

(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2014-533239

(P2014-533239A)

(43) 公表日 平成26年12月11日(2014.12.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	
A61P 27/02 (2006.01)	A61P 27/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-536147 (P2014-536147)	(71) 出願人	502233344 エスパテック - アノバルティス カ ンパニー エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成24年10月19日 (2012.10.19)		スイス国、シーエイチ-8952 シュリ ーレン、パーギシュトラーセ 21
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月16日 (2014.4.16)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/004404	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02013/056851	(72) 発明者	リーグラウ, アシュトリト ツェー, スイス国 8005 チューリッヒ, コ ンラートシュトラーセ 55
(87) 国際公開日	平成25年4月25日 (2013.4.25)	(72) 発明者	ボラス, レオナルド スイス国 ツェーハー-8952 シュリ ーレン, バンデンタルシュトラーセ 1 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/549,482		
(32) 優先日	平成23年10月20日 (2011.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 安定な複数抗原結合抗体

(57) 【要約】

本発明は、複数の抗原に結合する抗体を提供し、前記抗体は、少なくとも2つの抗体軽鎖可変ドメインおよび2つの抗体重鎖可変ドメインを有し、各軽鎖可変ドメインは、重鎖可変ドメインに連結してVH/VLコンストラクトを形成し、VHドメインのうちの少なくとも1つは、AHo位置12、103および/または144の特定のアミノ酸を含み、VLドメインのうちの少なくとも1つは、AHo位置47および/または50の特定のアミノ酸を含む。本発明の組み換え抗体の発現のための核酸分子、ベクターおよび宿主細胞、それらを単離するための方法、ならびに医薬における前記抗体の使用もまた開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数抗原結合抗体分子であって、

a) 1つは抗原 A に対する特異性を有し (VH - A)、1つは抗原 B に対する特異性を有する (VH - B)、2つの重鎖可変ドメインと、

b) 1つは抗原 A に対する特異性を有し (VL - A)、1つは抗原 B に対する特異性を有する (VL - B)、2つの軽鎖可変ドメインと

を含み、前記 2つの重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にセリンもしくはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にセリンもしくはトレオニンのうちの少なくとも1つを含み、ならびに / または前記 2つの軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、A H o 位置 5 0 にアルギニンを含む、複数抗原結合抗体分子。

10

【請求項 2】

VH - A は、ペプチドリンカー 1 により VL - B に連結して VH - A / VL - B コンストラクトを形成し、VH - B は、ペプチドリンカー 2 により VL - A に連結して VH - B / VL - A コンストラクトを形成する、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 3】

前記 VH - A / VL - B コンストラクトが、VH - A - (リンカー 1) - VL - B 方向にある、請求項 2 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 4】

前記 VH - B / VL - A コンストラクトが、VH - B - (リンカー 2) - VL - A 方向にある、請求項 2 に記載の複数抗原結合抗体。

20

【請求項 5】

ペプチドリンカー 1 およびペプチドリンカー 2 は、それぞれ 1 ~ 10 個のアミノ酸を有する、請求項 2 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 6】

ペプチドリンカー 1 は、G G G G S (配列番号 1) の配列を有し、ペプチドリンカー 2 は、G G G G S (配列番号 1) の配列を有する、請求項 5 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 7】

VH - A / VL - B コンストラクトは、ペプチドリンカー 3 により VH - B / VL - A コンストラクトにさらに連結している、請求項 2 に記載の複数抗原結合抗体。

30

【請求項 8】

ペプチドリンカー 3 は、10 ~ 30 個のアミノ酸を有する、請求項 7 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 9】

ペプチドリンカー 3 は、(G G G G S)₄ (配列番号 4) の配列を有する、請求項 8 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 10】

VH - A - 配列番号 1 - VL - B - 配列番号 4 - VH - B - 配列番号 1 - VL - A 構成を有する、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

40

【請求項 11】

前記 VH - A は、VL - A に連結して、抗原 A に対する特異性を有する単鎖抗体 (s c F v A) を形成し、VH - B は、VL - B に連結して、抗原 B に対する特異性を有する単鎖抗体 (s c F v B) を形成する、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 12】

前記 s c F v - A は、VH - A / VL - A - リンカー 3 - VH - B / VL - B 構成で s c F v - B に連結している、請求項 11 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 13】

前記リンカー 3 は、配列番号 4 の配列を有する、請求項 12 に記載の複数抗原結合抗体

50

【請求項 14】

前記 2 つの軽鎖可変ドメインの少なくとも 1 つは、ヒト V k a p p a 1 ファミリー軽鎖可変領域であるか、またはそれから得られる、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 15】

前記 2 つの重鎖可変ドメインの少なくとも 1 つは、ヒト V H 3 ファミリー重鎖可変領域であるか、またはそれから得られる、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 16】

前記 V H ドメインおよび前記 V L ドメインは、ウサギ目からの C D R を含む、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 17】

V H - A および / または V H - B は、A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にトレオニンを含む、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 18】

V L - A および / または V L - B の A H o 位置 5 0 の前記アルギニンは、置換により導入される、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 19】

V H - A および / または V H - B の A H o 位置 1 2 のセリン、A H o 位置 1 0 3 のセリンまたはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 のセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも 1 つは、置換により導入される、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 20】

二価である、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 21】

二重特異性である、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 22】

前記重鎖可変ドメインの少なくとも 1 つは、A H o 位置 2 4 にトレオニン (T)、A H o 位置 2 5 にバリン (V)、A H o 位置 5 6 にアラニン (A) またはグリシン (G)、A H o 位置 8 2 にリシン (K)、A H o 位置 8 4 にトレオニン (T)、A H o 位置 8 9 にバリン (V)、および A H o 位置 1 0 8 にアルギニン (R) の少なくとも 3 つを含む、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項 24】

疾患の診断および / または治療のための、請求項 1 に記載の複数抗原結合抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条に従い、2 0 1 1 年 1 0 月 2 0 日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 5 4 9 , 4 8 2 号の優先権を主張し、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、少なくとも 2 つの抗体軽鎖可変ドメインと、2 つの抗体重鎖可変ドメインとを有する安定な複数抗原結合抗体に関し、定常ドメインを有さず、各軽鎖可変ドメインは、重鎖可変ドメインに連結して V H / V L コンストラクトを形成し、V H ドメインの少なくとも 1 つは、A H o 位置 1 2、1 0 3 および / または 1 4 4 に特定のアミノ酸を含み、V L ドメインのうちの少なくとも 1 つは、A H o 位置 4 7 および / または 5 0 に特定のアミノ酸を含む。本発明は、さらに、そのような抗体を生成する方法、およびそのような抗体を含む薬学的組成物に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

2つ以上の抗原に結合することができる抗体分子は、複数のタンパク質が関与する疾患の治療のための可能性のある治療薬剤として望ましい。例えば、同じシグナル伝達経路における2つのタンパク質を標的とすること、または2つの異なる経路の活性を、各経路におけるタンパク質を標的とすることにより調節することが望ましい場合が多い。そのような抗体の例は、多重特異性抗体（例えば、2つの異なる標的分子に結合する二重特異性抗体）および多価抗体（例えば、1つの標的分子の2つの異なる結合部位に結合する二価抗体）を含む。治療抗体の分野において、2つの治療抗体を単一の分子に組み合わせ、相加的または相乗的効果を利用しながら、安定性および他の望ましい特性を維持するための、いくつかのアプローチが開発されている。そのようなアプローチは、タンデム単鎖可変断片（Tds c Fv）（非特許文献1；非特許文献2）、二特異性抗体（非特許文献3）、タンデム二特異性抗体（非特許文献4）、1つで2つの抗原に結合する抗体（非特許文献5）、および二重可変ドメイン抗体（非特許文献6）等の組み換え構成を含む。

10

【0004】

2成分治療アプローチが魅力的である疾患の一例は、脈絡膜血管新生である。脈絡膜血管新生の血管成分は、血管内皮細胞、内皮細胞前駆体、および周皮細胞を含む。組織病理学により、血管新生刺激の源であると共に、多くの場合容量分析的に最大の成分であると思われる血管外成分は、炎症性、グリアおよび網膜色素上皮細胞、ならびに線維芽細胞を含む。組織損傷は、いずれの成分によっても引き起こされる可能性がある。各成分は、様々な単剤治療により別個に標的とされ得る。しかしながら、血管内皮成長因子（VEGF）および腫瘍壊死因子（TNF）に対する二重特異性抗体は、両方の成分を同時に攻撃する機会を示す。

20

【0005】

多重特異性および多価抗体に関連した一般的な問題は、低い安定性、ならびに産生収率、純度および親和性に関する問題である。合理的設計および指向進化（非特許文献7）を含む、これらの問題に対応するための様々なアプローチが開発されている。しかしながら、そのようなアプローチは、時間を要し、さらに普遍的に該当し得る結果を提供しなければならない。

結果として、当該技術分野において、安定で可溶性であり、また従来のも多重特異性および多価抗体構成の欠陥を有さない多重特異性および多価抗体構成が必要とされている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hagemeyer et al., 2009, Thromb Haemost 101:1012-1019

【非特許文献2】Robinson et al., 2008, Br J Cancer 99:1415-1425

【非特許文献3】Hudson et al., 1999, J Immunol Methods 231:177-189

【非特許文献4】Kipriyanov, 2009, Methods Mol Biol 562:177-193

40

【非特許文献5】Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614

【非特許文献6】Wu et al., 2007, Nat Biotechnol 25:1290-1297

【非特許文献7】Mabry and Snavely, 2010, IDrugs 13:543-549

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

本発明は、可変重鎖および/または可変軽鎖における特定の位置に特定のアミノ酸残基を含む、極めて安定な分子である、複数の抗原に結合する抗体、例えば二重特異性および二価抗体を提供する。

【0008】

一態様において、本発明は、複数抗原結合抗体分子であって、

a) 1つは抗原Aに対する特異性を有し(VH-A)、1つは抗原Bに対する特異性を有する(VH-B)、2つの重鎖可変ドメインと、

b) 1つは抗原Aに対する特異性を有し(VL-A)、1つは抗原Bに対する特異性を有する(VL-B)、2つの軽鎖可変ドメインと

を含み、2つの重鎖可変ドメインのうちの少なくとも1つは、A H o位置12にセリン、A H o位置103にセリンもしくはトレオニン、およびA H o位置144にセリンもしくはトレオニンのうちの少なくとも1つを含み、ならびに/または2つの軽鎖可変ドメインのうちの少なくとも1つは、A H o位置50にアルギニンを含む、複数抗原結合抗体分子を提供する。

10

【0009】

ある特定の態様において、VH-Aは、VL-Aに連結して、抗原Aに対する特異性を有する単鎖抗体(s c F v A)を形成し、VH-Bは、VL-Bに連結して、抗原Bに対する特異性を有する単鎖抗体(s c F v B)を形成する。

【0010】

一態様において、本発明は、複数抗原結合抗体分子であって、ペプチドリンカー1により抗原Bに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-B)に連結してVH-A/VL-Bコンストラクトを形成する、抗原Aに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-A)と、ペプチドリンカー2により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-A)に連結してVH-B/VL-Aコンストラクトを形成する、抗原Bに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-B)とを含み、複数抗原結合抗体は、定常領域を有さず、VL-AおよびVL-Bのうちの少なくとも1つは、A H o位置50にアルギニンを含み、VH-AおよびVH-Bのうちの少なくとも1つは、A H o位置12にセリン、A H o位置103にセリンまたはトレオニン、およびA H o位置144にセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つを含む、複数抗原結合抗体分子を提供する。

20

【0011】

ある特定の態様において、VH-A/VL-Bコンストラクトは、VH-A-(リンカー1)-VL-B方向またはVH-B-(リンカー1)-VL-A方向にある。他の態様において、VH-B/VL-Aコンストラクトは、VH-B-(リンカー2)-VL-A方向またはVH-A-(リンカー2)-VL-B方向にある。

