

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7603578号  
(P7603578)

(45)発行日 令和6年12月20日(2024.12.20)

(24)登録日 令和6年12月12日(2024.12.12)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00 Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
請求項の数 31 (全98頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-502692(P2021-502692)	(73)特許権者	510340757
(86)(22)出願日	平成31年3月29日(2019.3.29)		メルス ナムローゼ フェンノートシャップ
(65)公表番号	特表2021-519610(P2021-519610 A)		オランダ・3 5 8 4・セーデー・ユトレ
			ヒト・3 エー・エン・4 エー・フェルデ
(43)公表日	令和3年8月12日(2021.8.12)		イーピン・ウップサララン・1 7
(86)国際出願番号	PCT/NL2019/050199	(74)代理人	100108453
(87)国際公開番号	WO2019/190327		弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開日	令和1年10月3日(2019.10.3)	(74)代理人	100110364
審査請求日	令和3年11月26日(2021.11.26)		弁理士 実広 信哉
(31)優先権主張番号	62/650,467	(74)代理人	100133400
(32)優先日	平成30年3月30日(2018.3.30)		弁理士 阿部 達彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	コルネリス・アドリアーン・デ・クライ
前置審査			フ
			オランダ・3 5 8 4・セーエム・ユトレ
			ヒト・ヤレラン・6 2 内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多価抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 つの F a b 結合ドメインを含む全長ベース抗体部分と、  
1 つの追加の結合ドメインと、を含む、多価抗体であって、  
前記 1 つの追加の結合ドメインが、C H 1 領域を含む F a b ドメインであり、リンカーによって前記ベース抗体部分に接続され、前記リンカーは、前記ベース抗体部分の可変領域及び前記 C H 1 領域を連結し、  
前記リンカーが、配列番号 1 に記載の配列を含む、あるいは、  
配列番号 2、4 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の配列を含む、又は、それに 1 個のアミノ酸挿入、欠失、置換、もしくは付加を有する、あるいは、  
配列番号 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の配列を含む、又は、それに 1 つまたは 2 個のアミノ酸挿入、欠失、置換、もしくは付加、もしくは、その組み合わせを有し、  
前記ベース抗体部分の各結合ドメイン及び前記 1 つの追加の結合ドメインが全て、V L - C L を含む共通軽鎖を有し、  
前記多価抗体が、3 つの異なるエピトープに結合する、多価抗体。

【請求項 2】

前記共通軽鎖が、生殖細胞系列配列を有するヒト軽鎖である、請求項 1 に記載の多価抗体。

【請求項 3】

前記共通軽鎖が、再構成生殖細胞系列ヒトカップ軽鎖 I g V 1 - 3 9 \* 0 1 / I G J

1 \* 0 1 である、請求項 1 又は 2 に記載の多価抗体。

【請求項 4】

前記共通軽鎖が、配列番号 29 の配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 5】

前記抗体の前記ベース部分が、第 2 の C H 3 ドメインと二量体化する第 1 の C H 3 ドメインを含み、前記第 1 の C H 3 ドメインは、351 位及び 366 位又はそれに対応する位置にアミノ酸残基リジンを含み、前記第 2 の C H 3 ドメインは、351 位又はそれに対応する位置にアスパラギン酸のアミノ酸残基、及び 368 位又はそれに対応する位置にグルタミン酸のアミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の多価抗体。

10

【請求項 6】

前記結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、免疫エフェクター細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 7】

前記免疫エフェクター細胞が T 細胞である、請求項 6 に記載の多価抗体。

【請求項 8】

前記 T 細胞上の前記抗原が C D 3 である、請求項 7 に記載の多価抗体。

【請求項 9】

前記結合ドメインのうちの少なくとも 1 つが、異常細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の多価抗体。

20

【請求項 10】

少なくとも 2 つの結合ドメインが、異常細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項 9 に記載の多価抗体。

【請求項 11】

前記異常細胞が腫瘍細胞である、請求項 9 又は 10 に記載の多価抗体。

【請求項 12】

前記少なくとも 2 つの結合ドメインが、E G F R 及び P D - L 1 に特異的に結合する、請求項 11 に記載の多価抗体。

【請求項 13】

第 1 の結合ドメインが P D - L 1 に特異的に結合し、第 2 の結合ドメインが C D 3 に特異的に結合し、第 3 の結合ドメインが E G F R に特異的に結合する、請求項 6 ~ 12 のいずれか一項に記載の多価抗体。

30

【請求項 14】

前記ベース抗体が、結合ドメイン 1 及び 2 を含み、前記追加の結合ドメイン 3 が結合ドメイン 1 に連結される、請求項 6 ~ 13 のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 15】

結合ドメイン 1 が C D 3 結合ドメインであり、結合ドメイン 2 及び 3 が、P D - L 1、E G F R、C D 1 3 7、C L E C 1 2 A、フィブリノーゲン、及び、サイログロブリンから選択される異なる標的細胞抗原に結合する、請求項 14 に記載の多価抗体。

【請求項 16】

40

結合ドメイン 2 が C D 3 結合ドメインであり、結合ドメイン 1 及び 3 が、P D - L 1、E G F R、C D 1 3 7、C L E C 1 2 A、フィブリノーゲン、及び、サイログロブリンから選択される異なる標的細胞抗原に結合する、請求項 14 に記載の多価抗体。

【請求項 17】

結合ドメイン 3 が C D 3 結合ドメインであり、結合ドメイン 1 及び 2 が、P D - L 1、E G F R、C D 1 3 7、C L E C 1 2 A、フィブリノーゲン、及び、サイログロブリンから選択される異なる標的細胞抗原に結合する、請求項 14 に記載の多価抗体。

【請求項 18】

前記 C D 3 結合ドメインが、

配列番号 97 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 98 のアミノ酸配列を有する

50

C D R 2、及び配列番号 9 9 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 1 7 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 2 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

10

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列を有する C D R 3、又は、

配列番号 1 5 1 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 5 3 のアミノ酸配列を有する C D R 3  
を含む重鎖可変領域、並びに、

配列番号 2 5 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 5 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 5 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3  
を含む、軽鎖可変領域

を含む、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 1 9】

20

前記 C D 3 結合ドメインが、

前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 8、配列番号 1 2 7、配列番号 1 3 6、配列番号 1 4 5、又は配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、並びに、

前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する配列番号 3 7 又は配列番号 4 0 を含む軽鎖可変領域  
を含む、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 2 0】

標的細胞抗原結合ドメインが、P D - L 1 結合ドメインである、請求項 1 4 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の多価抗体。

30

【請求項 2 1】

前記 P D - L 1 結合ドメインが、

配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 6 1 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 6 2 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 6 9 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 7 0 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 7 1 のアミノ酸配列を有する C D R 3、又は、

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を有する C D R 3、  
を含む重鎖可変領域、並びに、

配列番号 2 5 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 5 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 5 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3  
を含む軽鎖可変領域

40

を含む、請求項 2 0 に記載の多価抗体。

【請求項 2 2】

前記 P D - L 1 結合ドメインが、

前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号 1 6 3、配列番号 1 7 2 又は配列番号 1 8 1 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、並びに、

前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号 3 7 又は配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

50

を含む、請求項 2 0又は請求項 2 1に記載の多価抗体。

【請求項 2 3】

標的細胞抗原結合ドメインが、E G F R 結合ドメインである、請求項 1 4 ~ 2 2のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 2 4】

前記 E G F R 結合ドメインが、

配列番号 1 8 7 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 8 8 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 8 9 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 1 9 6 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 1 9 8 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 0 6 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 0 7 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 1 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3、又は、

配列番号 2 2 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 2 4 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 2 5 のアミノ酸配列を有する C D R 3、

を含む重鎖可変領域、並びに、

配列番号 2 5 4 のアミノ酸配列を有する C D R 1、配列番号 2 5 5 のアミノ酸配列を有する C D R 2、及び配列番号 2 5 6 のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 2 3に記載の多価抗体。

【請求項 2 5】

前記 E G F R 結合ドメインが、前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号 1 9 0、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 8、配列番号 2 1 7、又は、配列番号 2 2 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、並びに、

前記 C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 5 の保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号 3 7 又は配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 2 3又は請求項 2 4に記載の多価抗体。

【請求項 2 6】

標的細胞抗原結合ドメインが、C L E C 1 2 A 結合ドメインである、請求項 1 4 ~ 2 5のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 2 7】

C D 3 結合ドメイン、E G F R 結合ドメイン、及び P D - L 1 結合ドメインを含む、請求項 1 8 ~ 2 5のいずれか一項に記載の多価抗体。

【請求項 2 8】

多価抗体の調製方法であって、前記方法が、

請求項 1 ~ 2 7のいずれか一項に記載の多価抗体に組み立てることができるポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む細胞を準備することと、

前記細胞を、前記ポリペプチドの発現及びそれらの組み立てを多価抗体に提供する条件下で培養することと、を含む、方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 2 7のいずれか一項に記載の多価抗体に組み立てることができるポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む細胞。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 7のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体及び / 又は希釈剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 3 1】

治療によるヒト又は動物の身体の処置に使用するための、請求項 1 ~ 2 7のいずれか一項に記載の多価抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50



## 【 0 0 0 1 】

本発明は、3つ以上の結合ドメインを有する多価抗体、及びかかる多価抗体の作製方法に関する。本発明は、多価抗体の構成ポリペプチド、及び多価抗体の1つ以上の結合ドメインを接続するために使用することができるリンカーに更に関する。本発明は、かかる多価抗体、リンカーをコードする核酸、及びかかる核酸を含むベクター、並びに多価抗体を産生する宿主細胞に更に関する。本発明はまた、癌細胞又は腫瘍細胞抗原上に存在する標的抗原及び免疫エフェクター細胞に關与する標的を含む、3つの抗原又は標的に同時に結合することができる多価抗体にも關する。また、本発明は、多価抗体を含む医薬組成物、及び治療によってヒト又は動物の処置に使用するための多価抗体に関する。また、本発明は、抗体を使用したヒト又は動物を処置するための方法に関する。

10

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

2つの抗原又は2つのエピトープに結合することができる二重特異性抗体などの多価抗体は、当該技術分野において既知である。かかる多価結合タンパク質は、細胞融合、化学的コンジュゲーション、又は組み換えDNA技術を含む様々な技術を使用して生成することができる。

## 【 0 0 0 3 】

抗体は、典型的には、2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖を含む4つのタンパク質で構成される多量体であり、重鎖は可変ドメイン(VH)、及び3つの定常領域(CH1、CH2、CH3)で構成され、軽鎖は可変軽鎖ドメイン(VL)及び定常領域(CL)から構成される。典型的には、軽鎖は、多くの非共有相互作用の影響を通じて、更にはジスルフィド結合を介して重鎖と対合する。2つの重鎖は、CH1をCH2に接続するヒンジ領域で、及び/又は2つのCH3ドメイン間の界面でのアミノ酸相互作用を介して、対合する。VHとVLとの対合は、抗原結合ドメインを形成し、典型的には、可変性は、相補性決定領域又はCDRである、VH及びVLドメイン内の3つの表面ループ形成領域において見出される。

20

## 【 0 0 0 4 】

2つの異なる抗原、又は同じ抗原内の2つの異なるエピトープに結合し得る、二重特異性抗体などの2つの異なる結合ドメインを有する抗体など、特定の多価抗体フォーマットが当該技術分野において既知である。かかるフォーマットでは、多価抗体が、1つの抗原を発現する正常な細胞を標的化したり、又はより低い発現レベルで1つの抗原を発現するかかる正常な細胞を標的化することなく、腫瘍細胞などの2つの抗原又はエピトープを発現する細胞又は標的を選択的に標的とすることを可能にする調整された結合の使用を可能にし得る。同様に、二重特異性抗体などの多価抗体上に2つの異なる結合ドメインを有することにより、異なる抗原の結合が可能となり、それにより、この多価抗体を使用して、単一細胞又は2つの相互作用細胞上の阻害分子及び刺激分子の両方を標的とすることができ、その結果、多価抗体の効力が高まる。多価抗体はまた、腫瘍にリダイレクトされ得る、例えば免疫調節細胞などの細胞をリダイレクトするために使用され得る。

30

## 【 0 0 0 5 】

単一の抗体における3つ以上の結合ドメインを組み込むことで、標的及び有効性のより多岐にわたる有益な組み合わせを可能にし得る。例えば、3つ以上の結合ドメインを有する多価抗体は、同じ抗原及びエピトープを標的とし得、標的に対する抗体のより低い比で、所与の標的に対する特異性及び/又は標的の飽和を可能にする。多価抗体は、標的細胞への高いアビジニティ結合を可能にするために、2つ以上の同一の抗原結合ドメインを含有してもよい。これは、腫瘍細胞上で過剰発現されるガングリオシドなどの抗原を特異的に標的化するために使用することができる。これらの腫瘍関連抗原は、通常の細胞上に存在するが、腫瘍細胞上では非常に高密度で存在する。いくつかの低親和性結合領域を含有する多価抗体は、正常細胞と反応しないか、又はより低い比で反応すると同時に、追加の受容体を活性化若しくは遮断しながら、腫瘍細胞への特異的標的化を可能にし得る。最終的に、3つ以上の結合領域が、かかる用途において有用である。

40

50

## 【 0 0 0 6 】

特定の多価抗体が当該技術分野において記載されてきたが、当該技術分野では、多価抗体の効率的な産生を可能にし、多くの抗原に対するその結合ドメインを容易に作製及び効率的かつ安定的に多価抗体へと変換でき、そして多岐にわたる抗原及びエピトープに結合することができる、新たなフォーマット及び新たなリンカーが必要とされている。3つ以上の結合ドメインを含有する抗体の操作は、従来、時間がかかり、非効率的で、費用がかかってきた。実際に、様々な抗原を標的化するために生成することができる高品質で低免疫原性の多価抗体の効率的な産生には、多くの障害が存在する。

## 【 0 0 0 7 】

例えば、3つ又は4つの結合ドメインを含有する既存の多価フォーマットは、第1に、分子中の全ての結合ドメインへのアクセスを制限する傾向があり、第2に、開発可能性にとって問題となり得る、配列ドメインを含有するG l y 4 S e r ( G 4 S ) リピートなどの合成リンカーに依存する。

10

## 【 0 0 0 8 】

既存の多価抗体フォーマットはまた、ジスルフィド結合及びアミノ酸相互作用によって会合される、又は単鎖可変領域断片 ( s i n g l e - c h a i n f r a g m e n t v a r i a b l e s ) ( s c F v ) の場合、短いリンカーによって接合され得る、異なる重鎖及び軽鎖に依存する。しかし、3つ以上の結合特異性の多重特異的フォーマットで使用される複数の可変ドメインのそれぞれにおいて、異なる可変鎖 ( 重鎖及び / 又は軽鎖 ) を使用する必要があるため、重鎖及び軽鎖の誤対合を防止するために、かかる分子の広範な操作を必要とする。このことは、常に、これらの分子の複雑性、安定性、免疫原性、及び産生レベルに影響を及ぼす。

20

## 【 0 0 0 9 】

多価抗体フォーマットは、各結合ドメインに同じ軽鎖を使用することに依存し得、この場合、該軽鎖と対合する1つ以上の同族可変領域は、該同族鎖が、抗原曝露、及びB細胞の発達中に発生する共進化のプロセスにตอบสนองして共通軽鎖と形成されて対合するのではなく、化学修飾によって強制的に対合する。

## 【 0 0 1 0 】

多価抗体フォーマットはまた、1つの抗原に結合する既存の単特異性抗体からの軽鎖に依存し得、これは、その後、ライブラリにおいて使用されて、該軽鎖を対合することが可能な重鎖を同定し、同時に異なるエピトープ又は抗原にも結合する。

30

## 【 0 0 1 1 】

かかる擬似共通軽鎖 ( p s e u d o - c o m m o n l i g h t c h a i n s ) は、本発明での使用には好ましくない。本発明の好ましい共通軽鎖は、多様な同族鎖と対合することが可能であり、体細胞組換え、好ましくは抗原曝露にตอบสนองした体細胞超変異を受けたDNAによってコードされる、再構成された同族鎖と対合する共通鎖から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づくものである。

## 【 0 0 1 2 】

疑似軽鎖アプローチは、利用可能な同族鎖の範囲を制限する。抗原曝露にตอบสนองして一緒に形成されなかった重鎖及び軽鎖の対合を強制することにより、特異性及び親和性の喪失につながり、有用性が制限される。更に、V H 及び V L のシャッフルを可能にし、親和性及び特異性を維持することは、任意の所与の抗体にとって、通常、稀少である。

40

## 【 0 0 1 3 】

抗原に結合する能力を維持しながら、重鎖及び軽鎖が免疫応答において共進化していない、重鎖及び軽鎖の対合を強制することは簡単ではなく、このアプローチの柔軟性を制限する可能性がある。

## 【 0 0 1 4 】

同様に、1つの抗体の軽鎖を再利用して、その軽鎖に結合可能な重鎖を同定し、更に対象となる異なる抗体にも結合することは、利用可能な重鎖の範囲を制限し、適切な追加の重鎖を同定できなくなる可能性が高くなり、より多くの抗原又はエピトープが結合しよう

50

とする。すなわち、重鎖と対合する軽鎖を使用して、所与の抗原に結合する F a b を形成して、該軽鎖と対合し、第 2 の抗原に結合することができる、後続の重鎖を同定してもよい。しかし、その軽鎖を 3 回目に使用して、第 3 の抗原又はエピトープに結合しながら該軽鎖と対合することができる第 3 の重鎖を同定することはますます稀少になり、更に稀少なことには、異なるエピトープ又は抗原にも結合しながら該軽鎖と対になることができる、より多くの重鎖が同定されることが求められる。

#### 【 0 0 1 5 】

本明細書に記載される本発明の好ましい実施形態は、抗原に応答して、多様な重鎖と対合する共通鎖を用い、単特異性抗体の既存の軽鎖の再利用又は化学修飾による軽鎖の同族鎖への強制対合を必要としない。

#### 【 0 0 1 6 】

2 つのドメインを直接融合することにより生物活性が損なわれる可能性があるため、多価抗体の構築が成功するかどうかは、異なるドメイン間のタンパク質リンカーの適切な選択に依存する。リンカー又は複数のリンカーの生物物理的特性、例えば、電荷、剛性、又は柔軟性、並びに結合ドメイン間の距離及び結合領域間の空間的コンフォメーションは、エピトープのアクセス及びその標的に結合する多価タンパク質の能力に影響を及ぼし得る。したがって、モジュール式で、異なる分子及び / 又は異なる細胞上に位置し得る異なる組み合わせのエピトープへの同時結合を可能にする多価抗体の構築を可能とする、異なる特徴を有する様々なリンカーを用いることができる多価フォーマットが必要とされている。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 1 7 】

【 文献 】 米国特許第出願公開 2 0 1 0 / 0 2 0 3 0 5 6 ( A 1 ) 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 3 / 0 7 9 1 7 4 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 1 6 3 4 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 9 2 0 1 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 4 9 1 6 号

【 文献 】 国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 3 2 2 3 号

#### 【 発明の概要 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 1 8 】

したがって、安定性、低免疫原性、及び開発可能性の容易さを維持しながら、標的の組み合わせに応じてモジュール式で用いることができる剛性、柔軟性、長さの異なる特徴を含む一連のリンカーの設計が当該技術分野において必要とされている。

したがって、3 つ以上の結合ドメインを含む広範な抗体の迅速かつ堅牢な生成に広く適用可能である抗体の産生のために、3 つ以上の結合ドメイン及びリンカーを有する多価抗体のための新しく有用なフォーマットが必要である。

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 1 9 】

本発明は、多重特異性抗体であり得る 3 つ以上の結合ドメインを含む多価抗体の新規なモジュール式フォーマットに基づく。これらのフォーマットでは、少なくとも 1 つの結合ドメインは、ベース抗体部分に接続され、該ベース抗体部分は 2 つの結合ドメインを含む。追加の結合ドメインは、可変領域、F v ドメイン、F a b ドメイン、又は修飾 F a b ドメイン、又はそれらのいずれかの機能的断片を含んでもよい。ベース抗体部分は、例えば、全長抗体又はその断片であってもよいが、いずれの場合にも、2 つの結合ドメインを含む。

#### 【 0 0 2 0 】

1 つ以上の追加の結合ドメインは、リンカー（複数可）を介してベース抗体部分に接続され、ベース抗体部分のものに加えて 1 つ以上の結合部分を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 1 】

リンカーは、1つ以上の追加の結合ドメインをベース抗体部分に接続するために使用される。リンカーは、ペプチド領域、例えば、1つ以上のヒンジ領域及び/又はヒンジ領域に由来する1つ以上の領域を含む。リンカーと、該リンカーが接続している定常領域（例えば、C H 1）との組み合わせは、多価抗体の特性の判定に重要であり得、抗体の正確な機能及び/又はベース抗体への1つ以上の追加の結合ドメインの配向を可能にする。したがって、リンカー配列が所与のサブタイプのヒンジに基づく場合、該リンカーが結合している追加の結合ドメインの定常領域は、同じサブタイプのものであることが好ましい場合がある。

## 【 0 0 2 2 】

1つ以上の追加の結合ドメイン（複数可）は、可変領域、F vドメイン、F a bドメイン、又は修飾F a bドメインを含み得る。

## 【 0 0 2 3 】

F a bドメインは、特に、安定であり、容易に製造することができる多価分子の製造に有用である予測可能な挙動を有するタンパク質ドメインを含むため、有益な追加の結合ドメインを構成する。

## 【 0 0 2 4 】

本発明の多価抗体の効率的な産生及び開発可能性を促進するため、該多価抗体は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V H）又は軽鎖可変領域（V L）であり得る共通可変領域を含み得るが、典型的には共通軽鎖（c L C）可変領域である。

## 【 0 0 2 5 】

共通可変領域は、典型的には、体細胞組換え、好ましくは親和性成熟を受けた核酸によってコードされる同族可変領域と対合しているか、又は体細胞組換え、好ましくは親和性成熟のプロセスを受けた核酸によりコードされる再構成可変領域に基づくか、若しくはそれに由来するか、及び/又は、ファージディスプレイ、ヒト化免疫系を有するトランスジェニック動物を含む動物の免疫化、及び当技術分野で周知の他の技術などの既知の抗体生成技術に基づくか、又はそれに由来する。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の多価抗体の各結合ドメインにおいて本質的に同一である共通可変領域の使用は、かかる抗体の開発及び製造を促進する。

## 【 0 0 2 7 】

したがって、本発明の多価抗体において使用するための共通可変領域の選択は、様々な同族重領域又は軽領域と共に広く使用することができるものである必要がある。

## 【 0 0 2 8 】

同一の、又は実質的に同一の共通可変領域、例えばc L C可変領域により、C r o s s m a b技術で使用されるような広範な操作、又は重鎖及び軽鎖の誤対合を防ぐためのリンカー（s c F vドメインで使用されるようなもの）を必要とすることなく、3つ以上の全ての結合領域に、完全な、又は実質的に完全なF a bドメインの使用が可能となる。また、本質的に生殖細胞系にコードされ、非免疫原性の共通可変領域が既知であるため（国際公開第2 0 0 9 / 1 5 7 7 7 1号を参照されたい）、3つ以上のF a bドメインのそれぞれにおいて該共通可変領域を使用することにより、免疫原性の低減をもたらすことができる。

## 【 0 0 2 9 】

多価抗体を産生するための本明細書に記載のフォーマットの追加の利点により、多様な同族可変領域と対合することができる共通可変領域（例えば、多様な重鎖可変領域と対合する共通軽鎖可変領域）（国際公開第2 0 0 9 / 1 5 7 7 7 1を参照されたい）をゲノム内に有するトランスジェニック動物、好ましくはトランスジェニックげっ歯類を使用することが可能となり、これにより、異なる抗原への曝露から形成された同族可変領域をコードするD N Aを、共通可変領域をコードするD N Aとともに宿主細胞に導入することが可能となる（多価抗体の生成のためにそれぞれ発現させることができる）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

例えば、その生殖細胞系に、共通可変領域をコードするDNAと、再構成されて同族可変領域を形成することができ、体細胞組換えを受けることができる再構成されていない免疫グロブリン遺伝子座をコードするDNAと、を含むトランスジェニックマウスは、1つ以上の抗原に曝露されることができ、その結果、次いで、3つ以上の抗原への曝露に基づいて産生された再構成可変領域を使用して、本発明の多価抗体を生成することができる。共通可変領域をコードする核酸配列、及び3つ以上の再構成可変領域を宿主細胞に形質転換して、本発明の多価抗体を発現させることができる。

## 【 0 0 3 1 】

したがって、多価抗体を産生するための本明細書に記載されるフォーマットは、全てが共通可変領域、好ましくは共通軽鎖可変領域を含み得る3つ以上の結合ドメインを利用する。

10

## 【 0 0 3 2 】

本発明のフォーマットは、ベース抗体部分のものに加えて、1つ以上の結合ドメインを含む。かかる追加の結合ドメインは、好ましくはCH1ドメイン及び可変ドメインを含む、Fvドメイン、Fabドメイン、又は修飾Fabドメインであってもよく、リンカーを介してベース抗体部分に接続される。修飾Fabドメインでは、CH1ドメインは、CLと対合していない。好適なCH1ドメインは、1つ以上の疎水性領域を除去するように操作されたものであってもよく、又はラクダ科動物若しくはサメ由来のものであってもよい。あるいは、追加の結合ドメインは、リンカーを介してベース抗体部分に接続される、CLドメイン及び可変ドメインを含んでもよい。CLドメインは、Cカッパ又はCラムダドメインのいずれかであり得る。

20

## 【 0 0 3 3 】

典型的には、追加の結合ドメイン（複数可）は、ベース抗体部分の結合ドメインの、共通可変部分若しくは再構成可変領域のいずれか又は両方のN末端領域におけるベース抗体部分の一方又は両方の結合ドメインに接続される。

## 【 0 0 3 4 】

あるいは、追加の結合ドメインは、ベース抗体部分の結合ドメインの共通鎖及び再構成可変ドメインの両方を、追加の結合ドメインのCH1及びCL領域に接続するリンカーを介して、ベース抗体部分に接続されてもよい。追加の結合ドメインが定常領域を欠いている場合、本明細書に開示される新規リンカーは、ベース抗体部分の結合ドメインの共通鎖及び再構成可変ドメインの両方を、追加の結合ドメインの共通鎖及び/又は再構成可変領域に接続してもよい。

30

## 【 0 0 3 5 】

あるいは、追加の結合ドメインは、単一のリンカーペプチドによってベース抗体部分に接続される、V<sub>H</sub>領域及びV<sub>L</sub>領域、すなわちFvドメインであってもよい。典型的には、この種類の追加の結合ドメイン（複数可）は、ベース抗体部分の結合ドメインの共通可変部分又は再構成可変領域のいずれかのN末端領域における、ベース抗体部分の一方又は両方の結合ドメインに結合される。

## 【 0 0 3 6 】

40

このフォーマットは、異なる長さ、構造、及び剛性度を含む、本明細書に開示される本発明のリンカーと共に使用される場合、驚くほど柔軟である。したがって、本発明は、3つ以上の結合ドメインを多価抗体に組み合わせるように開発を容易にさせる、開示された多価抗体フォーマットにおいて使用するための異なる特性を有するリンカーのレパートリーを提供する。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書に開示されるリンカーにより、本発明は、適切なリンカーの選択と、対応する結合ドメイン（例えば、Fabドメイン）のセットの選択とを一緒にしたモジュール式アプローチを提供し、これにより、これらの結合ドメインが多価抗体において様々な効能のために一緒に機能することを可能にする。

50

## 【 0 0 3 8 】

本発明の多価抗体は、治療、特に、いわゆる「エンゲージャー」抗体として使用することができ、それにより、抗体は、免疫エフェクター細胞と腫瘍細胞との間にリンクを形成することができる。

## 【 0 0 3 9 】

したがって、本発明によれば、  
2つの結合ドメインを含むベース抗体部分と、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインと、を含む多価抗体を提供し、  
該ベース抗体部分は、リンカーによって少なくとも1つの追加の結合ドメインに接続され、  
該ベース抗体部分の各結合ドメイン及び該少なくとも1つの追加の結合ドメインのそれぞれは全て、共通可変領域を有し、  
該リンカーは、ヒンジ配列、又はヒンジ配列に由来する配列を含む。

10

## 【 0 0 4 0 】

本発明はまた、  
2つの結合ドメインを含むベース抗体部分と、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインと、を含む多価抗体を提供し、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインは、C H 1領域を含み、該リンカーによって該ベース抗体部分に接続されて、該ベース抗体部分の可変領域及び該C H 1領域を連結し、  
該多価抗体は、少なくとも3つの異なるエピトープに結合する。

20

## 【 0 0 4 1 】

好ましくは、ベース抗体部分の各結合ドメイン及び少なくとも1つの追加の結合ドメインのそれぞれは全て、共通可変領域を有してもよい。

## 【 0 0 4 2 】

様々な1つ以上の追加の結合ドメイン  
好ましい実施形態は多価抗体であり、1つ以上の結合ドメインが、重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）を含むF vドメインである。

## 【 0 0 4 3 】

更なる好ましい実施形態は多価抗体であり、1つ以上の結合ドメインが、重鎖可変領域（V H）及び軽鎖可変領域（V L）を含むF a bドメインであり、該F a bドメインの重鎖可変領域がC H 1領域（V H - C H 1）を含み、該F a bの軽鎖可変領域がC L領域（V L - C L）を含む。該F a bドメインは、Vカッパ - Cカッパ、Vラムダ - Cラムダ、Vラムダ - Cカッパ、又はVカッパ - CラムダのいずれかであるV L - C Lを含有し得る。

30

## 【 0 0 4 4 】

別の実施形態は多価抗体であり、1つ以上の追加の結合ドメインが、V H - C H 1及びV Lからなる修飾F a bドメインである。あるいは、一実施形態は多価抗体であり、1つ以上の追加の結合ドメインが、V L - C L及びV Hからなる修飾F a bドメインである。かかる修飾F a bドメインでは、その同族領域と対合するものではない定常領域C H 1若しくはC Lが存在する、及び/又はその同族領域と対合するものではない可変領域V H若しくはV Lが存在する。

40

## 【 0 0 4 5 】

共通鎖  
好ましい実施形態は多価抗体であり、1つ以上の追加の結合ドメインは、抗原への曝露後に体細胞再構成を受けた再構成可変領域と対合する共通の再構成可変領域を含むF a bドメインを含むか、又は体細胞再構成の結果である配列から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づく核酸によってコードされる。あるいは、再構成可変領域は、合成ファージディスプレイライブラリの使用を含む当該技術分野において既知の分子生物学技術を使用して、多様性がレパートリーに導入される合成レパートリーから得られるか、それに由来するか、又はそれに基づくものであり得る。好ましくは、F a bドメインは、対応する再構成重鎖可変領域と対合する共通軽鎖可変領域を含む。好ましくは、共通軽鎖可変

50

領域は、C L 領域に接続され、再構成重鎖可変領域は、C H 1 領域に接続される。好ましくは、共通軽鎖は、C L 及びC H 1 領域の結合を介して重鎖可変領域と対合する。あるいは、共通鎖が重鎖であり、再構成可変領域が軽鎖であり、該鎖は、それぞれC H 1 及びC L ドメインを含んでもよく、C L 及びC H 1 領域の結合を介して対合してもよい。

#### 【 0 0 4 6 】

好ましい実施形態は多価抗体であり、3つ以上の結合ドメインがそれぞれ同じ共通鎖を含むが、3つ以上の結合ドメインは、異なる再構成可変同族鎖を含み、より好ましくは、同一の共通鎖が共通軽鎖である。

#### 【 0 0 4 7 】

好ましい実施形態は多価抗体であり、3つ以上の結合ドメインが、抗原に曝露され、共通軽鎖と対合する再構成重鎖可変領域を含む抗体を産生する、共通軽鎖と再構成されていない重鎖可変領域を含むトランスジェニック動物の核酸配列から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づいた核酸によってコードされる再構成可変領域を含む。あるいは、多価抗体の一実施形態では、3つ以上の結合ドメインは、抗原に曝露され、共通重鎖と対合する再構成軽鎖可変領域を含む抗体を産生する、共通重鎖と再構成されていない軽鎖可変領域を含むトランスジェニック動物の核酸配列から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づいた核酸によってコードされる再構成可変領域を含む。

#### 【 0 0 4 8 】

リンカー組成物

好ましい実施形態は該多価抗体であり、該リンカーが天然に存在する配列であるか、又は天然に存在する配列に基づくものである。より具体的には、該リンカーは、ヒンジ配列であるか、又はヒンジ配列に基づく配列を含む。より具体的には、該リンカーは、I g G 1 ヒンジ領域、I g G 2 ヒンジ領域、I g G 3 ヒンジ領域、又はI g G 4 ヒンジ領域に基づくヒンジ領域を含み得る。

#### 【 0 0 4 9 】

あるいは、該リンカーは、以下：

E S K Y G P P ( 配列番号 1 )

E P K S C D K T H T ( 配列番号 2 )

G G G G S G G G G S ( 配列番号 3 )

E R K S S V E S P P S P ( 配列番号 4 )

E R K C S V E S P P S P ( 配列番号 5 )

E L K T P L G D T T H T ( 配列番号 6 )

E S K Y G P P S P S S P ( 配列番号 7 )

E R K S S V E A P P V A G ( 配列番号 8 )

E R K C S V E A P P V A G ( 配列番号 9 )

E S K Y G P P A P E F L G G ( 配列番号 1 0 )

E P K S C D K T H T S P P S P ( 配列番号 1 1 )

E P K S C D G G G G S G G G G S ( 配列番号 1 2 )

G G G G S G G G G S A P P V A G ( 配列番号 1 3 )

E P K S C D K T H T A P E L L G G ( 配列番号 1 4 )

E R K S S V E S P P S P A P P V A G ( 配列番号 1 5 )

E R K C S V E S P P S P A P P V A G ( 配列番号 1 6 )

E L K T P L G D T T H T A P E F L G G ( 配列番号 1 7 )

E S K Y G P P S P S S P A P E F L G G ( 配列番号 1 8 )

E P K S C D K T H T S P P S P A P E L L G G ( 配列番号 1 9 )

E R K S S V E E A A A K E A A A K A P P V A G ( 配列番号 2 0 )

E R K C S V E E A A A K E A A A K A P P V A G ( 配列番号 2 1 )

E S K Y G P P E A A A K E A A A K A P E F L G G ( 配列番号 2 2 )

E P K S C D K T H T E A A A K E A A A K A P E L L G G ( 配列番号 2 3 )

E L K T P L G D T T H T E A A A K E A A A K A P E F L G G ( 配列番号 2 4 )

10

20

30

40

50

又はこれらのいずれか１つに対して少なくとも約８５％の配列同一性を有する配列のうちの１つ以上を含むペプチド領域を含む。

【００５０】

好ましくは、本発明の多価抗体は、配列番号１～２４のいずれか１つのアミノ酸配列、又は配列番号１～２４のいずれかに対して少なくとも約８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むことにより、ベース抗体部分を１つ以上の結合ドメインに接続するリンカーを含む。

【００５１】

表１は、かかるリンカーがどのようにＣＨ１領域に接続され得るかを示す。

【００５２】

本発明の好ましい多価抗体は、剛性であるリンカーを含む。より好ましくは、該多価抗体は、らせん形成配列を含むリンカーを含む。

【００５３】

本発明の好ましい多価抗体は、（ＥＡＡＫ）<sub>２</sub>モチーフを含むペプチド配列を含むリンカーを含む。

【００５４】

本発明の好ましい多価抗体は、柔軟であるリンカーを含む。

【００５５】

本発明の好ましい多価抗体は、該多価抗体が接続している定常領域のサブタイプのヒンジ領域に対応する、３つ以上のアミノ酸残基を含むリンカーを含む。

【００５６】

本発明の好ましい多価抗体は、該多価抗体が接続している定常領域のサブタイプのヒンジ領域に対応する、配列番号１～２４の配列を含むリンカーを含む。

【００５７】

リンカー位置／配向

好ましい実施形態は多価抗体であり、ベース抗体部分が、リンカーによって１つ以上の追加の結合ドメインに接続され、該リンカーが、該ベース抗体部分の可変領域のＮ末端を、１つ以上の追加の結合ドメインのＣ末端に接合する。好ましくは、ベース抗体部分は、Ｆａｂドメインを含み、１つ以上の追加の結合ドメインは、ＣＨ１ドメイン及びＣＬドメインを含むＦａｂドメインを含み、リンカーは、ベース抗体部分のＦａｂの可変領域のＮ末端を１つ以上の追加の結合ドメインのＦａｂドメインのＣＨ１ドメイン及びＣＬドメインのＣ末端のいずれか若しくは両方に接続する。

【００５８】

本発明の好ましい実施形態は、ベース抗体部分の各結合ドメインに、及び１つ以上の追加の結合ドメインのそれぞれに共通鎖と、ベース抗体部分の再構成可変領域のＮ末端を１つ以上の追加の結合ドメインの再構成可変領域のＣ末端に接続するリンカーと、を含む多価抗体である。より好ましくは、１つ以上の追加の結合ドメインは、ＣＨ１ドメイン及びＣＬドメインを含むＦａｂドメインを含み、リンカーは、ベース抗体部分のＦａｂドメインの可変領域のＮ末端を、１つ以上の追加の結合ドメインのＦａｂドメインのＣＨ１ドメイン又はＣＬドメインに接続する。

【００５９】

追加の結合ドメインを含む領域の対合

抗体の組み立ては、ＶＨとＶＬ間、及びＣＨ１とＣＬ間の界面において相互作用する残基に基づいた、軽鎖及び重鎖の会合、すなわちＶＨとＶＬ及びＣＨ１とＣＬの会合（対合）によって生じる。典型的には、対合は、軽鎖が、サブタイプに応じて、ＣＬ内の軽鎖のシステイン残基と、ＣＨ１又はヒンジにおける重鎖のシステイン残基との間のジスルフィド結合によって重鎖に共有結合することにより更に安定化する。

