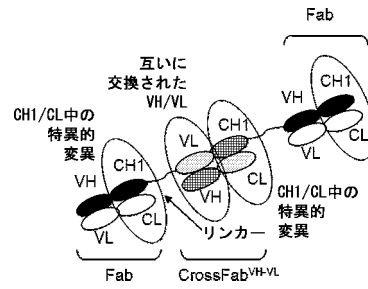
【図 8 C】



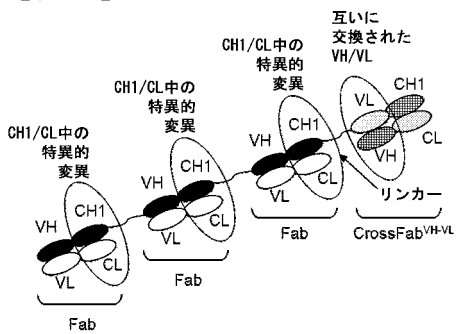
【図 8 D】



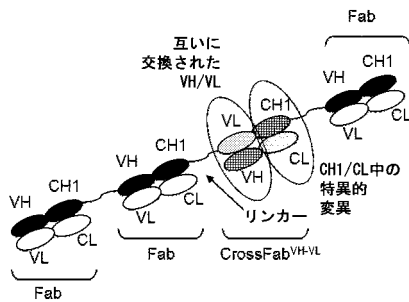
【図 8 E】



【図 9】



A



B

【配列表】

2017511139000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/057165

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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/057165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/22 C07K16/24
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, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTIAN KLEIN ET AL: "Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies", MABS, vol. 4, no. 6, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 653-663, XP055106060, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21379 The whole document, in particular Table 2, Figure 1, and section 'Enforcing light chain association' ----- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2015

Date of mailing of the international search report

09/09/2015

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

Chapman, Rob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/057165

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEBASTIAN FENN ET AL: "Crystal Structure of an Anti-Ang2 CrossFab Demonstrates Complete Structural and Functional Integrity of the Variable Domain", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), page e61953, XP055106055, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0061953 The whole document, in particular Fig.1 -----	1-6,8-15
X	WO 2013/174873 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 28 November 2013 (2013-11-28) The whole document, in particular Fig.2a -----	1-15
X	WO 2013/150043 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE) 10 October 2013 (2013-10-10) The whole document, in particular, SEQ ID NO:28,37,56, and 58 -----	1-15
X,P	WO 2014/081955 A1 (AMGEN INC [US]) 30 May 2014 (2014-05-30) The whole document, in particular Example 8, Tables 3 (Ab 1D01 and 2A01), 5 and 6. -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/057165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013174873 A1	28-11-2013	CA 2869529 A1 CN 104379604 A EP 2855531 A1 JP 2015520168 A KR 20150013188 A US 2015166670 A1 WO 2013174873 A1	28-11-2013 25-02-2015 08-04-2015 16-07-2015 04-02-2015 18-06-2015 28-11-2013
WO 2013150043 A1	10-10-2013	AU 2013244999 A1 CA 2868404 A1 CL 2014002539 A1 CN 104245738 A CO 7081144 A2 CR 20140431 A EA 201401077 A1 EP 2834273 A1 JP 2015514102 A KR 20150002758 A PE 24222014 A1 PH 12014502010 A1 US 2015132307 A1 WO 2013150043 A1	25-09-2014 10-10-2013 16-01-2015 24-12-2014 10-10-2014 01-12-2014 27-02-2015 11-02-2015 18-05-2015 07-01-2015 21-01-2015 24-11-2014 14-05-2015 10-10-2013
WO 2014081955 A1	30-05-2014	AU 2013347963 A1 CA 2888496 A1 KR 20150085539 A PH 12015501097 A1 TW 201434857 A US 2014154254 A1 UY 35148 A WO 2014081955 A1	07-05-2015 30-05-2014 23-07-2015 27-07-2015 16-09-2014 05-06-2014 30-05-2014 30-05-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
	A 6 1 P 19/00	
	A 6 1 P 37/02	

(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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シェイファー ヴォルフガング
ドイツ連邦共和国 6 8 1 9 9 マンハイム タンホイザーリング 1 9 0

(72)発明者 クライン クリスチャン
スイス連邦 8 9 0 6 ボンシュテッテン カップフシュトラーセ 2 6 ビー

(72)発明者 イムホフ-ユング サビーヌ
ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 ブラネック エーゲンホーフエンシュトラーセ 2 6 ビー

(72)発明者 クロスターマン ステファン
ドイツ連邦共和国 8 2 0 6 1 ノイリート ケルンバウアーシュトラーセ 8

(72)発明者 モルホイ ミヒャエル
ドイツ連邦共和国 8 0 6 8 6 ミュンヘン ファヒナーシュトラーセ 7 エイ

(72)発明者 レグラ ヨルグ トーマス
ドイツ連邦共和国 8 1 3 7 7 ミュンヘン インナーコフラーシュトラーセ 1 7 ビー

Fターム(参考) 4C085 AA14 BB31 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20