30

【0012】

別の態様において、VL-AまたはVL-Bは、配列番号6の配列に対して少なくとも65%の同一性を有するフレームワーク配列を含む。

【0013】

別の態様において、VH-AまたはVH-Bは、配列番号7の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するフレームワーク配列を含む。

40

【0014】

別の態様において、VL-A/VH-BおよびVH-B/VL-Aコンストラクトのうちの少なくとも1つは、ヒトV k a p p a 1ファミリー軽鎖可変領域、ヒトV l a m b d a 1ファミリー軽鎖可変領域、またはヒトV k a p p a 3ファミリー軽鎖可変領域を含む。

【0015】

別の態様において、VL-A/VH-BおよびVH-B/VL-Aコンストラクトのうちの少なくとも1つは、ヒトV H 3ファミリー重鎖可変領域、ヒトV H 1 aファミリー重鎖可変領域、またはヒトV H 1 bファミリー重鎖可変領域を含む。

【0016】

50

別の態様において、VHドメインおよびVLドメインは、ウサギ目からのCDRを含む。

【0017】

別の態様において、本発明は、複数抗原結合抗体であって、

a) ペプチドリンカー3により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-A)に連結してscFv-Aを形成する、抗原Aに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-A)を含む、単鎖抗体と、

b) ペプチドリンカー3により抗原Bに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-B)に連結してscFv-Bを形成する、抗原Bに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-B)を含む、単鎖抗体と

を含み、scFv-Aは、ペプチドリンカー1によりscFv-Bに連結され、VL-AおよびVL-Bのうちの少なくとも1つは、AHO位置50にアルギニンを含み、VH-AおよびVH-Bのうちの少なくとも1つは、AHO位置12にセリン、AHO位置103にセリンまたはトレオニン、およびAHO位置144にセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つを含む、複数抗原結合抗体を提供する。

【0018】

一態様において、本発明の複数の抗原結合抗体は、VH-A/VL-A-リンカー-VH-B/VL-B構成の、抗原Aに対する特異性を有する単鎖抗体および抗原Bに対する特異性を有する単鎖抗体を含む。好ましい態様において、リンカーは、20個のアミノ酸を有する。別の好ましい態様において、リンカーは、配列番号4の配列を有する。

【0019】

さらに別の態様において、本発明は、複数抗原結合抗体分子であって、ウサギ目からのCDRと、ペプチドリンカー1により抗原Bに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-B)に連結してVH-A/VL-Bを形成する、抗原Aに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-A)と、ペプチドリンカー2により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-A)に連結してVH-B/VL-Aコンストラクトを形成する、抗原Bに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-B)とを含み、重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、AHO位置24にトレオニン(T)、AHO位置25にバリン(V)、AHO位置56にアラニン(A)またはグリシン(G)、AHO位置82にリシン(K)、AHO位置84にトレオニン(T)、AHO位置89にバリン(V)、およびAHO位置108にアルギニン(R)の少なくとも3つを含む、複数抗原結合抗体分子を提供する。ある特定の態様において、そのような抗体は、可変軽鎖ドメインの少なくとも1つにおいて、AHO位置1にグルタミン酸(E)、AHO位置3にバリン(V)、AHO位置4にロイシン(L)、AHO位置10にセリン(S)、AHO位置47にアルギニン(R)、AHO位置57にセリン(S)、AHO位置91にフェニルアラニン(F)および/またはAHO位置103にバリン(V)をさらに含む。

【0020】

本発明の具体的な好ましい実施形態は、以下のある特定の好ましい実施形態のより詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本明細書において示される詳細は、例であり、本発明の好ましい実施形態の例示的な考察のみを目的とし、本発明の様々な実施形態の原理および概念的側面の最も有用で容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために示される。これに関して、本発明の基本的理解に必要とされるよりも詳しく本発明の構造的詳細を示すことはしないが、説明を図面および/または例と併せれば、本発明のいくつかの形態がどのようにして実践において具現化され得るかが、当業者に明らかとなる。

【0022】

本発明がより容易に理解され得るようになるために、ある特定の用語が以下のように、また発明を実施するための形態の全体を通して記載されるように定義される。定義および

10

20

30

40

50

説明は、以下の例において明確および明瞭に変更されない限り、または意味の適用によりいかなる解釈も無意味となる、もしくは本質的に無意味となる場合でない限り、今後のいかなる解釈にも優先されることを意図し、目的とする。用語の解釈が無意味となる、または本質的に無意味となる場合、定義は、Webster's Dictionary, 3rd Editionまたは当業者に知られている辞書、例えばOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)から採用されるべきである。

【0023】

本発明の全般的な目的は、治療用途に好適な複数の抗原に結合することができる抗体を提供することである。本明細書において初めて説明されるように、そのような抗体の特性は、ある特定のアミノ酸が軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインにおける特定の位置に存在する場合、改善され得る。そのような改善された特性は、例えば、増加した安定性、産生収率、および純度を含む。

10

【0024】

したがって、本発明は、複数の抗原に結合する抗体であって、

a) ペプチドリンカー1により抗原Bに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-B)に連結してVH-A/VL-Bコンストラクトを形成する、抗原Aに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-A)と、

b) ペプチドリンカー2により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-A)に連結してVH-B/VL-Aコンストラクトを形成する、抗原Bに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-B)と

20

を含み、VL-AおよびVL-Bのうちの少なくとも1つは、A_HO位置47および/または50にアルギニンを含み、VH-AおよびVH-Bのうちの少なくとも1つは、A_HO位置12にセリン、A_HO位置103にセリンもしくはトレオニン、および/またはA_HO位置144にセリンもしくはトレオニンを含む抗体を提供する。一実施形態において、VLは、A_HO位置50にアルギニンを含み、VHは、A_HO位置12にセリン、A_HO位置103にトレオニン、およびA_HO位置144にトレオニンを含む。

【0025】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、定常ドメインを有さない複数抗原結合抗体、例えばscFv抗体である。

30

【0026】

「scFv」という用語は、リンカーにより接続された抗体重鎖可変ドメイン(または領域; VH)および抗体軽鎖可変ドメイン(または領域; VL)を含む分子を指し、定常ドメインを有さない。そのようなscFv分子は、一般構造NH₂-VL-リンカー-VH-COOHまたはNH₂-VH-リンカー-VL-COOHを有し得る。好適なリンカーは、本明細書に記載され、また当業者に知られており、例えば、国際特許出願WO2010/006454に記載のリンカーを含む。

【0027】

本明細書において使用される場合、「複数抗原結合抗体」は、少なくとも4つの可変ドメインを有する抗体であり、異なる標的分子の2つ以上の抗原(例えば二重特異性抗体)または同じ標的分子の2つ以上の抗原(例えば二価抗体)に結合し得る。本発明の複数抗原結合抗体の形態は、当業者に知られているように、二特異性抗体、単鎖二特異性抗体、およびタンデム抗体を含むが、これらに限定されない。

40

【0028】

「二重特異性抗体」は、本明細書において使用される場合、2つの異なる標的分子に結合し得る抗体である。

【0029】

「二価抗体」は、本明細書において使用される場合、1つの標的分子の2つの異なる部位に結合し得る抗体である。

50

【0030】

ある特定の実施形態において、本発明の複数抗原結合抗体のV Lは、本明細書において複数抗原結合抗体構成の安定性を改善することが示されている少なくとも1つの特定の位置において少なくとも1つの特定のアミノ酸を含み、本発明の複数抗原結合抗体のV Hは、本明細書において複数抗原結合抗体構成の安定性を改善することが示されている3つの特定の位置のうち少なくとも1つにおいて3つの特定のアミノ酸のうち少なくとも1つを含む。特定の実施形態において、V Lにおける位置は、A H o位置50および/またはA H o位置47であり、前記位置(複数を含む)のアミノ酸は、アルギニンである。別の特定の実施形態において、V Hにおける位置は、A H o位置12、103、および144であり、前記位置の好ましいアミノ酸は、A H o位置12におけるセリン、A H o位置103におけるセリンまたはトレオニン、およびA H o位置144におけるセリンまたはトレオニンである。好ましい実施形態において、V Hにおけるアミノ酸は、A H o位置12におけるセリン、A H o位置103におけるトレオニン、およびA H o位置144におけるトレオニンである。ある特定の実施形態において、これらの好ましいアミノ酸は、特定された位置(複数を含む)における自然発生アミノ酸の置換により、V Lおよび/またはV Hに導入され得る。

10

【0031】

A H o付番方式は、Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309: 657-670)においてさらに説明されている。代替的に、Kabata (Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)によりさらに説明されているKabata付番方式が使用されてもよい。抗体重鎖および軽鎖可変領域におけるアミノ酸残基位置を特定するために使用される2つの異なる付番方式の変換表は、A. Honegger, 2001, J. Mol. Biol. 309: 657-670に記載されている。V LにおけるA H o位置47の対応するKabata番号は、39である。V LにおけるA H o位置50の対応するKabata番号は、42である。V HにおけるA H o位置12の対応するKabata番号は、11である。V HにおけるA H o位置103の対応するKabata番号は、89である。V HにおけるA H o位置144の対応するKabata番号は、108である。

20

30

【0032】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に開示される好ましい位置に好ましいアミノ酸の1つ以上を含み、また、少なくとも2つの抗体、または例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fvを含む、それらの抗体断片の結合特異性を含む、複数抗原結合抗体を提供する。そのような抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖二量体またはその任意の最小断片、例えばFvまたはLadnerらの米国特許第4,946,778号(その内容は参照により明示的に組み込まれる)に記載のような単鎖コンストラクトであってもよい。ある特定の実施形態において、そのような複数抗原結合抗体は、A H o位置50にアルギニンを有する少なくとも1つのV L、ならびにA H o位置12にセリン、A H o位置103にセリンまたはトレオニン、およびA H o位置144にセリンまたはトレオニンを有する少なくとも1つのV Hを含む。

40

【0033】

リンカーおよびV H/V Lコンストラクト

本明細書において使用される場合、「ペプチドリナー1」および「ペプチドリナー2」は、V H/V Lコンストラクトで可変ドメインを互いに、または1つ以上のscFvコンストラクトを互いに接続するリンカーペプチドを指す。「V H/V Lコンストラクト」は、特定の抗原に結合するCDRを有するV Hドメイン、および異なる抗原に結合するCDRを有するV Lドメインを含む、V H-A/V L-BもしくはV H-B/V L-Aコ

50

ンストラクト、または、特定の抗原に結合するCDRを有するVHドメイン、および同じ抗原に結合するCDRを有するVLドメインを含む、VH-A/VL-AもしくはVH-B/VL-Bコンストラクトであってもよい。そのようなコンストラクトの形態は、VH-L-VLまたはVL-L-VH（式中、Lは、ペプチドリンカー1または2である）であってもよい。そのようなペプチドリンカーは、好ましくは、約20アミノ酸以下の長さである。特に、そのようなペプチドリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸の長さである。ある特定の実施形態において、ペプチドリンカーは、3～7アミノ酸の長さである。ペプチドリンカー1および/またはペプチドリンカー2の好ましいリンカー配列は、GGGS（配列番号1）である。本発明の複数抗原結合抗体におけるペプチドリンカー1および/またはペプチドリンカー2として有用な他のリンカー配列は、GGSおよびGGGGGS（配列番号2）を含む。ある特定の実施形態において、VH/VLコンストラクトは、単鎖抗体であってもよい。単鎖抗体におけるリンカーは、当該技術分野において知られている。好ましくは、本発明の抗体における好ましい抗原に結合するVHおよびVLドメインを連結する単鎖抗体のリンカーは、例えば以下に示される配列番号4の配列を有する、20アミノ酸までであってもよい。

10

【0034】

ある特定の実施形態において、VH/VLコンストラクトは、ペプチドリンカー3により別のVH/VLコンストラクトに接続される。他の実施形態において、VH/VLコンストラクトにおける可変ドメインは、ペプチドリンカー3により互いに接続される。ペプチドリンカー3は、好ましくは、約10アミノ酸超および約30アミノ酸未満の長さである。特に、ペプチドリンカー3は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸の長さである。ある特定の実施形態において、ペプチドリンカー3は、10～15アミノ酸の長さである。ペプチドリンカー3の好ましいリンカー配列は、GSDSNAGRASAGNTS（配列番号3）である。ペプチドリンカー3の別の好ましいリンカー配列は、(GGGS)₄（配列番号4）である。保存的变化（例えば置換）が、本発明の複数抗原結合抗体の活性および好ましい特性に影響することなくリンカー配列に形成され得ることが、当業者に理解される。