【００６０】

したがって、本発明の多価抗体では、追加の１つ以上の結合ドメイン（複数可）がリンカー（複数可）を介してベース抗体部分に接続され、１つ以上の結合ドメイン（複数可）

10

20

30

40

50



は、F<sub>v</sub>ドメイン、F<sub>a</sub>bドメイン、又は修飾F<sub>a</sub>bドメインを含み、結合ドメイン（通常は、重鎖領域及び軽鎖領域）を含む対応する免疫グロブリン鎖は、安定した会合で一緒に対合する。

【0061】

追加の結合ドメインを含有する本発明の多価抗体の場合、結合ドメインは、F<sub>v</sub>又はF<sub>a</sub>bドメインであり、システイン残基が存在してもよく、又は重鎖及び軽鎖ドメイン内に操作されてもよく、それによりジスルフィド結合が形成されて追加の結合ドメインの重鎖と軽鎖との間の対合を安定化させる。本発明の多価抗体が、IgG1サブクラスを含む追加の結合ドメインを含む場合、(G4S)<sub>n</sub>などの人工リンカーの上流（n末端側）に接続される、重鎖のIgG1（EPKSC）の上部ヒンジを使用して、追加の結合ドメインの軽鎖と共有結合するシステインが提供され得る。追加の結合ドメインにおいて使用される他のサブクラスに関して、当業者であれば、追加の結合ドメインの軽鎖ドメイン及び重鎖ドメインの対合を安定化させ、使用される該軽鎖と重鎖との間にジスルフィド架橋を形成するために用いられるリンカー内のシステイン残基を操作する能力について認識するであろう。

10

【0062】

野生型IgG1ヒンジ領域は、配列：EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG（配列番号42）を有する。下線を付したC残基は、IgG1重鎖におけるCys220であり、軽鎖のCys214と対合する。本発明の多価抗体が、かかるヒンジに基づくリンカーを含む場合、好ましくは、Cys220以外の任意のCys残基は、ジスルフィド結合を形成することができないアミノ酸残基、例えばSerで置換される。

20

【0063】

野生型IgG2ヒンジ領域は、配列：ERKCCVCCPPCPAPPVAG（配列番号46）を有する。下線を付したC残基は、軽鎖のCys214と対合するIgG2-B重鎖においてCys219である。IgG2-Aにおいては、重鎖のCys127はCys214と対合する。本発明の多価抗体が、かかるヒンジに基づくリンカーを含む場合、好ましくは、Cys215以外の任意のCys残基は、ジスルフィド結合を形成することができないアミノ酸残基、例えばSerで置換される。

【0064】

野生型IgG3ヒンジ領域は、配列：ELKTPLGDTTHTCPRCPPEPKSCDTPPPCPRCPPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFLGG（配列番号50）を有する。IgG3においては、重鎖のCys131は軽鎖のCys214と対合する。

30

【0065】

IgG4ヒンジ領域は、配列：ESKYGPSPCPCPAPEFLGG（配列番号54）を有する。IgG4においては、重鎖のCys131は軽鎖のCys214と対合する。本発明の多価抗体が、かかるヒンジに基づくリンカーを含む場合、好ましくはヒンジのCPSPC領域内のCys残基のうちの1つ又は両方が、ジスルフィド結合を形成することができないアミノ酸残基、例えばSerで置換される。

【0066】

本明細書に記載されるように、3つの異なるエピトープに同時に結合することができるIgG構造に基づいて、三価構築物を含む多価構築物を生成するために、リンカーは、異なるサブクラスのIgGヒンジに基づいて使用され、ベース抗体部分の結合ドメインを、重鎖定常領域を含む追加の結合ドメインに接続する。追加の結合ドメインの軽鎖のシステインと重鎖のシステインの間の共有結合の安定化を確実にするために、本発明は、ヒンジ領域を含むか、又は特定のサブタイプのヒンジ領域に基づくリンカーを、同じサブタイプに由来する追加の結合ドメインのCH1と一致させる。

40

【0067】

多価抗体が、対合する領域（例えば、VH-CH1とVL-CLの対合、又はVHとVLの対合）からなる追加の結合ドメインを含む場合、領域間の界面を安定化させることは

50

、本発明において様々な方法で達成され得る。1つ以上の追加の結合ドメインが、可変重鎖領域及び可変軽鎖領域からなるF a bドメインである場合、C H 1は、可変重鎖領域に接続され得る。C H 1は、共有結合、典型的には、可変軽鎖領域に接続されたジスルフィド架橋でC Lと対合することができる。加えて、F a bドメインの重鎖及び軽鎖は、非共有相互作用を介して対合している。あるいは、1つ以上の追加の結合ドメインをベース抗体部分に結合するリンカーを更に使用して、いずれかの鎖とのペプチド結合、及び対応する鎖との共有結合を形成することにより、可変重鎖領域を追加の結合ドメインの可変軽鎖領域に対合することができる。これは、リンカーのN末端の、又はその付近にシステインを、並びに1つ以上の追加の結合ドメインの可変重鎖及び/又は可変軽鎖領域のC末端の、又はその付近にシステインを設計することによって達成することができ、これにより、リンカーと、1つ以上の追加の結合ドメインの可変重鎖及び/又は可変軽鎖領域との間に共有結合が形成される。F a bドメインなどの1つ以上の追加の結合ドメインを含むドメインを対合する他の手段は、当業者に既知であり、以下に更に詳細に記載される。

10

#### 【0068】

好ましい実施形態は多価抗体であり、ベース抗体部分及び1つ以上の追加の結合ドメインを含む。1つ以上の追加の結合ドメインが、重鎖可変(V H)領域及び軽鎖可変(V L)領域を含むF vドメインである場合、本発明のリンカーは、該F vの重鎖可変領域と軽鎖可変領域と対合しながら、ベース抗体部分をF vに接続する。

#### 【0069】

あるいは、結合ドメインは、C H 1領域を含む可変重鎖領域と、C L領域を含む可変軽鎖領域とを含むF a bドメインである。本発明のリンカーは、F a bドメインのC H 1及びC L領域を対合しながら、ベース抗体部分をC H 1領域又はC L領域又はその両方でF a bドメインに接続する。

20

#### 【0070】

ベース抗体部分の対合

ベース抗体部分の重鎖定常領域(例えば、C H 2及びC H 3)を対合する、及びそれらのヘテロ二量体化を引き起こす、異なる技術が当該技術分野において既知である。例えば、抗体重鎖のヘテロ二量体化を引き起こすためのD E K K変異の使用(参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013/157954及びDe Nardis et al., J. Biol. Chem. (2017) 292(35) 14706-14717)により、効率的なヘテロ二量体形成、安定なF c領域、及び製造の容易さが更に可能となる。このアプローチにより、分子のF c領域を機能させ、F c受容体、補体、及びF c R nなどの免疫受容体と関与することができる。したがって、本発明の特定の多価抗体の実施形態は、当業者に既知であるD E K K修飾、又は他のF c修飾を用いて、ベース抗体部分の重鎖を優先的にヘテロ二量体化する。

30

#### 【0071】

更に、多価抗体の特定の実施形態では、例えば、T細胞を関与、刺激、及び/又は共刺激するために多価抗体を使用して、免疫系のエフェクター機能に関与しないことが望ましい場合があり(例えば、抗体依存性細胞傷害、抗体媒介性食作用、及び/又は細胞依存性細胞傷害を制限するため)、その場合には、エフェクター機能を排除又は軽減するために、F c領域に追加の修飾を用いる場合がある。したがって、本発明の特定の多価抗体の実施形態は、エフェクター機能(複数可)を排除又は軽減する、ベース抗体部分の重鎖定常領域に対する修飾を含有する。

40

#### 【0072】

本発明の更なる好ましい実施形態は、C H 2又はC H 3領域を欠く2つの重鎖からなるベース抗体部分を含む多価抗体であり、該重鎖は、ヒンジ領域において一緒に結合される。

#### 【0073】

本発明はまた、多価抗体の調製方法を提供し、この方法は、本発明の多価抗体に組み立てることができるポリペプチドをコードする1つ以上の核酸配列を含む細胞を提供することを含む。細胞は、ベース抗体部分、少なくとも1つの追加の結合ドメイン、及び少なく

50

とも1つのリンカーの発現、及び本発明の多価抗体へのそれらの組み立てを提供するための条件下で、培養され得る。

【0074】

本発明はまた、本発明の多価抗体の構成タンパク質をコードする核酸及びそれらが産生する多価抗体も提供する。

【0075】

本発明はまた、本発明の核酸配列を含むベクターも提供する。

【0076】

本発明はまた、核酸を発現し、該多価抗体を産生する宿主細胞も提供する。

【0077】

本発明はまた、同族鎖に多様性を有する共通鎖抗体を産生する、その生殖細胞系に共通鎖を含むトランスジェニック動物の使用によるものを含む、該多価抗体を生成する方法を提供し、該多価抗体は、抗原に曝露されたトランスジェニック動物によって発現される共通鎖抗体の1つ以上の同族鎖から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づく核酸によってコードされる再構成可変領域を有する1つ以上の結合ドメインを含む。

【0078】

本発明はまた、多様なヒト重鎖可変領域と対合することができる共通ヒト軽鎖可変領域を含む非ヒトトランスジェニック動物を提供し、該共通軽鎖可変領域及びヒト重鎖可変領域をコードする核酸は、非ヒトトランスジェニック動物の内因性可変領域遺伝子座に存在する（それぞれ軽鎖及び重鎖、又はその逆）、及び／又は該トランスジェニック動物の生殖細胞系の他の場所に安定して組み込まれ（例えば、Rosa遺伝子座）、該トランスジェニック動物を抗原と接触させることにより、共通軽鎖可変領域と対合する一連の再構成ヒト重鎖可変領域が生成され、該再構成ヒト重鎖可変領域をコードする核酸は、本発明の多価抗体を産生することができる宿主細胞に形質転換され、該多価抗体は、抗原に曝露されたトランスジェニック動物によって産生された1つ以上の再構成ヒト重鎖可変領域から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づいた核酸によってコードされた該再構成ヒト重鎖可変領域を含む1つ以上の結合ドメインを含む。

【0079】

本発明はまた、本発明の抗体と、薬学的に許容される担体及び／又は希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0080】

本発明はまた、治療によってヒト又は動物の身体の処置に使用するための本発明の抗体も提供する。

本発明はまた、医学的適応症に罹患しているヒト又は動物を処置するための方法も提供し、該方法は、ヒト又は動物に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。

【0081】

参照しやすいように、図15～図28では、三重特異性分子を説明する場合に、次のフォーマット：MFA×MFB：MFC又は抗原A×抗原B：抗原Cが使用されており、その結果、×が続くMFA又は抗原Aは「短腕」を構成し、その際×は二量体化を示し、続いてMFB又は抗原Bが、長腕の内部の位置を説明し、続いて「：」がリンカーを示し、続いてMFC又は抗原Cが、長腕の遠位ドメインにあるMFC又は抗原Cを示す。用語「モック」は、多価分子の文脈において使用される場合、それが試験される所与のアクセシビリティ中に存在しない抗原に結合することができる、かかる分子の結合ドメインを指す。典型的には、本明細書で使用されるモック結合ドメインは、破傷風毒素（TT）、フィブリノーゲン（Fibrin）、又はサイログロブリン（Thyro）に結合する。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1a】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図1b】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多

10

20

30

40

50

価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 c】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 d】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 e】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 f】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 g】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

10

【図 1 h】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 i】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 j】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 k】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 l】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

20

【図 1 m】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 n】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 o】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 p】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 q】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

30

【図 1 r】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 s】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 t】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 1 u】異なる結合ドメイン構造、リンカー、及びベース抗体部分を含む、本発明の多価抗体のフォーマットについて示す。

【図 2 a】ベクター M V 1 6 2 6 内の構築物をクローニングするために使用される V H 1 - C H 1 - リンカー - V H 2 インサートの概略図を示す。図示されていないが、ベクターはまた、V H 2 に接続された C H 3 - C H 2 - C H 1 領域をコードし得ることが理解される。

40

【図 2 b】V H 1 が破傷風トキソイド抗原に結合し、V H 2 がフィブリノーゲン抗原に結合し、V H 3 がサイログロブリン抗原に結合する、三重特異性抗体を示す。

【図 3】M V 1 6 2 6 ベクターの概略図を示す。

【図 4】M G 1 0 2 5 C 3 7 7 発現ベクターの概略図を示す。

【図 5】M V 1 6 2 6 にクローニングするために使用されるインサートの配列のアラインメントを示す。アラインメントは、明確にする目的で、C H 1 - リンカーのみを網羅することに留意されたい。

50

【図 6】MV 1 0 5 7 ベクターの概略図を示す。

【図 7】MV 1 2 6 0 ベクターの概略図を示す。

【図 8】非還元（上）及び還元（下）条件における I g G の S D S - P A G E ゲルを示す。

【図 9】2 4 の多価構築物のスクリーニングデータを示す。

【図 1 0】1 8 の多価構築物のスクリーニングデータを示す。

【図 1 1 A】共通軽鎖アミノ酸配列である。

【図 1 1 B】共通軽鎖可変ドメインの D N A 配列及び翻訳したものである（I G K V 1 - 3 9 / j k 1）。

【図 1 1 C】共通軽鎖定常領域の D N A 配列及び翻訳したものである。

【図 1 1 D】I G K V 1 - 3 9 / j k 5 共通軽鎖可変ドメインの翻訳したものである。

【図 1 1 E】V 領域 I G K V 1 - 3 9 A である。

【図 1 1 F】共通軽鎖の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 である。

【図 1 2】4 つの異なる条件下で分析された、1 8 個の多価 I g G 構築物及び 4 個の対照抗体の安定性分析である。

【図 1 3】8 つのリンカーのバイオインフォマティクスモデリングである。

【図 1 4】長腕内部免疫細胞結合ドメイン及び短腕腫瘍細胞抗原結合ドメイン（1 4 a）又は長腕遠位腫瘍細胞抗原結合ドメイン及び短腕腫瘍細胞抗原結合ドメイン（1 4 b）を有する、2 つのエンゲージャー三重特異性フォーマットである。

【図 1 5 a】短腕上の E G F R（図 1 5 a において E G F R x C D 3 : T T）のフォーマットの読み取り値として、C D 2 5 及び C D 6 9 の発現を伴うフローサイトメトリーによる B x P C 3 細胞における T 細胞活性化（E G F R 発現の中央値）である。二重特異性抗体（E G F R x C D 3）は、陽性対照として使用される。

【図 1 5 b】長腕上の E G F R（図 1 5 b において T h y r o x C D 3 : E G F R）のフォーマットの読み取り値として、C D 2 5 及び C D 6 9 の発現を伴うフローサイトメトリーによる B x P C 3 細胞における T 細胞活性化（E G F R 発現の中央値）である。二重特異性抗体（E G F R x C D 3）は、陽性対照として使用される。

【図 1 6 a】H C T 1 1 6 細胞における T 細胞の細胞傷害（E G F R 発現の中央値）を、E G F R x C D 3 : T T（図 1 6 a）について C e l l T i t e r G l o によって評価された A T P レベルを測定することによって求めた。E n v i s i o n マイクロプレートリーダー上の発光によって測定された上のグラフの A T P レベルは、G r a p h P a d P r i s m を用いて分析された相対発光量（R L U）値を示し、下のグラフは、次の式：殺傷率 =  $(100 - (\text{試料の R L U} / \text{I g G なし R L U}) \times 100)$  に基づく殺傷率と関連している。

【図 1 6 b】T h y r o x C D 3 : E G F R（図 1 6 b）の両方について C e l l T i t e r G l o によって評価された A T P レベルを測定することによって求めた。E n v i s i o n マイクロプレートリーダー上の発光によって測定された上のグラフの A T P レベルは、G r a p h P a d P r i s m を用いて分析された相対発光量（R L U）値を示し、下のグラフは、次の式：殺傷率 =  $(100 - (\text{試料の R L U} / \text{I g G なし R L U}) \times 100)$  に基づく殺傷率と関連している。

【図 1 7 a】H C T 1 1 6 細胞における T 細胞の細胞傷害に対するリンカーの効果である（図 1 7 a）。

【図 1 7 b】様々なリンカーにおける標的細胞溶解対サイトカイン放出の比較を、I L - 2（図 1 7 b）について実証した。

【図 1 7 c】様々なリンカーにおける標的細胞溶解対サイトカイン放出の比較を、I F N - g（図 1 7 c）について実証した。

【図 1 7 d】様々なリンカーにおける標的細胞溶解対サイトカイン放出の比較を、T N F - A（図 1 7 d）について実証した。

【図 1 8】C D 3 結合ドメインが短腕上に位置する C D 3 x P D - L 1 : E G F R 三重特異性 T 細胞エンゲージャー分子の構成である。

【図 1 9】C D 3 結合ドメインが長腕の内部領域に位置する E G F R x C D 3 : P D - L

10

20

30

40

50

1 三重特異性 T 細胞エンゲージャー分子の構成である。

【図 2 0】C D 3 結合ドメイン及び 2 つの腫瘍細胞抗原結合ドメインを組み合わせた三重特異性分子を、1 つの腫瘍細胞抗原結合ドメイン、モックドメイン、及び C D 3 結合ドメインを有する三重特異性対照、及び上記の陽性対照と比較して、T 細胞の細胞傷害活性データが M D A - M B - 2 3 1 細胞に対して提供された。

【図 2 1】C D 3 結合ドメイン及び 2 つの腫瘍細胞抗原結合ドメインを組み合わせた三重特異性分子と、1 つの腫瘍細胞抗原結合ドメイン、モックドメイン、及び C D 3 結合ドメインを有する三重特異性対照と比較した、T 細胞の細胞傷害活性データが M D A - M B - 2 3 1 細胞に対して提供され、該三重特異性分子は、E G F R 及び P D - L 1 を標的とするための親和性の範囲を含む腫瘍細胞抗原結合ドメインを含む。

10

【図 2 2】C D 3 結合ドメイン及び 2 つの腫瘍細胞抗原結合ドメインを組み合わせた三重特異性分子と、1 つの腫瘍細胞抗原結合ドメイン、モックドメイン、及び C D 3 結合ドメインを有する三重特異性対照と比較した、T 細胞の細胞傷害活性データが H C T 1 1 6 細胞に対して提供され、該三重特異性分子は、E G F R 及び P D - L 1 を標的とするための親和性の範囲を含む腫瘍細胞抗原結合ドメインを含む。

【図 2 3 a】M D A - M B - 2 3 1 細胞に対する F A C S データは、P D - L 1 親和性の範囲と E G F R 親和性の範囲の曲線下面積 (A U C) として示され、腫瘍抗原結合ドメインの親和性の増加と相関する二重抗原結合を示す。

【図 2 3 b】T 細胞の細胞傷害性活性データは、B x P C 3 細胞に対して提供され、C D 3 x P D - L 1 : E G F R のフォーマットを有する特定の三重特異性分子を示す。単一抗原及び C D 3 に結合する分子 (C D 3 x E G F R : モック又は C D 3 x モック : P D - L 1 のいずれか) への細胞傷害に対する相加作用により、同時の二重抗原結合及び免疫細胞関与が生じた。特定の重鎖配列は示されていない。

20

【図 2 4】C D 3 結合ドメインが長腕の遠位領域に位置する E G F R x フィブリノーゲン : C D 3 三重特異性 T 細胞エンゲージャー分子の構成である。

【図 2 5】T 細胞活性化データは H T 2 9 細胞に対して提供され、図 1 5 で使用されている陽性対照 E G F R x C D 3 二重特異性抗体と比較して、異なる C D 3 結合ドメインを使用した様々な E G F R x フィブリノーゲン : C D 3 三重特異性 T 細胞エンゲージャー分子による T 細胞活性化を示す。

【図 2 6】同じ E G F R 結合ドメイン (M F 9 8 9 1) を有する E G F R x C D 3 : E G F R 二重特異性三価分子の構成である。

30

【図 2 7】H C T 1 1 6 細胞の T 細胞活性化活性を、同じ E G F R 結合ドメイン (M F 9 8 9 1) と様々なリンカーを有する異なるスーパークラスターの異なる C D 3 結合ドメインを有する一連の二重特異性三価 E G F R x C D 3 : E G F R 分子について測定した。

【図 2 8】M D A - M B - 2 3 1 細胞の T 細胞活性化活性を、同じ E G F R 結合ドメイン (M F 9 8 9 1) と様々なリンカーを有する様々なスーパークラスターの異なる C D 3 結合ドメインを有する一連の二重特異性三価 E G F R x C D 3 : E G F R 分子について測定した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 8 3】

40

「抗体」は、抗原上のエピトープに結合する 1 つ以上のドメインを含有するタンパク質の免疫グロブリンクラスに属するタンパク質分子を意味し、かかるドメインは、抗体の可変領域に由来するか又は配列相同性を共有する。抗体結合は、特異性及び親和性を含む異なる性質を有する。特異性は、どの抗原又はそのエピトープが結合ドメインによって特異的に結合されているかを判定する。親和性は、特定の抗原又はエピトープへの結合の強度についての尺度である。本明細書では、抗体の「特異性」は、特定の抗原に対するその選択性を指し、「親和性」は、抗体の抗原結合部位とそれが結合するエピトープとの間の相互作用の強度を指すことに注意しておくといよい。

【0 0 8 4】

したがって、本明細書で使用する場合、「結合特異性」は、抗原決定基と反応する個々

50

の抗体結合部位の能力を指す。典型的には、本発明の抗体の結合部位は、F a b ドメインに位置し、重鎖及び／又は軽鎖の超可変領域から構築される。

【0085】

「親和性」は、単一抗原結合部位とその抗原との間の相互作用の強度である。抗原に対する本発明の抗体の単一抗原結合部位は、解離定数（K D）で表すことができる。典型的には、治療用途のための抗体は、最大  $1 \times 10^{-10}$  M 又は更により高い親和性を有し得る。

【0086】

「抗原」は、宿主生物において（抗体を産生するために）免疫応答を誘導することができる、及び／又は抗体によって標的化されることができる分子である。分子レベルにおいて、抗原は、抗体の抗原結合部位によって結合される能力を特徴とする。また、抗原の混合物は「抗原」とみなすことができ、すなわち、当業者であれば、時には腫瘍細胞の溶解物、又はウイルス粒子が「抗原」として示されてもよく、その一方で、かかる腫瘍細胞溶解物又はウイルス粒子の調製は、多くの抗原決定基が存在することを認識するであろう。抗原は、少なくとも1つ、多くの場合、より多くのエピトープを含む。

【0087】

「エピトープ」又は「抗原決定基」は、免疫グロブリン又は抗体が特異的に結合する抗原上の部位である。エピトープは、タンパク質の3次フォールディング（それぞれ、いわゆる直鎖及び立体構造エピトープ）によって並置された連続アミノ酸又は非連続アミノ酸から形成することができる。連続的な直鎖アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒に曝露されて保持される一方で、3次フォールディングにより形成されるエピトープは、構造が、典型的には、変性溶媒による処理で失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的コンフォメーションにおいて3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のアミノ酸を含んでもよい。

【0088】

用語「重鎖」又は「免疫グロブリン重鎖」は、任意の生物の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含み、特に明記されない限り、重鎖可変ドメインを含む。重鎖可変ドメインという用語は、特に明記されない限り、3つの重鎖C D R 及び4つのF R 領域を含む。重鎖の断片としては、C D R、C D R 及びF R、並びにこれらの組み合わせが挙げられる。典型的な重鎖は、可変ドメイン（N末端からC末端へ）、C H 1 ドメイン、ヒンジ、C H 2 ドメイン、及びC H 3 ドメインを有する。重鎖の機能的断片は、抗原を特異的に認識することができ、少なくとも1つのC D Rを含む断片を含む。

【0089】

用語「軽鎖」は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、又はV<sub>L</sub>（又はその機能的断片）、及び免疫グロブリン定常ドメイン、又は任意の生物からのC<sub>L</sub>（又はその機能的断片）配列を含む。特に明記されない限り、用語「軽鎖」は、ヒトのカッパ、ラムダ、及びこれらの組み合わせから選択される軽鎖を含み得る。軽鎖可変（V<sub>L</sub>）ドメインは、典型的には、特に明記されない限り、3つの軽鎖C D R 及び4つのフレームワーク（F R）領域を含む。概して、全長軽鎖は、N末端からC末端に、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4を含むV<sub>L</sub>ドメイン、及び軽鎖定常ドメインを含む。本発明で 사용할ことができる軽鎖としては、例えば、重鎖によって選択的に結合したエピトープに選択的に結合しないものが挙げられる。

【0090】

多価抗体の発明での使用に適した軽鎖には、既存の抗体ライブラリー（ウェットライブラリー又はi n s i l i c o）で最も一般的に使用される軽鎖をスクリーニングすることにより同定できるものなどの共通軽鎖が含まれ、該軽鎖は、重鎖のエピトープ結合ドメインの親和性及び／又は選択性を実質的に阻害しないが、一連の重鎖と対合するのにも適している。例えば、好適な軽鎖は、そのゲノムに組み込まれた共通軽鎖を含むトランスジェニックげっ歯類などのトランスジェニック動物由来のものを含み、これは、抗原への曝露時に重鎖に多様性を有する共通軽鎖抗体の大きなパネルを生成するために使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 1 】

本発明による用語「共通軽鎖」は、同一であり得る、又はいくつかのアミノ酸配列の違いを有し得る軽鎖を指し、本発明の抗体の結合特異性は影響を受けない、すなわち、その違いは機能的結合領域の形成に実質的に影響を与えない。

## 【 0 0 9 2 】

例えば、本明細書において使用される共通鎖の定義の範囲内で、同一ではないが機能的に同等である可変鎖を調製又は発見することが可能である（例えば、保存的アミノ酸変化、同族鎖と対合する場合に結合特異性に寄与しないか、又は部分的にのみ寄与する領域におけるアミノ酸の変化などを導入及び試験することにより）。したがって、かかる変異体は、異なる同族鎖を結合し、機能的抗原結合ドメインを形成することも可能である。したがって、本明細書において使用する場合、用語「共通軽鎖」は、重鎖との対合後に得られる抗体の結合特異性を保持しながら、同一であり得る又はいくつかのアミノ酸配列の差異を有し得る軽鎖を指す。特定の共通軽鎖とかかる機能的に同等である変異体との組み合わせは、用語「共通軽鎖」に包含される。

10

## 【 0 0 9 3 】

「Fvドメイン」は、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む結合ドメインを意味する。

## 【 0 0 9 4 】

「Fabドメイン」は、可変領域を含む結合ドメイン、典型的には、対合する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む結合ドメインを意味する。Fabドメインは、定常軽ドメイン（CL）及びVLドメインと対合するCH1及びVHドメインを含む、定常領域ドメインを含み得る。かかる対合は、例えば、CH1ドメイン及びCLドメインにおいてジスルフィド架橋を介した共有結合として行ってもよい。

20

## 【 0 0 9 5 】

「修飾Fabドメイン」は、CH1及びVHドメインを含む結合ドメインを意味し、VHはVLドメインと対合し、CLドメインは存在しない。あるいは、修飾Fabドメインは、CLドメイン及びVLドメインを含む結合ドメインであり、VLはVHドメインと対合しており、CH1ドメインは存在しない。CH1又はCL領域が対合していない形態で存在し得るように、疎水性の領域の長さを除去又は低減することが必要であり得る。一本鎖抗体を自然に発現する動物の種、例えば、ラマ若しくはラクダなどのラクダ科動物、又はサメのCH1領域を使用してもよい。修飾Fabドメインの他の例としては、その同族領域及び/又は可変領域VH又はVLと対合していない定常領域CH1又はCLが存在し、これはその同族領域と対合するものではない。

30

## 【 0 0 9 6 】

本明細書において使用する場合、用語「免疫エフェクター細胞」又は「エフェクター細胞」は、標的細胞の生存力に影響を及ぼすように活性化され得る、哺乳類免疫系内の細胞の自然なレパートリー内の細胞を指す。免疫エフェクター細胞は、リンパ系細胞、例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性T細胞を含むT細胞、又はB細胞を含むが、骨髄系細胞もまた、免疫エフェクター細胞、例えば、単球又はマクロファージ、樹状細胞、及び好中球顆粒球と見なすことができる。したがって、該エフェクター細胞は、好ましくは、NK細胞、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、又は好中球顆粒球である。

40

## 【 0 0 9 7 】

本明細書における核酸又はアミノ酸配列について言及する場合、「パーセント（%）同一性」は、最適な比較目的のために配列をアラインメントした後、選択された配列中の残基と同一である候補配列中の残基の割合として定義される。2つの配列間のアラインメントを最適化するために、比較される2つの配列のいずれかにギャップが導入され得る。かかるアラインメントは、比較される配列の全長にわたって実施することができる。あるいは、アラインメントは、より短い長さ、例えば約20、約50、約100以上の核酸/ベース又はアミノ酸にわたって実施されてもよい。配列同一性は、報告されたアラインメン

50



ト領域にわたる2つの配列間における同一一致の割合である。

【0098】

配列の比較、及び2つの配列間の配列同一性の割合の測定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。当業者であれば、2つの配列をアラインメントさせ、2つの配列間の同一性を測定するために、いくつかの異なるコンピュータプログラムが利用可能であるという事実を認識するであろう (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley)。2つのアミノ酸配列又は核酸配列間のパーセント配列同一性は、2つの配列のアラインメントのためのNeedleman及びWunschアルゴリズムを使用して求めることができる。(Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453)。Needleman-Wunschアルゴリズムは、コンピュータプログラムNEEDLEに実装される。本発明の目的のために、EMBOS SパッケージのNEEDLEプログラムを使用して、アミノ酸及び核酸配列のパーセント同一性を求める(2.8.0バージョン又はそれ以上, EMBOS S: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>)。タンパク質配列については、EBL O S U M 6 2 が置換マトリックスに使用される。DNA配列の場合、DNA F U L L が使用される。使用されるパラメータは、10のギャップオープンペナルティ及び0.5のギャップ伸長ペナルティである。

【0099】

上述のようなNEEDLEプログラムによるアラインメント後、クエリ配列と本発明の配列間の配列同一性の割合は、以下のように計算される：アラインメントのギャップの総数を差し引いた後、両方の配列の同一のアミノ酸又は同一のヌクレオチドを示すアラインメントの対応する位置の数を、アラインメントの全長で除算する。

【0100】

本明細書において、用語「接続された」は、一次アミノ酸配列においてペプチド結合によって互いに接合されるドメインを指す。例えば、VH-CH1-CH2-CH3を含むベース抗体部分の重鎖は、追加の結合ドメインVH-CH1(又は追加の結合ドメインに対する追加の結合ドメイン)の重鎖に、リンカーを介して接続され得(CH1で追加の結合ドメインの重鎖をベース抗体部分のVH領域に接続する)、これは一緒に1つのポリペプチド鎖を構成する。同様に、CH1ドメインは可変重領域に接続されてもよく、CLドメインは可変軽領域に接続されてもよい。

【0101】

「対合」とは、本発明の多価抗体を構成するポリペプチド間において、これらが多量体化することができるような相互作用を指す。例えば、追加の結合ドメインは、軽鎖領域(VL-CL)と対合した重鎖領域(VH-CH1)を含んでもよく、CH1及びCLは対合して該結合ドメインを形成する。本明細書に記載されるように、抗体ドメイン(例えば、重鎖及び軽鎖)の対合は、非共有相互作用により、またジスルフィド結合を介して生じ、本明細書に開示される技術及び当該技術分野において既知の方法によって操作することができる。

【0102】

本明細書及び添付の特許請求の範囲を通して、「含む(comprise)」、「含む(include)」、及び「有する(having)」という単語、並びに「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む(includes)」、及び「含む(including)」などの変形は、包括的に解釈されるべきであ

る。すなわち、これらの単語は、文脈によって許される場合、具体的に列挙されていない他の要素又は整数の可能な包含を伝えることを意図している。

【0103】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書では、2つ以上の（すなわち、1つ又は少なくとも1つ）文法的対象の物品を指すために使用される。一例として、「要素」は、1つの要素又は2つ以上の要素を意味し得る。

【0104】

本発明は、  
2つの結合ドメインを含むベース抗体部分と、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインと、を含む多価抗体を提供し、  
該ベース抗体部分は、リンカーによって少なくとも1つの追加の結合ドメインに接続され、

10

該ベース抗体部分の各結合ドメイン及び該少なくとも1つの追加の結合ドメインのそれぞれは全て、共通可変領域を有し、

該リンカーは、ヒンジ配列、又はヒンジ配列に由来する配列を含む。

【0105】

本発明はまた、  
2つの結合ドメインを含むベース抗体部分と、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインと、を含む多価抗体を提供し、  
少なくとも1つの追加の結合ドメインは、C H 1領域を含み、該リンカーによって該ベース抗体部分に接続されて、該ベース抗体部分の可変領域及び該C H 1領域を連結し、  
該多価抗体は、少なくとも3つの異なるエピトープに結合する。

20

【0106】

かかる多価抗体では、ベース抗体部分の各結合ドメイン及び少なくとも1つの追加の結合ドメインのそれぞれは全て、共通可変領域を有してもよい。

【0107】

したがって、本発明は、典型的には、少なくとも3つの結合ドメインを介して標的又は複数の標的に結合することが可能な多価抗体を提供する（すなわち、抗体は多価抗体である）。多価抗体は、任意に多重特異性抗体であり得る。すなわち、本発明の抗体は、2つ以上の異なるエピトープ又は2つ以上の異なる抗原、例えば、2つ、3つ、4つ、又はそれ以上の異なるエピトープ又は抗原に結合することができる。

30

【0108】

多価抗体の異なるフォーマット

本発明の他の特徴及び態様は、例として本発明の実施形態による特徴を示した添付の図面と合わせて詳細な説明から明らかになることに留意されたい。図面は例示的なものであり、特許請求の範囲及び完全な範囲の詳細な開示によって定義される本発明の範囲を限定することを意図したり、限定したりするものではなく、本明細書に記載された発明を説明し、可能にする。本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び追加の結合ドメイン、好ましくはV L - C L領域と対合するV H - C H 1領域を含むF a bドメインを含み得る。該多価抗体は、3つのV H領域、及び3つのV L領域を含む。V H又はV Lのいずれかは、同族鎖の再構成可変領域と対合する共通可変領域（V H c又はV L c）であり得る。例えば、3つのV L領域は、共通鎖（V L c）であってもよく、各V H領域（V H 1 ~ V H 3）は、再構成可変領域を含んでもよく、該V H 1、V H 2、及びV H 3領域は、同じエピトープ又は3つの異なるエピトープに結合してもよい。多価抗体は、共通軽鎖（V L c）及び3つの重鎖可変領域（V H 1 ~ V H 3）を含み、V L c - C Lと対合したV H 3 - C H 1からなる追加のF a bドメインは、ベース抗体部分のV H 1又はV H 2領域と追加のF a bドメインのC H 1との間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体に接続されてもよい。例えば、図1 aを参照のこと。

40

【0109】

あるいは、追加のF a bドメインは、ベース抗体の共通軽鎖領域（V L c）と追加のF

50

a b ドメインの C L 領域との間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体に接続されてもよい。例えば、図 1 b を参照のこと。本発明の別の態様では、3 つの V H 領域は、共通鎖 ( V H c ) であってもよく、各 V L 領域は、再構成可変領域を含んでもよく、該 3 つの V L 領域は、同じ又は異なるエピトープ ( V L 1 ~ V L 3 ) に結合してもよい。多価抗体は、共通重鎖 ( V H c ) 及び 3 つの軽鎖可変領域 ( V L 1 ~ V L 3 ) を含み、追加の F a b ドメインは、ベース抗体部分の V L 1 又は V L 2 領域と追加の F a b ドメインの C L との間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体に接続されてもよい。例えば、図 1 c を参照のこと。あるいは、追加の F a b ドメインは、ベース抗体の共通重鎖領域 ( V H c ) と追加の F a b ドメインの C H 1 領域との間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体に接続されてもよい。例えば、図 1 d を参照のこと。

10

#### 【 0 1 1 0 】

あるいは、追加の F a b ドメインは、共通鎖が重鎖であるか軽鎖であるかにかかわらず、ベース抗体の重可変領域及び軽可変領域の両方と、追加の F a b ドメインの C H 1 及び C L 領域の間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体に接続されてもよい。例えば、図 1 e を参照のこと。