20

【0035】

ある特定の実施形態において、VH/VLコンストラクトは、VH-A-（リンカー1または2）-VL-B；VH-B-（リンカー1または2）-VL-A；VH-A-（リンカー1または2）-VL-A；VH-B-（リンカー1または2）-VL-B；VL-A-（リンカー1または2）-VH-A；VL-B-（リンカー1または2）-VH-Bの構成の1つであってもよい。VH/VLコンストラクト内のVHおよびVLドメインの他の方向が、当業者に企図され得る。例えば、VL-A-（リンカー1または2）-VH-B、VL-B-（リンカー1または2）-VH-A、VL-A-（リンカー1または2）-VH-A、VL-B-（リンカー1または2）-VH-Bである。特定の実施形態において、VH/VLコンストラクトがペプチドリンカー3により接続される場合、VH-A-（リンカー1）-VL-A-（リンカー3）-VH-B-（リンカー2）-VL-B；VH-A-（リンカー1）-VL-B-（リンカー3）-VH-B-（リンカー2）-VL-A；VL-A-（リンカー1）-VH-B-（リンカー3）-VL-B-（リンカー2）-VH-A、VL-A-（リンカー1）-VH-A-（リンカー3）-VL-B-（リンカー2）-VH-Bの構成の1つが形成され得る。本明細書において特定される構成は、限定されない例であり、当業者は、コンストラクトが生成され適切に折り畳まれる時に標的抗原の結合が達成される限り、様々な他の方向でVHおよびVLドメインを配置することができる。容易に理解されるはずである。

30

40

【0036】

一態様において、本発明の複数の抗原結合抗体は、VH-A/VL-A-リンカー3-VH-B/VL-B構成の、抗原Aに対する特異性を有する単鎖抗体および抗原Bに対する特異性を有する単鎖抗体を含み、リンカー3は、配列番号4の配列を有する。

【0037】

50

一実施形態において、本発明の複数抗原結合抗体の好ましい構成は、VH - A - 配列番号1 - VL - B - 配列番号4 - VH - B - 配列番号1 - VL - Aである。

【0038】

代替的に、本発明のVH/VLコンストラクトは、(例えば、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合、またはその他により)互いに機能的に連結して、複数抗原結合抗体を形成し得る。

【0039】

本発明は、複数の抗原に結合する抗体を提供する。本明細書に記載のように、そのような抗体は、異なる標的分子に結合し得る(例えば、少なくとも2つの異なるタンパク質に対する特異性を有する二重特異性抗体)か、または同じ標的分子上の異なるエピトープに結合し得る(例えば、同じタンパク質に対する特異性を有するが、そのタンパク質上の2つ以上の結合部位に結合する二価抗体)。具体的な標的分子(複数を含む)は、当業者により必要性に応じて選択され得る。

【0040】

限定ではなく例として、本発明は、本明細書における実施例に記載のように、VEGFおよびTNFに対する特性を有する二重特異性抗体を提供する。そのような抗体は、VEGFおよびTNFを阻害することが望ましい疾患を治療するのに有用である。

【0041】

ある特定の実施形態において、抗VEGF/TNF抗体は、加齢黄斑変性、脈絡膜血管新生、血管新生緑内障、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝臓癌、卵巣癌、昏睡、男化腫瘍、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、頭部および頸部の癌、鼻咽腔癌、喉頭癌、肝芽腫、カポジ肉腫、メラノーマ、皮膚癌、血管腫、海綿状血管腫、血管芽細胞腫、膵臓癌、網膜芽細胞腫、星細胞腫、膠芽細胞腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫、腎細胞癌、前立腺癌、母斑症に付随する異常血管増殖、浮腫(脳腫瘍に付随するもの等)、メグズ症候群、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、一般的な炎症の慢性および/または自己免疫性状態、一般的な免疫介在性炎症性障害、炎症性CNS疾患、目、関節、皮膚、粘膜、中枢神経系、胃腸管、尿路または肺に影響する炎症性疾患、一般的なブドウ膜炎の状態、網膜炎、HLA-B27+ブドウ膜炎、ベーチェット病、乾性眼症候群、緑内障、シェーグレン症候群、糖尿病(糖尿病性神経障害を含む)、インスリン耐性、一般的な関節炎の状態、関節リウマチ、骨関節炎、反応性関節炎およびライター症候群、若年性関節炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、ギラン-バレー症候群、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、慢性腎疾患、膀胱炎、乾癬(乾癬性関節炎を含む)、化膿性汗腺炎、脂肪織炎、壊疽性膿皮症、SAPHO症候群(滑膜炎、座瘡、膿疱症、骨化過剰症および骨炎)、座瘡、スイート症候群、天疱瘡、クローン病(腸外兆候を含む)、潰瘍性大腸炎、気管支喘息、過敏性肺炎、一般的なアレルギー、アレルギー性鼻炎、アレルギー性副鼻腔炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺線維症、ウェゲナー肉芽腫症、川崎症候群、巨細胞性動脈炎、チャージ-ストラウス血管炎、結節性多発動脈炎、熱傷、移植片対宿主病、宿主対移植片反応、臓器または骨髄移植後の拒絶反応の発現、一般的な血管炎の全身および局所の状態、全身性および円板状エリテマトーデス、多発性筋炎および皮膚筋炎、強皮症、子癩前症、急性および慢性膵臓炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、眼科手術(例えば水晶体手術(眼のレンズ置換術)または緑内障手術)後等の術後炎症、関節手術(関節鏡視下手術を含む)、関節関連構造の手術(例えば靭帯)、口腔および/または歯科手術、低侵襲的心臓血管手技(例えば、PTCA、アテローム切除術、ステント留置)、腹腔鏡下および/または内視鏡下腹腔内および婦人科手技、内視鏡下泌尿器科手技(例えば、前立腺手術、尿道鏡検査、膀胱鏡検査、間質性膀胱炎)、または一般的な手術前後の炎症(予防)、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ベル麻痺、クロイツフェルト-ヤコブ病の治療に使用され得る。癌関連骨溶解、癌関連炎症、癌関連疼痛、癌関連悪液質、骨転移、TNFの中心また

10

20

30

40

50

は周縁作用によりもたらされるか否か、および疼痛の炎症性、侵害性または神経障害性形態に分類されるか否かに関わらない、疼痛の急性および慢性形態、坐骨神経痛、腰痛、手根管症候群、複合性局所疼痛症候群（CRPS）、痛風、ヘルペス後神経痛、線維筋痛、局所的疼痛状態、転移腫瘍による慢性疼痛症候群、月経困難症。細菌、ウイルスまたは真菌性敗血症、結核、AIDS、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、高血圧、脂質異常症、心不全および慢性心不全。

【0042】

本発明の抗体のその特異的標的抗原への結合は、例えば、酵素免疫測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、FACS分析、バイオアッセイ（例えば、成長阻害）、または免疫プロットアッセイにより確認することができる。これらのアッセイはそれぞれ、一般的に、関心のある複合体に特異的な標識化された試薬（例えば抗体）を使用することにより、特に関心のあるタンパク質 - 抗体複合体の存在を検出する。代替的に、複合体は、様々な他の免疫測定法のいずれかを使用して検出され得る。例えば、抗体は、放射活性物質で標識化され、放射免疫測定法（RIA）において使用されてもよい（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weintraub, B., Principle of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい）。放射性同位体は、カウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用等の手段により、またはオートラジオグラフィーにより検出され得る。

10

20

【0043】

本発明の抗体は、治療および診断目的を含むいくつかの目的に有用である。

【0044】

VLおよびVHドメインの特性

ある特定の実施形態において、本発明の複数抗原結合抗体のVLおよびVHは、ヒト抗体、非ヒト抗体（例えば、げっ歯類、ヒト以外の霊長類、ウサギ目、または任意の他の好適な動物において産生された抗体）、キメラ抗体、ヒト化抗体等からのCDRを含む。特定の実施形態において、CDRは、ウサギ目からのものである。

【0045】

「ウサギ目」という用語は、ウサギ科（例えば野ウサギ（hare）およびウサギ（rabbit））、およびナキウサギ科（ナキウサギ（pika））を含む、分類学上のウサギ目のメンバーを指す。最も好ましい実施形態において、ウサギ目は、ウサギである。「ウサギ」という用語は、本明細書において使用される場合、ウサギ科に属する動物を指す。

30

【0046】

「CDR」という用語は、主に抗原結合に寄与する抗体の可変ドメイン内の6つの超可変領域の1つを指す。6つのCDRに対して最も一般的に使用される定義の1つは、Kabata E. A.ら（1991, Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication 91-3242）により提供された。いくつかの場合において、KabataによるCDRの定義は、軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2およびCDR3（CDR L1、CDR L2、CDR L3、またはL1、L2、L3）、ならびに重鎖可変ドメインのCDR2およびCDR3（CDR H2、CDR H3またはH2、H3）に対してのみ適用することができ、一方重鎖可変ドメインのCDR1（CDR H1またはH1）は、以下の残基により定義される（Kabata付番）：重鎖のCDR1は、位置26から開始し、位置36の前で終了する。この定義は、基本的に、KabataおよびChothiaにより異なって定義されるようなCDR H1の融合である。

40

【0047】

一実施形態において、本発明の複数抗原結合scFv抗体のVLは、以下の配列（配列番号5）に対して少なくとも65%の同一性、より好ましくは少なくとも80%、85%

50

、90%、95%、96%、97%、98%、より好ましくは99%の同一性を有する配列を含む。

E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V I I T C (X)_{n = 1 - 50} W Y Q Q K P G
R A P K L L I Y (X)_{n = 1 - 50} G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L
Q P D D F A T Y Y C (X)_{n = 1 - 50} F G Q G T K L T V L G

【0048】

別の実施形態において、本発明のVH複数抗原結合scFv抗体は、以下の配列(配列番号6)に対して少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、より好ましくは99%の同一性を有する配列を含む。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T A S (X)_{n = 1 - 50} W V R Q A
P G K G L E W V G (X)_{n = 1 - 50} R F T I S R D T S K N T V Y L Q M N S L R
A E D T A V Y Y C A R (X)_{n = 1 - 50} W G Q G T L V T V S S

【0049】

本明細書において使用される場合、X残基は、CDR挿入部位である。Xは、任意の自然発生アミノ酸であってもよく、少なくとも3つおよび最大50個のアミノ酸が存在し得る。配列番号5および配列番号6のフレームワーク配列は、X残基を有さない配列であると理解される。

【0050】

本発明の複数抗原結合抗体において有用な好適な抗体フレームワークは、ヒトV κ ap p a 1ファミリー軽鎖可変領域、ヒトV λ amb d a 1ファミリー軽鎖可変領域、ヒトV κ ap p a 3ファミリー軽鎖可変領域、ヒトVH3ファミリー重鎖可変領域、ヒトVH1 aファミリー重鎖可変領域、およびヒトVH1 bファミリー重鎖可変領域を含むがこれらに限定されず、軽鎖可変領域は、(例えば自然発生アミノ酸の置換により)A H o位置47および/または50にアルギニンを有する、または有するように操作されており、重鎖可変領域は、(例えば自然発生アミノ酸の置換により)A H o位置12にセリン、A H o位置103にセリンまたはトレオニン、およびA H o位置144にセリンまたはトレオニンを有する、または有するように操作されている。

【0051】

本発明の複数抗原結合抗体を生成するために使用され得るフレームワークの限定されない例は、参照により全内容が組み込まれる国際特許出願W O 2008/004834、国際特許出願W O 2009/155726、および国際特許出願W O 03/097697に開示されているフレームワークを含む。そのような例において、軽鎖可変領域は、A H o位置47および/または50にアルギニンを含むように修飾されてもよく、重鎖可変領域は、A H o位置12にセリン、A H o位置103にセリンもしくはトレオニン、および/またはA H o位置144にセリンもしくはトレオニンを含むように修飾されてもよい。

【0052】

「抗体フレームワーク」または「フレームワーク」という用語は、本明細書において使用される場合、可変ドメインVLまたはVHの一部を指し、この可変ドメインの抗原結合ループ(CDR)の骨格として機能する。本質的に、これは、CDRを有さない可変ドメインである。

【0053】

本明細書において使用される場合、「同一性」は、2つのポリペプチド、分子、または2つの核酸の間の配列の一致を指す。2つの比較される配列の両方における位置が、同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットにより占有される場合(例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンにより占有される場合、または、2つのポリペプチドのそれぞれにおける位置がリシンにより占有される場合)、それぞれの分子は、その位置において同一である。2つの配列の間の「同一性パーセント」は、2つの配列により共有される一致する位置の数を比較される位置の数で除し、100を乗じた関数である。例えば、2つの配列における10個の位置のうち6個が一致する場合、2つの配列は60

10

20

30

40

50

%の同一性を有する。例として、DNA配列CTGACTおよびCAGGTTは、50%の同一性を共有する(6つの全位置のうち3つが一致する)。一般に、2つの配列が最大同一性を与えるように整列された時に比較がなされる。そのような整列は、例えば、ALIGNプログラム(DNAstar, Inc.)等のコンピュータプログラムにより便利に実行される、Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453の方法を使用して提供され得る。また、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用い、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988))のアルゴリズムを使用して決定され得る。さらに、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックス、ならびにギャップ加重16、14、12、10、8、6、または4および長さ加重1、2、3、4、5、または6を用い、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)内のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970))アルゴリズムを使用して決定され得る。

10

20

30

40

50

【0054】

一実施形態において、本発明の複数抗原結合抗体は、ウサギ目CDRと、A_HO位置24におけるトレオニン(T)、A_HO位置25におけるバリン(V)、A_HO位置56におけるアラニン(A)またはグリシン(G)、A_HO位置82におけるリシン(K)、A_HO位置84におけるトレオニン(T)、A_HO位置89におけるバリン(V)、およびA_HO位置108におけるアルギニン(R)のうちの、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つを含む1つ以上の重鎖可変ドメインとを含む。

【0055】

別の実施形態において、本発明の複数抗原結合抗体は、ウサギ目CDRと、可変軽鎖ドメインの少なくとも1つにおいて、A_HO位置1にグルタミン酸(E)、A_HO位置3にバリン(V)、A_HO位置4にロイシン(L)、A_HO位置10にセリン(S)、A_HO位置47にアルギニン(R)、A_HO位置57にセリン(S)、A_HO位置91にフェニルアラニン(F)および/またはA_HO位置103にバリン(V)とを含む。

【0056】

核酸分子およびベクター

一実施形態において、本発明は、本発明の複数抗原結合scFv抗体の生成のための核酸分子を含む。

【0057】

「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を指す。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれた場合、「作用可能に連結」する。例えば、プロモーターもしくはエンハンサーは、配列の転写に影響する場合、コード配列に作用可能に連結する。ある特定の実施形態において、本発明は、本発明の抗体、本発明の可変軽鎖、および/または本発明の可変重鎖をコードする単離核酸分子を提供する。

【0058】

一実施形態において、本発明の核酸分子は、本明細書に記載のような1つ以上のV_H/V_Lコンストラクトをコードする。例えば、本発明の核酸分子は、V_H-A-(リンカー1もしくは2)-V_L-B; V_H-B-(リンカー1もしくは2)-V_L-A; V_H-A-(リンカー1)-V_L-B-(リンカー3)-V_H-B-(リンカー2)-V_L-A; V_H-A-(リンカー1もしくは2)-V_L-A; V_H-B-(リンカー1もしくは2)-V_L-B; V_H-A-(リンカー1)-V_L-A-(リンカー3)-V_H-B-(リンカー2)-V_L-B; V_L-A-(リンカー1もしくは2)-V_H-B、V_L-B-(リンカー1もしくは2)-V_H-A; V_L-A-(リンカー1)-V_H-B-(リンカー3)-V_L-B-(リンカー2)-V_H-A; V_L-A-(リンカー1もしくは2)-V_H

- A、V L - B - (リンカー 1 もしくは 2) - V H - B ; V L - A - (リンカー 1) - V H - A - (リンカー 3) - V L - B - (リンカー 2) - V H - B ; または当業者により企図される任意の他の方向の構成の 1 つで V H / V L コンストラクトをコードする。

【0059】

別の実施形態において、本発明は、本発明による核酸分子を含むベクターを含む。

【0060】

「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの 1 つの種類は、追加的な DNA 断片がライゲーションされ得る環状二本鎖 DNA ループを指す、「プラスミド」である。ベクターの別の種類は、ウイルスベクターであり、ここでは追加の DNA 断片がウイルスゲノムにライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製が可能である（例えば、複製の細菌源を有する細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）が、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合されてもよく、それにより宿主ゲノムと共に複製される。そのような発現ベクターおよび発現産物を単離する方法は、当業者に一般的に知られており、例えば、Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook* 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 に記載されている。

10

【0061】

「宿主細胞」という用語は、発現ベクターが導入されている細胞を指す。宿主細胞は、細菌、微生物、植物または動物細胞を含み得る。軽質転換を受けやすい細菌は、エンテロバクター属、例えば大腸菌またはサルモネラの菌種；バシラス属、例えば枯草菌；肺炎球菌属；連鎖球菌属、およびインフルエンザ菌のメンバーを含む。好適な微生物は、サッカロマイセス・セレピシアエおよびピキア・パストリスを含む。好適な動物宿主細胞株は、CHO (チャイニーズハムスター卵巣細胞株) および NS0 細胞を含む。

20

【0062】

複数抗原に結合する抗体を調製するためのある特定の方法は、例えば、参照によりその全内容が明示的に組み込まれる米国特許第 7, 838, 637 号および米国特許第 7, 129, 330 号に記載されている。

【0063】

本発明の抗体は、組み換え遺伝子の分野における日常的な技術を使用して生成され得る。ポリペプチドの配列を知れば、それらをコードする cDNA を、当該技術分野において周知の方法による遺伝子合成によって生成することができる。これらの cDNA は、好適なベクタープラスミドにクローニングされ得る。

30

【0064】

本発明の抗体は、開示される配列からなるのではなく、それらを含むことを理解されたい。例えば、クローニング戦略は、N 末端に 1 つまたはいくつかの追加的残基を有する抗体が存在するコンストラクトが作製されることを必要とし得る。具体的には、開始コドンから得られたメチオニンは、翻訳後に切断されていない場合、最終タンパク質に存在し得る。s c F v 抗体に対するほとんどのコンストラクトは、N 末端に追加的アラニンを形成する。

40

【0065】

薬学的組成物

ある特定の実施形態において、本発明は、少なくとも 1 種の生理学的に許容される担体または賦形剤と共に、1 つ以上の本発明の複数抗原結合抗体を含む、薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、例えば、水、緩衝剤（例えば、中性緩衝生理食塩水もしくはリン酸緩衝生理食塩水）、エタノール、鉱物油、植物油、ジメチルスルホキシド、炭水化物、（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、アジュバント、ポリペプチド、またはグリシン等のアミノ酸、酸化防止剤、EDTA もしくはグルタチオン等のキレート剤、および/または保存剤を含んでもよい。

50

【0066】

担体は、多くは化合物の安定性またはバイオアベイラビリティを制御することを目的とした、患者への投与前に抗体と関連し得る物質である。そのような製剤中での使用のための担体は、一般に生体適合性であり、また生分解性であってもよい。担体は、例えば、一価または多価分子、例えば血清アルブミン（例えば、ヒトまたはウシ）、卵アルブミン、ペプチド、ポリリシン、ならびにアミノデキストランおよびポリアミドアミン等の多糖類を含む。担体はまた、例えば、ポリラクテートポリグリコレート、ポリ（ラクチド - c o - グリコリド）、ポリアクリレート、ラテックス、デンブロン、セルロースまたはデキストランを含む、ビーズおよび微小粒子等の固体支持材料を含む。担体は、共有結合（直接またはリンカー基を介して）、非共有結合的相互作用またはその混合を含む、様々な手法で化合物を保持し得る。

10

【0067】

薬学的組成物は、例えば、眼内、鼻腔内、耳内、舌下、経皮、局所的、経口、経鼻、経直腸または非経口投与を含む、任意の適切な投与様式用に製剤化され得る。ある特定の実施形態において、経口用途に好適な形態の組成物が好ましい。そのような形態は、例えば、丸薬、錠剤、トローチ、ドロップ、水性もしくは油性懸濁液、分散性粉末もしくは顆粒、エマルジョン、ハードもしくはソフトカプセル剤、またはシロップもしくはエリキシル剤を含む。さらに他の実施形態内において、本明細書において提供される組成物は、凍結乾燥物として製剤化されてもよい。非経口という用語は、本明細書において使用される場合、皮内、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、脊髄、頭蓋内、くも膜下および腹腔内注射、ならびに任意の同様の注射または注入技術を含む。

20

【0068】

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、眼周囲、結膜、テノン嚢下、腔内、硝子体内、眼内、網膜下、結膜下、眼球後方、または小管内注射等の眼組織注射により；カテーテルまたは他の留置デバイス、例えば網膜ペレット、眼内インサート、坐薬、または多孔質、非多孔質もしくはゼラチン状材料を含むインプラントを使用して眼に直接適用することにより；局所的点眼剤または軟膏により；あるいは、盲嚢内または強膜に隣接して（経強膜的）もしくは強膜の中（強膜内）もしくは眼内に移植された徐放デバイスにより、眼に直接送達され得る。腔内注射は、薬剤を小柱網に到達させるように角膜を通して前眼房内に行われてもよい。小管内注射は、シュレム管から、またはシュレム管へと排液する静脈集合路内に行われてもよい。

30

【0069】

眼内送達のために、本発明の抗体は、眼科的に許容される保存剤、共溶媒、界面活性剤、粘度向上剤、浸透向上剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、または水と組み合わせられて、水性無菌眼科用懸濁液または溶液を形成してもよい。局所眼科製品は、例えば複数用量形態で包装されてもよい。したがって、使用中の微生物汚染を防止するために、保存剤が必要となり得る。好適な保存剤は、クロロブタノール、メチルパラベン、プロピルパラベン、フェニルエチルアルコール、エドト酸二ナトリウム、ソルビン酸、ポリクオタニウム - 1、または当業者に知られた他の試薬を含む。そのような保存剤は、典型的には、0.001%から1.0% w/vのレベルで使用される。本発明の単位用量組成物は、無菌であるが、典型的には保存されない。したがって、そのような組成物は、一般に、保存剤を含有しない。

40

【0070】

ある特定の実施形態において、眼に局所的に投与されることを意図した組成物は、点眼薬または眼軟膏剤として製剤化され、抗体の総量は、約0.001%から1.0% (w/w)、好ましくは約0.01%から約1.0% (w/w) である。

【0071】

ある特定の状況における本発明の薬学的組成物は、局所投与用の溶液として投与される。製剤化の容易性、および、罹患した眼に溶液の1滴から2滴を注入することによりそのような組成物を容易に投与することができる患者の能力に基づき、水性溶液が一般に好ま

50

しい。しかしながら、組成物はまた、懸濁液、粘濁性もしくは半粘濁性ゲル、または他の種類の固体もしくは半固体組成物であってもよい。

【0072】

経口用途を意図した薬学的組成物は、薬学的組成物の製造のための技術分野において知られた任意の方法に従って調製されてもよく、魅力的で味の良い調製物を提供するために、1種以上の薬剤、例えば甘味剤、香味剤、着色剤、および保存剤を含有してもよい。錠剤は、錠剤の製造に好適な生理学的に許容される賦形剤と混合された活性成分を含有する。そのような賦形剤は、例えば、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム）、造粒および崩壊剤（例えば、コーンスターチまたはアルギン酸）、結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）ならびに滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）を含む。錠剤は、コーティングされていないとしてもよく、または、胃腸管における分解および吸収を遅延させ、それにより長期間にわたる持続作用を提供するために、既知の技術によりコーティングされているとしてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の時間遅延材料が使用され得る。