#### 【 0 1 1 1 】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び 2 つ以上の追加の結合ドメイン、例えば 2 つの F a b ドメインを含み得る。該多価抗体の V H 又は V L 領域のいずれかは、同一又は異なる抗原又はエピトープに結合する再構成可変領域を含む同族鎖 (例えば、V H c 及び V L 1 ~ V L 4、又は V H 1 ~ V H 4 及び V L c) を有する共通可変領域 (例えば、V H c 又は V L c) であり得る。追加の F a b ドメインは、ベース抗体部分の共通鎖 (V H c 又は V L c) と追加の F a b ドメインの共通可変領域のそれぞれの定常領域との間、又はベース抗体の再構成可変ドメイン (V H 1 及び V H 2、又は V L 1 及び V L 2) と追加の F a b ドメインの再構成可変ドメインのそれぞれの定常領域との間に位置するリンカーを介してベース抗体部分に接続されてもよい。例えば、図 1 f は、ベース抗体及び 2 つの追加の F a b ドメインを含む本発明の多価抗体を示し、抗体は、共通軽鎖 (V L c) 及び 4 つの重鎖可変領域 (V H 1 ~ V H 4) を含み、リンカーは、ベース抗体の再構成重鎖可変領域 (V H 2 及び V H 3) 及び追加の F a b ドメインの C H 1 領域において、ベース抗体を追加の F a b ドメインに接続する。あるいは、図 1 g は、本発明の多価抗体を示し、該ベース抗体は、第 1 の追加の F a b ドメインの C H 1 領域に対する第 1 の再構成重鎖領域 (V H 2) で 2 つの追加の F a b ドメインに接続され、第 2 の追加の F a b ドメインの C L 領域にベース抗体の共通軽鎖可変領域 (V L c) が接続される。あるいは、図 1 h は、本発明の多価抗体を示し、該ベース抗体は、ベース抗体の両方の共通軽鎖領域 (V L c) を 2 つの追加の F a b ドメインの C L 領域に接続するリンカーを介して、2 つの追加の F a b ドメインに接続される。あるいは、図 1 j は、本発明の多価抗体を示し、該ベース抗体は、ベース抗体の再構成重鎖可変領域 (V H 3) 及び共通軽鎖領域 (V L c) の両方を、それぞれ C H 1 及び C L で第 1 の追加の F a b ドメインに接続しているリンカーを介して、第 1 の追加の F a b ドメインに接続され、第 2 の追加の F a b ドメインは、リンカーを介して、第 2 の追加の F a b ドメインの C H 1 領域でベース抗体の第 2 の再構成重鎖可変領域 (V H 2) に接続される。あるいは、(図 1 i) 第 2 の追加の F a b ドメインは、ベース抗体の共通軽鎖可変領域 (V L c) に対するリンカーを介して、第 2 の追加の F a b ドメインの C L 領域に接続される。あるいは、(図 1 k) 第 2 の追加の F a b ドメインは、第 2 の追加の F a b ドメインの C H 1 及び C L 領域のそれぞれにおいて、第 2 の再構成重鎖可変領域 (V H 2) 及びベース抗体部分の共通軽鎖 (V L c) の両方にリンカーを介して接続される。本明細書に記載され、図 1 f ~ 1 k に示されるフォーマットはまた、共通鎖が重鎖 (V H c) であり、多価抗体が、最大 4 つの異なる結合特異性を含む 4 つの再構成軽鎖可変領域 (V L 1 ~ V L 4) を含む場合にも適用される。

20

30

40

#### 【 0 1 1 2 】

更に、2 つ以上の追加の結合ドメインは、第 1 の F a b ドメインがリンカーを介して第 2 の F a b ドメインに接続され、これは次にベース抗体部分に接続されるように、リンカ

50

ーを介してベース抗体部分の1つの結合ドメインのみに接続され得る。すなわち、第1のリンカーは、ベース抗体部分と追加のF a bドメインのうちの1つとの間に配置され、第2のリンカーは、2つの追加のF a bドメインの間に配置される。2つのリンカーは、同一でも異なってもよい。

#### 【0113】

本発明の別の態様では、多価抗体を構成する個々のタンパク質は、同じタンパク質内で重鎖及び軽鎖を混合することができる。例えば、多価抗体は、N末端からC末端へV L c - C L - V H 2 - C H 1 - C H 2 - C H 3の順にベース抗体に連結された追加のF a bドメインを含む第1のタンパク質からなり得、それにより、リンカーは、追加のF a bドメインのV L c - C L領域を、V H 2 - C Lにおいてベース抗体部分に接続する。V H 1 - C H 1を含む第2のタンパク質は、該第1のタンパク質のV L c - C Lと対合する。第3のタンパク質は、N末端からC末端へV H 3 - C H 1 - C H 2 - C H 3の順に含み、その結果、第3及び第1のタンパク質は、それぞれのC H 1領域の下で対合する。第4のタンパク質は、N末端からC末端へV L c - C Lの順に含み、第1のタンパク質のV H 2 - C H 1及び第3のタンパク質のV H 3 - C H 1と対合する。例えば、図1 lを参照のこと。

#### 【0114】

図1 lに記載及び図示されたフォーマットは、共通軽鎖、及び最大3つの異なる結合特異性を含む少なくとも3つの再構成重鎖可変領域(V H 1 ~ V H 3)の使用を示しているが、このフォーマットは、共通鎖が重鎖(V H c)である場合に適用され、多価抗体は、最大3つの異なる結合特異性を含む3つ以上の再構成軽鎖可変領域(V L 1 ~ V L 3)を含むことが理解される必要がある。

#### 【0115】

本発明の別の態様は、4つのタンパク質を含む多価抗体であり、共通鎖は共通軽鎖である。多価抗体は、N末端からC末端の順に4つのタンパク質で構成されており、リンカーがC H 1をV L cに接続するV H 1 - C H 1 - V L c - C Lの第1のタンパク質と、V H 1 - C H 1と対合して追加のF a bドメインを形成するV L c - C Lの第2のタンパク質と、第3のタンパク質のC H 1が第2のタンパク質のC Lと対合する、V H 2 - C H 1 - C H 2 - C H 3を含む第3のタンパク質と、第3及び第4のタンパク質がC H 1領域の下で対合し、第2のタンパク質(V L c - C L)が第4のタンパク質のC H 1領域で第4のタンパク質と対合するV H 3 - C H 1 - C H 2 - C H 3を含む第4のタンパク質と、を含む。例えば、図1 mを参照のこと。

#### 【0116】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び追加のF a bドメインを含んでもよく、多価抗体のV H又はV L領域のいずれかは、共通可変領域であってもよく、追加のF a bドメインは、ベース抗体のV H(図1 n)又はV L(図1 o)のいずれかに配置されたリンカーを介してベース抗体部分に接続されてもよく、該リンカーは、ベース抗体をF a bドメインに同時に接続し、更にF a bドメインの同族鎖と対合する。かかる例では、該F a bドメインは、任意にC H 1 - C Lドメインを欠いていてもよく、リンカーを使用してF a bドメインの可変ドメインを対合してもよい。

#### 【0117】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分と、対合されたV H及びV Lを含む追加の結合ドメインとを含み得る。V H及びV Lを含む該追加の結合ドメインは、V HとV Lとの間に形成されたシステイン架橋を介して対合してもよく、それにより、C H 1又はC L領域の存在を必要としない場合がある。例えば、図1 pを参照のこと。なお、システイン架橋が図1 pに示されているが、当業者は、追加のシステイン架橋が、典型的には、C H 1 / C L界面(図示せず)に存在することを理解する。

#### 【0118】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び追加の修飾F a bドメインを含み得る。修飾F a bドメインは、修飾C H 1を含んでもよく、これにより、C Lと対合する必要性がない。例えば、C H 1は、ラクダ科C H 1であってもよく、又はラクダ科C H 1に基づいて

10

20

30

40

50

もよく、又は当該技術分野において既知の技術を介して疎水性残基を欠くように修飾されてもよい。各VH又はVLは、共通又は再構成可変領域であってもよい。追加の修飾Fabドメインは、ベース抗体部分のVH2と修飾FabドメインのCH1との間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体部分に接続されてもよい。修飾FabドメインのVH及びVLは、システイン架橋、又はあるいは非共有相互作用を介して対合されてもよい。例えば、図1qを参照のこと。あるいは、追加の修飾Fabドメインは、ベース抗体部分のVLと修飾FabドメインのCH1との間に配置されたリンカーを介してベース抗体部分に接続されてもよい。修飾FabドメインのVH及びVLは、システイン架橋を介して対合されてもよい。例えば、図1rを参照のこと。

#### 【0119】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び追加の修飾Fabドメインを含んでもよく、該修飾Fabドメインは、修飾CLを含んでもよく、これにより、CH1と対合する必要性がない。例えば、CLは、疎水性領域を除去するように操作され得る。修飾Fabドメインの各VH又はVLは、共通又は再構成可変領域であってもよい。追加の修飾Fabドメインは、ベース抗体部分のVLと修飾FabドメインのCLとの間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体部分に接続されてもよい。修飾FabドメインのVH及びVLは、システイン架橋を介して対合されてもよい。例えば、図1sを参照のこと。

#### 【0120】

本発明の多価抗体は、ベース抗体部分及び追加の修飾Fabドメインを含んでもよく、該修飾Fabドメインは、修飾CLを含んでもよく、これにより、CH1と対合する必要性がない。例えば、CLは、疎水性領域を除去するように操作され得る。修飾Fabドメインの各VH又はVLは、共通又は再構成可変領域であってもよい。追加の修飾Fabドメインは、ベース抗体部分のVH2と修飾FabドメインのCLとの間に配置されたリンカーを介して、ベース抗体部分に接続されてもよい。修飾FabドメインのVH及びVLは、システイン架橋を介して対合されてもよい。例えば、図1tを参照のこと。

#### 【0121】

本発明のベース抗体部分

図1a～1uは、CH2及びCH3領域を含む対合する重鎖定常領域を含む多価抗体のベース抗体部分を示すが、これらの領域は単に例示目的のために示され、本発明はこれらの実施形態に限定されないことに留意されたい。本明細書では、開示される抗体における使用に好適なベース抗体部分及び追加の結合ドメインの異なるフォーマットが記載される。

#### 【0122】

本発明の多価抗体のベース抗体部分は、全長免疫グロブリン、例えば、全長IgG、IgA、IgE、IgD又はIgM部分であり得るが、好ましくはIgG、より好ましくはIgG1であってもよい。

#### 【0123】

本発明の任意の抗体において、追加の結合ドメイン、好ましくはFabドメインのうちの少なくとも1つは、抗体のベース抗体部分のCH1ドメイン(複数可)のものとは異なる免疫グロブリンサブクラスのCH1ドメインを含んでもよく、及び/又は異なるクラスの軽鎖を有してもよい。例えば、抗体のベース部分が全長IgG1である場合、追加の結合ドメインのうちの少なくとも1つは、サブクラスIgG2a、IgG2b、IgG3若しくはIgG4のCH1ドメインを含む、及び/又は抗体のベース部分がカッパ軽鎖を含む場合、追加の結合ドメインのうちの少なくとも1つはラムダ軽鎖を含んでもよい。

#### 【0124】

ベース抗体の重鎖は、当業者に既知の技術、例えば、ベース抗体のCH3領域におけるDEKK修飾の操作を通じて優先的に対合するように設計されてもよい。重鎖のヘテロ二量体化を推進するためのCH3領域における遺伝子操作について示す、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013/157954号及びDe Nardis Et al., J. Biol. Chem. (2017) 292(35) 14706-14717を参照のこと。本発明において使用され得るヘテロ二量体化を推進するための代替的なアプ

10

20

30

40

50

ローチとしては、ノブリンホールフォーマット（国際公開第1998/050431号）、及び電荷操作の使用（Gunasekaran, JBC 2010, vol 285, pp 19637 - 19646）を含む。

【0125】

Fc領域は、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）、抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cellular cytotoxicity、ADCC）、及び抗体依存性細胞貪食作用（antibody-dependent cell phagocytosis、ADCP）などの抗体のエフェクター機能を媒介する。多価抗体に応じて、エフェクター機能を低減又は増大させることが望ましい場合がある。本発明のいくつかの実施形態のように、免疫応答が活性化、増強、又は刺激されるべき場合、エフェクター機能の低減が望まれ得る。エフェクター機能を低減した抗体を使用して、とりわけ免疫細胞の細胞表面分子を標的化することができる。抗体が有害な細胞を標的化している場合にエフェクター機能の増加が望ましい場合があり、それにより免疫エフェクター細胞又は補体カスケードがかかる標的を排除又は溶解する能力を高めることができる。

10

【0126】

重鎖Fc領域のエフェクター機能は、当業者に既知の修飾によって軽減又は排除され得る。同様に、重鎖Fc領域のエフェクター機能は、当業者に既知の修飾によって増強され得る。例えば、ADCCは、CH2ドメインの遺伝子修飾によって増強され得る。例えば、Strohl, Curr. Opin. Biotechnol. 2009(6)685 - 91を参照のこと。

20

【0127】

本発明の多価抗体は、一実施形態では、アフコシル化され得る。本発明の多価抗体は、好ましくは、正常なCHO細胞において産生された同じ抗体と比較した場合に、Fc領域におけるN-結合型炭水化物構造のフコシル化の量の減少を含む。

【0128】

本発明の多価抗体の一態様はまた、CH2又はCH3領域を欠いているベース抗体を含み、ベース抗体部分の該重鎖は、CH1領域の下のスチン共有結合架橋によって接合されてもよい。

【0129】

本発明のベース抗体部分の変形形態を含む本発明の態様を図1uに示す。

30

【0130】

本明細書では、本発明の抗体のベース部分を1つ以上の結合ドメインと接続するために使用することができるリンカーのレパートリーについて説明する。可変領域、Fvドメイン、Fabドメイン、又は修飾Fabドメインなどの1つ以上の結合ドメインは、本発明の抗体のベース抗体部分に接続され得る。

【0131】

本発明の抗体は、ベース抗体部分を含み、リンカー又は複数のリンカーを介して、1つ以上の結合ドメインに結合する。

【0132】

全長IgGベース抗体部分を含む多価抗体は、かかる構造が、典型的には、好ましい半減期、予測可能な生物物理的挙動、及びより低い免疫原性などの有益な特性を有するため好ましい。本発明の抗体は、典型的には治療用途に好適であり、したがって、ヒト治療薬の使用のためのヒト配列から構成される。あるいは、該抗体は、当業者に周知の技術を使用して、治療薬が使用されている種の配列を有するか、又はその所与の種内のコンセンサス配列に基づいている。

40

【0133】

本発明の抗体のベース抗体部分が全長IgGである場合、全長IgGは、所望の特性を提供する突然変異を含み得る。かかる変異は、いずれかの領域の相当部分の欠失ではない。しかしながら、得られるIgG部分の結合特性を本質的に変えることなく、1つ又はい

50

くつかのアミノ酸残基が挿入、欠失、又は置換されている全長 I g G 部分は、用語「全長 I g G」に含まれる。例えば、かかる I g G 部分は、好ましくは非 C D R 領域において、1 ~ 10 アミノ酸残基の 1 つ以上の挿入、欠失、又は置換を有することができ、該挿入、欠失又は置換されたアミノ酸は、I g G の結合特異性にとっては必須ではない。

【0134】

I g G 1 は、ヒトにおけるその長い循環半減期に基づいて優勢であり得る。また、ヒトにおける免疫原性を軽減するために、本発明による抗体のベース抗体部分はヒト抗体であることが好ましい。

【0135】

本発明の抗体のベース部分は、本質的に完全な抗体を含むと定義される全長免疫グロブリンであってもよい。かかる本質的に完全な抗体は、インタクトな抗体の全ての機能を必ずしも有さなくてもよい。

【0136】

本明細書に記載される抗体の全長ベース部分は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む。各鎖は、定常(C)領域及び可変(V)領域を含有し、これは重鎖ではC H 1、C H 2、C H 3、V H、軽鎖ではC L、V Lと表示されるドメインに分解することができる。抗体は、定常ドメインを介して、典型的にはF c部分を介して、免疫系の分子及び細胞と相互作用することができる。

【0137】

二重特異性又は多重特異性抗体を含む本発明の抗体の定常領域は、好ましくはヒト定常領域である。この定常領域は、1つ以上の、好ましくは10個以下の、好ましくは5個以下の、天然に存在するヒト抗体の定常領域とは異なるアミノ酸を含有することができる。本明細書で産生される様々な抗体の可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインライブラリに由来する。したがって、これらの可変ドメインはヒトである。独自のC D R領域は、ヒトに由来してもよく、合成であってもよく、又は別の生物に由来してもよい。本発明の抗体又は二重特異性抗体は、好ましくはヒト又はヒト化抗体である。好適な重鎖定常領域を、非限定的に表21に例示される。

【0138】

本発明の抗体は、典型的には、多重特異性抗体の半減期及び安定性を維持するインタクトなF c領域を有する。F cはまた、F c受容体、補体、及びF c R nなどの免疫エフェクター分子との相互作用を可能にし得る。当業者には理解されるように、F c受容体との相互作用を防止若しくは軽減するか、又はF c受容体との相互作用を強化するために、F c領域を設計するために、技術が利用可能である。

【0139】

ベース抗体部分及び1つ以上の追加の結合ドメイン、例えば、F a bドメインは、1つ以上のリンカーを介して接続される。少なくとも1つの追加のF a bドメインは、所与のアイソタイプ又はサブクラスのもの、例えば、I g G 1、2 a、2 d、3、又は4であり得、少なくとも1つの追加のF a bは、全長I g G部分のF a bドメインのサブクラスとは異なるサブクラスのものであり得るか、又は異なるクラス(カッパ又はラムダ)の軽鎖を保有し得る。

【0140】

多価抗体フォーマットで使用するためのリンカー

本発明の抗体は、1つ以上の追加の結合ドメインをベース抗体部分に接続する1つ以上のリンカーを含む。リンカーは、リンカーが接続される結合ドメインと共に、多価抗体の機能性を少なくとも部分的に判定する。

【0141】

本発明の抗体において、リンカーのペプチド領域は、ヒンジ配列を含んでもよく、又はヒンジ配列に基づく配列を含んでもよい。したがって、好適なペプチド領域のアミノ酸配列は、天然に生じる配列を含んでもよく、又は天然に生じる配列に基づく配列を含んでもよい。かかる配列の使用は、本発明の多価抗体の開発可能性に役立ち得、低免疫原性を確

10

20

30

40

50

保するのに役立ち得る。

【0142】

ヒンジ領域は、I g G 及び I g A 免疫グロブリンクラスの重鎖の中央部分（すなわち、F a b を F c に接続する部分）における柔軟性アミノ酸伸張であり、これらの2つの重鎖をジスルフィド結合により対合する。システイン及びプロリンアミノ酸が豊富であり、任意の他の免疫グロブリン領域とほとんど類似しない。

【0143】

したがって、本発明の多価抗体において使用するための、1つ以上の追加の結合ドメインをベース抗体部分に接続するのに好適なリンカーは、I g G 又は I g A ヒンジ配列由来であり得る。リンカー領域は、I g G 1 ヒンジ領域、I g G 2 ヒンジ領域、I g G 3 ヒンジ領域、又は I g G 4 ヒンジ領域に基づくことができる。

10

【0144】

典型的には、使用されるヒンジ領域の種類は、リンカーが接続される追加の F a b ドメインの定常領域、例えば C H 1 の種類と一致する。すなわち、リンカーが、I g G 1 ヒンジ領域の配列又は複数の配列に基づく場合、該リンカーが接続している追加の F a b ドメインの C H 1 は、I g G 1 由来の C H 1 である。

【0145】

抗体のリンカーは、上部、中央、若しくは下部ヒンジ領域、又はかかる領域のサブセットに基づいてもよい。

【0146】

20

I g G 1 ヒンジ領域は、配列：E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G（配列番号42）を有する。

【0147】

上部ヒンジ領域は、E P K S C D K T H T（配列番号43）として定義される。

【0148】

中央ヒンジ領域は、C P P C P（配列番号44）として定義される。

【0149】

下部ヒンジ領域は、A P E L L G G（配列番号45）として定義される。

【0150】

したがって、本発明の抗体では、リンカーは、これらの配列のうちの1つ以上、及び/又はこれらの配列のうちの1つ以上に基づく配列を含んでもよい。

30

【0151】

I g G 2 ヒンジ領域は、配列：E R K C C V E C P P C P A P P V A G（配列番号46）を有する。

【0152】

上部ヒンジ領域は、E R K C C V E（配列番号47）として定義される。

【0153】

中央ヒンジ領域は、C P P C P（配列番号48）として定義される。

【0154】

下部ヒンジ領域は、A P P V A G（配列番号49）として定義される。

40

【0155】

したがって、本発明の抗体では、リンカーは、これらの配列のうちの1つ以上、及び/又はこれらの配列のうちの1つ以上に基づく配列を含んでもよい。

【0156】

I g G 3 ヒンジ領域は、配列：E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P A P E F L G G（配列番号50）を有する。

【0157】

上部ヒンジ領域は、E L K T P L G D T T H T（配列番号51）として定義される。

【0158】

50



中央ヒンジ領域は、C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P (配列番号52)として定義される。

【0159】

下部ヒンジ領域は、A P E F L G G (配列番号53)として定義される。

【0160】

I g G 4 ヒンジ領域は、配列：E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G (配列番号54)を有する。

【0161】

上部ヒンジ領域は、E S K Y G P P (配列番号55)として定義される。

【0162】

中央ヒンジ領域は、C P S C P (配列番号56)として定義される。

【0163】

下部ヒンジ領域は、A P E F L G G (配列番号57)として定義される。

【0164】

コンセンサス配列 C X X C を有する中間領域は、野生型 I g G と関連して両方の I g G 重鎖を接続し、剛性である。これらのジスルフィド架橋は、現在の用途には必須ではなく、したがって、リンカーは中央ヒンジ配列を含み、好ましくは C X X C コンセンサス中の他方又は両方の C y s 残基は、例えば、S e r 残基で置換される。したがって、好ましい実施形態では、C x x C は S x x S であってもよい。

【0165】

本発明の多価抗体において使用するのに好適なリンカーは、中間ヒンジ配列、例えば中間ヒンジ配列を含むが、下部及び/又は上部ヒンジ配列を含まない配列に基づくものであり得る。本発明の多価抗体において使用するのに好適なリンカーは、上部ヒンジ配列、例えば上部ヒンジ配列を含むが、下部及び/又は中央ヒンジ配列を含まない配列に基づくものであり得る。本発明の多価抗体において使用するのに好適なリンカーは、中間ヒンジ配列、例えば下部及び上部ヒンジ配列の組み合わせを含む配列を含まないものであり得る。

【0166】

したがって、本発明は、配列番号3～5、7～11、又は13～24のうちの1つのアミノ酸配列を含むリンカーを提供する。

【0167】

したがって、本発明の抗体では、リンカーは、これらの配列のうちの1つ以上、及び/又はこれらの配列のうちの1つ以上にに基づく配列を含んでもよい。ペプチド領域は、本質的に中間領域配列からなるか、若しくはかかる配列に基づいていてもよく、又は本質的に上部及び下部領域配列からなるか、若しくはかかる配列に基づいていてもよい。

【0168】

本発明の抗体における使用に好適なリンカーは、本明細書に記載の任意のリンカー配列のアミノ酸配列を含む配列を参照して定義することができ、その中には0～5個のアミノ酸挿入、欠失、置換、又は付加(又はこれらの組み合わせ)が作製される。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書に記載のリンカー配列に関して、0～4、好ましくは0～3、好ましくは0～2、好ましくは0～1、好ましくは0のアミノ酸挿入、欠失、置換、又は付加(又はこれらの組み合わせ)を含むアミノ酸配列を含む。

【0169】

好適なリンカーは、約7～約29アミノ酸長、例えば約10～約20アミノ酸長であってもよい。しかしながら、好適なリンカーは、短いリンカー、例えば約7～約10のアミノ酸長であってもよく、又は長いリンカー、例えば約20～約29アミノ酸長であってもよい。

【0170】

リンカーは、I g ヒンジ領域を含んでもよく、又はリンカーと同じサブクラスのC H 1 領域に接続されたI g G ヒンジ領域に基づく配列を含んでもよく、共通軽鎖の共有結合のためのシステインを含んでもよい。

10

20

30

40

50

## 【0171】

本発明の抗体における使用に好適なリンカーは、IgG1ヒンジ領域、IgG2ヒンジ領域、IgG3ヒンジ領域、又はIgG4ヒンジ領域に基づくことができる。

## 【0172】

(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>配列が使用される場合、好ましくは、それは、IgG以外のアイソタイプ又はIgG1以外のサブクラス由来のヒンジ配列と組み合わせて使用され、CH1領域を含む。

## 【0173】

本発明の抗体では、リンカーは剛性であっても柔軟性であってもよく、荷電配列を含んでもよく、直線状であっても屈曲していてもよい。

## 【0174】

本発明の目的のための剛性配列は、約1.015以下のKarpplus及びSchulz柔軟性予測を有する配列である。部分的に柔軟性の配列は、約1.015～約1.04のKarpplus及びSchulz柔軟性予測を有するものである。本発明の目的のための柔軟性配列は、少なくとも約1.015のKarpplus及びSchulz柔軟性予測を有する配列である(Karpplus PA, Schulz GE. タンパク質中の鎖の柔軟性予測 - ペプチド抗原の選択のためのツール. Naturwissenschaften 1985; 72: 212-3; (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>)). 柔軟性予測は、配列に沿った7つの残基の連続したウィンドウにわたって計算され(1残基刻み)、ウィンドウ毎に予測される「柔軟性」指数が得られる。リンカー配列全体にわたる全体的な柔軟性は、配列全体にわたって平均として与えられる。

## 【0175】

IgGヒンジ領域内のCys残基の除去又は置換は、Cys残基をセリン(Ser)と置換することを含む、そのヒンジに基づくリンカーをより柔軟にすることができる。あるいは、リンカーは、らせん形成配列の存在を考慮して剛性リンカーであってもよい。したがって、中間ヒンジ領域、例えば、保存されたCPPCMモチーフは、らせん形成配列、例えば(EAAAK)<sub>2</sub>によって置き換えられてもよく、これは、リンカー中に短い剛性のらせんをもたらす。したがって、本発明の抗体では、リンカーは、例えばアミノ酸配列(EAAAK)<sub>2</sub>を含むらせん形成配列を含んでもよい。かかる配列の使用は、剛性を加えるのに役立ち得る。

## 【0176】

本発明のリンカーは、好ましくは、配列番号3～5、7～11、若しくは13～24のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、又はこれらのいずれか1つに対して少なくとも約90%の配列同一性、好ましくは、これらのいずれか1つに対して少なくとも約95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、より好ましくは、これらのいずれか1つに対して少なくとも約97%の配列同一性、より好ましくは、これらのいずれか1つに対して少なくとも約98%の配列同一性、より好ましくは、これらのいずれか1つに対して少なくとも約99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

## 【0177】

例えば、本発明の多価抗体での使用に好適なリンカーは、0～5個のアミノ酸挿入、欠失、置換、又は付加(又はこれらの組み合わせ)が作製される配列番号1～24のいずれか1つのアミノ酸配列を含む配列を参照して定義され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号3～5、7～11、又は13～24に記載の配列に関して、0～4、好ましくは0～3、好ましくは0～2、好ましくは0～1、好ましくは0のアミノ酸挿入、欠失、置換、又は付加(又はこれらの組み合わせ)を有するアミノ酸配列を含む。

## 【0178】

本発明の多価抗体での使用に好適なリンカーは、配列番号1～24のいずれか1つのアミノ酸配列、又はこれらのいずれか1つに対して少なくとも約85%の配列同一性を有するアミノ酸配列、例えば、これらのいずれか1つに対して少なくとも約90%の配列同一

10

20

30

40

50

性、例えば、これらのいずれか 1 つに対して少なくとも約 95% の配列同一性、例えば、これらのいずれか 1 つに対して約 98% の配列同一性、例えば、これらのいずれか 1 つに対して少なくとも約 99% の配列同一性を含む配列を参照して定義することができる。

# 【 0 1 7 9 】

表 1 は、リンカー配列が C H 1 及び V H 2 領域にどのように接続され得るかを示す。

## 【 表 1 】

表 1: 下線を付した配列はリンカー配列である; 隣接配列は、追加の Fab の CH1 領域の CH1 領域及び以下の重鎖 VH 領域の VH2 領域である。

#	名前	リンカー配列(下線部)は、リンカー配列の前後に CH1 領域及び VH 配列をそれぞれ含有する。対照 IgG1 配列では、CH2 領域が存在する(下線部)。
1	IgG1 H	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTSPSPAPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 58)
2	IgG1 MH	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTSPSPPEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 59)
3	IgG1 UH	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTTEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 60)
4	IgG1 G4S	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 61)
5	IgG1 R	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTTEAAAKEAAKAPPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 62)
6	IgG1 UL	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKHTAPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 63)
7	IgG2A H	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKSSVESPPSPAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 64)
8	IgG2A MH	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKSSVESPPSPEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 65)
9	IgG2A UL	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKSSVEAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 66)
10	IgG2B H	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKCSVESPPSPAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 67)
11	IgG2B MH	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKCSVESPPSPEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 68)
12	IgG2B UL	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKCSVEAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 69)
13	IgG2A G4SL	NVDHKPSNTKVDKTV <u>GSGGGSGGGGSAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 70)
14	IgG2A G4SS	NVDHKPSNTKVDKTV <u>GSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 71)
15	IgG2A R	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKSSVEAAAKEAAKAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 72)
16	IgG2B R	NVDHKPSNTKVDKTV <u>ERKCSVEAAAKEAAKAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 73)
17	IgG3 ULH	NVNHKPSNTKVDKRV <u>ELKTPLGDTTHTAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 74)
18	IgG3 UH	NVNHKPSNTKVDKRV <u>ELKTPLGDTTHTTEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 75)
19	IgG3 R	NVNHKPSNTKVDKRV <u>ELKTPLGDTTHTTEAAAKEAAKAPPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 76)
20	IgG4 H	NVDHKPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPSPSPAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 77)
21	IgG4 MH	NVDHKPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPSPSPPEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 78)
22	IgG4 UL	NVDHKPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 79)
23	IgG4 UH	NVDHKPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 80)
24	IgG4 R	NVDHKPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPEAAAKEAAKAPPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (配列番号 81)
25	IgG1 ヒンジ	NVNHKPSNTKVDKRV <u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM</u> (配列番号 82)

なお、リンカー(上記において下線を付した)の後の VH2 配列は、使用される特定の可変領域に応じて、変化してもよい。他の実施形態では、リンカーの後の配列は、共通軽鎖を含む軽鎖可変領域であってもよい。

# 【 0 1 8 0 】

追加の結合ドメインの対合する領域へのリンカーの使用

本明細書で使用されるリンカーは、ベース抗体部分を少なくとも 1 つの追加の結合ドメインに接続し得る。加えて、少なくとも 1 つの追加の結合ドメインが Fab ドメインであ

るか、又は重鎖可変領域と軽鎖可変領域との対合から構成される場合、リンカーは、共有結合を介して、典型的にはジスルフィド架橋を介して、重鎖及び軽鎖を対合し得る。ジスルフィド架橋は、リンカー内のシステイン残基と追加の結合ドメイン（複数可）の可変領域との間に形成され得る。リンカーによって引き起こされるかかる対合は、共通軽鎖と対応する再構成重鎖可変領域とを含むF a bドメイン、又は共通重鎖と対応する再構成軽鎖可変領域とを含むF a bドメイン、を含む追加の結合ドメインに適用することができる。

#### 【0181】

##### 多価性及び多重特異性

本発明の多価タンパク質のベース抗体の2つの結合ドメインが異なる抗原に結合する場合、該第1及び第2の抗原は、1つの細胞又は異なる細胞型に位置する2つの異なる分子又は部分であり得る。内因性免疫細胞を動員及び活性化することによって細胞傷害を媒介する2つの結合ドメインを含む抗体は、新たなクラスの抗体治療薬である。これは、標的細胞（すなわち、腫瘍細胞）及びエフェクター細胞（すなわち、T細胞、NK細胞、及びマクロファージ）の抗原結合特異性を1分子中で組み合わせることによって達成することができる（例えば、国際公開第2014/051433号を参照のこと）。本発明の抗体は、少なくとも3つの結合ドメインを含む。ベース抗体部分は、典型的には、2つの異なる結合ドメインを含む（ただし、2つの結合ドメインは同じ配列を有してもよく、同じエピトープに結合してもよい）。3つ以上の結合ドメインを含む多価抗体は、1つ、2つ、3つ、又はそれ以上の腫瘍関連抗原を標的にして、正常細胞に対する有害細胞の特異的標的化を可能にし得る。例えば、多価抗体の1つの結合ドメイン又は2つの結合ドメインは、異常な（腫瘍）細胞上の抗原に結合してもよく、一方で、多価抗体の第2又は第3の結合ドメインは、1つ以上の腫瘍関連抗原を発現する腫瘍細胞の方向付けられた殺傷を引き起こし得る免疫エフェクター細胞上の抗原に結合し得る。あるいは、多価抗体の2つの結合ドメインは、腫瘍細胞で発現される同一の抗原又は異なる抗原上の2つの異なるエピトープに特異的に結合し得、一方で、これらの腕の親和性は、1つの抗原のみを発現する細胞への結合を軽減するために、又は多価抗体の1つの結合ドメインのみが関与する場合に弱められる。又は、本発明の多価抗体の3つの結合ドメインは、3つの異なる抗原又は同一の抗原に結合し得るが、免疫エフェクター細胞の異なるエピトープで結合してもよい。

#### 【0182】

同様に、3つ以上の結合ドメインを含む多価抗体は、リガンド又は酵素などの機能的標的に結合し得、生物学的応答を誘発するか、又は標的の機能を遮断し、阻害性又はアゴニスト性の細胞活性をもたらす。本発明の多価抗体の少なくとも1つの結合ドメインは、リンカーを介してベース抗体部分の結合ドメインに接続される。ベース抗体部分の結合ドメインがF a bドメインである場合、これは、例えば、V H - C H 1 - リンカー - V H - C H 1の形態をとることができ、リンカーは、ベース抗体部分の重鎖を少なくとも1つの追加の結合ドメイン、好ましくはF a bドメインに接続する。

#### 【0183】

あるいは、これは、例えば、V L - C L - リンカー - V L - C Lの形態をとることができ、リンカーは、ベース抗体部分の軽鎖を少なくとも1つの追加の結合ドメイン、好ましくはF a bドメインに接続する。

#### 【0184】

F a bドメインなどの追加の結合ドメインは、それぞれ別個のリンカーを介して、ベース抗体部分の結合ドメインのそれぞれに接続されてもよい。追加の結合ドメインをベース抗体部分又は追加の結合ドメインに接続する2つ以上のリンカーは、同じであっても異なってもよい。更に、リンカーは、結合ドメインの同族鎖の対合を可能にし得る。

#### 【0185】

本発明の抗体が2つ以上のリンカーを含む場合、それらのリンカーは同じであっても異なってもよく、又はこれらの組み合わせであってもよい。後者の状況の一例は、多重特異性抗体が3つのリンカーを含み、これらのうちの2つは同じであり、第3のリンカーは異なる（他の2つから）。

## 【0186】

更に、リンカーを介してベース抗体部分の結合ドメインに接続された結合ドメインは、それ自体が、本明細書に記載されるリンカーを介して接続された結合ドメインに結合されてもよく、該ベース抗体部分は、リンカーを介して追加の結合ドメインに接続し、その結合ドメインをリンカーを介して第2の追加の結合ドメインに接続することなどにより、モジュール的に伸長し得る。

## 【0187】

このようにして、本発明の抗体は、3つ以上のエピトープに結合することができる。したがって、本発明の多重特異性抗体は、3つ以上のエピトープに特異的に結合することができる。

10

## 【0188】

本発明の抗体は、2つ、3つ、又はそれ以上の抗原に結合することができる。したがって、本発明の多重特異性抗体は、2つ、3つ、又はそれ以上の抗原に特異的に結合することができる。

## 【0189】

本発明の抗体は、1つの抗原上の異なるエピトープに結合することができる2つ以上のFabドメインなどの2つ以上の結合ドメインを含んでもよい。

## 【0190】

したがって、本発明の抗体は、異なる2つ以上のFabドメインなどの少なくとも3つの結合ドメインを含む。

20

## 【0191】

本発明の別の態様は、少なくとも3つのFabドメインを含む多価抗体を含み、したがって、典型的には互いに全て異なる3つのエピトープに結合することができる。

## 【0192】

本発明の抗体は多価であってもよい。本発明の抗体は多重特異性であってもよい。多価は、抗体が少なくとも3つの結合ドメインを有し、したがって少なくとも3つの抗原結合部位を有することを示す。多重特異性は、抗体が少なくとも2つの異なるエピトープ、例えば、同じ抗原上の2つの異なる抗原又は2つのエピトープに結合することができることを示す。三重特異性は、抗体が3つの異なるエピトープに結合することができることを示す。四重特異性は、抗体が4つの異なるエピトープなどに結合することができることを示す。

30

## 【0193】

本発明の抗体は、同じ分子上に位置する標的エピトープに結合し得る。これは、1つのエピトープのみが標的化されている状況と比較して、該標的分子の(生物学的)機能のより効率的な拮抗作用を可能にし得る。例えば、本発明の抗体は、抗原細胞上、例えば、成長因子受容体、又は腫瘍細胞が増殖するのに重要な可溶性分子に存在する2つ又は3つ以上のエピトープに同時に結合し得、それによって、制御されていない増殖をもたらすいくつかの独立したシグナル伝達経路を効果的に遮断する。

## 【0194】

本発明の少なくとも2つの抗体の任意の組み合わせは、成長因子受容体又は可溶性分子などの標的分子上に存在する2、3、4以上のエピトープに同時に結合してもよい。

40

## 【0195】

標的部分は、可溶性分子であってもよく、又は膜結合部分であってもよく、又は結合時に内在化する細胞表面上に存在する部分であってもよい。

## 【0196】

標的エピトープは、異なる部分、例えば2つ(すなわち、第1の部分上の2つ以上の標的エピトープ及び第2の部分上の1つ以上の標的エピトープ)又は3つの異なる部分上(すなわち、3つの部分のそれぞれの少なくとも1つの標的エピトープ)に位置し得る。この場合、異なる標的部分のそれぞれの、可溶性部分若しくは膜結合部分、又は結合時に内在化する細胞表面上に存在する部分のいずれかであってもよい。一実施形態では、異なる

50

標的部分は可溶性部分である。あるいは、少なくとも1つの標的部分は可溶性部分であり、一方で少なくとも1つの標的部分は膜結合部分である。更に別の代替例では、全ての標的部分は膜結合部分である。一実施形態では、異なる標的部分は同じ細胞上で発現されるが、他の実施形態では、異なる標的部分は異なる細胞上で発現される。

【0197】

非限定的な例として、本発明の任意の抗体、又は本発明の抗体と追加抗体との任意の組み合わせは、複数の膜結合受容体を同時に遮断し、腫瘍細胞のサイトカイン又は成長因子などの複数の可溶性分子を中和するか、又は異なるウイルス血清型若しくはウイルス株を中和するのに好適であり得る。

【0198】

本発明の抗体では、少なくとも1つの標的エピトープが腫瘍細胞上に位置してもよい。あるいは、又はそれに加えて、少なくとも標的エピトープは、エフェクター細胞の表面上に位置してもよい。これは、例えば、腫瘍細胞殺傷のためのT細胞又はNK細胞の動員に好適である。例えば、本発明の抗体は、免疫エフェクター細胞上に位置する標的分子に特異的に結合することによって、免疫エフェクター細胞、好ましくはヒト免疫エフェクター細胞を動員することができる。更なる実施形態では、該免疫エフェクター細胞は、本発明の抗体の標的分子への結合時に活性化される。エフェクター機構の動員は、例えば、T細胞受容体又はFcガンマ受容体などの細胞傷害性トリガー分子に結合することができ、それにより下流の免疫エフェクター経路又は免疫エフェクター細胞を活性化する、本発明による方法によって産生されたIg様分子を投与することによる免疫調節された細胞傷害のリダイレクトを包含し得る。

【0199】

免疫細胞エンゲージャー

本発明の抗体などの多価多量体は、免疫エフェクター細胞エンゲージャー抗体であってもよい。すなわち、本発明の多価抗体は、T細胞などの免疫エフェクター細胞上の抗原に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含むものであってもよく、また癌又は腫瘍細胞などの異常細胞上の抗原に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含むものであってもよい。

【0200】

三重特異性抗体などの本発明の多価多量体は、3つの結合ドメインを有するものであってもよく、腫瘍細胞、及び2つの免疫エフェクター細胞を含む、3つの細胞を、エンゲージャー複合体にまとめたものであってもよい。

【0201】

三重特異性抗体などの本発明の多価多量体は、更に、2つの細胞を標的化する3つの結合ドメイン及び可溶性分子を有するものであり得る。

【0202】

本明細書に記載される実施形態では、Fcは野生型Fcであってもよく、当業者に既知の手段に基づいて、ADCC若しくはCq1の結合のために強化されてもよく、又は当業者に既知の手段に基づいて、かかる活性のために排除されてもよい。

【0203】

多価抗体を関与するかかる免疫細胞の構成要素は、様々な構成で互いに対して配置することができる。例示的な構成を図1a~1uに示す。特定の実施形態では、本発明は、免疫細胞関与多価抗体に関し、第3の結合ドメインは、Fab重鎖のC末端において、ベース抗体の第1又は第2の結合ドメインのN末端に連結される。

【0204】

一実施形態では、免疫細胞関与多価抗体は、3つの結合ドメイン、すなわち、ベース抗体部分及び1つの追加の結合ドメインを含み、それにより、該多価抗体は、三重特異性である。

【0205】

ベース抗体部分の結合ドメインのうちの1つは、免疫エフェクター細胞上の抗原に結合

10

20

30

40

50

してもよい。あるいは、追加の結合ドメインは、免疫エフェクター細胞の抗原に結合してもよい。すなわち、免疫エフェクター細胞上の抗原に対する結合ドメインは、位置 1、2 又は 3 であってもよく、これらの位置は、図 1 a に示される V H 1、V H 2、及び V H 3 に対応する。あるいは、共通重鎖が使用される場合、免疫エフェクター細胞上の抗原に対する結合ドメインは、例えば、図 1 c に示されるように、V L 1、V L 2、及び V L 3 に対応する位置 1、2 又は 3 であってもよい。

#### 【0206】

本発明の免疫エフェクター細胞エンゲージャー抗体において、結合ドメインのうちの少なくとも 1 つは、異常細胞上の抗原に特異的に結合し得る。典型的には、少なくとも 2 つの結合ドメインは異常細胞上の抗原に結合し、典型的には少なくとも 2 つの結合ドメインは、異常細胞上の抗原上の少なくとも 2 つの異なる抗原又はエピトープに結合する。本発明の免疫エフェクター細胞エンゲージャー抗体において、2 つ以上の結合ドメインは、抗原及びエピトープを含む同じ標的と、免疫エフェクター細胞を関与する別の結合ドメインとを結合してもよい。

10

#### 【0207】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の多価抗体は、免疫エフェクター細胞上の抗原に特異的に結合し、また腫瘍細胞などの異常細胞上の 2 つの異なる抗原に特異的に結合する。

#### 【0208】

本発明の一実施形態では、T 細胞関与多価抗体は、標的細胞抗原、特に腫瘍細胞抗原、及びヒト T 細胞の表面抗原に同時に結合することができる。一実施形態では、T 細胞関与多価抗体は、標的細胞抗原、特に腫瘍細胞抗原、及びヒト C D 3 に同時に結合することができる。一実施形態では、T 細胞関与多価抗体は、標的細胞抗原及び C D 3 に同時結合することによって T 細胞及び標的細胞を架橋することができる。別の実施形態では、同時結合は、標的細胞、特に腫瘍細胞の溶解をもたらす。一実施形態では、同時結合は、T 細胞の活性化をもたらす。他の実施形態では、同時結合は、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性エフェクター分子放出、細胞傷害性活性、及び活性化マーカーの発現の群から選択される、T リンパ球、特に細胞傷害性 T リンパ球の細胞応答をもたらす。一実施形態では、標的細胞抗原に同時結合することなく、T 細胞関与ポリペプチドの C D 3 への結合は、T 細胞活性をもたらさず、例えば、残りの結合ドメインは腫瘍細胞抗原に結合しない。

20

30

#### 【0209】

一実施形態では、T 細胞関与多価抗体は、T 細胞の細胞傷害性活性を標的細胞にリダイレクトすることができる。一実施形態では、リダイレクトは、標的細胞による M H C 媒介性ペプチド抗原提示及び / 又は T 細胞の特異性とは無関係である。一実施形態では、T 細胞は細胞傷害性 T 細胞である。別の実施形態では、T 細胞は、C D 4 <sup>+</sup> 又は C D 8 <sup>+</sup> T 細胞である。別の実施形態では、T 細胞は、C D 8 <sup>+</sup> T 細胞である。

#### 【0210】

本発明の T 細胞関与多価抗体は、ヒト T 細胞の表面抗原に結合することができる少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、結合ドメインは、C D 3 ( 本明細書では「C D 3 抗原結合ドメイン」とも呼ばれる ) に結合する。

40

#### 【0211】

用語「C D 3」( 分化群 3 ) は、C D 3 鎖 ( S w i s s P r o t P 0 9 6 9 3 )、C D 3 鎖 ( S w i s s P r o t P 0 4 2 3 4 )、C D 3 鎖 ( S w i s s P r o t P 0 7 7 6 6 )、及び C D 3 鎖ホモ二量体 ( S w i s s P r o t P 2 0 9 6 3 ) から構成されるタンパク質複合体を指す。C D 3 イプシロンは、様々な別名の下で既知であり、そのうちのいくつかは、「C D 3 e 分子、イプシロン ( C D 3 - T C R 複合体 )」、「C D 3 e 抗原、イプシロンポリペプチド ( T i T 3 複合体 )」; T 細胞表面抗原 T 3 / L e u - 4 イプシロン鎖; T 3 E; T 細胞抗原受容体複合体, T 3 のイプシロンサブユニット; C D 3 e 抗原; C D 3 - イプシロン 3; I M D 1 8; T C R E である。C D 3 E 遺伝子についての I d は、H G N C : 1 6 7 4; E n t r e z G e n e : 9 1 6; E n s e m

50

b1: ENSG00000198851; OMIM: 186830、及びUniProtKB: P07766である。これらの鎖は、T細胞受容体(TCR)及び鎖と会合して、TCR複合体を形成し、分裂促進シグナル伝達によって、Tリンパ球において活性化シグナルを生成することができる。CD3は、T細胞及びNK細胞上で発現される。本明細書において、CD3について言及される場合、特に明記されない限り、ヒトCD3を指す。

#### 【0212】

特定の実施形態では、T細胞関与ポリペプチドは、CD3に対する特異的結合が可能な2つ以下の結合ドメインを含む。一実施形態では、T細胞関与ポリペプチドは、CD3に対する一価の結合を提供する。一実施形態では、T細胞関与ポリペプチドは、CD3結合結合ドメインのスーパークラスターの1つのメンバーを含む。「スーパークラスター」が本明細書において使用され、特定の抗原に対する結合特異性を失うことなく、例えば、本発明のVH若しくはVL及び/又はCDRを含む重鎖可変領域に関して、許容されるアミノ酸変化を有する可変領域を指す。より具体的には、「スーパークラスター」は、同じVH-V遺伝子の使用を共有し、HCDR3において少なくとも70%の配列同一性を有し、同じHCDR3長を有するクローン群である。スーパークラスター内のクローンは、潜在的にエピトープ上の異なる親和性及び/又は異なる位置の同じ抗原に結合することが予想される。

10

#### 【0213】

CD3結合ドメインは、親和性、エピトープ、及び他の特性の範囲であり得る。CD3の細胞外部分に結合することができる特定の可変ドメインは、MF8057、MF8058、MF8078のVHのアミノ酸配列及びこのスーパークラスターの可変領域、MF8397及びこのスーパークラスターの可変領域、MF8508及びこのスーパークラスターの可変領域、並びにMF9249及びMF9267並びにこのスーパークラスターの可変領域、を含む可変ドメインである。

20

#### 【0214】

CD3抗原結合ドメインは、MF8057、MF8058、MF8078のVH及びこのスーパークラスターの可変領域、MF8397及びこのスーパークラスターの可変領域、MF8508及びこのスーパークラスターの可変領域、並びにMF9249及びMF9267並びにこのスーパークラスターの可変領域からなる群から選択される少なくとも1つの重鎖相補性決定領域(CDR)(配列番号97、配列番号106、配列番号115、配列番号124、配列番号133、配列番号142、配列番号98、配列番号107、配列番号116、配列番号125、配列番号134配列番号143配列番号152配列番号99、配列番号108、配列番号117、配列番号126、配列番号135、配列番号144及び/又は配列番号153)と、配列番号254、配列番号255、配列番号256からなる群から選択される少なくとも1つの軽鎖CDRと、を含む。

30

#### 【0215】

一実施形態では、CD3抗原結合ドメインは、配列番号97、配列番号106、配列番号115、配列番号124、配列番号133、又は配列番号142の重鎖CDR1、配列番号98、配列番号107、配列番号116、配列番号125、配列番号134、配列番号143、又は配列番号152の重鎖CDR2、配列番号99、配列番号108、配列番号117、配列番号126、配列番号135、配列番号144、又は配列番号153の重鎖CDR3、配列番号254の軽鎖CDR1、配列番号255の軽鎖CDR2、及び配列番号256の軽鎖CDR3を含む。

40

#### 【0216】

一実施形態では、CD3抗原結合ドメインは、配列番号100、配列番号109、配列番号118、配列番号127、配列番号135、配列番号145、及び配列番号154の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号37及び配列番号40の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は10

50



0 % 同一である軽鎖可変領域配列と、を含む。

【0217】

一実施形態では、CD3 抗原結合ドメインは、配列番号100、配列番号109、配列番号118、配列番号127、配列番号135、配列番号145、又は配列番号154の重鎖可変領域と、配列番号37又は配列番号40のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0218】

多価抗体における結合ドメインの位置は、定義することができる。ベース抗体の結合ドメイン又は可変ドメインが結合ドメイン1及び2と呼ばれる場合、追加の1つ以上の結合ドメインは、結合ドメイン3、4などと呼ばれ得る。結合ドメインは、BDとも呼ばれる。BD3は、BD1又はBD2に連結されてもよい。BD3がBD1又は2のうちの1つに連結される場合、BD4は、存在する場合、BD1及び2の他方に連結される。

10

【0219】

本発明のT細胞関与多価抗体は、標的細胞抗原（本明細書では「標的細胞抗原結合ドメイン」又は「第2」若しくは「第3」抗原結合ドメインとも呼ばれる）に結合することができる、少なくとも2つの抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、T細胞関与多価抗体は、標的細胞抗原に結合することができる2つの抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、これらの抗原結合ドメインのそれぞれは、同じ抗原決定基に特異的に結合する。別の実施形態では、標的細胞抗原結合ドメインは同一である。一実施形態では、T細胞エンゲージャーポリペプチドは、標的細胞抗原に結合可能な2つ以下の標的細胞抗原結合ドメインを含む。

20

【0220】

一実施形態では、多価抗体は、CD3 結合ドメインであるBD1と、第1の標的細胞抗原（以後TA1と呼ぶ）に結合する結合ドメインであるBD2と、第2の標的細胞抗原（以後TA2と呼ぶ）に結合する結合ドメインであるBD3と、を含む。この実施形態では、BD3は、BD1又はBD2に連結され得る。一実施形態では、BD3に結合するTA2は、BD1に結合するCD3に連結される。別の実施形態では、BD3に結合するTA2は、BD2に結合するTA1に連結される。

【0221】

一実施形態では、多価抗体は、BD1に結合するTA1、BD2に結合するTA2、及びBD3に結合するCD3を含む。この実施形態では、BD3は、BD1又はBD2に連結され得る。一実施形態では、BD3に結合するCD3は、BD1に結合するTA1に連結される。別の実施形態では、BD3に結合するCD3は、BD2に結合するTA2に連結される。

30

【0222】

一実施形態では、本発明は、ベース抗体が結合ドメイン1及び2（BD1及び2）を含み、追加の結合ドメイン3（BD3）が結合ドメイン1（BD1）に連結され、任意選択の追加の結合ドメイン4（BD4）が結合ドメイン2（BD2）に連結される、多価抗体を提供する。一実施形態では、結合ドメイン1はCD3 結合ドメインであり、結合ドメイン2及び3は異なる標的細胞抗原に結合する。別の実施形態では、結合ドメイン2はCD3 結合ドメインであり、結合ドメイン1及び3は異なる標的細胞抗原に結合する。更なる実施形態では、結合ドメイン3はCD3 結合ドメインであり、結合ドメイン1及び2は異なる標的細胞抗原に結合する。

40

【0223】

好ましい実施形態では、多価の抗体は、更なる異なる標的細胞抗原に結合する結合ドメイン4を含む。

【0224】

本発明は、本明細書に記載の多価抗体を更に提供し、ベース抗体は結合ドメイン1及び2を含み、追加の結合ドメイン3は結合ドメイン1に連結され、任意選択の追加の結合ドメイン4は結合ドメイン2に連結される。一実施形態では、結合ドメイン1はCD3 結合

50

ドメインであり、結合ドメイン 2 及び 3 は異なる標的細胞抗原に結合する。別の実施形態では、結合ドメイン 2 は C D 3 結合ドメインであり、結合ドメイン 1 及び 3 は異なる標的細胞抗原に結合する。更なる実施形態では、結合ドメイン 3 は C D 3 結合ドメインであり、結合ドメイン 1 及び 2 は異なる標的細胞抗原に結合する。

#### 【 0 2 2 5 】

結合ドメイン 4 を含む場合、ドメインは、更に更なる異なる標的細胞抗原に結合することが好ましい。

#### 【 0 2 2 6 】

一実施形態では、該標的細胞抗原結合ドメインの第 1 は、P D - L 1、E G F R、C D 1 3 7、C L E C 1 2 A、フィブリノーゲン、又はサイログロブリンに結合する。一実施形態では、標的細胞抗原結合ドメインの第 1 及び第 2 は、P D - L 1、E G F R、C D 1 3 7、C L E C 1 2 A、フィブリノーゲン、及びサイログロブリンから選択される抗原に結合する。第 1 及び第 2 の標的細胞結合ドメインは、好ましくは異なる抗原に結合する。

#### 【 0 2 2 7 】

C D 3 結合ドメインは、好ましくは、M F 8 0 5 7 又は M F 8 0 5 8 又は M F 8 0 7 8 又は M F 8 3 9 7 又は M F 8 5 0 8 又は M F 9 2 4 9 又は M F 9 2 6 7 の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む。C D 3 結合ドメインは、好ましくは C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 1 0、好ましくは 0 ~ 5 のアミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを有する、M F 8 0 5 7、M F 8 0 5 8、M F 8 0 7 8、M F 8 3 9 7、M F 8 5 0 8、M F 9 2 4 9、又は M F 9 2 6 7 の V H のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

#### 【 0 2 2 8 】

標的細胞抗原結合ドメインは、P D - L 1 結合ドメインであり得る。存在する場合、P D - L 1 結合ドメインは、好ましくは、M F 5 3 7 7、又は M F 5 4 4 4、又は M F 5 3 8 0 の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む。P D - L 1 結合ドメインは、好ましくは、C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 1 0、好ましくは 0 ~ 5 のアミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを有する、M F 5 3 7 7、M F 5 4 4 4、又は M F 5 3 8 0 の V H のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

#### 【 0 2 2 9 】

標的細胞抗原結合ドメインは、E G F R 結合ドメインであり得る。存在する場合、E G F R 結合ドメインは、好ましくは、M F 8 2 3 3、又は M F 9 8 9 1、又は M F 9 8 8 6、又は M F 9 8 7 3、又は M F 9 9 8 8 の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む。E G F R 結合ドメインは、好ましくは、C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 1 0、好ましくは 0 ~ 5 のアミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを有する、M F 8 2 3 3、M F 9 8 9 1、M F 9 8 8 6、M F 9 8 7 3、又は M F 9 9 8 8 の V H のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

#### 【 0 2 3 0 】

標的細胞抗原結合ドメインは、C L E C 1 2 A 結合ドメインであり得る。存在する場合、C L E C 1 2 A 結合ドメインは、好ましくは、M F 4 3 2 7 の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む。C L E C 1 2 A 結合ドメインは、好ましくは、C D R 以外の 1 つ以上の位置に 0 ~ 1 0、好ましくは 0 ~ 5 のアミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを有する、M F 4 3 2 7 の V H のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

#### 【 0 2 3 1 】

一実施形態では、多価抗体は、C D 3 結合ドメイン、E G F R 結合ドメイン、及び P D - L 1 結合ドメインを含む。

#### 【 0 2 3 2 】

示される重鎖可変領域を有する結合ドメインは、軽鎖可変領域を含む。軽鎖可変領域は

、好ましくは、アミノ酸配列 C D R 1 - Q S I S S Y、C D R 2 - A A S、C D R 3 - Q Q S Y S T P、すなわち I G K V 1 - 3 9 ( I M G T による ) の C D R を含む C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 領域を含む。アミノ酸の変異、挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせは、好ましくは軽鎖可変領域の C D R 3 領域にはなく、好ましくは軽鎖可変領域の C D R 1 又は C D R 2 領域にはない。好ましい実施形態では、軽鎖可変領域は、示される配列に対する欠失、付加又は挿入を含まない。この実施形態では、軽鎖可変領域は、示されるアミノ酸配列に対して 0 ~ 5 個のアミノ酸置換を有することができる。アミノ酸置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。本発明の抗体の軽鎖の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 は、好ましくは、本明細書の他の箇所に記載されるように、それぞれ、アミノ酸配列 C D R 1 - Q S I S S Y、C D R 2 - A A S、C D R 3 - Q Q S Y S T P、すなわち、I G K V 1 - 3 9 ( I M G T による ) の C D R を含む。示される重鎖可変領域を有する結合ドメインの軽鎖は、好ましくは全て同じ軽鎖を含む。好ましくは、本明細書の他の箇所に定義される共通軽鎖である。

10

#### 【 0 2 3 3 】

アミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせは、好ましくは重鎖可変領域の C D R 3 領域にはなく、好ましくは重鎖可変領域の C D R 1 及び / 又は C D R 2 領域にはない。好ましい実施形態では、重鎖可変領域は、示される配列に対する欠失、付加、又は挿入を含まない。一実施形態では、重鎖可変領域は、示されるアミノ酸配列に対して 0 ~ 1 0 個、好ましくは 0 ~ 5 個のアミノ酸置換を有することができる。好ましい実施形態では、重鎖可変領域は、C D R 以外の位置に、示されるアミノ酸配列に対して 0 ~ 9、0 ~ 8、0 ~ 7、0 ~ 6、0 ~ 5、0 ~ 4、好ましくは 0 ~ 3、好ましくは 0 ~ 2、好ましくは 0 ~ 1、及び好ましくは 0 のアミノ酸の挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを含む。挿入、付加、欠失、又は置換の組み合わせは、アラインメントされた配列が 1 0 超の位置で異なる(好ましくは 5 未満)場合、特許請求される組み合わせである。アラインメントされた配列のうち的一方にあるギャップは、他の配列でスキップされたのと同じアミノ酸の数に値する。アミノ酸置換は、もしあれば、好ましくは保存的アミノ酸置換である。

20

#### 【 0 2 3 4 】

一実施形態では、標的細胞抗原結合ドメインは、F a b 分子である。一実施形態では、標的細胞抗原結合ドメインは、特異的抗原決定基に結合する F a b 分子であり、T 細胞関与多価抗体を標的部位、例えば、抗原決定基を有する特定のタイプの腫瘍細胞に向けることができる。

30

#### 【 0 2 3 5 】

特定の実施形態では、標的細胞抗原結合は、プログラム細胞死 1 タンパク質 ( P D - L 1 )、好ましくはヒト P D - L 1 ( 配列番号 2 5 7 ) と特異的に結合する。

#### 【 0 2 3 6 】

P D - L 1 は、妊娠、組織同種移植、自己免疫疾患、及び肝炎などの他の疾患状態などの特定の事象中に免疫応答を抑制する役割を果たす、1 型膜貫通タンパク質である。P D L 1 の P D - 1 又は B 7 . 1 ( C D 8 0 ) への結合は、抑制性シグナルを伝達し、これは、T 細胞を発現する P D - 1 の増殖を低減する。P D - 1 は、アポトーシスを介した外来抗原特異的 T 細胞の蓄積を制御することができると考えられている。P D - L 1 は、様々な癌細胞によって発現され、その発現は、癌細胞に対して免疫応答を弱めることに少なくとも部分的に関与すると考えられている。P D - L 1 は、B 7 ファミリーのタンパク質のメンバーであり、様々な他の名称で知られており、例えば、C D 2 7 4 分子、C D 2 7 4 抗原、B 7 ホモログ 1、P D C D 1 リガンド 1、P D C D 1 L G 1、P D C D 1 L 1、B 7 H 1、P D L 1、プログラム細胞死 1 リガンド 1、プログラム細胞死リガンド 1、B 7 - H 1、及び B 7 - H であり、C D 2 7 4 についての外部 I d s は、H G N C : 1 7 6 3 5、E n t r e z G e n e : 2 9 1 2 6 ; E n s e m b l : E N S G 0 0 0 0 0 1 2 0 2 1 7 ; O M I M : 6 0 5 4 0 2 ; U n i P r o t K B : Q 9 N Z Q 7 である。

40

#### 【 0 2 3 7 】

50

P D - L 1 結合ドメインは、親和性、エピトープ、及び他の特性の範囲であり得る。P D - L 1 の細胞外部分に結合することができる特定の可変ドメインは、M F 5 3 7 7、M F 5 4 4 4、又はM F 5 3 8 0 のV Hのアミノ酸配列を含む可変ドメインである。

【 0 2 3 8 】

P D - L 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 9、配列番号 1 7 8、配列番号 1 6 1、配列番号 1 7 0、配列番号 1 7 9 配列番号 1 6 2、配列番号 1 7 1、及び配列番号 1 8 0 のV Hからなる群から選択される少なくとも1つの重鎖C D Rと、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 5、及び配列番号 2 5 6 の群から選択される少なくとも1つの軽鎖C D Rを含む。

【 0 2 3 9 】

一実施形態では、P D - L 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 9、又は配列番号 1 7 8 の重鎖C D R 1、配列番号 1 6 1、配列番号 1 7 0、又は配列番号 1 7 9 の重鎖C D R 2、配列番号 1 6 2、配列番号 1 7 1、又は配列番号 1 8 0 の重鎖C D R 3、配列番号 2 5 4 の軽鎖C D R 1、配列番号 2 5 5 の軽鎖C D R 2、及び配列番号 2 5 6 の軽鎖C D R 3を含む。

【 0 2 4 0 】

一実施形態では、P D - L 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 6 3、配列番号 1 7 2 及び配列番号 1 8 1 の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一である重鎖可変領域配列と、配列番号 3 7 及び配列番号 4 0 の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一である軽鎖可変領域配列と、を含む。

【 0 2 4 1 】

一実施形態では、P D - L 1 抗原結合ドメインは、配列番号 1 6 3、配列番号 1 7 2 又は配列番号 1 8 1 の重鎖可変領域と、配列番号 3 7 又は配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【 0 2 4 2 】

特定の実施形態では、P D - L 1 抗原結合ドメインは、アミノ酸配列を含むP D - L 1 抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を含み、M P D L 3 2 8 0 A、R G 7 4 4 6 (米国特許第出願公開 2 0 1 0 / 0 2 0 3 0 5 6 (A 1) 号を参照のこと)、M E D I - 4 7 3 6 (国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号を参照のこと)、M S B - 0 0 1 0 7 1 8 C (国際公開第 2 0 1 3 / 0 7 9 1 7 4 号を参照のこと)、S T I - 1 0 1 4 (国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 1 6 3 4 号を参照のこと)、C X - 0 7 2 (国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 9 2 0 1 号を参照のこと)、K N 0 3 5 (Z h a n g e t a l . , C e l l D i s c o v . 7 : 3 (M a r c h 2 0 1 7) を参照のこと)、L Y 3 3 0 0 0 5 4 (例えば、国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 4 9 1 6 号を参照のこと)、及びC K - 3 0 1 (G o r e l i k e t a l . , A A C R : A b s t r a c t 4 6 0 6 (A p r 2 0 1 6) を参照のこと)、及び1 2 A 4 又はM D X - 1 1 0 5 (例えば、国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 3 2 2 3 号を参照のこと)について開示されている。

【 0 2 4 3 】

特定の実施形態では、P D - L 1 抗原結合ドメインは、P D - L 1 抗体M P D L 3 2 8 0 A、R G 7 4 4 6 (U S 2 0 1 0 / 0 2 0 3 0 5 6 A 1 を参照のこと)、M E D I - 4 7 3 6 (国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号を参照のこと)、M S B - 0 0 1 0 7 1 8 C (国際公開第 2 0 1 3 / 0 7 9 1 7 4 号を参照のこと)、S T I - 1 0 1 4 (国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 1 6 3 4 号を参照のこと)、C X - 0 7 2 (国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 9 2 0 1 号を参照のこと)、K N 0 3 5 (Z h a n g e t a l . , C e l l D i s c o v . 7 : 3 (M a r c h 2 0 1 7) を参照のこと)、L Y 3 3 0 0 0 5 4 (例えば、国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 4 9 1 6 号を参照のこと)、及びC K - 3 0 1 (G o r e l i k e t a l . , A A C R : A b s t r a c t 4 6 0 6 (A p r 2 0 1 6) を参照のこと)、及び1 2 A 4 又はM D X - 1 1 0 5 (例えば、国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 3 2 2 3 号を参照のこと)、の重鎖及び軽鎖可変領域と同じエピトープに結合する。

10

20

30

40

50

## 【0244】

特定の実施形態では、PD-L1抗原結合ドメインは、PD-L1抗体MPDL3280A、RG7446(US2010/0203056 A1を参照のこと)、MEDI-4736(国際公開第2011/066389号を参照のこと)、MSB-0010718C(国際公開第2013/079174号を参照のこと)、STI-1014(国際公開第2013/181634号を参照のこと)、CX-072(国際公開第2016/149201号を参照のこと)、KN035(Zhang et al., Cell Discov. 7:3(March 2017)を参照のこと)、LY3300054(例えば、国際公開第2017/034916号を参照のこと)、及びCK-301(Gorelik et al., AACR: Abstract 4606(Apr 2016)を参照のこと)、及び12A4又はMDX-1105(例えば、国際公開第2013/173223号を参照のこと)、の重鎖及び軽鎖可変領域を有するPD-L1への結合について競合する。

10

## 【0245】

特定の実施形態では、標的細胞抗原結合は、ヒト上皮成長因子受容体(EGFR)(配列番号258)と特異的に結合する。「ErbB1」又は「EGFR」は、Her-又はcErbB-1、-2、-3及び-4と命名された4つの受容体チロシンキナーゼ(receptor tyrosine kinase、RTK)のファミリーのメンバーである。EGFRは、4つのサブドメインから構成される細胞外ドメイン(ECD)を有し、これらのドメインのうちの2つは、リガンド結合に関与し、そのうちの1つは、ホモ二量体化及びヘテロ二量体化に関与する。この項で使用される参照番号は、「本明細書で引用された参照文献」との表題が付けられた列举の番号付けを指す。EGFRは、多様な細胞内応答を得るために、様々なリガンドからの細胞外シグナルを統合する。EGFRにより活性化される主要シグナル伝達経路は、Rasマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinase、MAPK)有糸分裂シグナル伝達カスケードから構成される。この経路の活性化は、Grb2のチロシンリン酸化EGFRへの動員によって開始される。これは、Grb2結合Rasグアニンヌクレオチド交換因子Son of Sevenless(SOS)を介してRasの活性化をもたらす。加えて、PI3-キナーゼ-Aktシグナル伝達経路はまた、EGFRによって活性化されるが、この活性化は、Her3の共発現が存在する場合にははるかに強力である。EGFRは、いくつかのヒト上皮悪性腫瘍、特に乳房、膀胱、非小細胞肺癌肺、結腸、卵巣、頭頸部、及び脳の癌に関与している。この遺伝子における活性化突然変異、並びに受容体及びそのリガンドの過剰発現が見出されており、自己分泌活性化ループが生じる。したがって、このRTKは、癌療法の標的として広く使用されている。細胞外リガンド結合ドメインに指向されたRTK及びモノクローナル抗体(monoclonal antibody、mAb)を標的とする小分子阻害剤の両方が開発されてきたが、これは、今までのところは、ほとんどが患者の選択群に関してだが、いくつかの臨床的成功を示している。ヒトEGFRタンパク質及びそれをコードする遺伝子についてのデータベース登録番号は、(GenBank NM\_005228.3)である。この登録番号は、主に、EGFRタンパク質を標的として同定する更なる方法を提供するために与えられ、抗体によって結合されたEGFRタンパク質の実際の配列は、例えば、いくつかの癌などで生じるものなどのコード遺伝子における変異のために変化し得る。本明細書において、EGFRに言及される場合、特に明記しない限り、ヒトEGFRを指す。EGFRに結合する抗原結合部位は、EGFR及びいくつかのEGFR陽性腫瘍で発現されたものなどの様々な変異体に結合する。

20

30

40

## 【0246】

EGFR結合ドメインは、親和性、エピトープ、及び他の特性の範囲であり得る。EGFRの細胞外部分に結合することができる特定の可変ドメインは、MF8233、MF9891、MF9886、MF9873、MF9988のVHのアミノ酸配列を含む可変ドメインである。

50

## 【0247】

E G F R 抗原結合ドメインは、配列番号 187、配列番号 196、配列番号 205、配列番号 214、配列番号 223、配列番号 188、配列番号 197、配列番号 206、配列番号 215、配列番号 224 配列番号 189、配列番号 198、配列番号 207、配列番号 216、及び配列番号 225 からなる群から選択される少なくとも 1 つの重鎖 C D R と、配列番号 254、配列番号 255、配列番号 256 の群から選択される少なくとも 1 つの軽鎖 C D R を含む。

## 【0248】

一実施形態では、E G F R 抗原結合ドメインは、配列番号 187、配列番号 196、配列番号 205、配列番号 214、又は配列番号 223 の重鎖 C D R 1、配列番号 188、配列番号 197、配列番号 206、配列番号 215、又は配列番号 224 の重鎖 C D R 2、配列番号 189、配列番号 198、配列番号 207、配列番号 216、又は配列番号 225 の重鎖 C D R 3、配列番号 254 の軽鎖 C D R 1、配列番号 255 の軽鎖 C D R 2、及び配列番号 256 の軽鎖 C D R 3 を含む。

10

## 【0249】

一実施形態において、E G F R 抗原結合ドメインは、配列番号 190、配列番号 199、配列番号 208、配列番号 217、及び配列番号 226 の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一である重鎖可変領域配列と、配列番号 37 及び配列番号 40 の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一である軽鎖可変領域配列と、を含む。

20

## 【0250】

一実施形態では、E G F R 抗原結合ドメインは、配列番号 190、配列番号 199、配列番号 208、配列番号 217、又は配列番号 226 の重鎖可変領域と、配列番号 37 又は配列番号 40 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

## 【0251】

特定の実施形態では、E G F R 抗原結合ドメインは、E G F R 抗体、セツキシマブ (C225, E r b i t u x (登録商標), L i l l y) 又はパニツムマブ (V e c t i b i x, A m g e n) の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。

## 【0252】

特定の実施形態では、E G F R 抗原結合ドメインは、E G F R 抗体、セツキシマブ (C225, E r b i t u x (登録商標), L i l l y) 又はパニツムマブ (V e c t i b i x, A m g e n) の重鎖及び軽鎖可変領域と同じエピトープに結合する。

30

## 【0253】

特定の実施形態では、E G F R 抗原結合ドメインは、E G F R 抗体、セツキシマブ (C225, E r b i t u x (登録商標), L i l l y) 又はパニツムマブ (V e c t i b i x, A m g e n) の重鎖及び軽鎖可変領域を有する E G F R への結合について競合する。

## 【0254】

## 共通可変領域

本発明の多価抗体は、好ましくは、3 つ以上の結合ドメインのそれぞれにおいて共通鎖を使用する。記載されるように、本発明の多価抗体のベース抗体部分は、好ましくは、1 つの抗原に結合する第 1 の重鎖可変領域 / 軽鎖可変領域 (V H / V L) の組み合わせを有し、第 2 の抗原に結合する第 2 の V H / V L の組み合わせを有する。ベース抗体部分に接続された、それぞれの追加の結合ドメインは、抗原上の更なるエピトープに結合する追加の V H / V L の組み合わせを含んでもよい。

40

## 【0255】

本発明のベース抗体部分は、好ましくは、2 つの重鎖 (一方又は両方が 1 つ以上の追加の C H 1 及び V H ドメインを含む) と、各 C H 1 及び V H ドメインと対合する軽鎖と、を含む。好ましくは、2 つの重鎖は適合性ヘテロ二量体化ドメインを有し、好ましくは、軽鎖は共通軽鎖である。あるいは、本発明の多価抗体のベース抗体部分は、2 つの軽鎖 (一

50

方又は両方が1つ以上の追加のC L及びV Lドメインを含む)、並びに各C L及びV Lドメインと対合する重鎖可変領域を含み、該重鎖可変領域は、共通重鎖可変領域を含む。

#### 【0256】

本発明の実施形態が、共通軽鎖を含む多価抗体を含み、該軽鎖は、2つ以上の重鎖可変領域をコードするDNAを含む宿主細胞内で発現され、該軽鎖は、利用可能な重鎖(又はC H 1 - V H 1 領域)と対合することができ、それにより少なくとも3つの機能的抗原結合ドメインを形成する。

#### 【0257】

機能的抗原結合ドメインは、抗原上のエピトープに特異的に結合することができる。好ましくは、本発明の多価抗体において使用される共通軽鎖は、本発明による方法により産生された全ての重鎖(又はC H 1 - V H 1 領域)と対合することができ、それにより機能的抗原結合ドメインを形成し、その結果、マッチしない重鎖及び軽鎖の誤対合が回避されるか、又は多価抗体よりも著しく低い比率で産生される。

#### 【0258】

本発明の多価抗体が、一連の重鎖可変領域と結合して機能的抗原結合ドメインを有する抗体を形成することができる共通軽鎖(可変領域)を有することが本発明の好ましい態様である。(国際公開第2004/009618号、国際公開第2009/157771号)。

#### 【0259】

本発明の多価抗体において使用するための共通軽鎖(可変領域)は、好ましくはヒト軽鎖(可変領域)である。共通軽鎖(可変領域)は、好ましくは生殖細胞系列配列を有する。好ましい生殖細胞系列配列は、ヒトレパートリーで頻繁に使用され、良好な熱力学的安定性、収率、及び溶解度を有する軽鎖可変領域である。好ましい生殖細胞系列軽鎖は、O 1 2である。共通軽鎖は、好ましくは、再構成生殖細胞系列ヒトカップ軽鎖I g V 1 - 3 9 \* 0 1 / I G J 1 \* 0 1 (図11A; 配列番号35)である。共通軽鎖可変領域は、好ましくは、再構成生殖細胞系列ヒトカップ軽鎖I g V 1 - 3 9 \* 0 1 / I G J 1 \* 0 1 の可変領域(図11A; 配列番号35)である。共通軽鎖は、好ましくは、0~5個のアミノ酸挿入、欠失、置換、付加、又はこれらの組み合わせを有する、図11B、又は8Dに示されるような(それぞれ配列番号37又は40)軽鎖可変領域を含む。共通軽鎖は、好ましくは、軽鎖定常領域、好ましくはカップ軽鎖定常領域を更に含む。共通軽鎖をコードする核酸は、共通軽鎖タンパク質を発現するために使用される細胞系に対してコード最適化され得る。コード核酸は、生殖細胞系列核酸配列から逸脱し得る。

#### 【0260】

本発明の多価抗体で使用するための共通軽鎖(可変領域)は、ラムダ軽鎖であり得、これもまた本発明の文脈内で提供されるが、カップ軽鎖が好ましい。本発明の共通軽鎖は、カップ又はラムダ軽鎖の定常領域を含み得る。このことは、好ましくは、カップ軽鎖の定常領域であり、好ましくは、該共通軽鎖は生殖細胞系列軽鎖であり、好ましくは、I g V K I - 3 9 遺伝子断片を含む再構成生殖細胞系列ヒトカップ軽鎖、例えば、再構成生殖細胞系列ヒトカップ軽鎖I g V K I - 3 9 \* 0 1 / I G J K I \* 0 1 (図11)である。再構成生殖細胞系ヒトカップ軽鎖I g V 1 - 3 9 \* 0 1 / I G J 1 \* 0 1、I G K V 1 - 3 9 / I G K J 1、h u V 1 - 3 9 軽鎖、又は短縮してh u V 1 - 3 9、又は単に1 - 3 9 という用語は、本出願全体にわたって互換的に使用される。当業者は、「共通」とは、アミノ酸配列が同一ではない軽鎖の機能的等価物を指すことも認識するであろう。該軽鎖の多くの変異体が存在し、機能的結合領域の形成に実質的に影響を与えない変異(欠失、置換、付加)が存在する。