10

【0073】

油性懸濁液は、植物油（例えば、落花生油、オリーブ油、ゴマ油もしくはココナツ油）、または液体パラフィン等の鉱物油に、活性成分を懸濁させることにより製剤化され得る。油性懸濁液は、蜜蝋、固形パラフィンまたはセチルアルコール等の増粘剤を含有してもよい。上記のような甘味剤、および/または香味剤が、味の良い経口用調製物を提供するために添加され得る。そのような懸濁液は、アスコルビン酸等の酸化防止剤の添加により保存され得る。

20

【0074】

水の添加による水性懸濁液の調製に好適な分散性粉末および顆粒は、分散または湿潤剤、懸濁化剤および1つ以上の保存料と混合された活性成分を提供する。好適な分散または湿潤剤および懸濁剤は、すでに上で述べられたものにより例示される。また、追加の賦形剤、例えば甘味、香味および着色剤が存在してもよい。

【0075】

また、薬学的組成物は、水中油エマルジョンの形態であってもよい。油相は、植物油（例えば、オリーブ油もしくは落花生油）、鉱物油（例えば、液体パラフィン）、またはそれらの混合物であってもよい。好適な乳化剤は、自然発生ガム（例えば、アカシアガムまたはトラガカントガム）、自然発生ホスファチド（例えば、大豆、レシチン、ならびに脂肪酸およびヘキシトールから得られるエステルまたは部分エステル）、無水物（例えば、モノオレイン酸ソルピタン）、ならびに脂肪酸およびヘキシトールから得られる部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルピタン）を含む。また、エマルジョンは、1種以上の甘味および/または香味剤を含んでもよい。

30

【0076】

薬学的組成物は、使用されるビヒクルおよび濃度に依存して、調節剤がビヒクル中に懸濁または溶解された、無菌注射用水性または油性懸濁液として調製され得る。そのような組成物は、既知の技術に従い、上述のもの等の好適な分散、湿潤剤および/または懸濁剤を使用して製剤化され得る。使用可能な許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、1,3-ブタンジオール、リンゲル液および等張食塩水がある。さらに、溶媒または懸濁化媒体として、無刺激不揮発性油が使用され得る。この目的のために、合成モノ-またはジ-グリセリドを含む任意の低刺激性の不揮発性油を使用することができる。さらに、オレイン酸等の脂肪酸が注射用組成物の調製に使用されてもよく、局所麻酔薬、保存剤および/または緩衝剤等のアジュバントがビヒクルに溶解されてもよい。

40

【0077】

薬学的組成物は、持続放出製剤（すなわち、投与後の調節剤の徐放に影響するカプセル等の製剤）として製剤化され得る。そのような製剤は、一般に、周知の技術を使用して調

50

製され、例えば経口、経直腸、もしくは皮下埋め込みにより、または所望の標的部位への埋め込みにより投与され得る。そのような製剤中での使用のための担体は、生体適合性であり、また生分解性であってもよく、好ましくは、製剤は、比較的一定のレベルの調節剤放出を提供する。持続放出製剤中に含有される抗体の量は、例えば、埋め込みの部位、放出の速度および期待される期間、ならびに治療または予防されるべき疾患/障害の性質に依存する。

【0078】

本明細書において提供される薬学的組成物は、好ましくは、標的分子（複数を含む）に検出可能に結合し、標的分子（複数を含む）に関連した疾患/障害を予防または阻害するために十分な体液（例えば、血液、血漿、血清、CSF、滑液、リンパ液、細胞間質液、涙液または尿）中の濃度を達成する量で投与される。用量は、認識可能な患者の利益をもたらす場合、効果的であるとみなされる。

10

【0079】

本発明の抗体の適切な用量（「治療上効果的な量」）は、例えば、治療されるべき状態、状態の重症度および経過、抗体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、薬歴、患者の病歴および抗体に対する反応、使用される抗体の種類、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体は、好適には、1回で、または一連の治療にわたり患者に投与され、診断以降の任意の時点で患者に投与され得る。抗体は、唯一の治療として、または問題の状態の治療に有用な他の薬物もしくは療法と併せて投与され得る。

【0080】

一般的な提案として、投与される抗体の治療上効果的な量は、1回または複数の投与に関わらず、約0.1mg/kgから約100mg/kg（患者の体重）の範囲内であり、使用される抗体の典型的な範囲は、例えば、毎日投与される約0.3mg/kgから約20mg/kg、より好ましくは約0.3から約15mg/kgである。しかしながら、他の投薬計画も有用となり得る。この療法の進行は、従来技術により容易に監視される。

20

【0081】

本発明の別の実施形態において、本発明の薬学的組成物の水性薬学的製剤を保持し、随意に使用説明書を提供する容器を備える製造品が提供される。好適な容器は、例えば、瓶、バイアル、およびシリンジを含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成され得る。例となる容器は、3~20ccの使い捨てガラスバイアルである。代替的に、複数用量製剤のために、容器は、3~100ccのガラスバイアルであってもよい。容器は製剤を保持し、容器上またはそれに関連したラベルは、使用上の説明を示してもよい。製造品は、さらに、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、シリンジ、および使用説明書を有する添付文書を含む、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

30

【0082】

ある特定の実施形態において、本発明は、以下を提供する。

1. 複数抗原結合抗体分子であって、

a) ペプチドリンカー1により抗原Bに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-B)に連結してVH-A/VL-Bコンストラクトを形成する、抗原Aに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-A)と、

40

b) ペプチドリンカー2により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL-A)に連結してVH-B/VL-Aコンストラクトを形成する、抗原Bに対する特異性を有する重鎖可変ドメイン(VH-B)と

を含み、複数抗原結合抗体は、定常ドメインを有さず、VL-AおよびVL-Bのうちの少なくとも1つは、A_{H0}位置50にアルギニンを含み、ならびに/またはVH-AおよびVH-Bのうちの少なくとも1つは、A_{H0}位置12にセリン、A_{H0}位置103にセリンまたはトレオニン、およびA_{H0}位置144にセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つを含む、複数抗原結合抗体分子。

2. VL-AおよびVL-Bのうちの少なくとも1つは、配列番号5の配列に対して少な

50

くとも65%の同一性を有するフレームワーク配列を含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

3. VH-AおよびVH-Bのうちの少なくとも1つは、配列番号6の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するフレームワーク配列を含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

4. VL-A/VH-BおよびVH-B/VL-Aコンストラクトのうちの少なくとも1つは、ヒトV kappa 1ファミリー軽鎖可変領域、ヒトV lambda 1ファミリー軽鎖可変領域、またはヒトV kappa 3ファミリー軽鎖可変領域を含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

5. VL-A/VH-BおよびVH-B/VL-Aコンストラクトのうちの少なくとも1つは、ヒトVH3ファミリー重鎖可変領域、ヒトVH1aファミリー重鎖可変領域、またはヒトVH1bファミリー重鎖可変領域を含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

6. VHドメインおよびVLドメインは、ウサギ目からのCDRを含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

7. VH-Aおよび/またはVH-Bは、A H o位置12にセリン、A H o位置103にトレオニン、およびA H o位置144にトレオニンを含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

8. VL-Aおよび/またはVL-BのA H o位置50のアルギニンは、置換により導入される、1に記載の複数抗原結合抗体。

9. VH-Aおよび/またはVH-BのA H o位置12のセリン、A H o位置103のセリンまたはトレオニン、およびA H o位置144のセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つは、置換により導入される、1に記載の複数抗原結合抗体。

10. ペプチドリンカー-1およびペプチドリンカー-2は、それぞれ1~10個のアミノ酸を有する、1に記載の複数抗原結合抗体。

11. VH-A/VL-BコンストラクトをVH-B/VL-Aコンストラクトに連結するペプチドリンカー-3をさらに含み、ペプチドリンカー-3は、10~30個のアミノ酸を有する、1に記載の複数抗原結合抗体。

12. ペプチドリンカー-1およびペプチドリンカー-2は、それぞれ3~7個のアミノ酸を有し、ペプチドリンカー-3は、15~20個のアミノ酸を有する、1に記載の複数抗原結合抗体。

13. ペプチドリンカー-1およびペプチドリンカー-2は、それぞれ5個のアミノ酸を有し、ペプチドリンカー-3は、20個のアミノ酸を有する、1に記載の複数抗原結合抗体。

14. ペプチドリンカー-1は、GGGG S (配列番号1)の配列を含み、ペプチドリンカー-2は、GGGG S (配列番号1)の配列を含み、ペプチドリンカー-3は、(GGGG S)₄ (配列番号4)の配列を含む、1に記載の複数抗原結合抗体。

15. VH-A-配列番号1-VL-B-配列番号4-VH-B-配列番号1-VL-A構成を有する、1に記載の複数抗原結合抗体。

16. 二価である、1に記載の複数抗原結合抗体。

17. 二重特異性である、1に記載の複数抗原結合抗体。

18. 1に記載の複数抗原結合抗体を含む、薬学的組成物。

19. 疾患の診断および/または治療のための、1に記載の複数抗原結合抗体の使用。

20. 1に記載のVH-A/VL-Bコンストラクトおよび/またはVH-B/VL-Aコンストラクトをコードする核酸分子。

21. 20に記載の核酸分子を含むベクター。

22. 21に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

23. 11に記載の抗体をコードする核酸分子。

24. 23に記載の核酸分子を含むベクター。

25. 24に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

26. 複数抗原結合抗体であって、

a) ペプチドリンカー-3により抗原Aに対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン(VL

10

20

30

40

50

- A) に連結して s c F v - A を形成する、抗原 A に対する特異性を有する重鎖可変ドメイン (V H - A) を含む、単鎖抗体と、

b) ペプチドリンカー 3 により抗原 B に対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン (V L - B) に連結して s c F v - B を形成する、抗原 B に対する特異性を有する重鎖可変ドメイン (V H - B) を含む、単鎖抗体と

を含み、s c F v - A は、ペプチドリンカー 1 により s c F v - B に連結され、V L - A および V L - B のうちの少なくとも 1 つは、A H o 位置 5 0 にアルギニンを含み、V H - A および V H - B のうちの少なくとも 1 つは、A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にセリンまたはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも 1 つを含む、複数抗原結合抗体。

27. V H - A および / または V H - B は、A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にトレオニンを含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

28. V L - A および / または V L - B の A H o 位置 5 0 のアルギニンは、置換により導入される、26 に記載の複数抗原結合抗体。

29. V H - A および / または V H - B の A H o 位置 1 2 のセリン、A H o 位置 1 0 3 のセリンまたはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 のセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも 1 つは、置換により導入される、26 に記載の複数抗原結合抗体。

30. ペプチドリンカー 1 は、1 ~ 10 個のアミノ酸を有する、26 に記載の複数抗原結合抗体。

31. ペプチドリンカー 3 は、10 ~ 30 個のアミノ酸を有する、26 に記載の複数抗原結合抗体。

32. ペプチドリンカー 1 は、3 ~ 7 個のアミノ酸を有し、ペプチドリンカー 3 は、15 ~ 20 個のアミノ酸を有する、26 に記載の複数抗原結合抗体。

33. ペプチドリンカー 1 は、5 個のアミノ酸を有し、ペプチドリンカー 3 は、15 個のアミノ酸を有する、26 に記載の複数抗原結合抗体。

34. V L - A または V L - B のうちの少なくとも 1 つは、配列番号 6 の配列に対して少なくとも 65 % の同一性を有するフレームワーク配列を含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

35. V H - A または V H - B のうちの少なくとも 1 つは、配列番号 7 の配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するフレームワーク配列を含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