#### 【0261】

I g V 1 - 3 9 は、免疫グロブリン可変カップ1 - 3 9 遺伝子についての短縮形である。この遺伝子はまた、免疫グロブリンカップ可変1 - 3 9、I G K V 1 - 3 9、I G K V 1 - 3 9、O 1 2 a、又はO 1 2としても知られる。この遺伝因子についての外部I d sは、H G N C : 5 7 4 0、E n t r e z G e n e : 2 8 9 3 0、E n s e m b l : E

10

20

30

40

50

NSG00000242371である。IgV 1-39の好ましいアミノ酸配列を図11に示す。これはV領域の配列を列挙している。V領域は、5つのJ領域のうちの1つと組み合わせることができる。図11は、J領域と組み合わせたIgV 1-39についての2つの好ましい配列を記載している。結合された配列は、IGKV1-39/jk1及びIGKV1-39/jk5として示され、代替名は、IgV 1-39\*01/IGJ 1\*01又はIgV 1-39\*01/IGJ 5\*01である (imgt.orgでのIMGTデータベースの世界的なウェブによる命名法)。

#### 【0262】

共通軽鎖可変領域は、カッパ軽鎖定常領域に結合することが好ましい。好ましい実施形態では、本発明の多価抗体において使用される軽鎖可変領域は、カッパ軽鎖IgV 1-39\*01/IGJ 1\*01又はIgV 1-39\*01/IGJ 5\*01を含む。好ましい実施形態では、多価抗体中の共通軽鎖はIgV 1-39\*01/IGJ 1\*01である。

10

#### 【0263】

共通軽鎖を産生する細胞は、例えば、再構成生殖細胞系列ヒトカッパ軽鎖IgV 1-39\*01/IGJ 1\*01及びラムダ定常領域に融合された前述の軽鎖の可変領域を含む軽鎖を産生することができる。本明細書では生殖系列配列を参照する場合、可変領域は生殖系列配列であることが好ましい。

#### 【0264】

本発明の多価抗体において使用するための好ましい共通軽鎖は、配列番号29に記載された配列を含むものである。

20

#### 【0265】

本発明の多価抗体において使用するための共通鎖は、重鎖であってもよく、こてもまた本発明の文脈においても提供される。共通重鎖は、二重特異性抗体を作製するために当該技術分野において使用されており、本明細書では3つ以上の結合ドメインを含む多価抗体を作製する際に使用することができ、該結合ドメインのうちの2つ以上は、当該技術分野において既知の共通重鎖を含む。例えば、重鎖可変ドメインが全てのライブラリメンバーに関して同じであり、したがって、多様性が軽鎖可変ドメインに基づく抗体ライブラリの使用である。かかるライブラリは、例えば、PCT/US2010/035619号、及びPCT/US2010/057780号に記載されており、これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。共通重鎖を有する結合ドメインを生成するためのこれらの及び他の技術は、当業者によって作られ得、本発明では、本明細書に開示される新規なフォーマットを有する多価抗体を産生するために使用することができる。

30

#### 【0266】

##### 多価抗体の産生

本発明の多価抗体は、図1a～図1u含む上記のような多価抗体を含む多量体を形成する3つ以上のタンパク質と一緒にコードする1つ以上の遺伝子構築物と個々の細胞を共トランスフェクションすることによって産生され得る。例えば、宿主細胞は、3つ以上の重鎖可変領域及び共通軽鎖可変領域をコードする核酸と共トランスフェクションされて、多価抗体を産生することができる。あるいは、本発明の多価抗体は、3つ以上の軽鎖可変領域及び共通重鎖と一緒にコードする1つ以上の遺伝子構築物を用いた個々の細胞の共トランスフェクションによって産生され得る。

40

#### 【0267】

ヘテロ二量体である産生抗体を有利にするために、いくつかの方法が公開されている。本発明において、細胞は、それぞれのホモ二量体の産生よりもヘテロ二量体の産生を優先することが好ましい。このことは、典型的には、ホモ二量化よりもヘテロ二量化（つまり、1つの重鎖が第2の重鎖と結合する二量化）を優先するように、重鎖の定常領域を修飾することによって達成される。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、適合性ヘテロ二量体化ドメインを有する2つの異なる免疫グロブリン重鎖を含む。

#### 【0268】

50



この適合性ヘテロ二量体化ドメインは、好ましくは、適合性免疫グロブリン重鎖 C H 3 ヘテロ二量体化ドメインである。野生型 C H 3 ドメインが使用される場合、2つの異なる重鎖 ( A 及び B ) と共通軽鎖との共発現は、3つの異なる抗体種、A A、A B 及び B B をもたらすであろう。A A 及び B B は、2つのホモ二量体抗体の表記であり、A B はヘテロ二量体抗体の表記である。所望のヘテロ二量体産物 ( A B ) の割合を増加させるために、C H 3 操作を使用することができ、又は言い換えれば、以下に定義されるように、適合性ヘテロ二量体化ドメインを有する重鎖を使用することができる。当該技術分野では、重鎖のこのようなヘテロ二量体化が達成され得る様々な方法が記載されている。

#### 【 0 2 6 9 】

本明細書で使用する時、用語「適合性ヘテロ二量体化ドメイン」は、操作ドメイン A ' が操作ドメイン B ' を有するヘテロ二量体を優先的に形成し、逆もまた同様であり、A ' - A ' と B ' - B ' との間のホモ二量体化が減少するように操作を受けたタンパク質ドメインを指す。

#### 【 0 2 7 0 】

米国特許出願公開第 1 3 / 8 6 6 , 7 4 7 号 ( 現在、米国特許第 9 , 2 4 8 , 1 8 1 号として発行 )、米国特許出願公開第 1 4 / 0 8 1 , 8 4 8 号 ( 現在、米国特許第 9 , 3 5 8 , 2 8 6 号として発行 )、国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 3 号、及び国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 4 号において、適合性ヘテロ二量体化ドメインを使用して多価抗体を産生するための方法及び手段が開示されている。本発明では、これらの手段及び方法を好適に採用することができる。具体的には、本発明の抗体は、好ましくは、本質的に二重特異性全長 I g G 分子のみを産生するための変異を含む。好ましい変異は、第 1 の C H 3 ドメイン又はそれに対応する位置におけるアミノ酸置換 L 3 5 1 K 及び T 3 6 6 K ( E U ナンバリング ) ( 「 K K - 変異体」重鎖 )、並びに第 2 のドメイン又はそれに対応する位置におけるアミノ酸置換 L 3 5 1 D 及び L 3 6 8 E ( 「 D E - 変異体」重鎖 ) である ( 又はその逆 )。D E - 変異体及び K K - 変異体が優先的に対をなして、ヘテロ二量体 ( いわゆる「 D E K K 」二重特異性分子 ) を形成することが、本発明者らの米国特許第 9 , 2 4 8 , 1 8 1 号及び同第 9 , 3 5 8 , 2 8 6 号の特許、並びに国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 4 号で以前に実証されている。D E - 変異体重鎖のホモ二量体化 ( D E D E ホモ二量体 ) 又は K K - 変異体重鎖のホモ二量体化 ( K K K K ホモ二量体 ) は、同一の重鎖間の C H 3 - C H 3 界面における荷電残基間の反発力のために、ほとんど発生しない。

#### 【 0 2 7 1 】

多価抗体を形成するために多量体化するタンパク質を発現することができる本発明の好ましい宿主細胞では、宿主細胞は、3つのタンパク質をコードする核酸で形質転換される。N 末端から C 末端の順に、コードされたタンパク質は、V H 1 - C H 1 - V H 2 - C H 1 - C H 2 - C H 3 を含む第 1 のタンパク質を含み、リンカーは、V H 2 及び C H 1 を第 1 のタンパク質上に接続し、第 2 のコードされたタンパク質は、V L c - C L を含み、第 3 のコードされたタンパク質は、V H 3 - C H 1 - C H 2 - C H 3 を含み、第 1 及び第 3 のコードされたタンパク質の C H 1 は、第 2 のコードされたタンパク質の C L と対合し、第 1 及び第 3 のタンパク質のコードされた C H 3 領域は、それぞれ、第 1 の C H 3 タンパク質若しくはそれに対応する位置においてアミノ酸 L 3 5 1 K 及び T 3 6 6 K ( E U 番号付け ) をコードする、又は第 3 のタンパク質若しくはそれに対応する位置においてアミノ酸 L 3 5 1 D 及び L 3 6 8 E をコードする、又はその逆もまた同様である。あるいは、該第 1 及び第 3 のタンパク質は、これらのタンパク質のそれぞれの C H 3 ドメインの効率的な対合を引き起こす他の適合性ヘテロ二量体化ドメインを含む。

#### 【 0 2 7 2 】

該 3 つのタンパク質をコードする該核酸は、本発明の多価抗体を生成するために、1つ以上のベクター上に存在し得る。同様に、宿主細胞は、図 1 a ~ 1 u のものを含む、上記の多価抗体のそれぞれについて、3つを超えるタンパク質をコードして生成することができる。

#### 【 0 2 7 3 】

該３つのタンパク質をコードしている該核酸は、宿主細胞のゲノムに、好ましくは、高発現、及び遺伝子サイレンシングの非存在又は減少のために既知の染色体領域で、安定的に組み込まれてもよい。

【０２７４】

したがって、本発明によれば、多価抗体の調製方法が提供され、該方法は、  
本発明による多価抗体に組み立てることができるポリペプチドをコードする１つ以上の核酸配列を含む細胞を準備することと、  
該宿主細胞を、ポリペプチドの発現及びそれらの組み立てを多価抗体に提供する条件下で培養することと、を含む。

【０２７５】

本発明の宿主細胞は、全発現免疫グロブリンに基づいて、本発明の多価抗体の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％の純度で産生することができる。

【０２７６】

本発明の宿主細胞は、多価抗体を産生することができ、産生される多価抗体の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％は、全ての結合部位に対して同族の共通鎖と対合した可変再構成領域を含む。

【０２７７】

本発明の宿主細胞は、多価抗体を産生することができ、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％の発現した共通鎖は多価抗体と対合しており、遊離した会合していないタンパク質ではない。

【０２７８】

抗体産生に好適な細胞は、ハイブリドーマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳ０細胞、又はＰＥＲ－Ｃ６細胞である。特に好ましい実施形態では、該細胞は、ＣＨＯ細胞である。本明細書に開示される抗体の産生のための細胞は、宿主細胞とも呼ばれる。

【０２７９】

様々な機関及び企業は、例えば、臨床使用のために、抗体の大規模生産のための細胞株を開発してきた。かかる細胞株の非限定的な例は、ＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞、又はＰＥＲ－Ｃ６細胞である。これらの細胞の少なくとも一部はまた、タンパク質の産生などの他の目的にも使用される。タンパク質及び抗体の工業規模生産のために開発された細胞株は、本明細書では産業細胞株と更に称される。好ましい実施形態では、本発明は、本発明の抗体を産生する工業用細胞株を提供する。

【０２８０】

一実施形態では、本発明は、本発明による抗体及び／又は本発明による核酸を含む細胞（宿主細胞）を提供する。該細胞は、好ましくは動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくは霊長類細胞、最も好ましくはヒト細胞である。本発明の目的のために、好適な細胞、好適な宿主細胞は、本発明による抗体及び／又は本発明による核酸を含み、好ましくは産生することができる任意の細胞である。

【０２８１】

本発明は、本発明による抗体を含む細胞を更に提供する。好ましくは、該細胞（典型的には *in vitro*、単離、又は組換え細胞）は、該抗体を産生する。好ましい実施形態では、該細胞は、ハイブリドーマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳ０細胞、又はＰＥＲ－Ｃ６細胞である。特に好ましい実施形態では、該細胞は、ＣＨＯ細胞である。本発明による細胞を含む細胞培養が更に提供される。様々な機関及び企業は、例えば、臨床使用のために、抗体の大規模生産のための細胞株を開発してきた。かかる細胞株の非限定的な例は、ＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞、又はＰＥＲ－Ｃ６細胞である。これらの細胞はまた、タンパク質の産生などの他の目的にも使用される。タンパク質及び抗

10

20

30

40

50

体の工業規模生産のために開発された細胞株は、本明細書では産業細胞株と更に称される。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、本発明の多価抗体の産生のための抗体の大規模生産のために開発された細胞株の使用を提供する。本発明は更に、請求項に記載の多価抗体に対して単独で又は一緒にコードされるもう1つの核酸分子を含む多価抗体を産生するための細胞を提供する。

#### 【0282】

本発明はまた、同じ細胞によって2つ以上の抗体を産生するための方法を提供し、該抗体のうちの少なくとも1つは、本明細書に記載される多価抗体である。この実施形態は、前述のDE/KKヘテロ二量体化システムによって例示される。しかしながら、本発明は、重鎖のヘテロ二量体化を可能にするための特定の方法に限定されない。前述のように、DE-変異体及びKK-変異体は、優先的に対合して、ヘテロ二量体（いわゆる「DEKK」二価/多価分子）を形成する。DE-変異体重鎖のホモ二量体化（DEDEホモ二量体）又はKK-変異体重鎖のホモ二量体化（KKKKホモ二量体）は、同一の重鎖間のCH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>界面における荷電残基間の反発力のために、ほとんど発生しない。DE-又はKK-変異体重鎖のいずれかを有する更なる重鎖を導入することにより、更なるDEKK二価/多価分子の産生が可能になる。新たに導入されたDE-重鎖（DE2）は、既存のKK重鎖と会合することができる。したがって、細胞は、2つの二重/多価抗体、DE1KK及びDE2KK二価抗体を産生する。新たなKK重鎖（KK2）が新たなDE重鎖の代わりに導入される場合、DEKK1とDEKK2との組み合わせを有する二価抗体が産生される。異なる抗体が細胞によって産生され得るレベルは、典型的には、互いに対するDE1/2及びKK1/2鎖の相対的発現を調節することによって最適に調節される。軽鎖は、典型的には、単一の重鎖のレベルを低減するのに十分に産生され、1つの鎖が産生されるレベルは、典型的には、相補鎖と効果的な対合を可能にするのに十分である。DE1/2において、KK例であるDE1及びDE2重鎖は、好ましくはKK重鎖のレベルと一緒に一致するレベルで産生される。それぞれの抗体のレベルは、DE1及びDE2が、互いに連動して産生されるレベルを調節することによって調節することができる。KK1/2 DE変異体の場合、状況は当然ながら同様であるが、KK1及びKK2鎖の場合は互いに関連している。重鎖のそれぞれに会合する結合ドメイン又は可変ドメインの数に応じて、この方法は、様々な異なる二価/多価抗体の産生を可能にする。ここで、いくつかの非限定的な例を説明する。この例では、重鎖DE1は、抗原Vに結合する結合ドメイン又は可変ドメインの全ての結合ドメインに共通軽鎖とともにある1つの重鎖可変領域を有し、重鎖DE2は、抗原W及びXに結合する2つの結合ドメイン又は可変ドメインを形成する、共通軽鎖とともにある2つの重鎖可変領域を有する。重鎖KKは、抗原Yに結合する結合ドメイン又は可変ドメインを形成する、共通軽鎖とともにある1つの重鎖可変領域を有する。細胞内においてこれらの重鎖及び軽鎖を産生すると、抗体DE1KK及び抗体DE2KKが産生され、抗体DE1KKは、抗原V及びYに結合する二価抗体である。抗体DE2KKは、抗原W、X、Yに結合する多価抗体である。上記の例において、DE1が共通軽鎖とともに2つの結合ドメイン又は可変ドメインを形成する2つの重鎖可変領域も有する場合、本発明の2つの多価抗体が産生される。KK重鎖はまた、追加の重鎖可変領域を提供することができ、それにより、同じ又は異なる抗原結合特異性の更なる結合ドメインを追加することもできる。上記のDE/KKなどの2つ以上の異なるヘテロ二量体化ドメインの組み合わせ、及びノブインホールドメインは、オリゴクローン抗体産生において更なる多様性を付加することができる。例えば、2つの重鎖を、一方がノブと共に、他方が相補的なホールと共に付加することにより、ノブ重鎖及びホール重鎖を含む独立した二価/多価抗体の産生を可能にする。各重鎖と会合する重鎖可変領域の数に応じて、そして同一であるか又は異なっているかに応じて、更なる単特異性抗体、又は更なる二価若しくは多価抗体が産生される。

#### 【0283】

本発明によると、2つ以上の抗体を含む組成物が提供され、そのうちの少なくとも1つは、本発明の多価抗体であってもよい。本発明のかかる組成物は、本発明の2つ以上の多

10

20

30

40

50

価抗体を含み得る。かかる組成物は、3つ、4つ、5つ、又はそれ以上の抗体を含んでもよく、そのうちの少なくとも1つは、本発明の多価抗体であってもよい。かかる組成物は、3つ、4つ、5つ、又はそれ以上の抗体を含んでもよく、これらの抗体の全ては、本発明の多価抗体であってもよい。

【0284】

かかる組成物では、組成物中に存在する1つ以上の抗体は、共通の1つの重鎖を有し得る。

【0285】

本発明の宿主細胞は、2つ以上の抗体を発現し得るか、又は発現することができる場合があり、そのうちの少なくとも1つは、本発明の多価抗体であってもよい。本発明の宿主細胞は、本発明の2つ以上の多価抗体を発現し得るか、又は発現することができる場合がある。かかる宿主細胞は、3つ、4つ、5つ、又はそれ以上の抗体を発現し得るか、又は発現することができる場合があり、そのうちの少なくとも1つは、本発明の多価抗体であってもよい。かかる宿主細胞は、3つ、4つ、5つ、又はそれ以上の抗体を発現し得るか、又は発現することができる場合があり、これらの全ては、本発明の多価抗体であってもよい。

10

【0286】

したがって、本発明によれば、2つ以上の抗体を含む組成物の調製方法が提供され、この方法は、

2つ以上の抗体に組み立てることができるポリペプチドをコードする1つ以上の核酸配列を含む細胞を提供することであって、そのうちの少なくとも1つは、本発明による多価抗体である、ことと、

20

該宿主細胞を、ポリペプチドの発現を提供する条件下で、それらの組み立てを2つ以上の抗体に提供する条件下で培養することであって、そのうちの少なくとも1つは、本発明による多価抗体である、ことと、を含む。

【0287】

本発明はまた、同じ細胞によって2つ以上の該抗体を産生するための方法を提供し、この抗体のうちの少なくとも1つは、本明細書に記載される多価抗体である。

【0288】

本発明は、少なくとも1つが請求項に記載の多価抗体である、2つ以上の抗体を含む組成物の産生方法であって、該方法は、

30

共通軽鎖とともにある重鎖可変領域を有する第1の重鎖をコードし、第1の抗原に結合する結合ドメイン又は可変ドメインを形成する核酸と、

該共通軽鎖とともにある重鎖可変領域を有する第2の重鎖をコードし、第2の抗原に結合する可変ドメイン、及び該共通軽鎖とともにある重鎖可変領域を形成し、第3の抗原に結合する可変ドメインを形成する核酸と、

該共通軽鎖とともにある重鎖可変領域を有する第3の重鎖をコードし、第4の抗原に結合する可変ドメインを形成する核酸と、

該共通軽鎖を含むポリペプチドをコードする核酸と、を有する細胞を提供することを含む、

40

該核酸のうちの2つ以上は、物理的に連結されていても、されていなくてもよく、該核酸のそれぞれは、該細胞内のコードされた重鎖及び軽鎖の発現を可能にする発現制御配列を更に含み、該方法は、該細胞を培養して該重鎖及び軽鎖の発現を可能にすることと、任意に該2つ以上の抗体を収集することと、を更に含む。一実施形態では、該第1及び第2の重鎖は、適合性ヘテロ二量体化ドメイン、好ましくはDE/KKヘテロ二量体化ドメインを有する。好ましい実施形態では、該第3の重鎖は、適合性ヘテロ二量体化ドメインの一部のうちの1つを含み、その結果、2つの抗体が産生される。一実施形態では、本方法は、該核酸を有する細胞の収集を提供することと、収集したものから、重鎖及び軽鎖それぞれの発現の所望の比を有する細胞を選択することと、を更に含む。好ましい実施形態では、該2つ以上の抗体は、2つ以上の多重特異性抗体である。好ましい実施形態では、細

50

胞は、本質的に2つ以上の抗体の等モル量を産生する。いくつかの実施形態では、細胞は、該2つ以上の抗体のうちの他方のものよりも一方の抗体をより多く産生する。

【0289】

非ヒト動物

多価結合タンパク質の合成及び発現は、一部は2つ以上の異なる重鎖と結合して発現できる適切な軽鎖の特定に関連する問題が原因で、一部は分離の問題が原因で問題がある。更に、当該技術分野では、多様な抗体の価数、安定性を有する柔軟性、及び低免疫原性を可能にする一連のリンカーを欠いている。

【0290】

本明細書に記載の方法及び組成物は、好適な方法から得られる、それに由来する、又はそれに基づいて、結合ドメインを有する好適な多価結合タンパク質を作製することを可能にする。好適な方法としては、ファージディスプレイ法（ファージディスプレイシステムにおいて生成された生殖細胞系列配列の修飾を含む）、及び当該技術分野において既知の他の *in vitro* 法を挙げることができる。特に有用な方法は、遺伝子組換え非ヒト動物に、体細胞組換えの自然なプロセス、及び親和性成熟により、共通軽鎖と会合して発現することができる適切な重鎖可変ドメインを作製させることである。

【0291】

一実施形態では、本発明の多価抗体において使用される可変ドメインは、生殖細胞系内に再構成されていない重鎖可変遺伝子座を含み、単一の再構成ヒト軽鎖可変ドメイン、例えば、げっ歯類などの共通軽鎖哺乳動物を発現する非ヒトトランスジェニック動物の重鎖及び軽鎖可変領域から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づく。かかる非ヒトトランスジェニック動物は、抗原への曝露時に、共通軽鎖と対合した多様な重鎖可変領域を発現し、次いで、それを使用して、多価抗体の産生のために宿主細胞に効率的に形質転換することができる、該トランスジェニック動物から得られるか、それに由来するか、又はそれに基づく重鎖可変領域をコードする核酸配列を開発することができる。

【0292】

特に、1つ以下、又は2つ以下のヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖可変ドメインを発現するように操作された免疫化された共通軽鎖動物の適切なB細胞のヒト可変領域配列は、本発明の多価抗体の潜在的V<sub>H</sub>ドメインの供給源として使用され得る。動物のB細胞は、様々な実施形態において多価抗体が結合する抗原である1つ又は複数の目的の抗原で免疫化される。該動物のB細胞は、様々な実施形態において多価抗体が結合する抗原である1つ以上の目的の抗原で免疫化される。該動物の細胞、組織、又は血清、脾臓又はリンパ材料をスクリーニングして、対象となる抗原に関する所望の特性、例えば、高親和性、低親和性、遮断能、活性化、内在化、又は他の特性などを示す重鎖可変ドメイン（又はそれらを発現するB細胞）を得る。該トランスジェニック動物における抗原刺激に応答して生成される重鎖可変ドメインのほぼ全てが、1つ未満、又は2つ未満のV<sub>L</sub>遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン軽鎖の発現と共に作られるため、重鎖可変領域は、トランスジェニック動物において発現される共通軽鎖ドメインを発現及び会合することができる。

【0293】

一態様では、本明細書に記載のエピトープ結合タンパク質が提供され、ヒトV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>配列は、目的のエピトープを含む抗原で免疫されている、本明細書に記載されるトランスジェニックマウス、及び/又は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2009/157771号に開示されているトランスジェニック動物のB細胞から得られる核酸に基づいて核酸によりコードされる。

【0294】

核酸配列、ポリペプチド、ベクター、及び細胞

本発明は、本発明の多価抗体の組み立てにおいて使用され得るポリペプチド又はリンカーをコードする核酸配列、かかる核酸配列を含むベクター、本発明の多価抗体を産生できる細胞、及びかかる細胞を使用してかかる多価抗体を調製する方法を、更に提供する。

## 【 0 2 9 5 】

本発明による多価抗体は、典型的には、本発明の抗体を形成するように一緒に組み立てるポリペプチドをコードする核酸配列を発現する細胞によって産生される。

## 【 0 2 9 6 】

したがって、本発明は、配列番号 1 ~ 3 若しくは 5 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含むリンカー、又はそれらのいずれかと少なくとも約 8 5 % の配列同一性、それらのいずれかと少なくとも約 8 5 % の配列同一性、例えばそれらのいずれかと少なくとも約 9 0 % の配列同一性、例えばそれらのいずれかと少なくとも約 9 5 % の配列同一性、例えばそれらのいずれかと少なくとも約 9 8 % の配列同一性、例えばそれらのいずれかと少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有するポリペプチドを提供する。

10

## 【 0 2 9 7 】

本発明は、V H 1 - C H 1 - ヒンジベースリンカー - V H 2 - C H 1 を含むポリペプチドを更に提供する。

## 【 0 2 9 8 】

特定の実施形態では、V H 1 及び V H 2 は、同じエピトープに結合する。特定の実施形態では、V H 1 及び V H 2 は、同じ抗原に結合するが、異なるエピトープに結合する。特定の実施形態では、V H 1 及び V H 2 は、別個のエピトープ及び抗原に結合する。

## 【 0 2 9 9 】

また、本発明によって提供されるのは、かかるリンカー又はポリペプチドをコードする核酸配列、及びかかる核酸配列を含むベクターである。

20

## 【 0 3 0 0 】

記載のポリペプチドを作製するために採用される核酸配列は、任意の好適な発現ベクター内に配置されてもよく、適切な状況では、単一の宿主細胞内の 2 つ以上のベクター内に配置されてもよい。

## 【 0 3 0 1 】

一般に、可変ドメインをコードする核酸配列は、適切なリンカー及び / 又は定常領域でクローニングされ、配列は、発現に好適な細胞株において好適な発現構築物内のプロモーターと作動可能に連結して配置される。

## 【 0 3 0 2 】

したがって、本発明は、抗体の調製方法も提供し、該方法は、  
本発明の多価抗体に組み立てることが可能なポリペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む細胞を準備することと、  
該宿主細胞を、ポリペプチドの発現及びそれらの組み立てを多価抗体に提供する条件下で培養することと、を含む。

30

## 【 0 3 0 3 】

## 多価抗体の発現

組み換え宿主細胞における抗体の発現は、当該技術分野において記載されている。本発明の抗体の軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子は、染色体外コピーとして存在してもよく、及び / 又は宿主細胞の染色体に安定的に組み込まれてもよい。後者が好ましいが、その場合には遺伝子サイレンシングを欠くことが知られている遺伝子座を標的とし得る。

40

## 【 0 3 0 4 】

本発明の抗体として組み立てるポリペプチドをコードしている核酸配列の発現を得るために、かかる発現を駆動することができる配列は、ポリペプチドをコードしている核酸配列に機能的に連結され得ることが、当業者には周知である。機能的な連結は、ポリペプチド又はその前駆体をコードする核酸配列が、これらの配列がポリペプチド又はその前駆体の発現を駆動できるように、発現を駆動することができる配列に連結されていることを説明することを意味する。有用な発現ベクターは、例えば、Invitrogen の p c D N A ベクターシリーズなど、当該技術分野において利用可能である。対象となるポリペプチドをコードする配列が、コードされたポリペプチドの転写及び翻訳を調節する配列を参照して適切に挿入される場合、得られる発現カセットは、発現と呼ばれる対象となるポリ

50

ペプチドを産生するのに有用である。発現を駆動する配列としては、プロモーター、エンハンサーなど、及びこれらの組み合わせが挙げられ得る。これらは、宿主細胞において機能することができ、それにより、それらに機能的に連結された核酸配列の発現を駆動することができる必要がある。プロモーターは、構成的であるか又は調節されていてもよく、ウイルス、原核生物、若しくは真核生物源、又は人工的に設計された物を含む様々な供給源から得ることができる。

#### 【0305】

本発明の核酸配列の発現は、天然プロモーター若しくはその誘導体由来、又は完全に異種プロモーター由来であってもよい。真核細胞において発現するためのいくつかの周知の多用されるプロモーターは、ウイルス由来のプロモーター、例えば、アデノウイルス、例えば、E1Aプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)由来のプロモーター、例えば、CMV最初期(IE)プロモーター、Simian Virus 40(SV40)由来のプロモーターを含む。好適なプロモーターはまた、例えばメタロチオネイン(MT)プロモーター、伸長因子1a(EF-1a)プロモーター、アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターなどの真核細胞に由来し得る。宿主細胞における本発明の核酸配列の発現を駆動することができる任意のプロモーター又はエンハンサー/プロモーターは、本発明において好適である。一実施形態では、発現を駆動することが可能な配列は、CMVプロモーターの領域、好ましくはCMV最初期遺伝子エンハンサー/プロモーターのヌクレオチド-735~+95を含む領域を含む。当業者であれば、本発明において使用される発現配列が、インスレーター、マトリックス付着領域、STARエレメントなどの発現を安定化又は増強することができるエレメントと好適に組み合わせられ得ることを認識するであろう。これは、発現の安定性及び/又はレベルを向上させることができる。

#### 【0306】

組み換え核酸配列を発現させるのに好適な任意の細胞を使用して、本発明の抗体を生成することができる。好ましくは、該細胞は懸濁増殖に適合される。

#### 【0307】

本発明の多価抗体は、典型的には、本発明の好適な細胞を培養し、該培養物から該抗体を採取することによって、宿主細胞において発現させることができる。好ましくは、該細胞は、無血清培地中で培養される。本発明の抗体は、細胞から回収され得るか、又は好ましくは、当業者に一般的に知られている方法によって細胞培養培地から回収され得る。

#### 【0308】

更に、本発明による抗体を製造するための方法によって得ることができる抗体が提供される。抗体は、好ましくは、培養培地から精製される。

#### 【0309】

回収後、当該技術分野において既知の方法を使用して、培養物から抗体を精製することができる。かかる方法としては、沈殿、遠心分離、ろ過、サイズ排除クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、陽イオン及び/又は陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用、クロマトグラフィーなどを挙げることができる。本発明の多価抗体を分離する手段としてリンカー配列をベースとする親和性クロマトグラフィーを使用することができる。

#### 【0310】

##### 医薬組成物及び使用方法

また、本発明によって提供されるのは、本発明の抗体と、薬学的に許容される担体及び/又は希釈剤を含む医薬組成物である。

#### 【0311】

したがって、本発明は、治療によってヒト又は動物の身体の処置に使用するための、本明細書に記載される多重特異性抗体を提供する。

#### 【0312】

本発明によって更に提供されるのは、医学的状态に罹患しているヒト又は動物を処置す

10

20

30

40

50

るための方法であって、該方法は、本明細書に記載されるように、治療有効量の抗体をヒト又は動物に投与することを含む。

#### 【0313】

患者に投与されるべき本発明による抗体の量は、典型的には、治療用ウィンドウ内にあり、これは、治療効果を得るために十分な量が使用されるが、その量は、許容不可能な程度の副作用をもたらす閾値を超えないことを意味する。所望の治療効果を得るために必要とされる抗体の量が少なくなるほど、治療用ウィンドウは典型的にはより大きくなるであろう。したがって、低薬用量で十分な治療効果を発揮する本発明による抗体が好ましい。

#### 【0314】

先行技術として与えられる特許文献又は他の事項への本明細書での言及は、その文書若しくは事項が既知であったこと、又はそれを含む情報が、特許請求の範囲のいずれかの優先日における共通の一般知識の一部であったことを認めるものとして解釈されるべきではない。

10

#### 【0315】

本明細書に記載される各参考文献の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0316】

明確さ及び簡潔な説明のために、特徴は本明細書では同じ又は別個の実施形態の一部として記載されているが、本発明の範囲は、記載される特徴の全て又は一部の組み合わせを有する実施形態を含んでもよいことが理解されよう。

20

#### 【0317】

以下の実施例は、本発明を例示する。参照しやすいように、実施例8～15について、三重特異性分子を説明する場合に、次のフォーマット：MFA×MFB：MFC又は抗原A×抗原B：抗原Cが使用されており、その結果、×が続くMFA又は抗原Aは「短腕」を構成し、その際×は二量体化を示し、続いてMFB又は抗原Bが、長腕の内部の位置を説明し、続いて「：」がリンカーを示し、続いてMFC又は抗原Cが、長腕の遠位ドメインにあるMFC又は抗原Cを示す。

#### 【実施例】

#### 【0318】

実施例1：多重特異性抗体を発現することができるベクターの生成のための可変ドメイン及びリンカーのクローニング

30

24のリンカー構築物を、IgG重鎖ヘテロ二量体（国際公開第2013/157954号及び国際公開第2013/157953号）の生成のために、CH3領域においてKK残基（L351K、T366K）を含有するMV1626ベクター（図3参照）に表2に詳細を示すサイズに従って、プールにクローニングした。構築物を、制限酵素SfiI及びXhoIを使用してベクターMV1626にクローニングした。全ての構築物は、MF1337のVH遺伝子、CH1ドメイン、翻訳物が表2に列挙されているリンカー配列、及びMF1122のVH遺伝子を連続して含有する。一例として、構築物MF1337×IgG4 UH×MF1122のDNA配列を以下の表3に提供する。概略的に構築物を図2aに示す。構築物は、構築物の名前に示されるIgGアイソタイプのCH1及びリンカー配列の両方に基づく。リンカー配列と組み合わせた全ての24のCH1領域の翻訳物が、図5に提供される。全ての3つのVH遺伝子及び共通軽鎖遺伝子の翻訳物は、以下の表4に提供される。

40



【表 2】

表2: 24の異なるリンカー／構築物の配列及び使用される名称; なお、CH1における差異もある(図5)。リンカー配列を以下に示す。リンカーと共にある各CH1配列を図5に示す。「リンカー名」は、CH1ドメインと共に示される配列を指す。

	リンカー名	配列	リンカー サイズ(aa)
プール1			
1	IgG4 UH	ESKYGPP(配列番号1)	7
2	IgG1 UH	EPKSCDKTHT(配列番号2)	10
3	IgG2A G4SS	GGGGSGGGGS(配列番号:3)	10
4	IgG2A MH	ERKSSVESPPSP(配列番号4)	12
5	IgG2B MH	ERKCSVESPPSP(配列番号5)	12
6	IgG3 UH	ELKTPLGDTTHT(配列番号6)	12
7	IgG4 MH	ESKYGPPSPSSP(配列番号7)	12
8	IgG2A UL	ERKSSVEAPPVAG(配列番号8)	13
9	IgG2B UL	ERKCSVEAPPVAG(配列番号9)	13
10	IgG4 UL	ESKYGPPAPEFLGG(配列番号10)	14
11	IgG1 MH	EPKSCDKTHTSPPSP(配列番号11)	15
12	IgG1 G4S	EPKSCDGGGGSGGGGS(配列番号12)	16
13	IgG2 G4SL	GGGGSGGGGSAPPVAG(配列番号13)	16
プール2			
1	IgG1 UL	EPKSCDKTHTAPELLGG(配列番号14)	17
2	IgG2A H	ERKSSVESPPSPAPPVAG(配列番号15)	18
3	IgG2B H	ERKCSVESPPSPAPPVAG(配列番号16)	18
4	IgG3 ULH	ELKTPLGDTTHTAPEFLGG(配列番号17)	19
5	IgG4 H	ESKYGPPSPSSPAPEFLGG(配列番号18)	19
6	IgG1 H	EPKSCDKTHTSPPSPAPELLGG(配列番号19)	22
7	IgG2A R	ERKSSVEEAAAKEAAAKAPPVAG(配列番号20)	23
8	IgG2B R	ERKCSVEEAAAKEAAAKAPPVAG(配列番号21)	23
9	IgG4 R	ESKYGPPEAAAKEAAAKAPEFLGG(配列番号22)	24
10	IgG1 R	EPKSCDKTHTTEAAAKEAAAKAPELLGG(配列番号23)	27
11	IgG3 R	ELKTPLGDTTHTTEAAAKEAAAKAPEFLGG(配列番号24)	29

10

20

30

40

50

【表 3】

表3：構築物MF1337xIgG4 UHxMF1122のDNA配列

DNA配列		配列番号
ggccccagccggccatggccgaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccggggggcctca gtgaagggtctctgcaaggcttctgactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcgccaggccc ctggacaagggttgaatggatgggatggatgagcgctaactggaaacacgggctatgcacagaagtt ccagggcagagtcaccatgaccaggggacacgtccataaacacagcctacatggagctgagcagcctgaca tctggtgacacggccgtttatttctgtgcgaggagtagtcttttcaagacagagacggcgccctactatc acttcgctctggacgtctggggccaagggaaccacgggtcacctctccagtgtctagcaccaggggccccag cgtgttccccctggccccctgcagccggagcaccagcgagagcaccggccgcccctgggctgcctggtgaag gactacttccccgagcccgtagccgtgagctggaacagcggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttc ccgcccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacgggtgccagcagcagcctggg caccaagacctacacctgcaacgtggaccacaagcccagcaacaccaagggtggacaagcgggtggagagc aagtacggcccccccgaggtgcagctggtggagctctgggggaggcgctggtccagcctgggaggtccctga gactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgcaactgggtccgcccaggctccagg caaggggctggagtggtggcagttatcatatgatggaagtaataaataactatgcagactccgtgaag ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctg aggacacggccgtgtattactgtgcaagagccctcttcacgacctcgccatggactattggggccaagg tacccttgtcaccgtctcgagt		配列番号 25
gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccggggggcctca gtgaagggtctctgcaaggcttctgactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcgccaggccc ctggacaagggttgaatggatgggatggatgagcgctaactggaaacacgggctatgcacagaagtt ccagggcagagtcaccatgaccaggggacacgtccataaacacagcctacatggagctgagcagcctgaca tctggtgacacggccgtttatttctgtgcgaggagtagtcttttcaagacagagacggcgccctactatc acttcgctctggacgtctggggccaagggaaccacgggtcacctctccagtgtctagcaccaggggccccag cgtgttccccctggccccctgcagccggagcaccagcgagagcaccggccgcccctgggctgcctggtgaag gactacttccccgagcccgtagccgtgagctggaacagcggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttc ccgcccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacgggtgccagcagcagcctggg caccaagacctacacctgcaacgtggaccacaagcccagcaacaccaagggtggacaagcgggtggagagc aagtacggcccccccgaggtgcagctggtggagctctgggggaggcgctggtccagcctgggaggtccctga gactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgcaactgggtccgcccaggctccagg caaggggctggagtggtggcagttatcatatgatggaagtaataaataactatgcagactccgtgaag ggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctg aggacacggccgtgtattactgtgcaagagccctcttcacgacctcgccatggactattggggccaagg tacccttgtcaccgtctcgagt		配列番号 284
EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGGGLEWMGWMS ANTGNTGYAQKFQGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTET APYYHFALDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPEVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLTVTVSS		配列番号 285 配列番号 284の 翻訳物