36. s c F v - A および s c F v - B のうちの少なくとも 1 つは、ヒト V k a p p a 1 ファミリー軽鎖可変領域、ヒト V l a m b d a 1 ファミリー軽鎖可変領域、またはヒト V k a p p a 3 ファミリー軽鎖可変領域を含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

37. s c F v - A および s c F v - B のうちの少なくとも 1 つは、ヒト V H 3 ファミリー重鎖可変領域、ヒト V H 1 a ファミリー重鎖可変領域、またはヒト V H 1 b ファミリー重鎖可変領域を含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

38. V H ドメインおよび V L ドメインは、ウサギ目からの C D R を含む、26 に記載の複数抗原結合抗体。

39. 複数抗原結合抗体分子であって、

a) ウサギ目からの C D R と；

b) ペプチドリンカー 1 により抗原 B に対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン (V L - B) に連結して V H - A / V L - B コンストラクトを形成する、抗原 A に対する特異性を有する重鎖可変ドメイン (V H - A) と、

c) ペプチドリンカー 2 により抗原 A に対する特異性を有する軽鎖可変ドメイン (V L - A) に連結して V H - B / V L - A コンストラクトを形成する、抗原 B に対する特異性を有する重鎖可変ドメイン (V H - B) と；

d) V H - A / V L - B コンストラクトを V H - B / V L - A コンストラクトに連結する、10 ~ 30 個のアミノ酸を有するペプチドリンカー 3 と

10

20

30

40

50

を含み、重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、A H o 位置 2 4 にトレオニン (T)、A H o 位置 2 5 にバリン (V)、A H o 位置 5 6 にアラニン (A) またはグリシン (G)、A H o 位置 8 2 にリシン (K)、A H o 位置 8 4 にトレオニン (T)、A H o 位置 8 9 にバリン (V)、および A H o 位置 1 0 8 にアルギニン (R) の少なくとも3つを含み、ペプチドリンカー 1 およびペプチドリンカー 2 は、それぞれ 1 ~ 1 0 個のアミノ酸を有する、複数抗原結合抗体分子。

4 0 . V L - A および V L - B のうちの少なくとも1つは、配列番号 5 の配列に対して少なくとも 8 5 % の同一性を有するフレームワーク配列を含む、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

4 1 . V H - A および V H - B のうちの少なくとも1つは、配列番号 6 の配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有するフレームワーク配列を含む、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

4 2 . 可変軽鎖ドメインのうちの少なくとも1つにおいて、A H o 位置 1 にグルタミン酸 (E)、A H o 位置 3 にバリン (V)、A H o 位置 4 にロイシン (L)、A H o 位置 1 0 にセリン (S)、A H o 位置 4 7 にアルギニン (R)、A H o 位置 5 7 にセリン (S)、A H o 位置 9 1 にフェニルアラニン (F) および / または A H o 位置 1 0 3 にバリン (V) をさらに含む、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

4 3 . 重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にセリンまたはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つを含む、3 9 の複数抗原結合抗体。

4 4 . V H - A および / または V H - B の A H o 位置 1 2 のセリン、A H o 位置 1 0 3 のセリンまたはトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 のセリンまたはトレオニンのうちの少なくとも1つは、置換により導入される、4 3 に記載の複数抗原結合抗体。

4 5 . ペプチドリンカー 1 およびペプチドリンカー 2 は、それぞれ 5 個のアミノ酸を有する、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

4 6 . ペプチドリンカー 3 は、1 5 ~ 2 0 個のアミノ酸を有する、4 5 に記載の複数抗原結合抗体。

4 7 . ペプチドリンカー 1 は、G G G G S (配列番号 1) の配列を含み、ペプチドリンカー 2 は、G G G G S (配列番号 1) の配列を含み、ペプチドリンカー 3 は、(G G G G S)₄ (配列番号 4) の配列を含む、4 6 に記載の複数抗原結合抗体。

4 8 . V H - A - 配列番号 1 - V L - B - 配列番号 4 - V H - B - 配列番号 1 - V L - A 構成を有する、4 7 に記載の複数抗原結合抗体。

4 9 . 二価である、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

5 0 . 二重特異性である、3 9 に記載の複数抗原結合抗体。

5 1 . 3 9 に記載の複数抗原結合抗体を含む、薬学的組成物。

5 2 . 疾患の診断および / または治療のための、3 9 に記載の複数抗原結合抗体の使用。

5 3 . 3 9 に記載の V H - A / V L - B コンストラクトおよび / または V H - B / V L - A コンストラクトをコードする核酸分子。

5 4 . 5 3 に記載の核酸分子を含むベクター。

5 5 . 5 4 に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【 0 0 8 3 】

本明細書全体を通して引用されるいかなる特許、特許出願および参考文献の内容も、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 8 4 】

文脈により別の意味が必要とされない限り、本明細書において使用される単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。

【 実施例 】

【 0 0 8 5 】

以下の実施例により本開示をさらに説明するが、実施例はさらなる限定として解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用される全ての図ならびに全ての参考文献、特許

10

20

30

40

50

および公開特許出願の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

(実施例1)

【0086】

ウサギ抗体から得られる二重特異性および二価抗体の分子設計、クローニングおよび発現。

二重特異性および二価抗体をコードするDNA配列を、デジタル遺伝子配列からのオリゴヌクレオチド合成、続いて重複伸長技術を使用した得られた断片のアニーリングにより生成した。全ての配列は、大腸菌コドン使用頻度、GC含量、mRNA二次構造、コドンおよびモチーフ反復、ならびに制限酵素認識部位に関して最適化した。異なるアミノ酸リンカー(表1を参照されたい)を使用して、異なる特異性を有するウサギ抗体からのヒト化VLおよびVHドメインを接続した。

10

【表1】

リンカー1および2	
3aa	GGS
5aa	GGGGS (配列番号1)
7aa	GGGGGGS (配列番号2)
リンカー3	
15aa	GSDSNAGRASAGNTS (配列番号3)
20aa	(GGGGS) ₄ (配列番号4)

20

【0087】

標的分子に二重特異的および二価的に結合するように、複数抗原結合抗体を調製した。全ての分子を、T7lacプロモーター、細菌リボソーム結合部位、続いて抗体分子を含有する不溶性大腸菌発現用の発現ベクター中でクローニングした。それぞれの封入体発現プラスミドで形質転換された大腸菌BL21(DE3)を、適切な抗生物質を含有するdYT培地中で37で増殖させた。約2.0の吸収(A600)で、1mMイソプロピル1-チオ-D-ガラクトピラノシド(最終濃度)の添加によりタンパク質発現を開始した。誘導から3時間後、大腸菌細胞を採取し、超音波照射により破壊し、洗浄および遠心分離ステップを繰り返すことにより封入体を単離した。

30

【0088】

封入体を6M Gdn-HClの存在下でmg/mlの濃度で可溶化し、20mMジチオスレイトールの添加により還元した。基本的なリフォールディングスクリーニングを行って、試験された条件の範囲から最善のpH、酸化還元系(シスチン/システイン)、および塩濃度を選択した。実験室規模のリフォールディングプロセスに対し、それぞれの個々の抗体の最善の条件を使用した。50倍体積のリフォールディング緩衝液への急速な希釈により、二重特異性または二価抗体タンパク質を還元した。上方濃縮およびPBS緩衝液(pH6.0)に対する透析後、サイズ排除クロマトグラフィーを使用してタンパク質を精製した。

(実施例2)

40

【0089】

二価抗体の生成

インターロイキン23(IL-23)に結合する二価抗体を、ウサギ抗体の一般的グラフトのためのヒト骨格であるrFW1.4フレームワークの可変ドメインに基づいて生成した(国際公開第WO2009/155726号に記載のように)が、これは本質的に全てのウサギ抗体に適合する。二特異性抗体、単鎖二特異性抗体、およびタンデム単鎖抗体を含む3つの構成を生成した。ヒトIL-23に結合することが示された抗体から、CDRを取り出した。ヘテロ二量体の形成をもたらす同じ細胞内のVHA-リンカー1-VLBおよびVHB-リンカー2-VLA構成の2つの断片の発現により、二特異性抗体(Db)が得られ、コード配列の各1つの前に、リボソーム結合部位(RBS)がある。これ

50

らの分子において、リンカー 1 および 2 は、5 アミノ酸であった (GGGGS、配列番号 1)。別の構成において、2つのポリペプチド鎖が、追加の中間リンカー (リンカー 3) により融合され、単鎖二特異性抗体 (scDb) をコードする単一の遺伝子を生成し (VHA-リンカー 1-VLB-リンカー 3-VHB-リンカー 2-VLA)、リンカー 3 は、15 アミノ酸からなっていた (GSDSNAGRASAGNTS、配列番号 3) (Vollkelt et al., 2001, Protein Eng 14: 815-823)。第 3 の構成であるタンデム scFv (Tds cFv) は、短い中間リンカー (GGGGS、配列番号 1) および長いリンカー 3 ((GGGGS)₄、配列番号 4) により 2 つの scFv を接続することにより生成され、VL-A-リンカー 3-VH-A-リンカー 1-VL-B-リンカー 3-VH-B のドメイン順序をもたらし、VH-A および VH-B、ならびに VL-A および VL-B が同一である二価分子を生成した。

10

【0090】

scDb 構成におけるフレームワーク領域に対する異なる特徴の効果を、産生能、安定性およびオリゴマーを形成する傾向に関して評価した。構成を表 2 に記載する。簡潔に述べると、分子 # 1 は、追加的な置換のない scDb における rFW1.4 の可変ドメインからなっていた。分子 # 2 は、AHo 位置 50 にアルギニンが両方の VL ドメイン (VL-A/-B) 上に導入された # 1 の変形であった。分子 # 3 もまた # 1 に基づいていたが、両方の VH ドメイン (VH-A/-B) 上に導入された 3 つの置換、具体的には AHo 位置 12 にセリン、AHo 位置 103 にトレオニン、および AHo 位置 144 にトレオニンを有していた。分子 # 14 は、両方の VL ドメイン (VL-A/-B) 上の AHo 位置 50 のアルギニン、ならびに両方の VH ドメイン (VH-A/-B) 上の AHo 位置 12 のセリン、AHo 位置 103 のトレオニン、および AHo 位置 144 のトレオニンの置換を有する分子 # 1 からなっていた。比較を目的として、ヒト生殖系列抗体レパトリーのコンセンサス配列を使用して、追加の scDb (# 5) を生成した (Knappiket al., 2000, J. Mol. Biol. 296: 57-86)。フレームワーク領域は、HuCal と示される、VH3 および VL カッパ 1 サブタイプのコンセンサス配列に対応する。このヒト化 scDb は、本明細書に記載の他の二価 scDb において使用された同じ CDR で生成され、したがって、差異は、フレームワーク領域のみ位置する。

20

【表 2】

#1	rFW1.4
#2	rFW1.4、VL-A/-B:AHo 位置 50 にアルギニン
#3	rFW1.4、VH-A/-B:AHo 位置 12 にセリン、AHo 位置 103 にトレオニン、AHo 位置 144 にトレオニン
#4	rFW1.4、VL-A/-B:AHo 位置 50 にアルギニン、AHo 位置 12 にセリン、AHo 位置 103 にトレオニン、AHo 位置 144 にトレオニン
#5	CDR の HuCal FW グラフト

30

(実施例 3)

【0091】

40

二重特異性抗体の生成

1 つの単一分子内に 2 つの異なる特異性を有するように、二重特異性単鎖二特異性抗体を設計した。元は VEGF₁₆₅ および TNF に対するウサギ抗体のヒト化により生成された 2 つの異なる scFv 抗体からの VH および VL ドメインを、可変領域遺伝子の源として使用し、VHA-リンカー 1-VLB-リンカー 3-VHB-リンカー 2-VLA 構成の単一断片を構築したが、A という標識が付された可変ドメインは VEGF₁₆₅ に結合し、B という標識を付された可変ドメインは TNF に結合する。VEGF₁₆₅ に結合する抗体は、以下の VL 配列:

EIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQASEI IHSWLA WYQQKPGKAPKLLIYLA S T L A S G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L Q P