10

20

30

40

50

【表 4】

表4:3つのVH遺伝子及び共通軽鎖遺伝子の翻訳物

タンパク質配列	説明	配列番号
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARALFTTIAMDYWGQGT LVT	MF1122の翻訳物	配列番号26
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARALFTTIAMDYWGQGT LVTVSS	MF1122の翻訳物	配列番号286
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARADWWATFDYWGQGT LVT	MF1025の翻訳物	配列番号27
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARADWWATFDYWGQGT LVTVSS	MF1025の翻訳物	配列番号287
EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYD INWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKF QGRVTMTSDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCA RSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGT TTVT	MF1337の翻訳物	配列番号28
EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYD INWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAQKF QGRVTMTSDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCA RSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGT TTVT	MF1337の翻訳物	配列番号288
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTF GGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	共通軽鎖(cLC)の翻訳物	配列番号29

## 【0319】

S f i I 制限酵素を使用して、インサート及びベクターを50 で2時間消化した後、X h o I 酵素を用いて37 で2時間消化した。消化したDNAを0.8%アガロースゲルにロードし、100ボルトで2時間実行した。続いて、1/5比(w/wベクター/インサート)中のT4 DNAリガーゼを用いて16 で一晩ライゲーションする前に、Q i a g e n Q l A q u i c k ゲル抽出キットを使用して、消化したベクター及びインサートをゲルから単離した。50 µLのDH5 - T1RコンピテントE. coliを、5 µLのライゲーションミックスの存在下で、氷上で30分間、続いて42 で2分間及び氷上で2分間のヒートショック操作で形質転換した。形質転換バクテリアをアンピシリンを添加したLB寒天にプレーティングし、37 で一晩インキュベートした。単一のコロニーを採取し、100 µLの滅菌脱イオン水と混合し、プライマーDO\_2130及びDO\_1056を使用してコロニーPCRに使用して、インサートの存在を確認し、続いてプライマーDO\_2130を使用してクローン確認のためにBigDye(登録商標)ターミネーターv1.1サイクルシーケンシングキット(ThermoFisher)によってシーケンスPCRを行った。

## 【0320】

確認されたクローンの単一コロニーを使用して、4 mLのLB-Ampを播種した。37 で一晩培養物を、製造元マニュアルに従ってQ I A G E N プラスミドミニキットを使用して、24ウェル形式ミニプレップで調製した。カラムから溶出した後、0.7体積の室温イソプロパノールを添加することにより、精製DNAを沈殿させた。DNAペレットを、1 mLの70%エタノールで洗浄し、無菌条件下で空気乾燥し、-20 で保管する前に無菌T r i s - E D T A 緩衝液中に再懸濁させた。BigDye(登録商標)ターミネーターv1.1サイクルシーケンシングキットを使用して、インサートにはプライマ

ーDO\_\_1488、DO\_\_1056、及びDO\_\_2130、とCH2/CH3領域にはプライマーDO\_\_0182及びDO\_\_0091を使用して、最終構築物をジデオキシシーケンシングした。

【0321】

全てのプライマー配列を表5に示す。

【0322】

シーケンシングは、全ての構築物が正常に調製されたことを示した。

【表5】

表5: プライマー配列

プライマー	配列	説明	配列番号
DO__0091	CCTCATGCATCACGGAGCATG	CH3_rev	配列番号30
DO__0182	CAAAGGCCAAACTCTCCACTC	CH2 fwd	配列番号31
DO__1056	CGCTGTGCCCCCAGAGGTGC	VH_rev	配列番号32
DO__1488	GTACCGGTGAATTGGCCGG	VH_fwd	配列番号33
DO__2130	GCGCCCTACTATCACTTCGCTCTGG	MF1337 CDR3 fwd	配列番号34

【0323】

実施例2：トランスフェクション及びIgG精製

実施例1で生成した発現ベクターを、多重特異性抗体のベース抗体部分の第2重鎖を発現するベクターMG1025C377(図4)と組み合わせ、CH3領域にL351D-L368E変異(国際公開第2013/157954号及び国際公開第2013/157953号)及び抗体MF1025のサイログロブリンFab遺伝子(国際公開第2013/157953号の実施例2を参照のこと)を有する。共通軽鎖とともにある2つの重鎖の発現は、図2bに示されるように、三重特異性抗体の産生をもたらす。

【0324】

FreeStyle 293-F細胞(ThermoFisher)を、24ウェルプレート形式において設計された抗体の発現に使用した。トランスフェクションの2日前に、FreeStyle 293-F細胞ストックを293-F培地に1:1の比率で分割し、軌道振とう速度155rpmで37℃、8%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。トランスフェクションの前日に細胞を5×10<sup>5</sup>細胞/mLの密度に希釈した。4mLの懸濁細胞を24のディープウェルプレートに播種し、通気性のあるシールで覆い、37℃、8%CO<sub>2</sub>で、285rpmの軌道振とう速度でインキュベートした。トランスフェクション日に、4.8mLの293-F培地を240μgのポリエチレンイミン(PEI)リニア(MW 25,000)と混合した。産生される各IgGについて、表6に詳述されるように、200μLの293F培養培地-PEI混合物を8μLのDNA(IgGヘテロ二量体の場合、各重鎖をコードしている4μLのDNA)に添加した。混合物を、細胞に穏やかに添加する前に、室温で20分間インキュベートした。トランスフェクションの翌日、500μLの293F培地で希釈したペニシリン-ストレプトマイシン(Pen Strept)を各ウェルに添加した。プレートを、トランスフェクションの7日後に回収するまで、285rpmの軌道振とう速度で37℃及び8%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。IgGを含有する500gの上清において5分間プレートを遠心分離し、10~12μmのメルトブローポリプロピレンフィルタープレートを用いてろ過し、精製前に-20℃で保管した。

【0325】

様々な対照抗体も発現させた、すなわち、

Fab MF1337を使用する二価抗破傷風トキソイド抗体(ベクターMG1337C057を使用)

Fab MF1025を使用する二価抗サイログロブリン抗体(ベクターMG1025

C 0 5 9 を使用 )

F a b M F 1 1 2 2 v を使用する二価抗フィブリノーゲン抗体 ( ベクター M G 1 1 2 2 C 0 5 7 を使用 )

【 0 3 2 6 】

M G 1 3 3 7 C 0 5 7 は、ベクター M V 1 0 5 7 から M F 1 3 3 7 の V H 領域を発現する構築物を示す。M G 1 0 2 5 C 0 5 9 は、ベクター M V 1 0 5 9 から M F 1 0 2 5 の V H 領域を発現する構築物を示す。M G 1 1 2 2 C 0 5 7 は、ベクター M V 1 0 5 7 から M F 1 1 2 2 の V H 領域を発現する構築物を示す。M V 1 0 5 7 ( 図 6 ) 及び M V 1 0 5 9 は、単特異性二価ヒト I g G 1 分子を発現するベクターである。M V 1 0 5 7 及び M V 1 0 5 9 は、本質的に同一のベクターであり、同一の I g G 1 分子の発現をもたらす。

10

【 0 3 2 7 】

F a b M F 1 3 3 7 及び F a b M F 1 0 2 5 を組み合わせた ( M G 1 0 2 5 C 3 7 7 × M G 1 3 3 7 C 2 6 0 を使用して ) 二重特異性抗サイログロブリン × 抗破傷風トキソイド抗体

【 0 3 2 8 】

F a b M F 1 1 2 2 及び F a b M F 1 0 2 5 を組み合わせた ( M G 1 0 2 5 C 3 7 7 × M G 1 1 2 2 C 2 6 0 を使用して ) 二重特異性抗サイログロブリン × 抗フィブリノーゲン抗体

【 0 3 2 9 】

M G 1 0 2 5 C 3 7 7 ( 図 4 ) は、L 3 5 1 D , L 3 6 8 E ( D E ) 変異を含有するヒト I g G 1 重鎖の文脈において、抗体 M F 1 0 2 5 の重鎖可変ドメインを発現する。M G 1 3 3 7 C 2 6 0 ( 図 7 ) は、L 3 5 1 K , T 3 6 6 K ( K K ) 変異を含有するヒト I g G 1 重鎖の文脈において、抗体 M F 1 3 3 7 の重鎖可変ドメインを発現する。M G 1 1 2 2 C 2 6 0 は、L 3 5 1 K , T 3 6 6 K ( K K ) 変異を含有するヒト I g G 1 重鎖の文脈において、抗体 M F 1 1 2 2 の重鎖可変ドメインを発現する。

20

30

40

50

【表 6】

表6:IgG産生のための形質転換スキーム

構築物1	構築物2
MG1025C377	MF1337xIgG4 UHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1 UHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2A G4SSxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2A MHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2B MHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG3 UHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG4 MHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2A ULxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2B ULxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG4 ULxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1 MHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1 G4SxMF1122
MG1025C377	MG1337C260
MG1025C377	MG1122C260
MG1337C057	— *
MG1122C057	— *
MG1025C059	— *
MG1025C377	MF1337xIgG2 G4SLxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1 ULxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2A HxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2 BHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG3 ULHxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG4 HxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1HxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2A RxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG2B RxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG4 RxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG1 RxMF1122
MG1025C377	MF1337xIgG3 RxMF1122
* = 二価対照	

10

20

30

## 【0330】

採取後、抗体を以下のように24ウェルフォーマットで精製した：上清を50μLの1M Trizma (pH8) 及び100μLのProteinA Sepharose CL-4Bビーズ(50% v/v, G.E Healthcare Life Sciences)と混合し、600rpmの軌道振とうで25℃で2時間インキュベートした。ビーズを真空ろ過し、3mLのPBS pH7.4で2回洗浄した。200μLのクエン酸緩衝液0.1M, pH3を添加し、続いて300μLの1M Trizma pH8で中和することによって、抗体の溶出を行った。精製IgG画分を直ちにPBS pH7.4に緩衝液交換した。IgG試料を、30kDaの96ウェルフィルタープレートに移し、ポリエーテルスルホン膜を、ウェル当たり10μLの体積が残るまで1500g、4℃で遠心分離した。各ウェルに200μLのPBSを添加し、試料を500rpmで3分間混合した後、IgGを4℃で保存するために回収した。IgG濃度は、Octet及びProteinAバイオセンサ(Pall ForteBio)によって測定した。ヒトIgGを、192μg/mlから開始して3μg/mlまで7つの2倍希釈液において標準として使用した。IgG試料の濃度を、重複して測定した。

40

## 【0331】

50

還元及び非還元 SDS - PAGE を、対照を含む全ての 30 個の産生された Ig G について行った。これらの結果を図 8 に示す。NR 条件下では、三重特異性の多価抗体では約 200 kDa、対照のモノクローナル Ig G 及び Bi clones (登録商標) では約 150 kDa の予想される産物サイズが観察された。R 条件では、三価抗体では約 25 kDa (LC)、約 50 kDa (HC / 1 VH)、及び約 75 kDa (HC / 2 VH) の産物サイズが観察された。対照 Ig G の約 25 kDa (LC) 及び約 50 kDa (HC) のバンドサイズは予想通りであった。結果はまた、三重特異性構築物について約 150 kDa のバンドを示した。これらは、より長い KK 含有重鎖よりも短い DE 重鎖を含む DE の、より高い発現レベルの結果である可能性がある DE 重鎖の会合から生じるホモ二量体である。

10

#### 【0332】

実施例 3 : ELISA において測定された VH 1、VH 2、及び VH 3 位置における Fab ドメインの結合活性

各構築物中の 3 つの Fab ドメインの結合活性を、破傷風トキソイド、フィブリノーゲン、及びサイログロブリン抗原、及び huEGFR - Fc 抗原を陰性対照として使用して、ELISA によって確認した (コーティング条件、供給元、及びカタログ番号については表 7 を参照されたい)。

#### 【0333】

各多重特異性 Ig G 試料を、最初に PBS 中 10 µg / ml に希釈し、フィブリノーゲン、破傷風トキソイド、及びサイログロブリンの滴定で、10 ~ 0.08 µg / ml の 4 つの 5 倍希釈液において、分析した。全ての 30 の試料を 10 µg / ml で huEGFR - Fc で分析した。PBS 中の適切な量の抗原を調製した。50 µl の希釈した抗原溶液を、ELISA プレートウェル当たり添加し、4 でコーティングした。プレートを洗浄緩衝液 (PBS / Tween) で 2 回洗浄した。ウェルを、300 µl / ウェルブロック緩衝液 (PBS / 2 % BSA) で室温で 1 時間ブロッキングした。インキュベーション中、適切な Ig G 希釈液をブロック緩衝液で作製した。プレートを、シンク上で反転させ、続いて組織上で叩くことによって空にした。50 µl の希釈 Ig G 試料及び対照を、ブロックプレートのウェルに添加し、シールで覆い、室温で 60 分間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液 (PBS / 0.05 % Tween) で 3 回洗浄した。ブロック緩衝液中の希釈した検出抗体 (マウス抗ヒト Ig G HRP コンジュゲート; Becton Dickinson, カタログ番号 555788) 1 / 2000 を 50 µl / ウェルで添加した。プレートをシールで覆い、室温で 60 分間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。TMB 基質溶液 (BD, OptEIA (商標) カタログ番号 51 - 2606 KC) を、試薬 A 及び B を 1 : 1 比で混合し、50 µl / ウェルを添加することによって作成し、(最大) 10 分間展開させた。50 µl の 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を各ウェルに添加して、染色反応を停止させた。

20

30

#### 【0334】

プレートを、「BioTek Elx808 ELISA プレートリーダーを使用して A450 で読み取った。各構築物の各抗原 ELISA について計算した GraphPad Prism 7 及び曲線下面積 (AUC) を使用して結合曲線をプロットし、表 8 に列挙した。12 % 及び 8 % のサイログロブリン (VH 1, DE 腕上, 図 1 を参照のこと) 及び破傷風トキソイド (VH 3, KK 腕の先端上, 図 1 を参照のこと) への結合については、AUC の小さな変動が見られる。フィブリノーゲン - 腕 (これは VH 2 である, 図 1) については、より大きな変動が見られる。これは、VH 2 位置における Fab ドメインのアクセシビリティ又は親和性が、VH 2 位置の Fab を VH 3 位置の Fab に接続するリンカーに依存することを示す。全てのリンカーは、機能性である VH 2 を提供する。

40

【表 7】

表7. ELISAに使用される抗原のリスト

抗原	コーティング濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	コーティング 緩衝液	供給元	カタログ番号
フィブリノーゲン	10	PBS	Sigma	F4753
破傷風トキソイド	2	PBS	Statens institute	T162-2
サイログロブリン	10	PBS	Sigma	T1126-500MG
huEGFR-Fc	2.5	PBS	R & D Systems	344-ER

10

【表 8】

表8: 表6に列挙した24の三重特異性多価抗体のELISA結合アッセイから得られた曲線下面積値3つの異なる抗原に結合するために、抗体をELISAに滴定した。得られたAUC値を、VH2位置におけるFabから得られたフィブリノーゲンに対する結合活性に基づいて選別した。これにより、VH2位置において様々なFabの結合活性が存在することが確認された。VH2位置におけるFabに対して最も高い活性を有する15の構築物を、更なる実験のために優先させ、最も低い活性を有する6つの構築物をイタリック体で示す。NDは、実施されずを意味する

20

構築物	破傷風 トキソイド, VH3	フィブリノーゲン, VH2	サイログロブリン, VH1
IgG1 MH	2.50	1.68	2.29
IgG1 H	2.55	1.64	2.44
IgG1 R	2.46	1.63	2.44
IgG1 G4S	2.54	1.56	2.19
IgG1 UH	2.33	1.42	2.31
IgG3 R	2.48	1.34	2.48
IgG3 UH	2.45	1.30	2.40
IgG2A R	2.51	1.30	2.40
IgG2A MH	2.43	1.25	2.31
IgG3 ULH	2.42	1.23	2.38
IgG2B R	2.51	1.21	2.42
IgG4 MH	2.46	1.18	2.35
IgG4 UL	2.50	1.17	2.25
IgG2A H	2.39	1.16	2.37
IgG2B H	2.42	1.16	2.36
IgG2A G4 SS	2.34	1.12	2.32
IgG2B MH	2.48	1.11	2.25
IgG4 UH	2.31	1.08	2.33
IgG2A UL	2.36	1.07	2.27
IgG2B UL	2.46	1.03	2.36
IgG2 G4SL	2.29	1.03	2.31
IgG1 UL	決定されず	決定されず	決定されず
IgG4 H	決定されず	決定されず	決定されず
IgG4 R	決定されず	決定されず	決定されず

30

40

## 【0335】

実施例4: 結合活性の安定性

三価抗体構築物中の3つのFabドメインの結合活性の安定性を、4つの加速ストレス

50



条件に従って分析した。試料をPBS中、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、4で1ヶ月間インキュベートした。試料をD10F培地中、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、40で7日間インキュベートした。試料をD10F培地中、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、50で2日間インキュベートした。試料をPBSで希釈し、5回の凍結解凍サイクル(5XFT)に供した。

【0336】

これらの加速ストレス条件に続いて、3つのFabドメインによって認識された抗原に対する結合活性を、前述のELISAで分析した。曲線下面積を計算し、表にした。

【0337】

40で加えられたストレスは、VH2位置におけるFabの結合に著しく影響を与えただけであり、試験された異なる構築物においてはフィブリノーゲンに異なる程度に結合する。50及び5XFTでの4でのストレスは、試験した異なる構築物において、3つ全てのFabドメインの異なる程度での結合に影響を及ぼす。

10

【0338】

結合活性を、各抗原及びストレス条件についてランク付けし、各ストレス条件下における16の最も最適な構築物を各Fab位置について特定した。構築物が16の最適な構築物の中にある回数を合計し、加速ストレス条件下での3つのFabの結合活性の保存に基づいて全ての構築物をランク付けするために使用した。

【0339】

結果は、図9に記載され、加速ストレス条件下で異なる構築物の様々な安定性が存在することを示す。21の産生された三価抗体構築物における3つのFabドメインの結合活性の安定性を、4つの加速ストレス条件に従って分析した。ELISAデータ(AUC)を表にする。結合活性をランク付けし、各ストレス条件下における16の最適な構築物を各Fab位置について特定した。構築物が16の最適な構築物の中にある回数を合計し、加速ストレス条件下での3つのFabの結合活性の保存に基づいて全ての構築物をランク付けするために使用した。

20

【0340】

全ての抗体は安定であり、一部は他の抗体よりも安定である。

【0341】

実施例5：大規模トランスフェクション及びIgG精製

以下のように、18個の構築物を、更なる分析のために大規模生産用を選択した：IgG1 MH、IgG1 H、IgG1 R、IgG1 G4S、IgG1 UH、IgG3 R、IgG3 UH、\*\*IgG2A R、IgG2A MH、IgG3 ULH、IgG2B R、IgG4 MH、IgG4 UL、IgG2A H、IgG2B H、\*IgG1 UL、\*IgG4 H、\*IgG4 R。対照として、以下の生成物が含まれた：二重特異性抗サイログロブリン×抗破傷風トキソイド(実施例2において前述のMG1025C377×MG1337C260を使用)及び二重特異性抗サイログロブリン×抗フィブリノーゲン(前述のMG1025C377×MG1122C260を使用して)。

30

【0342】

これらの構築物のDNAを、前述のように調製した。表6に列挙した構築物の共トランスフェクションによって、前述したように多重特異的IgGをトランスフェクションした。選択した構築物を、より大規模に産生した。トランスフェクションの2日前に、Freestyle HEK293-F細胞ストックを293-F培養液に500ml培養フラスコあたり100mlの最終容量で1:1の比率で分割し、軌道振とう速度155rpmで37及び8%CO2でインキュベートした。トランスフェクションの1日前、細胞を293-F培養培地で希釈することによって調製された $5.0 \times 10^5$ 細胞/mlの密度を有する細胞懸濁液で細胞を計数した。次いで、細胞をT500フラスコあたり100mlの細胞懸濁液で播種し、155rpmの軌道振とう速度で37及び8%CO2でインキュベートした。翌日、細胞をトランスフェクトした。293-F培地、PEI、及びDNAの混合物は、7.5mlの293-F培地、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で187.5 $\mu\text{l}$ のPEIストック、 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で150 $\mu\text{l}$ のDNAを混合して調製した。これを室温で

40

50

20分間インキュベートし、次いで細胞に添加し、次いで、37℃及び8%CO<sub>2</sub>で、155rpmの軌道振とう速度で7日間インキュベートした。

#### 【0343】

抗体タンパク質を含有する上清を1000gで10分間遠心分離して細胞を除去した。上清を0.45μmフィルターを用いてろ過した。IgGを、AKTAexplorer 100システム(GE Health Care)及びタンパク質A親和性クロマトグラフィーを使用して上清からIgGを精製した後、脱塩した。製造業者の指示に従って、HiTrap MabSelect SuRe 5mlカラム及びHiTrap 5ml 脱塩カラム(GE Health Care)を使用した。IgG濃度をOD<sub>280</sub>吸光度によって求めた。全ての構築物についてPBS中で0.8~4.9mgのIgGを得た。生成したタンパク質を、実施例2において前述したようにSDS-PAGE(還元及び非還元)で分析した。データは、実施例2に見られるデータを確認し、ここでは提供しない。

#### 【0344】

HP-SECを実施して、多重特異性抗体のベース抗体部分を構成する2つの重鎖間の発現比を確かめた。三価構築物中の2つの重鎖のサイズ差により、ハーフボディ及びホモ二量体は、高性能サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)において同定及び定量化することができる。TSKガードカラムSWXL(Tosoh Bioscienceカタログ番号08543)及びTSK-gelカラムG3000SWXL(Tosoh Bioscienceカタログ番号08541)を装備したDionex HPLCシステムを使用して、HP-SECを実施した。各分析のために、PBS中の20μgのタンパク質試料をカラムに注入し、これを200mMのリン酸ナトリウム、50mMのNaClをランニング緩衝液として使用して、4℃で1mL/分の流速で流した。クロマトグラムを、Chromleon 6.80ソフトウェアを使用して、UV<sub>280</sub>結果に基づいて保持時間及び相対ピーク面積について分析した。三価のIgG/DEDEホモ二量体の量の比を計算し、以下の表9に示す。平均を超える三価/DEDE比を有する構築物は、イタリック体で提示される。

#### 【表9】

表9: 多重特異性抗体のベース抗体部分を構成する2つの重鎖間の発現比を確かめるためにHP-SECを実施した。三価のIgG/DEDEホモ二量体の量の比を計算し、表にした。

構築物	三価対DEDE比
IgG1 MH	6.1
IgG1 H	5.7
IgG1 UH	5.6
IgG2B H	5.6
IgG2A MH	5.4
IgG1 UL	5.3
IgG2A H	5.3
IgG1 G4S	5.1
IgG2B R	4.4
IgG1 R	4.3
IgG4 H	3.1
IgG4 UL	3.1
IgG4 MH	2
IgG4 R	2
IgG3 R	1.7
IgG3 ULH	1.7
IgG3 UH	1.7
IgG2A R	分析されず

#### 【0345】

大規模精製 I g G ( 2 つの対照を含む ) の安定性を、前述の異なるストレス条件の後、P B S 中で 5 回凍結解凍サイクル後、D 1 0 F 培地中で 4 0 で 1 週間インキュベート後、D 1 0 F 培地中で 5 0 で 1 週間インキュベート後、P B S 中で 5 0 で 1 週間インキュベート後に評価した。ストレスを受けた試料の性能を、4 で 1 週間のインキュベーション後、同じ試料の性能と比較した ( 対照 ) 。その目的のために、1 0 0 m l の生成物からの精製 I g G を P B S 中で 0 . 2 m g / m l で希釈し、2 つのバッチに分割した : 1 つは P B S 中で 0 . 2 m g / m l での安定性試験 ( 4 、 3 x F T 、及び 5 0 ) のために、1 つは上記のように 4 、 4 0 、及び 5 0 でのストレス試験のために D 1 0 F 中で 0 . 1 m g / m l に希釈した。試料 I g G 1 H については、0 . 1 9 4 m g / m l の濃度を使用した。

10

**【 0 3 4 6 】**

これらの加速ストレス条件に続いて、3 つの F a b 断片によって認識された抗原に対する結合活性を、前述の E L I S A で分析した。曲線下面積を計算し、表にした ( 図 1 0 を参照 ) 。4 で保存した対照試料の活性と比較した、ストレス後の残存結合活性のパーセンテージを、各結合活性について計算した。各ストレス条件における各標的に対する各結合活性について、試料をこれらのパーセンテージに基づいてランク付けした。平均を超えるパーセンテージは表示し、平均を超えることを示した各試料の回数が合計され、図 1 0 の表の最後の列に記載される。これは、ストレス後の 3 つの F a b 腕の結合活性によって測定される構築物の安定性が多様に存在することを示す。

**【 0 3 4 7 】**

20

実施例 6 : 1 8 の多価 I g G 構築物の安定性分析

安定性分析は、図 1 0 において同定された 1 8 の多価構築物上で、実施例 5 に前述したように、安定性分析を行った。加えて、参照により組み込まれる国際公開第 2 0 1 8 / 0 5 6 8 2 1 ( A 1 ) 号に前述されている M F 6 7 4 4 ( 配列番号 9 1 ) 、 M F 1 3 3 7 ( 配列番号 2 8 及び配列番号 2 8 8 ) 、及び M F 1 1 2 2 ( 配列番号 2 6 及び配列番号 2 8 6 ) を含む重鎖結合ドメインを有する 4 つの対照抗体を使用し、これらは c L C に結合され、すなわち、

F a b M F 6 7 4 4 / c L C を使用した単特異性抗 C D 1 3 7 抗体、

F a b M F 1 1 2 2 / c L C を使用した単特異性抗フィブリノーゲン抗体、

F a b M F 1 3 3 7 / c L C を使用した単特異性抗破傷風トキソイド抗体、並びに

30

D E K K 二重特異性対照として F a b M F 1 1 2 2 / c L C 及び F a b M F 1 3 3 7 / c L C を含む二重特異性抗フィブリノーゲン x 抗破傷風トキソイド抗体である。

**【 0 3 4 8 】**

安定性分析のために試験した試料のリストを以下の表 1 0 に提供する。

40

50

## 【表 10】

表 10. 安定性分析のために試験した試料のリスト: 18 の多価抗体及び 4 つの対照抗体

IgG	CH3	Fab (複数可)	コメント
Ctrl AA	野生型	MF6744	単特異性IgG
Ctrl BB	野生型	MF1122	単特異性IgG
Ctrl CC	野生型	MF1337	単特異性IgG
Ctrl BC	DE-KK	MF1122-MF1337	二重特異性-DEKK
試料 1	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 H (配列番号 19)
試料 2	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG2A MH (配列番号 4)
試料 3	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG4 UL (配列番号 10)
試料 4	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 G4S (配列番号 12)
試料 5	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 MH (配列番号 11)
試料 6	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 R (配列番号 23)
試料 7	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 UH (配列番号 2)
試料 8	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG1 UL (配列番号 14)
試料 9	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG2A H (配列番号 15)
試料 10	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG2A R (配列番号 20)
試料 11	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG2B H (配列番号 16)
試料 12	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG2B R (配列番号 21)
試料 13	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG3 R (配列番号 24)
試料 14	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG3 UH (配列番号 6)
試料 15	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG3 ULH (配列番号 17)
試料 16	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG4 H (配列番号 18)
試料 17	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG4 MH (配列番号 7)
試料 18	DE-KK	MF6744xMF1337:MF1122	三重特異性-IgG4 R (配列番号 22)

## 【0349】

18 の多価構築物及び 4 つの対照抗体の安定性を、4 つの異なる条件に従って分析した。したがって、22 の試料 (18 三価 + 4 対照) を PBS 中で 0.2 mg/ml に希釈し、

4 (T0) で 1 ヶ月間 (参照として見た)、

50 で 7 日間、

- 80 での 5 X 凍結解凍 (FT) サイクル、又は

室温で 400 rpm で 4 時間振とう。

## 【0350】

これら 4 つの条件のそれぞれの後、安定性を、7 つの異なる方法を用いて分析した、すなわち、

UV-Vis 吸収分光法: 凝集体によるバックグラウンド緩衝吸収及び光散乱の減算後、吸光度を 350 nm で試験して、Eckhardt, 1994: Mulinacci, 2011b and Peters, 2013 に説明されるように、試料の凝集状態に関する

る情報を提供する。

90°光散乱分光法：溶液中、光の散乱強度は、タンパク質濃度、屈折率、粒径及び形状、並びに入射光の波長などの異なる要因によって影響され得る。この方法は、Capelle, 2005; Demeule, 2007a及びb; Mulinacci, 2011a及び2013; Luca, 2010; Patois, 2011及び2012; Peters, 2013において報告されているタンパク質凝集を研究するために使用される。

【0351】

T0と比較した変化率(%)として表されるトリプトファン固有の蛍光発光：環境の疎水性と剛性の変化は、トリプトファンの蛍光発光によって測定することができる(Capelle, 2005; Demeule, 2007a及びb及び2009; Mulinacci, 2011a及びb; Luca, 2010; Patois, 2011; Peters, 2013)。

10

【0352】

1, 8-ANS蛍光発光は、T0と比較した変化率(%)として表される：帯電していない小さな疎水性蛍光プローブとして、1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸(1, 8-ANS)は、タンパク質、タンパク質凝集体、界面活性剤ミセル、浸出物、膜及び細胞成分の静電ポケットに結合すると水中で蛍光になり、したがって膜表面及びタンパク質の研究に使用することができる(Demeule, 2009; Mulinacci, 2011a及びb; Luca, 2010)。

【0353】

20

T0と比較した変化率(%)として表されるナイルレッド蛍光発光：帯電していない小さな疎水性蛍光プローブとして、ナイルレッドは環境の極性に影響され、タンパク質分解、タンパク質凝集、脂質構造、タンパク質アンフォールディングを分析するために使用することができる(Sackett and Wolff, 1987)。

【0354】

粒子の数/1µlを測定するナイルレッド蛍光顕微鏡法：Leica DMi8顕微鏡を使用して蛍光顕微鏡法用にタンパク質凝集体を可視化するために、試料を染色するのにナイルレッドが使用される(Demeule, 2007a及びb, 並びに2009; Mulinacci, 2011b及び2013; Patois, 2011)。

【0355】

30

動的光散乱、T0と比較したモノマーの変化率(%) (強度計算)として表される：動的光散乱は、NanoFlex装置を使用して測定される。光ファイバーを通過するレーザーは散乱し、粒子のサイズ分布プロファイルを判定するために散乱光強度を測定する検出器に向かって粒子から散乱及び反射される。

【0356】

これらの方法の読み取り値は、タンパク質の安定性の尺度であるタンパク質の凝集、断片化、及びアンフォールディングに関する。結果は、400rpmでの4時間の振とうが、抗体の安定性に最も影響を及ぼしたことを示した。対照単特異性PG1337/MF1337抗体は、ストレス条件によって最も影響を受けた。したがって、全ての18の多価構築物及び二重特異性対照はPG1337/MF1337Fabを含有しているため、全ての結果は、閾値として設定されたPG1337で正規化された。

40

【0357】

分子の安定性は、4つの異なる条件の間に全ての7つの方法のスコアを組み合わせることによって計算した。結果は図12に見ることができ、構築物が様々な安定性の範囲を有することを明らかとし、様々な三重特異性分子が対照二重特異性IgGに対して優れた安定性を示した。

【0358】

実施例7：バイオインフォマティクスリンカーの特性評価

以下の表11に記載され、図13に示される8つのリンカーを更に特性評価した。Karplus及びSchulzの柔軟性予測方法(配列内の各アミノ酸の柔軟性指数の平均

50

を計算する)を使用して、これらの配列のそれぞれについて柔軟性予測を得た。柔軟性指数は、Karplus PA, Schulz GEに記載されるタンパク質構造中の各アミノ酸の平均特性に由来する。タンパク質中の鎖の柔軟性予測 - ペプチド抗原の選択のためのツールNaturwissenschaften 1985; 72: 212-3; (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>)。表11では、KSスコアが1.015以下である場合には剛性(R)として、KSスコアが約1.015~1.04である場合には部分的に柔軟としてリンカーを示す。本発明の目的のための柔軟性配列は、1.04を超えるKarplus及びSchulz柔軟性予測を有する配列である。

【表11】

10

表11: 8つのリンカー及びKarplus及びSchulzに従って判定された柔軟性

#	リンカー	配列	柔軟性	配列番号
1	IgG1 G4S	EPKSCDGGGGSGGGGS F	F	12
2	IgG1 H	EPKSCDKTHTSPSPAPPELLGG	F	19
3	IgG1 MH	EPKSCDKTHTSPSP	F	11
4	IgG1 UH	EPKSCDKTHT	Med	2
5	IgG2A H	ERKSSVESPPSPAPPVAG	F	15
6	IgG2A MH	ERKSSVESPPSP	R	4
7	IgG2B H	ERKCSVESPPSPAPPVAG	Med	16
8	IgG2B R	ERKCSVEEAAAKEAAAKAPPVAG	R	21

20

【0359】

Rosetta局所構造予測を使用して、これらのリンカーの第2のバイオインフォマティクス予測を得た。本明細書ではRosetta断片のピッカーを使用して、Gron t D, Kulp DW, Vernon RM, Strauss CEM, Baker D (2011) Generalized Fragment Picking in Rosetta: Design, Protocols and Applications. PLoS ONE 6(8): e23294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023294>に記載されているような局所構造予測を提供した。予測ツールをこのように使用する場合は、最小40残基が好ましく、したがって、リンカーの末端にグリシン残基を導入して、中央にリンカー配列を有する各40残基長の配列を作製した。これらのリンカーは、ProteinDataBank内の構造内の近くの局所配列のマッチを見つけるRosetta断片パイプラインを通じてシーケンシングを実行し、局所構造を予測するためにこれらの配列間のマッチを使用して、2次構造が特性評価された。次いで、中心の断片を、図13の上記8つの配列のそれぞれについて可視化した。

30

【0360】

結果の要約を以下の表12に示す: F = 柔軟性 M = 中間、R = 剛性、C = コイル = 柔軟性、H = らせん = 剛性、E = スtrand = 中間であり、これは、予測される二次構造に基づくKarplus及びSchultzスコアとの一般的な一致を示す。

40

## 【表 1 2】

表12:柔軟性結果の要約

#	リンカー	配列番号	Karplus Schultz	断片の予測
1	IgG1 G4S	12	F	CE
2	IgG1 H	19	F	CH
3	IgG1 MH	11	F	C
4	IgG1 UH	2	M	H
5	IgG2A H	15	F	C
6	IgG2A MH	4	R	H
7	IgG2B H	16	M	CE
8	IgG2B R	21	R	H

10

## 【0361】

実施例8:抗CD3、PD-L1、及びEGFR結合ドメインの生成  
免疫化に使用されるマウス。

CD3、EGFR、及びPD-L1に結合するヒト抗体の生成のために、ヒト共通軽鎖及びヒト重鎖(HC)ミニ遺伝子座(ヒトV遺伝子セグメント、全てのヒトD及び全てのヒトJの選択を含む)(参照により本明細書に組み込まれるW02009/157771を参照)のトランスジェニックマウスを、以下に見られるタンパク質をコードするDNA又は組換えDNAのいずれかで免疫化することができる。これらのマウスは、「MeMo(登録商標)」マウスと称される。特定の重鎖可変領域、又は本明細書に開示される配列を有する三価多量体については、これらは、当業者に既知の任意の手段によって産生することができる。

20

## 【0362】

タンパク質免疫化

「MeMo(登録商標)」マウスを、組換えタンパク質及びGerbuアジュバントM(M Gerbu Biotechnik c#3001)を皮下注射することにより免疫化した。組み換えhuPDL1-His(SinoBiological;カタログ番号10084-H08H)タンパク質を免疫化に使用した。マウスを、40µlのアジュバントと混合したPBS中40µgの組換えタンパク質で、100µlの総容量で免疫化させた。続いて、14及び28日目に、マウスを、20µlのアジュバントと混合したPBS中20µgの組換えタンパク質で、50µlの総容量で追加免疫化させた。35日目にマウス血清を採取し、血清力価を求めた。低血清力価を有するマウスは、ブースター免疫化及び血清分析の更なるサイクルを受けた。各サイクルは、50µlのPBS中20µgの組換えタンパク質を使用する週2回の免疫化、続いて1週間後の力価分析のための血清採取からなった。ヒト及びマカクザル標的に対して高い血清力価を示すマウスは、50µlのPBS中の20µgの組換えタンパク質を3日間連続して毎日注射することからなる最終的な追加免疫化を受けた。最終注射から1日後に、マウスリンパ系組織を採取した。