50

DDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG、配列番号7；
および

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQ
APGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWQGQGTTLVTVSS
配列番号8の配列を有するVHを有していた。

AHo位置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、およびAHo位置144に
トレオニンを有するVHドメインの配列は、

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQ
APGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWQGQGTTLVTVSS
、配列番号9であった。

10

TNF に結合する抗体は、

EIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQSSQSVYGN IWM AWYQQ
KPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGSGAEFTLTISSL
QPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLG、配列番号10の
VL配列；

および

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSTISRSYWICWVRQ
APGKGLEWVGC IYGDNDITPLYANWAKGRFTISRDT SKNT
VYLQMNSLRAEDTATYYCARLGYADYAYDLWGQGTTLVTVSS
S、配列番号11の配列を有するVHを有していた。

20

【0092】

二重特異性抗体は、実施例1に記載の標準的DNA操作技術を使用して設計および構築
した。フレームワーク領域に導入された異なるフレームワークの特徴、および異なるリン
カーの組み合わせの効果を、異なる二重特異性scDbに対して評価し、表3に記載する

【表3】

#6	FW1.4、リンカー(5aa-15aa-5aa)
#7	rFW1.4、リンカー(5aa-15aa-5aa)
#8	rFW1.4、リンカー(5aa-15aa-5aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン
#9	rFW1.4、リンカー(5aa-15aa-5aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン、VH-B:AHo位 置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、AHo位置144にトレオニン
#10	rFW1.4、リンカー(5aa-15aa-5aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン、VH-A/B:AHo 位置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、AHo位置144にトレオニン
#11	rFW1.4、リンカー(5aa-20aa-5aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン、VH-A/B:AHo 位置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、AHo位置144にトレオニン
#12	rFW1.4、リンカー(7aa-20aa-7aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン、VH-A/B:AHo 位置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、AHo位置144にトレオニン
#13	rFW1.4、リンカー(3aa-20aa-3aa)、VL-A:AHo位置50にアルギニン、VH-A/B:AHo 位置12にセリン、AHo位置103にトレオニン、AHo位置144にトレオニン

30

40

【0093】

5-20-5のリンカーの組み合わせ、ならびにAHo位置12にセリン、AHo位置
103にトレオニン、およびAHo位置144にトレオニンを有する発現したコンストラ
クトの配列は、以下の通りであった：

MEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVR
QAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWQGQGTTLVTVS
SGGGGSEIIVMTQSPSTLSASVGD RVIITCQSSQSVYGN I
WMAWYQQKPGRAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGSGAEFT

50

LTISSLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGTKLTVLGGG
 GSGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSC
 TASGFTISRYSYWICWVRQAPGKGLEWVGCIFYGDNDITPLY
 ANWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARLG
 YADYAYDLWGQGTTVTVSSGGGGSEIVMTQSPSTLSASVG
 DRVIITCQASEIHSWLAWYQQKPKAPKLLIYLASTLAS
 GVP SRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLAST
 NGANFGQGTKLTVLG (配列番号12)。

(実施例4)

【0094】

10

二重特異性および二価抗体の特性決定。
 産生能

不溶性発現タンパク質をリフォールディングし、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) により精製した。得られたタンパク質を、培養培地1リットル当たりのmgとして、その精製タンパク質収率に基づき特性決定した。この値は、それぞれの分子の生産能の特徴的な測定値を与えた。純度は、リフォールディングされたタンパク質の精製後の試料の、可溶性凝集物を除くモノマー含量として定義した。分取用サイズ排除クロマトグラフィーにより純度を決定した。TSK gel Super SW2000カラム (TOSOH Bioscience) を使用して、モノマーおよび可溶性凝集物のピークを非モノマー種から分離した。モノマータンパク質のパーセンテージを、全生成物ピークの総面積で除したモノマーピーク的面積として計算した。

20

【0095】

熱安定性測定 (FT-IR、DSC)

分子を3mg/mlに濃縮し、通過物をブランク測定のために採取した。FT-IR (フーリエ変換赤外分光法) 読取値およびDSC (キャピラリ示差走査熱量測定) を行って、熱安定性を測定した。Tensor Bruker機器においてFT-IR Bio-ATR (減衰全反射) 細胞を使用し、FT-IRスペクトルを得た。分子を5ステップの熱勾配 (25 から95) で熱負荷することにより、二次構造の変化を示す変性プロファイルを得た。全てのスペクトル操作は、OPUSソフトウェアを使用して行った。一時的な大気 (CO₂ およびH₂O) バックグラウンドおよびブランク試料に対して正規化を行った。次いで、得られたタンパク質スペクトルをベースライン補正し、タンパク質アミドIスペクトルを、予期された領域における最も広い分解可能なピークの幅から決定した。平滑化関数と共に三次多項式関数を使用して、アミドIバンドスペクトルに対し二次導関数スペクトルを得た。3回の低温測定に対し0%の変性タンパク質、および3回の高温測定に対し100%の変性タンパク質を仮定して、最初の曲線フィッティング計算に線形補正曲線を使用したアミドI二次導関数分析により、タンパク質構造の変化を推定した。変性プロファイルを使用して、ボルツマンS字モデルを適用して全てのバリエーションに対し熱的アンフォールディング遷移の中間点 (T_m) を近似した。DSC測定もまた、試料を熱的にアンフォールディングさせた。示差走査熱量計 (MicroCalキャピラリVP-DSC) は、200 / 時間の温度勾配を使用した。緩衝剤信号の基準低減およびμMの各タンパク質濃度に対する正規化、続いてベースライン補正を行うことによりデータ分析を実行したが、全ての操作はDSCのMicroCalソフトウェアで実行した。T_mは、エネルギー取り込みのほとんどが生じた際の点に等しい温度であり、アンフォールディングの温度を示した。

30

40

【0096】

短期安定性試験

可溶性凝集物および分解生成物に関し、40 で2週間のインキュベーションの前および後に、タンパク質を検査した。10mg/ml、20mg/ml、40mg/ml、および60mg/mlの所望濃度までタンパク質を濃縮した。タンパク質が所望濃度に達するために十分可溶性でない場合は、可能な限りの最高濃度を分析した。最高濃度は、さら

50

なる濃縮が濃度を増加させることなく沈殿をもたらすのみとなった時に到達した。これらの試料を0日目および14日目に分析した。12.5%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により、両方の時点で純度および出現する可能性のある分解バンドの分析を行った。インキュベーション期間の前および後に、可溶性のオリゴマー化および凝集物を、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー(SE)-HPLCにより評価した。TSK gel Super SW2000カラム(TOSOHBioscience)でモノマーを非モノマー種から分離し、モノマータンパク質のパーセンテージを、全生成物ピークの総面積で除したモノマーピーク的面積として計算した。ナノドロップデバイスを使用して、波長280nmでのUV吸収測定により全濃度を決定した。このようにして、この短期安定性の試験は、溶解度、安定性、凝集およびオリ

10

【0097】

結果

IL23に結合する二価分子：

IL-23に二价的に結合する、異なるscFv様構成を試験した。これらの分子は、上記実施例2に記載のようにIL-23に結合するVHおよびVLドメインを含んでいた。全ての分子を、方法において説明されるように、それらの産生特性、熱安定性および短期安定性に従い特性決定した。

試験した構成は、特に以下を含んでいた。

分子#14：二特異性抗体(Db)：VHA-リンカー1-VLBおよびVHB-リンカー2-VLA；(リンカー1および2=配列番号1)；

分子#15：単鎖二特異性抗体(scDb)：VHA-リンカー1-VLB-リンカー3-VHB-リンカー2-VLA；(リンカー1および2=配列番号1；リンカー3=配列番号4)；

分子#16：タンデムscFv(TdscFv)：VLA-リンカー3-VHA-リンカー1-VLB-リンカー3-VHB；(リンカー3=配列番号4；リンカー1=配列番号1)。

20

【0098】

これらの構成の全てにおいて、VL-Aおよび-Bは同一であり、VH-Aおよび-Bは同一であり、したがって、IL-23に結合する二価抗体を生成した。

30

【0099】

細菌系におけるscDbおよびTdscFv抗体の産生能は、しばしば、それらの比較的低い収率および凝集体を形成する傾向により制限される。しかしながら、評価した全ての構成は、精製された封入体からのリフォールディングにより効率的に産生された。リフォールディングされたタンパク質は、分取サイズ排除クロマトグラフィーによるその後の精製後には主にモノマーであった(表4を参照されたい)。dscFv#16は、最も高い収率を示したが、89%という最も低い純度を示した。Db#15およびscDb#14は、同様の収率を有し、scDbは、SE-HPLCによりモノマー含量として測定された最も高い純度を示した。

40

【表4】

#	収率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#14	83.5	98
#15	88	92
#16	158	89

【0100】

示差走査熱量測定(DSC)により測定すると、3つ全ての構成が約73の同様のT

50

mを示した。結果を表5に示す。

【表5】

#	T _m 近似値 [°C]
#14	73.8
#15	73.1
#16	73.2

【0101】

10

FT-IRにより測定されるT_mにわずかな差が観察された(表6を参照されたい)。DSC測定と一致して、これらの結果は、3つ全ての構成が熱的に安定であることを裏付けた。

【表6】

#	T _m [°C]
#14	70.3
#15	68.9
#16	67.1

20

【0102】

試料が40で14日間インキュベートされる短期安定性試験において、溶解度および安定性を試験した(表7を参照されたい)。Db #15およびscDb #14は、最大約20mg/mlの濃度までのみ可溶であったが、それらは、14日目に、まだ約95%の高モノマー含量を維持した。これは、この短期間における高い安定性を反映していた。TdsCFv #16は、最大40mg/mlまで可溶であったが、14日の期間にモノマー含量を失い、最終的に66.6%のモノマー含量となった。したがって、この実験は、scDb #14およびDb #15が、これらの条件下で、TdsCFv #16と比較して凝集する傾向を低減したことを実証した。

30

【表7】

#	SE-HPLC 純度 [%]	濃度 [mg/ml]
#14	95.6	23
#15	93.3	26
#16	66.1	40

【0103】

IL23に結合する二価分子、フレームワークの特徴を有するscDb構成：

40

次いで、IL-23に二価的に結合する、表2に記載される異なるscDb変異体を試験した。全ての分子を、方法において説明されるように、それらの産生特性、熱安定性および短期安定性に従い特性決定した。

【0104】

全ての二価scDb分子は、VHA-リンカー1-VLB-リンカー3-VHB-リンカー2-VLA(リンカー1および2=配列番号1;ならびにリンカー3=配列番号4)のドメイン順で生成され、VL-Aおよび-Bは同一であり、VH-Aおよび-Bは同一であり、特定の置換は実施例2、表2に要約される。

【0105】

rFW1.4フレームワークに基づく全ての二価分子は、十分に産生可能であり、試料

50

は、分取サイズ排除クロマトグラフィーによる精製後には主にモノマーであった（表 8 を参照されたい）。生殖系列コンセンサスフレームワークに基づく s c D b # 5 は、最も低い産生収率および精製された試料のモノマー含量を示した。

【表 8】

#	収率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#5	19	61.6
#1	65	98
#3	65	99
#2	101	98
#4	40	98

10

【0106】

r F W 1 . 4 フレームワークに基づく全ての二価分子は、示差走査熱量測定（D S C）において約 7 3 の高い T m を示した。生殖系コンセンサスフレームワークに基づく s c D b は、6 6 の最も低い T m を示した（表 9 を参照されたい）。

【表 9】

#	Tm 近似値 [°C]
#5	66
#1	74.5
#3	73.6
#2	73.2
#4	73.4

20

【0107】

安定性および最大到達濃度における明確な差が、異なるバージョンの二価 I L - 2 3 結合分子の間に観察された（表 1 0 を参照されたい）。生殖系列コンセンサスに基づく s c D b # 5 は、4 0 で 2 週間のインキュベーション後に 4 4 % の減少したモノマー含量を示した。r F W 1 . 4 フレームワークに基づく分子は、4 0 で 2 週間のインキュベーション後に主にモノマー性を維持し、8 7 ~ 9 5 % のモノマー含量を示した。

30

【0108】

両方の V L ドメイン上の A H o 残基位置 5 0 にアルギニンが導入された変異体 # 2 は、両方の V L ドメインにおいて残基位置 5 0 にリシンを有する # 1 と比較して、4 0 で 2 週間のインキュベーション後に最も高いモノマー含量を示した。また、両方の V H ドメイン上に A H o 位置 1 2 にセリン、A H o 位置 1 0 3 にトレオニン、および A H o 位置 1 4 4 にトレオニンを含有する変異体 # 3 は、# 1 と比較して、4 0 で 2 週間のインキュベーション後により高いモノマー含量を示した。また、これらの置換の組み合わせである s c D b # 4 は、タンパク質を濃縮する能力の増加をもたらし、これは溶解度のさらなる増加を意味した（表 1 0 を参照されたい）。

40

【表 1 0】

#	SE-HPLC 純度[%]	濃度 [mg/ml]
#5	44.4	2
#1	87.5	2.1
#3	95.7	1.9
#2	90.1	35
#4	94.9	41

10

【0 1 0 9】

VEGFおよびTNF を結合する二重特異性分子：

VEGFおよびTNF に二重特異的に結合する異なるs c D b変異体を試験した。分子間の差については、実施例3、表3を参照されたい。全ての分子を、それらの産生特性、熱安定性および短期安定性に従い特性決定した。

【0 1 1 0】

全ての二価s c D b分子が、V H A - リンカー1 - V L B - リンカー3 - V H B - リンカー2 - V L - Aの順であった。ドメインV L - AおよびV H - Aは、TNF 結合抗体断片をアセンブルした。ドメインV L - BおよびV H - Bは、VEGF結合抗体断片をアセンブルした。導入された置換およびリンカー配列の変化は、実施例3、表3に具体的に要約される。

20

【0 1 1 1】

全ての二重特異的分子が産生可能であったが、異なる収量およびモノマー含量に達した(表11を参照されたい)。20 a a (配列番号4)からなるリンカー3を含有する#11 s c D bバージョンを、同じ置換を含有するがリンカー3(配列番号3である)のみが異なるバージョン#9と比較した。S c D bバージョン#11は、61 mg/mlおよび75%の増加した収率および純度を示したが、一方s c D b #9は、わずか7 mg/mlの収率および34%の純度を有した。#10上の追加の置換は、いかなる置換も有さないs c D bバージョン#6と比較して、純度を著しく増加させた。

【表 1 1】

#	収率 [mg/L]	SE-HPLC 純度[%]
#6	13	19
#7	6	72
#8	25	71
#9	7	34
#10	4	96
#11	62	75
#12	34	74
#13	11	69

30

【0 1 1 2】

置換を有する全ての二重特異性s c D b分子が、熱安定性に関するD S C測定において、72 を超える高いT_mを示す。いかなる置換も有さないバージョンであり、57.2のT_mに達するのみであった#6と比較すると、特にそうであった(表12を参照されたい)。リンカー構造の交換は、熱安定性を変化させなかった。これらのs c D b変異体、#11、#12、および#13はまた、74のT_mをまだ有していた。

40

【表 1 2】

#	T _m 近似値 [°C]
#6	57.2
#7	72.1
#8	72.5
#9	74.2
#10	74.8
#11	74.8
#12	74.6
#13	75.4

10

【0 1 1 3】

20 a a (配列番号 4) からなるリンカー 3 を有する二重特異性 s c D b 変異体、# 1 1、# 1 2、および # 1 3 は、F T - I R により測定すると、約 6 9 の T_m を示した。これらの値を、1 5 a a リンカー 3 (配列番号 3) を含有する # 9 の 6 6 . 2 の T_m と比較した。これらの熱安定性の結果は、1 5 a a から 2 0 a a のリンカー 3 の交換が、表 1 3 に示されるように、s c D b 分子の T_m を増加させることを示した。

【表 1 3】

20

#	T _m 近似値 [°C]
#9	66.2
#11	69.8
#12	68.9
#13	69.5

【0 1 1 4】

二重特異性 s c D b バージョンにおいて、濃縮プロセス中および 4 0 で 1 4 日間のインキュベーション後に、溶解度および安定性の明確な差が観察された。F W 領域上に導入された置換は、s c D b タンパク質の溶解度および安定性を増加させた (表 1 4 を参照されたい)。V H - B 上に追加の置換を有するバージョン # 1 0 は、1 4 日目に、8 8 % のモノマー含量を有していた。これらの値を、1 4 日目に 5 3 % のモノマー含量を有する # 9 および 1 9 % のモノマー含量を有する # 6 と比較する。これらの結果は、置換により安定性が向上することを示した。0 日目よりも 1 4 日目において純度がより高い場合、この比較から分子を除外した。

30

【0 1 1 5】

1 5 a a 配列 (配列番号 3) から 2 0 a a (配列番号 4) へのリンカー 3 の交換は、s c D b 分子の溶解度および安定性の増加をもたらした (表 1 4 を参照されたい)。# 1 1、# 1 2、および # 1 3 と比較した分子 # 9 の溶解度および安定性の差は、この結論を裏付ける。s c D b の変異体、# 9 ならびに # 1 1、# 1 2、および # 1 3 は、同じ置換を含有していたが、異なるリンカー 3 配列を含有していた (実施例 3、表 3 を参照されたい)。リンカー 3、2 0 a a (配列番号 4) ならびにリンカー 1 および 2、5 a a (配列番号 1) を有する s c D b の # 1 1 バージョンは、4 0 m g / m l の濃度で 8 1 % のモノマー含量を示したが、# 9 は、5 3 % のモノマー含量で 1 0 m g / m l に達するのみであった (表 1 4 を参照されたい)。

40

【表 1 4】

#	SE-HPLC 純度[%]	濃度 [mg/ml]	
#6	19.3	5.5	
#7	99.1	1.5	*
#8	92.5	8.7	*
#9	53.2	10	*
#10	88.8	1.5	+
#11	81.2	40	
#12	83.7	40	
#13	43.0	40	

10

【 0 1 1 6 】

上記開示は、本発明のある特定の具体的実施形態を強調するものであり、その全ての改変または代替の均等物が、添付の特許請求の範囲に記載されるような本発明の精神および範囲内であることを理解されたい。

【 配列表 】

[2014533239000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/004404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K16/00	C07K16/46 A61K39/395 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, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/155723 A2 (ESBATECH AN ALCON BIOMEDICAL R [CH]; BORRAS LEONARDO [CH]; GUNDE TEA []) 30 December 2009 (2009-12-30) claims 1, 7,8	1-17, 19-24
X	WO 2009/000099 A2 (ESBATECH AG [CH]; BORRAS LEONARDO [CH]; URECH DAVID [CH] ESBATECH AG []) 31 December 2008 (2008-12-31) claims 1,4, 8	1-24
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 April 2013		16/04/2013
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 Weigl, Martina

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/004404

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILLER BRIAN R ET AL: "Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies", PROTEIN ENGINEERING DESIGN & SELECTION, vol. 23, no. 7, July 2010 (2010-07), pages 549-557, XP002690428, ISSN: 1741-0126 the whole document	1-24
X	----- WO 2010/008690 A1 (UCHICAGO ARGONNE LLC [US]; STEVENS FRED J [US]) 21 January 2010 (2010-01-21) the whole document	1-24
X	----- LEO BORRAS ET AL: "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 285, no. 12, 9 March 2010 (2010-03-09), pages 9054-9066, XP002668298, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M109.072876 [retrieved on 2010-01-07] the whole document	1-24
X,P	----- WO 2012/051734 A1 (ESBATECH AN ALCON BIOMEDICAL RES UNIT LLC [CH]; BORRAS LEONARDO [CH];) 26 April 2012 (2012-04-26) page 21, line 21 - line 32; claims 18-23 page 26, line 12 - line 22	1-24
A	----- KRISTOFFER FAMM ET AL: "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 376, no. 4, 29 February 2008 (2008-02-29), pages 926-931, XP002668297, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.10.075 [retrieved on 2007-11-04] the whole document	1-24
	----- -/--	

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/004404

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HONEGGER A ET AL: "Yet Another Numbering Scheme for Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling and Analysis Tool", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1006/JMBI.2001.4662 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-24
A	<p>ROBINSON M K ET AL: "Targeting ErbB2 and ErbB3 with a bispecific single-chain Fv enhances targeting selectivity and induces a therapeutic effect in vitro", BRITISH JOURNAL OF CANCER, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 99, no. 9, 28 October 2008 (2008-10-28), pages 1415-1425, XP009115294, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6604700 [retrieved on 2008-10-07] cited in the application figure 2</p> <p>-----</p>	1-24
A	<p>HUDSON P J ET AL: "High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 231, no. 1-2, 10 December 1999 (1999-12-10), pages 177-189, XP004186084, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(99)00157-X cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-24
X	<p>WO 2009/082624 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; LEWIS KATHERINE E [US]; BRENDER TY M [US]; YI E) 2 July 2009 (2009-07-02) figure 1; example 6; tables 9-13</p> <p>-----</p>	1-16,18, 20-24

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/004404**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2012/ 004404

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 17, 19(completely); 1-16, 20-24(partially)

A multiple antigen-binding antibody molecule comprising two heavy chain variable domains one with specificity to antigen A (VH-A) and one with specificity for antigen B (VH-B) and two light chain variable domains one with specificity to antigen A (VL-A) and one with specificity for antigen B (VL-B) wherein at least one of the two heavy chain variable domains comprises at least one of the following: a Serine at AHo position 12, a Serine or Threonine at AHo position 103 and a Serine or Threonine at AHo position 144

2. claims: 18(completely); 1-16, 20-24(partially)

A multiple antigen-binding antibody molecule comprising two heavy chain variable domains one with specificity to antigen A (VH-A) and one with specificity for antigen B (VH-B) and two light chain variable domains one with specificity to antigen A (VL-A) and one with specificity for antigen B (VL-B) wherein at least one of the two light chain variable domains comprises an Arginine at AHo position 50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/004404

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009155723 A2	30-12-2009	AU 2009264564 A1	30-12-2009
		CA 2727992 A1	30-12-2009
		CN 102076716 A	25-05-2011
		EP 2307457 A2	13-04-2011
		JP 2011525358 A	22-09-2011
		KR 20110028516 A	18-03-2011
		US 2011159007 A1	30-06-2011
		WO 2009155723 A2	30-12-2009
		WO 2009000099 A2	31-12-2008
CA 2689941 A1	31-12-2008		
CN 101849001 A	29-09-2010		
CN 102838673 A	26-12-2012		
EP 2158315 A2	03-03-2010		
JP 2010531145 A	24-09-2010		
KR 20100028575 A	12-03-2010		
NZ 581468 A	28-09-2012		
RU 2010102065 A	27-07-2011		
US 2009074780 A1	19-03-2009		
WO 2009000099 A2	31-12-2008		
WO 2010008690 A1	21-01-2010	CA 2729899 A1	21-01-2010
		EP 2313502 A1	27-04-2011
		JP 2011528035 A	10-11-2011
		US 2011130324 A1	02-06-2011
		WO 2010008690 A1	21-01-2010
WO 2012051734 A1	26-04-2012	TW 201221142 A	01-06-2012
		US 2012100153 A1	26-04-2012
		UY 33679 A	30-03-2012
		WO 2012051734 A1	26-04-2012
WO 2009082624 A2	02-07-2009	NONE	

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	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	11/04	(2006.01)	A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/00	
A 6 1 P	7/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/10	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	27/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	27/04	
A 6 1 P	17/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/10	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	A 6 1 P	31/06	
			A 6 1 P	31/18	
			G 0 1 N	33/531	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ソマヴィラ, ロベルト

スイス国 ツェーハー - 8 1 5 2 オプフィコン, ファルマンシュトラーゼ 4 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA06 EA04 FA02 HA01

4C085 AA14 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03 GG05 GG06 GG08 GG10

4H045 AA11 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74