30

40

## 【0363】

DNA免疫化

MeMo(登録商標)のマウスを、マイクロピグメンテーション装置を用いて、DNAタトゥーによって免疫化させた。DNAタトゥー免疫化を、標的抗原をコードする20µgのプラスミドDNAを用いて行った。マウスを、ヒト標的PD-L1をコードするDNAで免疫化した。PD-L1の免疫化については、0.5mgの抗CD25抗体PC61.5をマウスに注射して寛容破綻することによる免疫化の開始の4日前にTreg細胞を枯渇させた。マウスを、0、3、6、14、17、28及び31日目に免疫化させた。35日目にマウス血清を採取し、血清力価を求めた。ヒト及び/又はマカクザル標的に対す

50

る血清反応性が低いマウスには、ヒト、ラット、又はマカクザルDNA抗原でブースター免疫化の更なるサイクルを受けさせて、血清分析を行った。各サイクルは、週2回のDNA免疫化、続いて1週間後の力価分析のための血清採取からなった。ヒト及びマカクザル標的を発現する細胞に対する血清反応性を示すマウスは、最終的な追加免疫化を受けた後、3日後にリンパ系組織を採取した。

#### 【0364】

##### リンパ組織の回収

脾臓及び流入領域リンパ節を、正常に免疫化された全てのマウスから除去した。脾臓リンパ節及び鼠径リンパ節の両方から単一細胞懸濁液を生成し、続いてこれらの組織をTRIzol LS試薬中に溶解し、使用するまで-80℃で保存した。正常に免疫化されたマウスからのVH遺伝子のRT-PCRクローニングにより「免疫」ファージ抗体レパートリーを生成し、鼠径リンパ節を「免疫」ファージ抗体レパートリーの構築に使用した。この目的のために、TRIzol LS溶解リンパ組織からRNAを抽出し、IgG-CH1特異的プライマーを用いてRT反応で1µgの全RNAを使用した。次いで、得られたcDNAを使用して、基本的にMarks et al. (J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3): 581-97)に記載されているように、自社開発VH特異的プライマーを使用して、VHコードcDNAのポリクロナルプールの増幅した。得られたPCR産物は、軽鎖がすべての抗体で同じであり、ベクターによってコードされていたことを除いて、de Haard et al (J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30)に記載されているように、ファージ上のFab断片の表示のためにファージミドベクターにクローニングされた。ライゲーション後、ファージミドを使用してE. coli TG1細菌を形質転換し、形質転換細菌をアンピシリン及びグルコースを含有するLB-寒天105プレート上に播種した。全てのファージライブラリは、10<sup>6</sup>個超の形質転換体を含有し、80%超のインサート頻度を有した。一晚増殖後に細菌を採集し、確立されたプロトコル(de Haard et al., J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30)に従ってファージを調製するために使用した。

#### 【0365】

##### 標的化抗体

EGFR及びPD-L1 cLC抗体を、以前に記載された方法を使用して、標的免疫化に成功したMeMo(登録商標)マウスから生成されたファージ抗体レパートリーから得た。更に、合成ヒト抗EGFR抗体を含む、EGFR抗体のための抗体可変ドメインVH鎖を生成する方法もまた、参照により本明細書に組み込まれる係属中の出願: WO 2015/130173(A1)、WO 2015/130172(A1)に記載されている。

#### 【0366】

##### CDR3を有するMeMo(登録商標)マウスの免疫化

CD3に結合するヒト抗体の生成のために、ヒト共通軽鎖及びヒト重鎖(HC)ミニ遺伝子座(ヒトV遺伝子セグメント、全てのヒトD及び全てのヒトJの選択を含む)(参照により本明細書に組み込まれるWO 2009/157771を参照)のトランスジェニックマウスを、TCR/CD3含有リポ粒子(Integral Molecular)で免疫化した。これらのマウスは、「MeMo(登録商標)」マウスと称される。特定の重鎖可変領域、又は本明細書に開示される配列を有する三価多量体については、これらは、当業者に既知の任意の手段によって産生することができる。

#### 【0367】

MeMo(登録商標)マウスは、リポ粒子を含有するHeK293T由来のヒト5D5M TCR/CD3で免疫化し、続いて抗TCR/CDR3免疫応答の生成及び抗TCR/CD3抗体パネル生成のためにヒトT細胞で免疫化した。

#### 【0368】

リポ粒子は、構造的にインタクトな膜タンパク質を細胞表面から直接濃縮し、これらの複雑なタンパク質を、抗体の免疫化及びスクリーニングのための可溶性の高濃度タンパク

10

20

30

40

50



質として操作できるようにする。

【0369】

本研究において免疫化に使用されるリポ粒子は、5D5M TCR の組み合わせを含む。アミノ酸配列（配列番号289及び配列番号290）

【0370】

5D5M TCR の組み合わせのHek293T由来TCR/CD3リポ粒子を合成、クローニングし、HEK293T細胞（Integral Molecular）への一過性トランスフェクションにより、このTCR/CD3の組み合わせを含むリポ粒子を生成するために使用した。

【0371】

5D5M TCR （配列番号289）

MWGVFLLYVSMKMGTTGQNI DQPTMTATEGAIVQINC  
TYQTS GFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSS  
FLSR SKGYSYLLLELQMKDSASYLCVMDSNYQLIWGAG  
TKLI IKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN  
VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC  
ANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ  
NLSVIGFRILL LKVAGFNLLMTLR LWS S

【0372】

5D5M TCR （配列番号290）

MRIRLLCCVAFSL LWAGPVIAGITQAPTSQILAAGR RMT  
LRCTQDMRHNAMEYWRQDLGLGLRLIHYSNTAGTTGKGEV  
PDGYSVSRANTDDFPLTLASAVPSQTSVYFCASSEAGGNT  
GELFFGEGSRLTVLEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK  
ATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ  
PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSEN  
DEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADC GFTSVSYQQGVLSAT  
ILYEILLGKATLYAVLVSA LVLMMAMVKRKDF

【0373】

MeMo（登録商標）マウスを、TCR/CD3リポ粒子及び初代ヒトT細胞を使用して免疫化に使用した。

【0374】

免疫化スケジュールは、35、56、77、及び98日目の時点を含み、抗原特異的IgG血清力価は、抗マウスIgG検出を使用して、QTG由来の3SDX TCR/CD3陽性及び陰性リポ粒子を使用したELISAによって、そして陽性対照としてCD3c5E-Fc融合タンパク質を使用したELISAによって求めた。35日目に採取された血清において反応性が観察され、どのマウスが関連する抗TCR/CD3応答を発現したかが判定される。

【0375】

全ての免疫化マウスについて、抗体発見のためのリンパ系材料を回収し、以下のように保存した：

力価は、ヒトTCR/CD3において1/300であるか（リポ粒子を使用するELISAにおいて）、又は、

力価は、ヒトTCR/CD3において1/300未満及び1/100超であり、最後のブースター免疫化の間に増加しなかった。

【0376】

リポ粒子を使用した初回免疫（Priming immunisation）

TCR/CD3についてMeMo（登録商標）マウスにおける体液性免疫応答をプライミングするために、ヒト5D5M TCR の組み合わせを含むリポ粒子を免疫化のために使用した。リポ粒子を、第1及び第2の注射用のGerbuアジュバントと共に使用

10

20

30

40

50

した。

#### 【0377】

ポリクローナルT細胞を用いたブースター免疫化

マウスを、細胞懸濁液の皮下注射によって免疫した。第1のブースター免疫化(28日目)は、PBS中の細胞とアジュバントとの混合物を含み、後続の注射全ては、PBS中の細胞からのみ構成される。35日目に、ヒトTCR/CD3に対する1/300の血清1gG力価(リポ粒子を使用したELISAにより測定)を発現したマウスは、42、43、及び44日目に細胞を追加注射された。これらの基準を満たすことができなかったマウスは、細胞とブースター免疫される(42日目及び49日目)。全ての後続の免疫化は、PBS中の細胞の皮下注射として与えられる。最終免疫化後、マウスを殺し、血清及び脾臓及び左鼠径リンパ節を収集する。

10

#### 【0378】

ELISA中の免疫化されたマウスからの血清のスクリーニング

暫定血清1gG力価を、TCR/CD3含有リポ粒子と「ヌル」リポ粒子を使用したELISAによりスクリーニングした。抗マウス1gG染色を使用して、血清1gG力価を測定し、この染色は最も敏感であることが示された。

#### 【0379】

CD3結合可変ドメインは、配列番号92~154に示されるように、そのCDR領域のCD3 MFの重鎖可変領域のアミノ酸配列を使用して作製された。

#### 【0380】

ファージミドベクターから1gG発現ベクターへのVHコードcDNAの再クローニング  
全ての標的特異的クローンのVHコード化cDNAを配列決定した。次いで、配列同一性及びクラスター解析に基づく固有のクローンの選択を、SfiI-BstEII又はSfiI/XhoI消化及び1gG発現プラスミドへの消化されたcDNAのプールのライゲーションを用いて、異なる1gG発現ベクターに再クローニングし、標準化された分子生物学的技術に従って行った。

20

#### 【0381】

培養上清からの抗体の精製

抗体を含有する培地を回収し、遠心分離して細胞残屑を除去する。続いて、Protein Aセファロースビーズを培地に添加する。培地及びProtein Aセファロースビーズを抗体とインキュベートして結合を可能にする。

30

#### 【0382】

インキュベーション後、ビーズを培地から単離し、真空フィルターによって洗浄する。溶出緩衝液とのインキュベーションによって、抗体をビーズから溶出させる。

#### 【0383】

任意に、精製1gGの緩衝液を交換/脱塩する。

#### 【0384】

緩衝液交換

精製された抗体を脱塩するために、フィルタープレート又はフィルターカラムを使用して抗体画分を遠心分離する。プレート又はカラムを遠心分離して、抗体画分の体積を減少させる。続いて、PBS又は必要な緩衝液を画分に添加して、緩衝液を低塩緩衝液と置き換える。任意に、抗体の保存緩衝液を更に脱塩するために、この遠心分離ステップに続いて緩衝液を追加することを繰り返す。

40

#### 【0385】

実施例9：短腕又は長腕上に腫瘍細胞抗原を有する三重特異性抗体の生成。

三重特異性抗体を、三重特異性抗体の効率的なヘテロ二量体化及び形成のために、CH3操作技術を用いて、異なるVHドメインを有する1gGをコードする2つのプラスミドの一過性共トランスフェクションによって生成した。共通軽鎖もまた、同じプラスミド又は別のプラスミド上のいずれかで同じ細胞に共トランスフェクションされる。本発明の同時係属出願(例えば、国際公開第2013/157954号及び国際公開第2013/1

50

57953号、参照により本明細書に組み込まれる)では、単一の細胞から多重特異性抗体を産生するための方法及び手段を開示しており、これにより、単特異性抗体の形成よりも多重特異性抗体の形成を有利にする手段が提供される。これらの方法はまた、三重特異性抗体を含む多価多量体の生成のために、本発明において好適に使用することができる。

【0386】

具体的には、三重特異性全長IgG分子を優勢に生成するのに好ましい変異は、第1のCH3ドメイン中の351及び366位でのヒト野生型配列に関連したアミノ酸置換、例えばL351K及びT366K(EU番号付けに従っての番号付け)(「KK-変異体」重鎖)、及び第2のCH3ドメイン中の351及び368位でのアミノ酸置換、例えばL351D及びL368E(「DE-変異体」重鎖)、又はその逆である。これは、負に帯電したDE-変異体重鎖及び正に帯電したKK-変異体重鎖が優先的に対合し、ヘテロ二量体を形成する(いわゆる「DEKK」分子)ことが、本発明の同時係属出願により以前に実証されている。DE-変異体重鎖のホモ二量体化(DE-DEホモ二量体)又はKK-変異体重鎖のホモ二量体化(KK-KKホモ二量体)は、同一の重鎖間のCH3-CH3界面における荷電残基間の強い反発力のために、ほとんど発生しない。

【0387】

本発明によれば、免疫細胞関与結合ドメイン又は腫瘍抗原結合ドメインは、長腕又は短腕の遠位又は内部位置を含む、多価分子上の任意の位置に配置でき、ヘテロ二量体化技術を利用して、単一特異性、二価ホモ二量体、又は四重特異性ホモ二量体よりも三重特異性分子を有利に生成することができる。

【0388】

まず、腫瘍細胞抗原結合ドメインが、長腕又は短腕の遠位領域又は内部領域のいずれかに配置され得ることが実証された。

【0389】

本明細書に記載の三重特異性及び/又は三価抗体のそれぞれについて、 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mlの密度になるまでシェーカープレート上のT125フラスコで培養した、懸濁増殖適応293細胞を介して発現が達成される。細胞は、24深型ウェルプレートの各ウェルに $0.3 \sim 0.5 \times 10^6$ 生細胞/mlの密度で播種した。細胞を、異なる抗体をコード化する2つのプラスミドの混合物で一過性にトランスフェクトし、独自のベクター系にクローニングした。トランスフェクションから7日後に、細胞上清を採取し、 $0.22 \mu\text{M}$ のフィルターを通してろ過した。無菌上清を、三重特異性抗体の精製まで4で保存した。

【0390】

長腕の内側の位置に免疫関与結合ドメインを有し、短腕に腫瘍細胞抗原を有する三重特異性分子の例については、CD3結合ドメイン(MF8078)、本発明のリンカー、及び破傷風トキソイド(TT)結合ドメイン(MF1337)のVH遺伝子をコードするDNAが、正に帯電したCH3ドメイン(KK)をコードするベクターにクローニングされ、その場合、EGFR結合ドメイン(MF8233)のVH遺伝子をコードするDNAは、EGFR $\times$ CD3:TTの三重特異性分子をコードする負に帯電したCH3ドメイン(DE)をコードするベクターにクローニングされる。3つの結合ドメインの重鎖可変領域は表13に記載され、これらの三重特異性分子の活性は図15a及び16aに記載された。これらの三重特異性分子の場合、各重鎖可変領域は、共通軽鎖と対合する(配列番号29)。

10

20

30

40

## 【表 1 3】

表 13.

EGFR×CD3:モック					
DE腕	KK腕				目的
		使用される リンカー	リンカー 配列番号		
MF8233	MF8078	IgG1 G4S	12	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG1 H	19	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG2A MH	4	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG1 MH	11	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG1 R	23	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG1 UH	2	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG1 UL	14	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG2A H	15	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG2A R	20	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG2B H	16	MF1337	試料
MF8233	MF8078	IgG2B R	21	MF1337	試料
MF1025	MF8078	IgG1 H*	19	MF1337	陰性対照
MF1025	MF8078	IgG2 AMH	4	MF1337	陰性対照

10

20

## 【0 3 9 1】

長腕の内側の位置に免疫関与結合ドメインを有し、遠位に腫瘍細胞抗原を有する三重特異性抗体の例については、CD3結合ドメイン(MF8078)のVH遺伝子をコードするDNA、本発明のリンカー、及びEGFR結合ドメイン(MF8233)のVH遺伝子をコードするDNAが、正に荷電したCH3ドメイン(KK)をコードするベクターにクローニングされ、その場合、サイログロブリン結合ドメイン(「Thyro」)(MF1025)のVH遺伝子をコードするDNAは、Thyro×CD3:EGFRの三重特異性分子をコードする負に荷電したCH3ドメイン(DE)をコードするベクターにクローニングされる。図14b. 3つの結合ドメインの重鎖可変領域は表14に記載され、これらの三重特異性分子の活性は図15b及び16bに記載された。これらの三重特異性分子の場合、各重鎖可変領域は、共通軽鎖と対合する(配列番号29)。

30

40

50

【表 1 4】

表 14.

モック×CD3:EGFR					
DE腕	KK腕				目的
		使用される リンカー	リンカー 配列番号		
MF1025	MF8078	IgG1 G4S	12	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG1 H	19	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG2A MH	4	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG1 MH	11	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG1 R	23	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG1 UH	2	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG1 UL	14	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG2A H	15	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG2A R	20	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG2B H	16	MF8233	試料
MF1025	MF8078	IgG2B R	21	MF1337	比較対象 タイプA
MF1025	MF8078	IgG1 H	19	MF1337	比較対象 タイプA
MF1025	MF1122	IgG2 AMH	4	MF1337	陰性対照
MF1025	MF8078	IgG1 H	19	MF1337	陰性対照
MF1025	MF1122	IgG2 AMH	4	MF1337	陰性対照

## 【0392】

実施例10：腫瘍細胞抗原結合ドメインをT細胞関与三価分子の短腕又は長腕に配置する効果。

細胞株

B×PC3は、ヒト膀胱癌細胞株である。

HCT-116は、ヒト結腸がん細胞株である。

## 【0393】

上記の一連の三重特異性IgGは、短腕に抗EGFR結合ドメイン（図14a及び表13）と長腕に抗EGFR結合ドメイン（図14b及び表14）を含有する三種特異性に11の異なるリンカーを組み込んだものと、一連の対照抗体を24ウェルの産生で生成した。これらの分子は、T細胞活性化を引き起こす能力について細胞傷害アッセイにおいて評価されている。

## 【0394】

Ficoll及びEasySepヒトT細胞分離キットを標準的な手法に従って使用し、健康なドナーの全血から静止T細胞を分離し、フローサイトメトリー分析を使用して抗CD3抗体で95%超のT細胞純度を確認し、その後凍結保存した。細胞傷害アッセイでは、凍結保存されたT細胞を解凍し、解凍時に生存率が90%を超える場合は、標準のトリパンブルー染色で測定して使用した。細胞傷害アッセイは、短く言えば、解凍した静止T細胞及びB×PC3（図15）又はHCT116（図16及び17）標的細胞を、5：1のE：T比で48時間、共培養した。三価抗体については、4µg/mlの濃度で開始する6段階3倍希釈系列を使用した。EGFR×CD3二重特異性抗体を陽性対照として使用した；モック×モック：モック、モック×CD3：モック、及びEGFR×モック：モック三価抗体を特異性対照に使用した。T細胞活性化を、フローサイトメトリーを使用して定量化した；CD4及びCD8 T細胞をCD4及びCD8発現に基づいてゲーティングし、続いて、T細胞上でCD25及びCD69発現を測定することによって、それらの活性化状態について分析した。標的細胞溶解は、Cell Titer Glo（Prom

e g a ) によって評価された A T P レベルを測定することによって、生存細胞の割合を測定することによって求めた。E n v i s i o n マイクロプレートリーダーでの発光によって測定された A T P レベルは、相対発光量 ( R L U ) 値をもたらし、これを G r a p h P a d P r i s m を用いて分析した。

【 0 3 9 5 】

各試料の標的細胞溶解度を以下のように計算した：

% 殺傷率 = ( 1 0 0 - ( R L U 試料 / R L U I g G なし ) × 1 0 0 ) 。

【 0 3 9 6 】

T 細胞活性化に関するこれらのデータ ( 図 1 5 を参照 ) 及び細胞傷害 ( 図 1 6 ) は、三重特異性抗体が機能性であることを示す。図 1 5 及び 1 6 に示すように、モック x C D 3 : E G F R 及び E G F R x C D 3 : モック三重特異性分子は、E G F R 標的の特異的 T 細胞活性化及び細胞傷害を誘導することが可能であることが実証される。抗 E G F R F a b が長腕内の遠位に配置される場合、モック x C D 3 : E G F R 三重特異性は、T 細胞活性化 ( 図 1 5 ) 及び細胞傷害 ( 図 1 6 ) の両方において、二重特異性 E G F R x C D 3、並びに短腕上に E G F R 結合ドメインを有し、長腕に C D 3 及びモック T T ( M F 1 3 3 7 ) 結合ドメインを有する ( 図 1 4 a を参照のこと ) 三重特異性の両方に対する活性の増強を示した。

【 0 3 9 7 】

更に、長腕上の E G F R 及び C D 3 を有する三重特異性抗体の活性に基づいて、リンカーは、図 1 7 b ~ d に示すように、比較的高いサイトカイン産生と関連するもの ( I g G 1 U H ( 配列番号 2 )、I g G 1 M H ( 配列番号 1 1 )、I g G 2 A M H ( 配列番号 4 )、及び I g G 1 G 4 S ( 配列番号 1 2 ) )、並びに比較的低いサイトカイン産生と関連するもの ( I g G 1 U L ( 配列番号 1 4 )、I g G 2 A H ( 配列番号 1 5 )、I g G 2 B R ( 配列番号 2 1 )、I g G 2 A R ( 配列番号 2 0 )、I g G 1 H ( 配列番号 1 9 )、I g G 1 R ( 配列番号 2 3 ) ) に結合することができる。リンカーの使用方法の変更と細胞傷害への影響はそれほど顕著ではなかった ( 図 1 7 a ) 。

【 0 3 9 8 】

実施例 1 1 : 短腕又は長腕上の結合ドメインと関与する免疫細胞を有する三重特異性抗体の生成。

本発明によれば、免疫細胞関与結合ドメインは、長腕又は短腕の遠位又は内部位置を含む多価分子上の任意の位置に配置することができ、ヘテロ二量体化技術は、三価分子を好適に生成するために利用することができる。図 1 8 ( 短腕上の C D 3 結合ドメイン )、図 1 9 ( 内側長腕上の C D 3 結合ドメイン )、及び図 2 5 ( 遠位長腕上の C D 3 結合ドメイン ) を参照のこと。

【 0 3 9 9 】

例えば、免疫関与ドメインは短腕に配置され、C D 3 結合ドメイン ( M F 8 0 7 8 ) の V H 遺伝子をコードする D N A は、正に荷電した C H 3 ドメイン ( K K ) をコードするベクターにクローニングされ、E G F R 結合ドメイン ( M F 9 9 8 8 ( 配列番号 2 1 8 ) 又は M F 9 8 9 1 ( 配列番号 1 9 1 ) )、リンカー I g G 2 A M H、及び P D - L 1 結合ドメイン ( M F 5 3 8 0 ( 配列番号 1 7 3 ) 又は M F 5 4 4 4 ( 配列番号 1 6 4 ) ) の V H 遺伝子をコードする D N A は、負に荷電した C H 3 ドメイン ( D E ) をコードするベクターにクローニングされる。図 1 8 ( C D 3 x P D - L 1 : E G F R ) 。

10

20

30

40

## 【表 1 5】

表 15

CD3xPD-L1:EGFR		
KK腕	DE腕	
MF8078	MF5380	MF9988
MF8078	MF5380	MF9891
MF8078	MF5444	MF9988
MF8078	MF5444	MF9891

10

## 【 0 4 0 0】

あるいは、免疫関与ドメインが長腕の内側の位置に配置されており、その場合、CD3結合ドメインのVH遺伝子(MF8078)、リンカーIgG2A MH(配列番号4)、及びPD-L1結合ドメインのVH遺伝子(MF5444(配列番号164))をコードするDNAが、MF5380(配列番号173)、MF5377(配列番号155)は、正に荷電したCH3ドメイン(KK)をコードするベクターにクローニングされ、EGFR結合ドメイン(MF9886(配列番号200)、MF9988(配列番号218)、MF9891(配列番号191)、又はMF9873(配列番号209))のVH遺伝子をコードするDNAは、負に荷電したCH3ドメイン(DE)をコードするベクターにクローニングされる。図19(EGFRxCD3:PD-L1)。

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 6

EGFRxCD3:PD-L1		
DE腕	KK腕	
MF9988	MF8078	MF5444
MF9988	MF8078	MF5380
MF9886	MF8078	MF5380
MF9988	MF8078	MF5377
MF9886	MF8078	MF5377
MF9891	MF8078	MF5377
MF9873	MF8078	MF5377
MF9891	MF8078	MF5380
MF9873	MF8078	MF5380
MF9891	MF8078	MF5444
MF9873	MF8078	MF5444
MF1337	MF8078	MF5377
MF1337	MF8078	MF5380
MF1337	MF8078	MF5444
MF9886	MF8078	MF1337
MF9988	MF8078	MF1337
MF9891	MF8078	MF1337
MF9873	MF8078	MF1337
対照抗体		
MF1337	MF8078	—
MF8233	MF8078	—

10

20

【0 4 0 1】

あるいは、免疫関与ドメインが長腕の遠位位置に配置され、この場合、CD3結合ドメイン(MF8078(配列番号110)、MF8508(配列番号128)又はMF8057(配列番号92))、リンカーIgG1H(配列番号19)のVH遺伝子、及びフィブリノーゲン結合ドメイン(「Fibri」)(MF1025)のVH遺伝子をコードするDNAは、正に荷電したCH3ドメイン(KK)をコードするベクターにクローニングされ、この場合、EGFR結合ドメイン(MF8233)のVH遺伝子をコードするDNAは、負に荷電したCH3ドメイン(DE)をコードするベクターにクローニングされる。図24(EGFRxFibri:CD3)。

【表 1 7】

表 1 7

EGFRxFibri:CD3				
DE腕	KK腕			
		使用されるリンカー	リンカー配列	
MF8233	MF1122	IgG1H	19	MF8078
MF8233	MF1122	IgG1H	19	MF8508
MF8233	MF1122	IgG1H	19	MF8057

30

40

50



## 【 0 4 0 2 】

上記の三重特異性分子のそれぞれについて、図 1 8、1 9、及び 2 4 に記載されているように、各重鎖可変領域は、共通軽鎖と対合する。配列番号 2 9。

## 【 0 4 0 3 】

以下に更に記載されるように、各 C D 3 結合ドメインの配置は、1 つ以上の細胞外に曝露された腫瘍細胞抗原を発現する細胞に対する T 細胞の細胞傷害又は活性化を生成するのに有効であることが実証された。

## 【 0 4 0 4 】

実施例 1 2 : E G F R x C D 3 : P D - L 1 の三重特異性フォーマットのための C D 3 を介した効果的な二重腫瘍抗原結合及び T 細胞関与。

細胞株 :

M D A - M B - 2 3 1 細胞 ( A T C C ( 登録商標 ) H T B - 2 6 ) は乳癌細胞であり、転移部位から誘導される。

## 【 0 4 0 5 】

図 1 9 のフォーマットに従って三重特異性抗体を産生し、かかる分子の能力を分析して腫瘍抗原標的化及び細胞傷害を介する T 細胞関与を同時に達成した。これらの抗体は、上記技術によって生成された。

## 【 0 4 0 6 】

低～高の様々な親和性を有する 4 つの抗 E G F R F a b ( M F 9 8 8 6、M F 9 9 8 8、M F 9 8 9 1、M F 9 8 7 3 ) を短腕に使用し、長腕に低～高の様々な遠位の親和性を更に含有する異なる抗 P D - L 1 F a b ( M F 5 4 4 4、M F 5 3 8 0、及び M F 5 3 7 7 ) と組み合わせた。抗 C D 3 F a b 及びリンカーは、M F 8 0 7 8 及びリンカー I g G 2 A M H ( 配列番号 4 ) を使用して一定に維持した。

## 【 0 4 0 7 】

E G F R 及び P D - L 1 親和性のランク付けは、それぞれ表 1 8 及び 1 9 の結合データに基づいた ; ランク付けは、下記の参照抗 E G F R 及び抗 P D - L 1 抗体に対する結合に基づくものであった。

## 【 表 1 8 】

表 18 重鎖 MF9886、MF9988、MF9891、MF9873 を有する

単特異的二価 EGFR 抗体の EGFR パネル

MF	MDA-MB-231 細胞 (%)
9886	10. 7
9988	21. 0
9891	44. 2
9873	82. 5
8233	100

## 【 0 4 0 8 】

E G F R 重鎖の親和性のランク付けは、重鎖 M F 8 2 3 3 を有する単特異性二価抗体の陽性対照と比較して、上記の E G F R 発現細胞に結合するこれらの単特異性二価抗体の相対的能力に基づく。

10

20

30

40

50

## 【表 19】

表19. 重鎖MF5444、MF5380、及びMF5377を有する単特異性二価PD-L1抗体のPD-L1パネル

抗PD-L1重鎖	huPD-L1への結合	比EC50/EC50 RG7446
MF5377	あり	3.09
MF5380	あり	3.67
MF5444	あり	5.46

10

## 【0409】

PD-L1重鎖腕の相対親和性ランク付けは、ELISA中のヒトPD-L1に結合する能力に基づく。この目的のために、ELISAプレートを、 $10\mu\text{g/ml}$ で開始して、8段階、3倍滴定希釈範囲でhuPD-L1-His(Sinobiological)でコーティングした。続いて、各PD-L1 Fabの結合を、PD-L1 x TTIgG  $5\mu\text{g/ml}$ として評価した。結合のためのEC50を判定し、抗PD-L1 RG7446 MPDL3280Aについて判定された結合EC50に正規化した。各ELISAプレート上に存在する米国特許出願公開第2010/0203056号を参照のこと。

## 【0410】

これらの三重特異性EGFR x CD3: PD-L1分子を、次いで、腫瘍細胞抗原について異なる抗原密度を有する2つの細胞株(HCT116及びMDA-MB-231)に対して本明細書に前述した方法に基づいて細胞傷害を誘導する能力について試験した。これらの細胞株の発現プロファイルは、対照抗体(EGFRの場合はセツキシマブ、PD-L1の場合はMPDL3280A)の使用によってFACS染色を使用して判定され、平均蛍光強度(MFI)がバックグラウンド信号より3倍高かった場合、目的の抗原の発現が陽性であると見なされた。PD-L1については3回、EGFRについては4回繰り返し、結果を以下に示すようにMFIとして報告した。

20

## 【表 20】

表20

細胞株	EGFR(MFI)	PD-L1(MFI)
HCT116	178,523	10,876
MDA-MB-231	276,915	74,581

30

## 【0411】

これらの細胞株に対する三重特異性分子の細胞傷害を調査するこの研究は、EGFR x CD3: PD-L1三重特異性分子の3つ全ての結合ドメインが2つの腫瘍細胞抗原とCD3を同時に結合でき、それにより三重特異性分子の両方の腫瘍抗原結合ドメインがT細胞の関与時に細胞傷害に寄与することを示す。図20及び21(MDA-MB-231細胞に対して)及び図22(HCT116細胞に対して)。これらの三重特異性分子は、一般に、二重特異性EGFR x CD3 x モック及びモック x CD3 x PD-L1対照よりも高い機能活性を示し、三重特異性分子9873 x 8078: 5377は、最大の溶解率を示す(図21)。本明細書で試験した三重特異性は、HCT116細胞と比較して比較的高い標的抗原レベルを有するMDA-MB-231細胞に対してより強力である(図21及び図22)。

40

## 【0412】

実施例13: CD3 x PD-L1: EGFRの三重特異性フォーマットのためのCD3を介した効果的な二重腫瘍抗原結合及びT細胞関与

図18のフォーマットに従って三重特異性抗体を産生し、免疫関与ドメインが短腕に存

50

在する場合に、同時の腫瘍抗原標的化が更に示される。これらの抗体は、上記技術によって生成された。このフォーマットでは、PD-L1親和性の増加に伴い、CD3×PD-L1：EGFR分子で観察されたMDA-MB-231細胞のFACにより測定される標的細胞結合の継続的な増強があったように、二重抗原標的相関結合が実証された。図23a．CD3×PD-L1：EGFRのフォーマットを有する特定のこれらの三重特異性分子の場合、同時の二重抗原結合及び免疫細胞関与は、単一の抗原及びCD3に結合する分子（重鎖配列図示せず）におけるB×PC3細胞の細胞傷害に相加効果があることが示され、これらの分子が3つすべての結合腕に同時に関与する能力が確認された。図23b．これらのデータに対する細胞傷害アッセイのプロトコルについては、上述した。

#### 【0413】

実施例14：EGFR×フィブリノーゲン：CD3の三重特異性フォーマットの場合、遠位長腕でのCD3を介した効果的なT細胞活性化。

Jurkat-NFAT-RE-luc2細胞(Promega)は、NFAT応答エレメント(NFAT-RE)によって駆動されるルシフェラーゼレポーターを発現する操作Jurkat T細胞株である。

#### 【0414】

HT29(ATCC HTB-38)は、ヒト結腸癌細胞である。

#### 【0415】

EGFR(MF8233)×フィブリノーゲン(MF1122)：CD3(MF8078)の三価分子を使用して、CD3結合ドメインを長腕の遠位領域に配置するための研究を実施した。図24．標的細胞HT29に対してJurkat-NFAT-RE-luc2細胞でT細胞活性化アッセイを実行して、このフォーマットの機能的なT細胞活性化能力を確立する。簡単に言えば、レポーターアッセイ：濃度範囲の三価抗体と対照抗体の存在下で、JurkatエフェクターT細胞を標的細胞と共にインキュベートした。5時間のインキュベーション後、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を使用して、レポーター細胞のルシフェラーゼ活性をT細胞活性化の読み取り値として測定した。発光活性はEnvisionマイクロプレートリーダーで測定され、相対発光量(RLU)値を得、GraphPad Prismを使用して分析した。

#### 【0416】

図25に示すように、EGFR×Fibri：CD3三重特異性分子によるT細胞の活性化は、図15aでT細胞の活性化を引き起こすことが以前に示されているEGFR×CD3抗体である陽性対照以上のレベルで示された。

#### 【0417】

実施例15：一連のCD3結合ドメイン及びリンカーに対するCD3を介した効果的な腫瘍抗原結合及びT細胞の関与

EGFR×CD3：EGFR二重特異性三価分子のパネルが生成され(図26)、様々な異なるCD3、免疫細胞関与結合ドメイン、及び8つの異なるリンカーに対する腫瘍標的化及びT細胞関与の有効性が示された。各三価分子は、短腕及び遠位の長腕の位置に同じ抗EGFR結合ドメイン(MF9891)を2つ含有し、長腕の内部の位置にCD3結合ドメインを有した。この研究では、Jurkat-NFAT-RE-luc2細胞及び標的細胞HCT116(中間EGFR発現)及びMDA-MB-231のレポーター細胞株を使用して、前述の方法によりT細胞活性化を測定した。陰性対照の場合、異なるスーパークラスターのCD3結合ドメインを使用した三価分子がモック×CD3×モック又は二重特異性(EGFR(MF8233)×TT(MF1337))(4,000ng/ml)を産生した。読み取り値は、5時間のインキュベーション後のレポーター活性に依存した。

#### 【0418】

様々なスーパークラスターから試験した各CD3は、HCT116細胞を使用してレポーター活性を示し、スーパークラスター7のCD3結合ドメインは、リンカー腕に基づく活性のスペクトルを示しながら、最低の相対レポーター活性を示した。対照的に、スーパ

10

20

30

40

50

ークラスタ-1からの2つのCD3結合ドメイン(MF8058及びMF8078)及びスーパークラスタ-4からのCD3結合ドメイン(MF8508)は、リンカー腕に関係なく比較的一貫した活性を示した。最後に、スーパークラスタ-1の1つのCD3結合ドメイン(MF8057)は、比較的低いレポーター活性を示し、異なるリンカーに関連するいくつかの差異をもたらした。図27を参照のこと。これらのデータの総説は、IgG1 MHリンカーを含有する三価が一貫してスーパークラスタにわたって最も強力であるように一貫して現れることを示す。

【0419】

同様に、様々なスーパークラスタから試験した各CD3結合ドメインは、MDA-MB-231細胞を使用してレポーター活性を示し、スーパークラスタ-7のCD3結合ドメインは、使用されたリンカーに基づく活性のスペクトルの比較的低いレポーター活性を示した。対照的に、スーパークラスタ-1からの3つのCD3結合ドメイン(MF8057、MF8058、及びMF8078)とスーパークラスタ-4からのCD3結合ドメインは、使用したリンカーに関係なく、比較的類似した活性を示した。図28を参照のこと。

10

表21

二重特異性分子の生成のためのIgG重鎖である。表21A:CH1領域。表21B:ヒンジ領域。図21C:CH2領域。図21D:L235G及びG236Rサイレンシング置換を含有するCH2。表21E:置換L351K及びT366K(KK)を含有するCH3ドメイン。表21F:置換L351D及びL368E(DE)を含有するCH3ドメイン。

20

【表22】

表21A

CH1:

```
gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgcg
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggcgtgcttacctacagtcctca
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactcctcagcagcgtcgtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt (配列番号291)
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V (配列番号292)
```

30

【表23】

表21B

ヒンジ:

```
Gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccca (配列番号293)
E P K S C D K T H T C P P C P (配列番号294)
```

40

50

## 【表 2 4】

## 表21C

CH2:

gcacctgaactcctggggggaccgtcagtcctcctcccccaaaaccaaggacacc  
 A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T  
 ctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac  
 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag  
 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K  
 ccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac  
 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H  
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtccaacaaagccctccagcc  
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A  
 Cccatcgagaaaaccatctccaagccaaa (配列番号295)  
 P I E K T I S K A K (配列番号296)

10

## 【表 2 5】

## 表21D

L235G及びG236Rサイレンシング置換を含有するCH2:

gcacctgaactcggcagggggaccgtcagtcctcctcccccaaaaccaaggacacc  
 A P E L G R G P S V F L F P P K P K D T  
 ctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac  
 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag  
 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K  
 ccgcgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac  
 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H  
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtccaacaaagccctccagcc  
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A  
 Cccatcgagaaaaccatctccaagccaaa (配列番号297)  
 P I E K T I S K A K (配列番号298)

20

30

40

50

## 【表 2 6】

## 表21E

CH3:DEKKのKK

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatccgggaggagatgaccaag

G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K

aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag

N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E

tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactcc

W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S

gacggctccttcttctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg

D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G

aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc

N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S

ctctccctgtctccgggtga

(配列番号299)

L S L S P G -

(配列番号300)

10

## 【表 2 7】

## 表21F

CH3:DEKKのDE

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatccgggaggagatgaccaag

G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K

aaccaggtcagcctgacctgcgagggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag

N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E

tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactcc

W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S

gacggctccttcttctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg

D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G

aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc

N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S

ctctccctgtctccgggtga

(配列番号301)

L S L S P G -

(配列番号302)

20

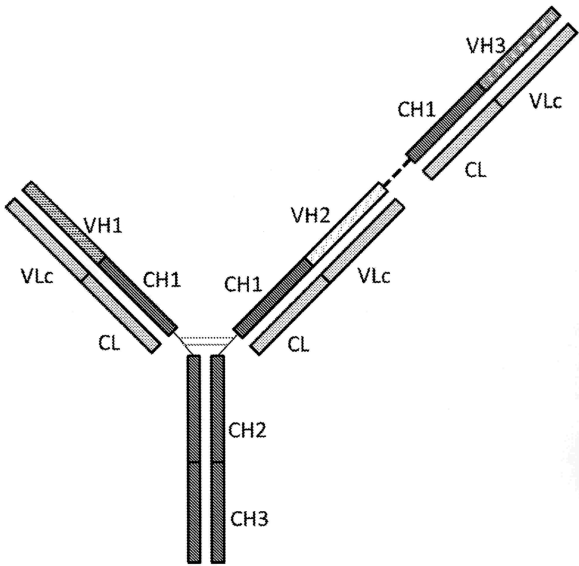
30

40

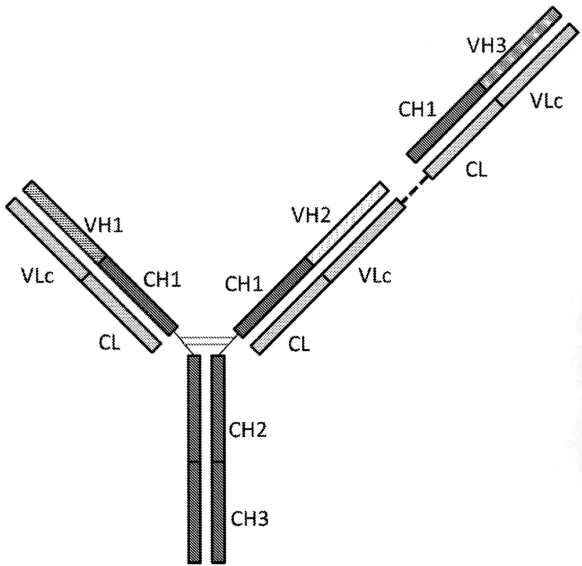
50

【図面】

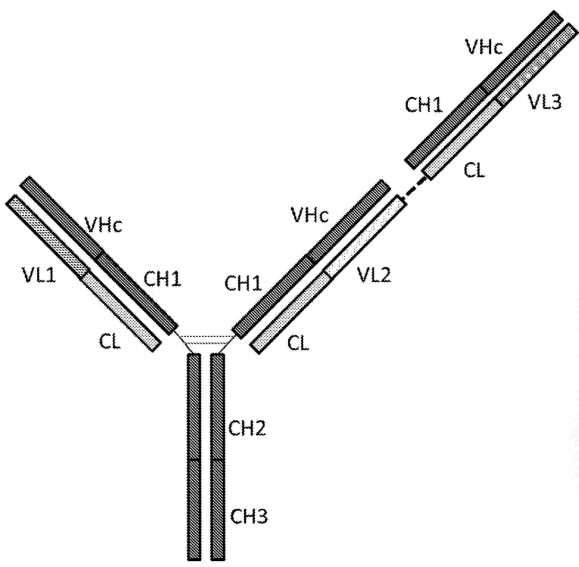
【図 1 a】



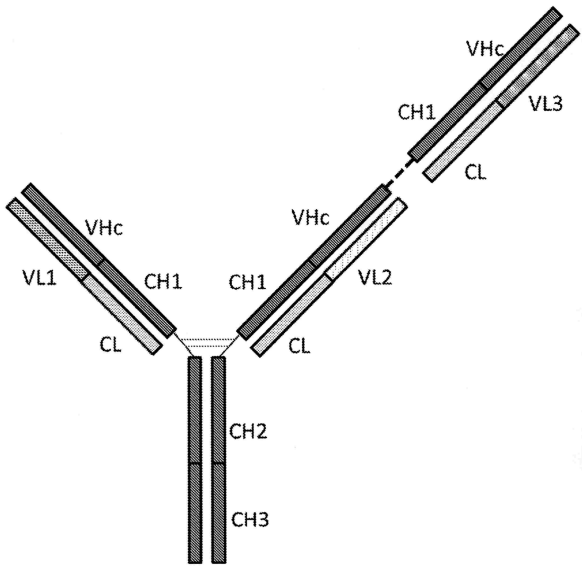
【図 1 b】



【図 1 c】



【図 1 d】



10

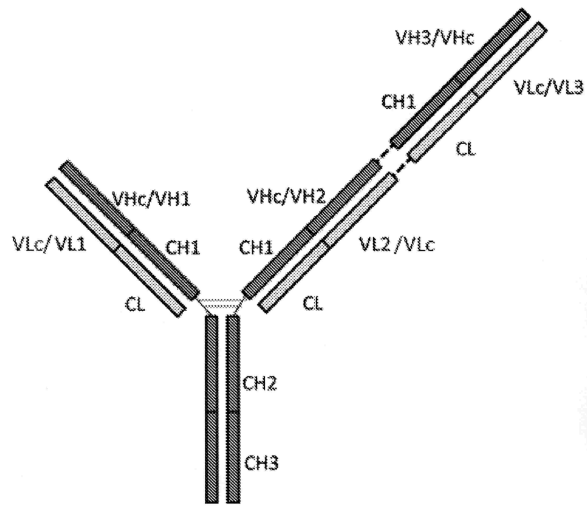
20

30

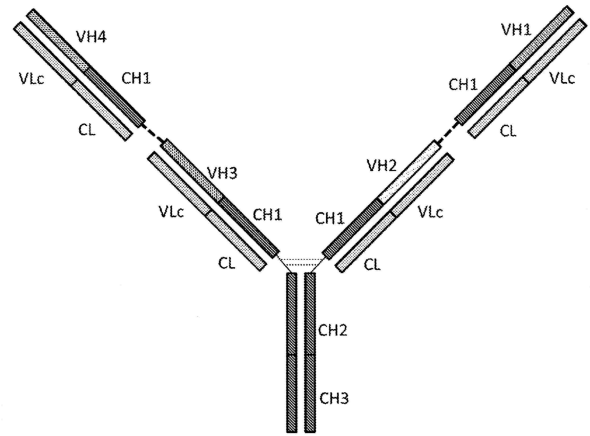
40

50

【図 1 e】

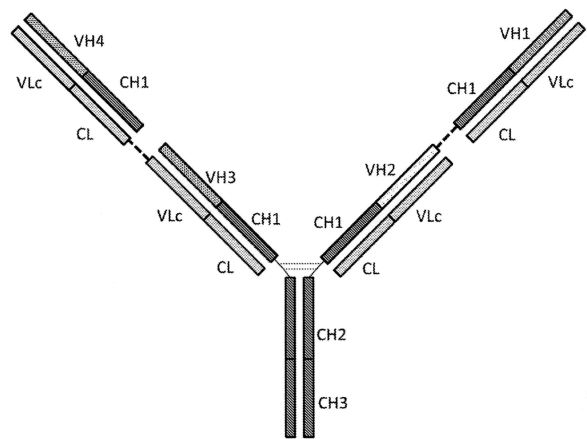


【図 1 f】

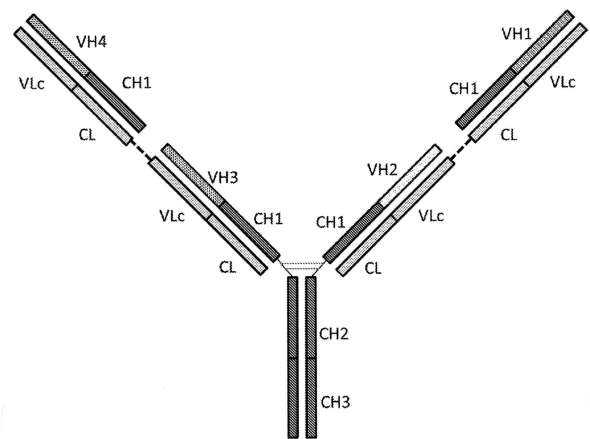


10

【図 1 g】



【図 1 h】



20

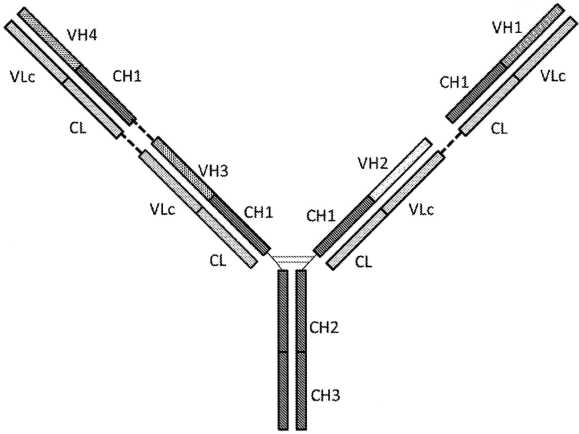
30

40

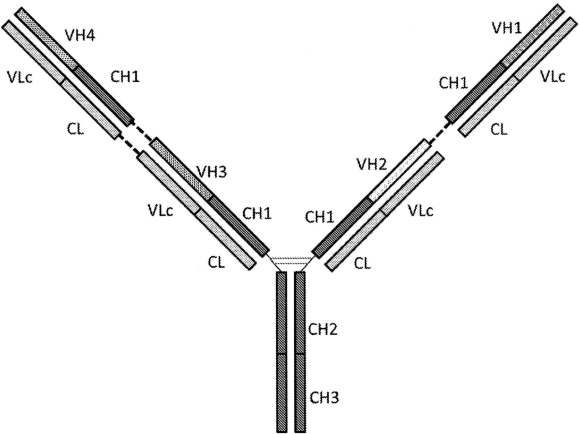
50



【図 1 i】

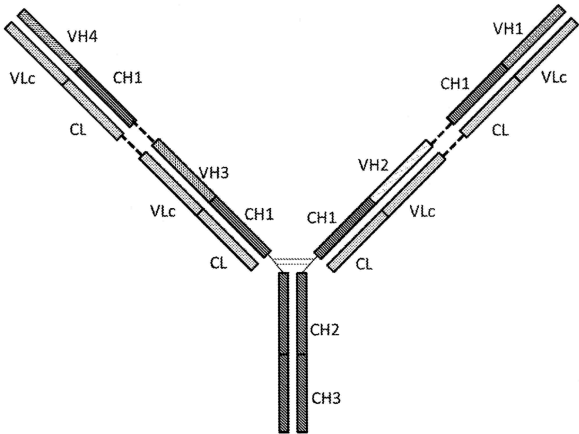


【図 1 j】

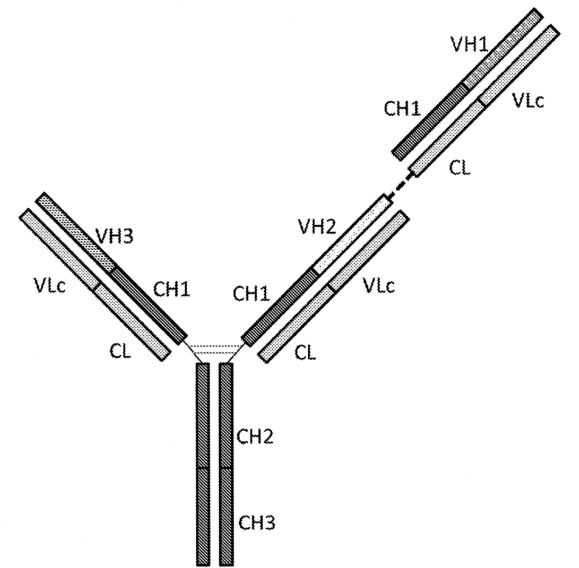


10

【図 1 k】



【図 1 l】



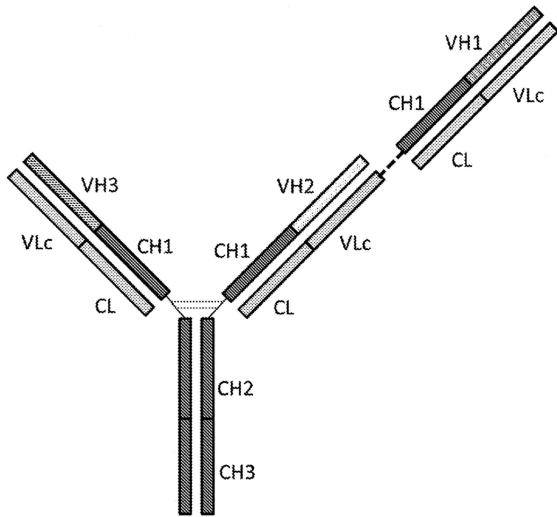
20

30

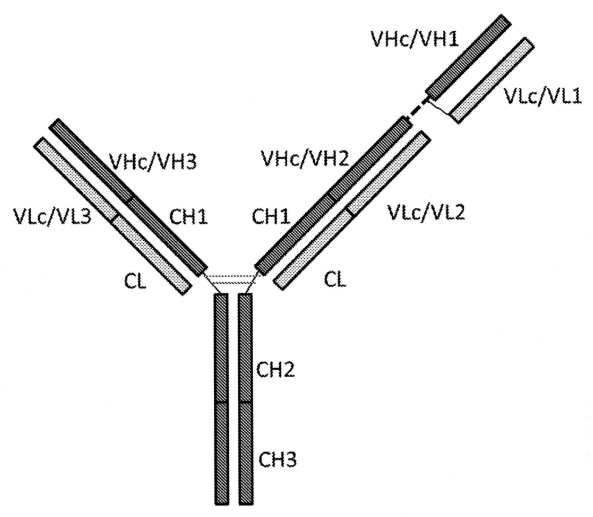
40

50

【図 1 m】

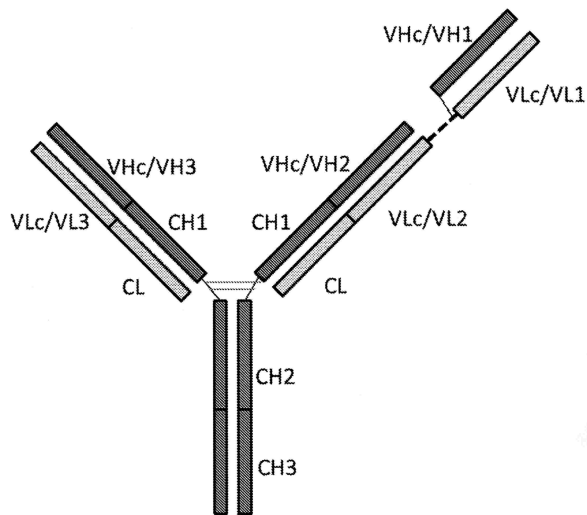


【図 1 n】

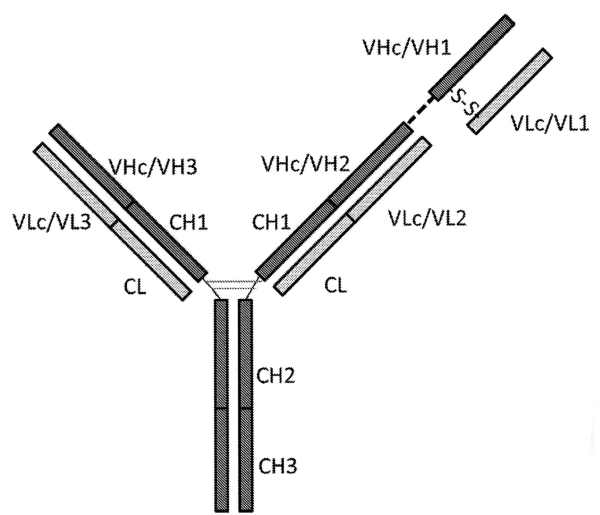


10

【図 1 o】



【図 1 p】



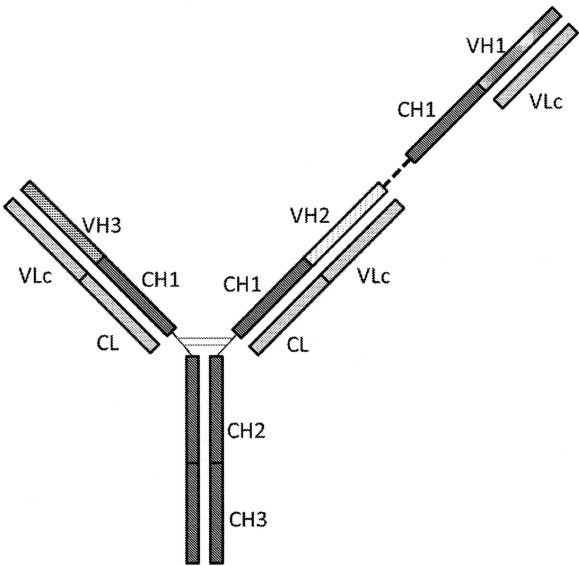
20

30

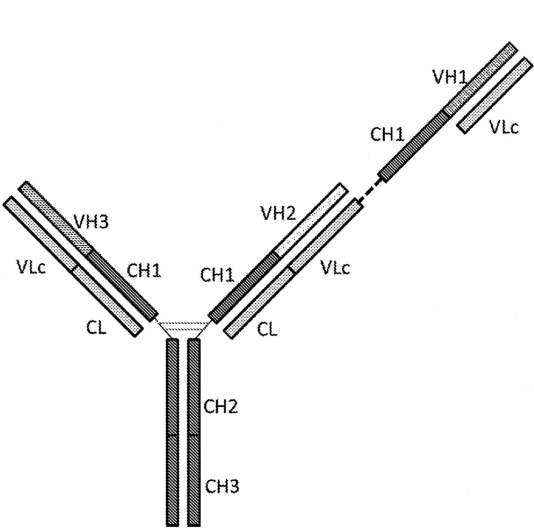
40

50

【図 1 q】

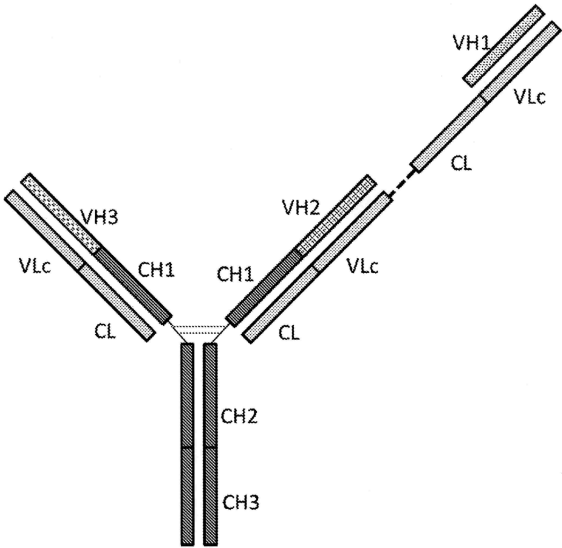


【図 1 r】

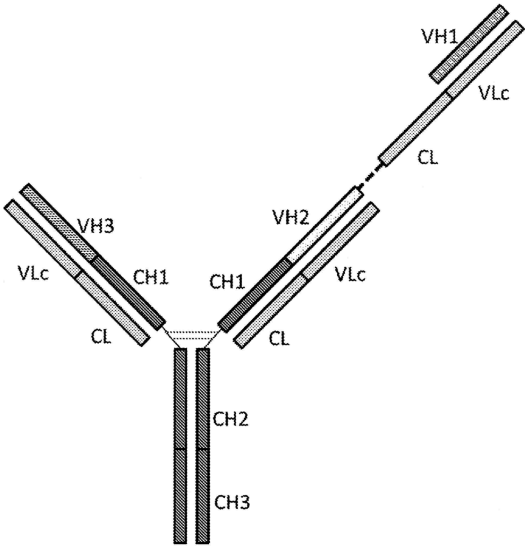


10

【図 1 s】



【図 1 t】



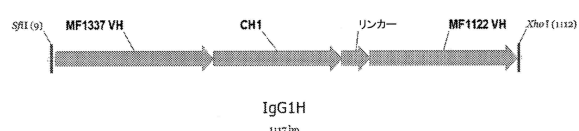
20

30

40

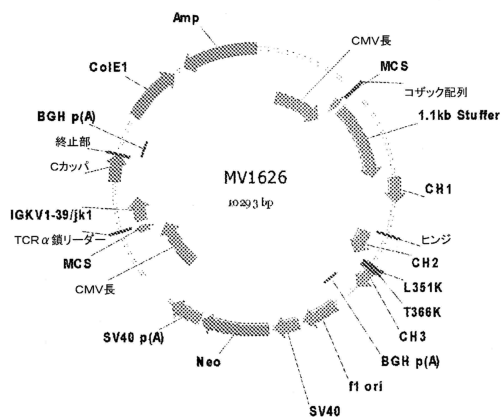
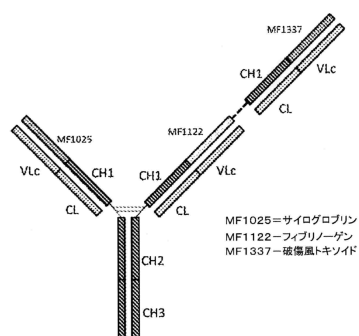
50

【 図 2 a 】



【 図 2 b 】

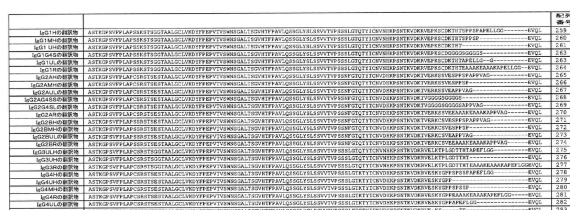
【圖 3】



40

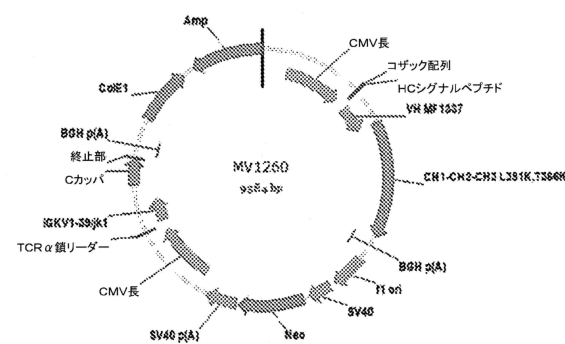
50

【圖 5】



【图 6】

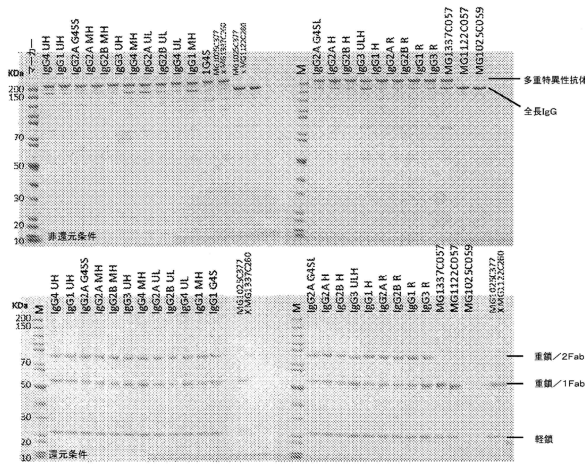
【图 7】



30

50

【圖 8】



【 1 1 B 】

(配列番号36及び37)

gacatccagatgacccagtcctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc  
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T  
atcactgccgggcaagtcagagcattagcagctacttaattggtatcagcagaaacca  
I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P  
gggaaagccccaagtcctgatctatgtgcatccagttgcaaagtggtgccatca  
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S  
aggttcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgtcaacct  
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccctccaacgttcggccaa  
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q  
gggaccaaggtggagatcaaa  
G T K V E I K

【 1 1 D 】

(配列番号40)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQSYSTPPITFGQGRLEIK

【 1 1 C 】

(配列番号38及び39)

cgaactgtggctgcaccatctgtctcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatct  
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S  
ggaaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacag  
G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q  
tggaagggtggataacgcccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggac  
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D  
agcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgag  
S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E  
aaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag  
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K  
agcttcaacaggggagagtgtag  
S F N R G E C -

10

【 1 1 E 】

(配列番号41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
SRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQSYSTP

20

30









40

50

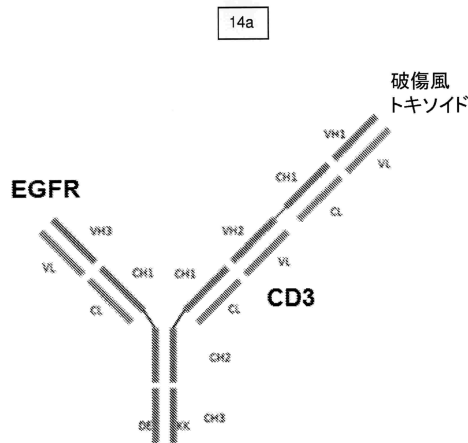
【 図 1 2 】

[illegible]

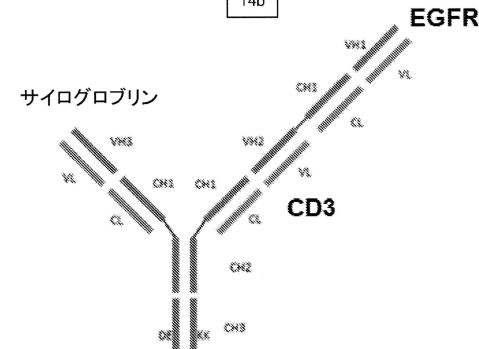
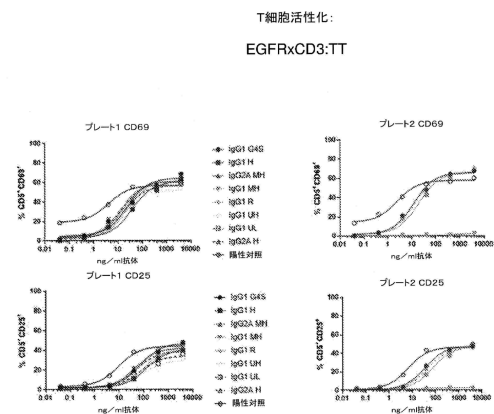
【 図 1 3 】

IgG1 UH	配列番号2	IgG2A H	配列番号15
			
IgG2A MH	配列番号4	IgG2B H	配列番号16
			
IgG1 MH	配列番号11	IgG1 H	配列番号19
			
IgG1G4	配列番号12	IgG2B R	配列番号21
			

【 図 1 4 】

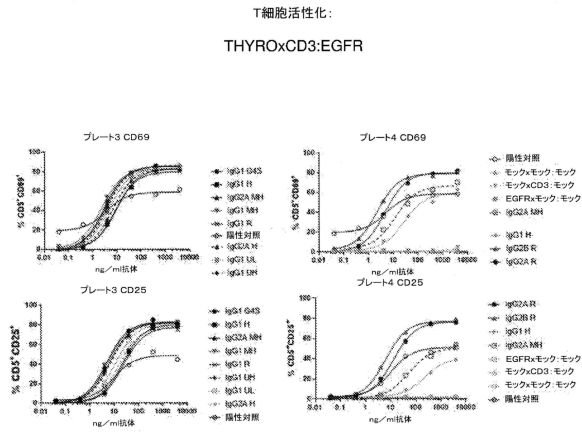


【 図 1 5 a 】

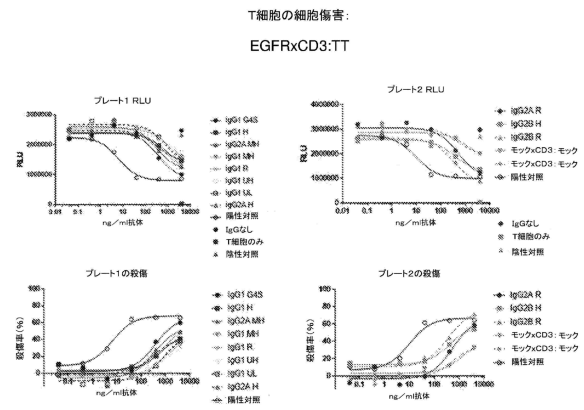




【図 15 b】

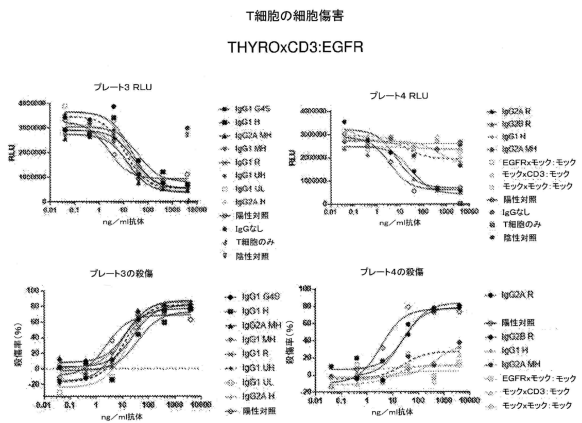


【図 16 a】

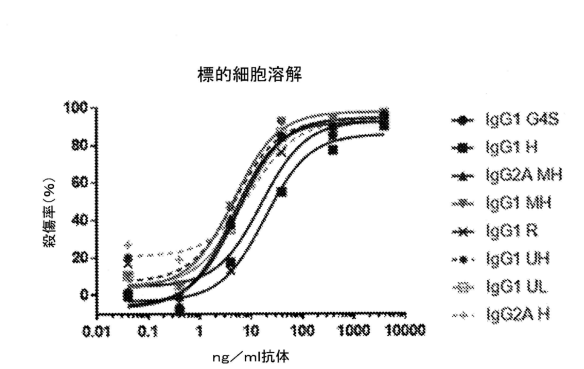


10

【図 16 b】



【図 17 a】



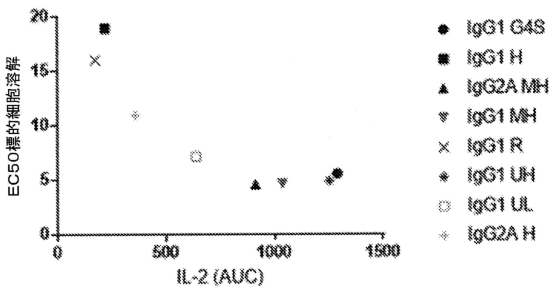
20

30

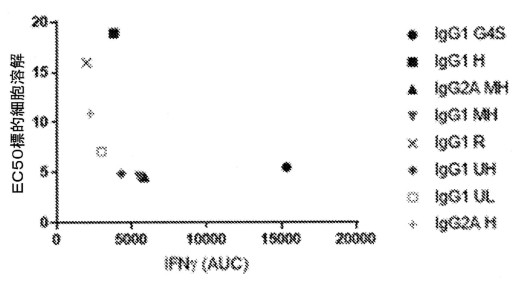
40

50

【 図 1 7 b 】

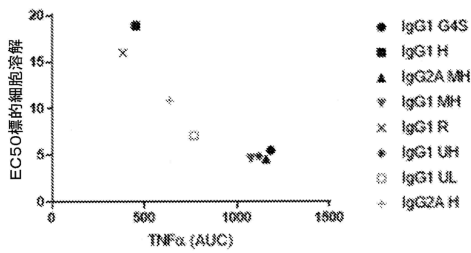


【 図 1 7 c 】

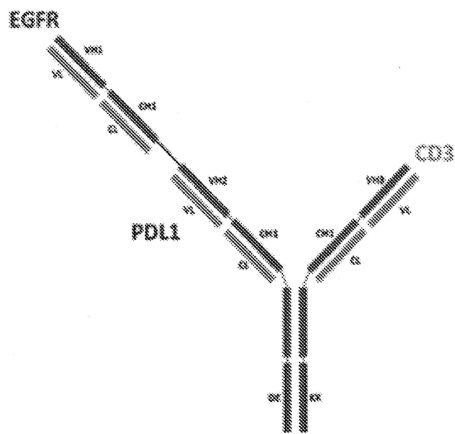


10

【 図 1 7 d 】



【 図 1 8 】



20

30

40

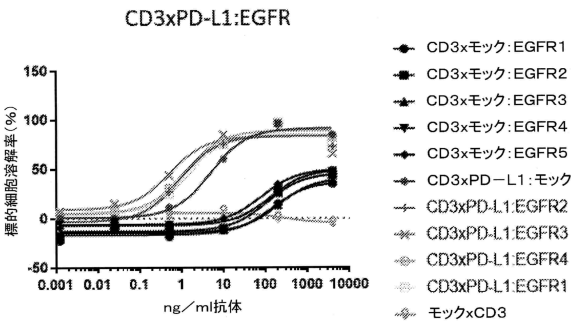
50



【 図 2 3 a 】

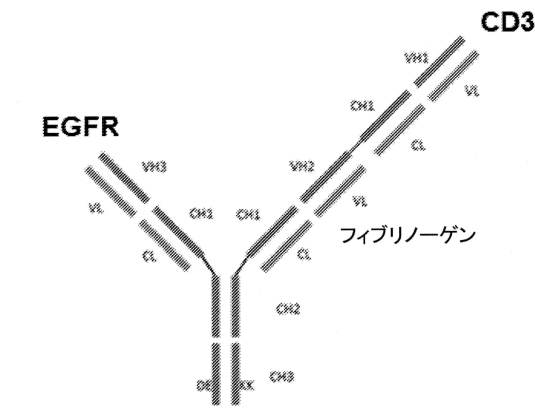
FACS	標準AUC	EGFR					
MDA		モック	-	MF9988	-	-	MF9891
PD-L1	-	12	N/A	50	69	83	146
	-	50	71	88	116	113	148
	-	45	81	N/A	112	121	148
	-	8	32	30	63	N/A	104
	-	5	14	N/A	40	43	71
MF5380	5	14	N/A	40	43	71	
MF5444	12	28	39	51	72	102	
対照		28	25	26	60	101	
EGFRxCD3							

【 図 2 3 b 】

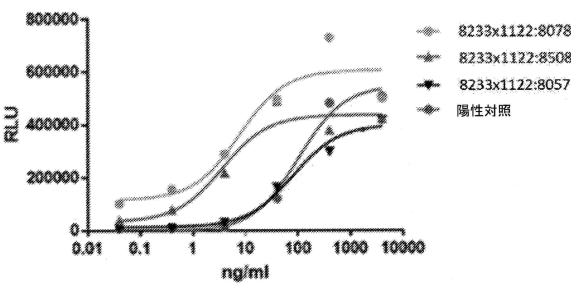


10

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



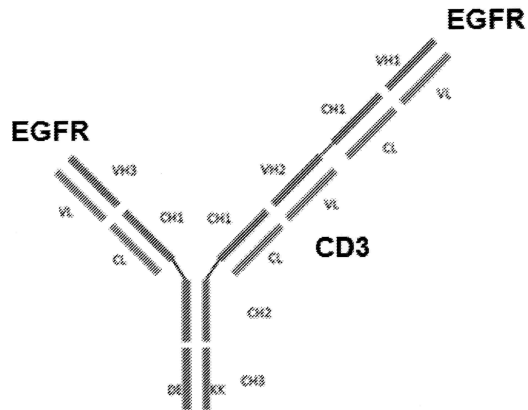
20

30

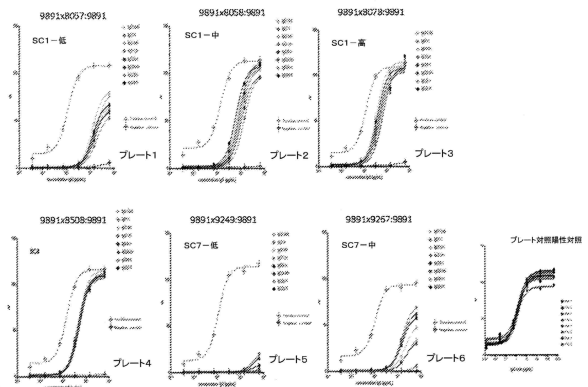
40

50

【図 26】

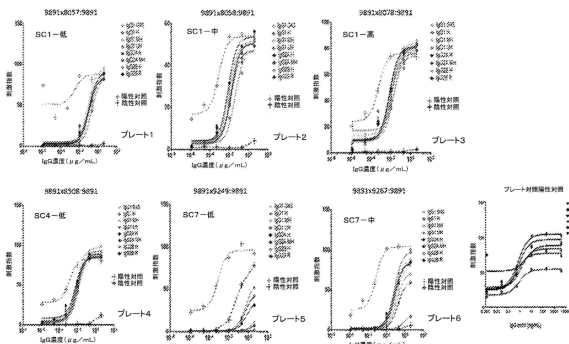


【図 27】



10

【図 28】



20

【配列表】

0007603578000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
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 P	35/00	

(72)発明者 リンダ・ヨハンナ・アレイダ・ヘンドリクス  
オランダ・3 5 8 4・セーエム・ユトレヒト・ヤレラーン・6 2 内

(72)発明者 トン・ルグテンベルグ  
オランダ・3 5 8 4・セーエム・ユトレヒト・ヤレラーン・6 2 内

(72)発明者 ピーテル・フォッコ・ファン・ロー  
オランダ・3 5 8 4・セーエム・ユトレヒト・ヤレラーン・6 2 内

審査官 小田 浩代

## (56)参考文献

特表 2 0 1 5 - 5 3 2 2 7 8 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 1 / 0 8 6 0 9 1 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 4 - 5 2 3 2 0 5 ( J P , A )

Digiammarino E L. et al. , Ligand association rates to the inner-variable-domain of a dual-variable-domain immunoglobulin are significantly impacted by linker design , Mabs , 2011年 , Vol. 3(5) , pp. 487-494

Kontermann R E , Dual targeting strategies with bispecific antibodies , MAb , 2012年 , Vol. 4(2) , pp. 182-197

Klement M. et al. , Effect of linker flexibility and length on the functionality of a cytotoxic engineered antibody fragment , J Biotechnol , 2015年 , Vol. 199 , pp. 90-97

Grummt M. et al. , Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility , EMBO J , 1998年 , Vol. 17(19) , pp. 5536-5542

Zhao L. et al. , A JAK2 interdomain linker relays Epo receptor engagement signals to kinase activation , J Biol Chem , 2009年 , Vol. 284(39) , pp. 26988-26998

Meehan R R. et al. , HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain , EMBO J , 2003年 , Vol. 22(12) , pp. 3164-3174

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d