

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 29 年 4 月 6 日 (2017.4.6)

【公表番号】特表 2016-510755 (P2016-510755A)

【公表日】平成 28 年 4 月 11 日 (2016.4.11)

【年通号数】公開・登録公報 2016-022

【出願番号】特願 2015-561668 (P2015-561668)

【国際特許分類】

C 07K 16/28 (2006.01)

C 12N 15/09 (2006.01)

C 12N 15/00 (2006.01)

C 12N 1/15 (2006.01)

C 12N 1/19 (2006.01)

C 12N 1/21 (2006.01)

C 12N 5/10 (2006.01)

A 61P 35/00 (2006.01)

A 61K 39/395 (2006.01)

A 61K 35/76 (2015.01)

A 61K 48/00 (2006.01)

C 12P 21/08 (2006.01)

【FI】

C 07K 16/28

C 12N 15/00 A

C 12N 15/00 Z N A

C 12N 1/15

C 12N 1/19

C 12N 1/21

C 12N 5/10

A 61P 35/00

A 61K 39/395 T

A 61K 35/76

A 61K 48/00

C 12P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 3 月 2 日 (2017.3.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大きな鎖と F a b 軽鎖の、2 つのポリペプチド鎖を含有するタンデム F c 二重特異性抗体 ( T F c B A ) であって、各鎖は C 末端および N 末端を有し、前記 T F c B A は、F a b 軽鎖および F a b 重鎖を含有する F a b 部分に含有される第一の結合部位を含有し、前記 F a b 重鎖は、前記大きな鎖の N 末端にあり、前記 F a b 部分は、c M E T に特異的に結合し、および、前記 T F c B A はさらに、大きな鎖の C 末端で一本鎖 F v ( s c F V ) 部分に含有される第二の結合部位を含有し、前記 s c F v 部分は、E p C A M に特異的に

結合し、ここで、

(a) 前記 F a b 重鎖および前記 s c F v 部分は、タンデム F c ( T F c ) を介して連結されており；

(b) 前記 T F c は、大きな鎖により含有され、および、T F c リンカーを介して連結され、連続的なポリペプチドを形成する第一の F c 領域および第二の F c 領域を有しており；および、

(c) 第一の F c 領域と第二の F c 領域が結合し F c 二量体を形成しており；ならびに、さらにここで、

(d) 前記 F a b 軽鎖は、配列番号 4 0 0 にある 3 つの軽鎖 C D R を含有するアミノ酸配列を含有し；および、

(e) 前記 F a b 重鎖は、配列番号 4 1 0 にある 3 つの重鎖 C D R を含有するアミノ酸配列を含有する、前記 T F c B A。

【請求項 2】

前記 s c F V 部分が、配列番号 4 7 2 であるアミノ酸配列を含有する、請求項 1 に記載の T F c B A。

【請求項 3】

前記 T F c B A の大きな鎖が、N 末端から C 末端へ、以下の順で含有する、請求項 1 または 2 に記載の T F c B A：

(i) F a b 重鎖可変領域 I g G 1 C H 1 ドメイン；

(i i) I g G 1 上部ヒンジならびに I g G 4 中部および下部ヒンジを含有するハイブリッドヒンジ；

(i i i) T 2 9 9 K 変異を含有する第一の I g G 4 C H 2 ドメイン；

(i v) T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、および Y 4 0 7 V 変異を含有する第一の I g G 1 C H 3 ドメイン；

(v) 第一のジスルフィド架橋モチーフ ( K S C D K T )；

(v i) 任意選択的に、a a 配列 ( G<sub>4</sub> S )<sub>8</sub> を含有するリンカーである、タンデム F c リンカー；

(v i i) I g G 4 中部ヒンジおよび下部ヒンジ；

(v i i i) T 2 9 9 D 変異を含有する第二の I g G 4 C H 2 ドメイン；

(i x) T 3 6 6 W 変異を含有する第二の I g G 1 C H 3 ドメイン；

(x) 第二のジスルフィド架橋モチーフ ( G E C )；

(x i) 連結リンカー；および、

(x i i) s c F v。

【請求項 4】

前記 T F c B A が、約 1 0 e - 8、1 0 e - 9、1 0 e - 1 0、1 0 e - 1 1、1 0 e - 1 2、または 1 0 e - 1 3 M 未満の c M E T に対する結合の K d を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の T F c B A。

【請求項 5】

前記 T F c B A が、3 . 0 x 1 0 e - 8 ~ 2 . 5 x 1 0 e - 9 M の c M E T に対する結合の K d を示す、請求項 4 に記載の T F c B A。

【請求項 6】

前記 T F c B A が、約 1 0 e - 7 もしくは 1 0 e - 8 M、または任意選択的に 1 0 e - 9 M 未満の E p C A M に対する結合の K d を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の T F c B A。

【請求項 7】

前記 T F c B A が、1 0 e - 8 ~ 1 0 e - 1 1 M の c M E T に対する結合の K d を示す、請求項 6 に記載の T F c B A。

【請求項 8】

前記 T F c リンカー配列が、配列番号 1 6 9 のアミノ酸配列を含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の T F c B A。

## 【請求項 9】

前記 T F c が、配列番号 171、配列番号 173、配列番号 175、配列番号 177、配列番号 179、配列番号 181、配列番号 183、配列番号 185、配列番号 187、配列番号 189、配列番号 191、配列番号 193、および、配列番号 195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の T F c B A。

## 【請求項 10】

配列番号 410 であるアミノ酸配列を含有する大きな鎖を含有する T F c B A 分子。

## 【請求項 11】

配列番号 410 の位置 1～118 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3、ならびに、配列番号 400 の位置 1～108 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む、c - M e t 結合部位を有する結合剤。

## 【請求項 12】

配列番号 410 の位置 1～118 のアミノ酸配列に少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに、配列番号 400 の位置 1～108 のアミノ酸に少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、c - M e t 結合部位を有する結合剤。

## 【請求項 13】

配列番号 472 の位置 135～250 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3、ならびに、配列番号 472 の位置 1～113 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む、E p C A M 結合部位を有する結合剤。

## 【請求項 14】

癌治療剤を製造するための、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A または結合剤の使用であって、

前記癌治療剤は治療有効量投与されるものであり、ここで、任意選択的に、前記治療有効量は、100ng / 患者体重 kg ～ 15mg / 患者体重 kg であり、および、さらに任意選択的に、前記治療有効量は、1mg / 患者体重 kg ～ 25mg / 患者体重 kg である、使用。

## 【請求項 15】

前記癌が、結腸直腸癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、胃癌、前立腺癌および膵臓癌から選ばれるいずれかであり、ここで任意選択的に、前記治療有効量は、1mg / 患者体重 kg ～ 10mg / 患者体重 kg である、請求項 14 に記載の使用。

## 【請求項 16】

癌患者における腫瘍増殖の阻害剤を製造するための、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A または結合剤の使用であって、

前記阻害剤は治療有効量投与されるものであり、ここで、任意選択的に、前記治療有効量は、100ng / 患者体重 kg ～ 15mg / 患者体重 kg、1mg / 患者体重 kg ～ 10mg / 患者体重 kg、または、1mg / 患者体重 kg ～ 25mg / 患者体重 kg である、使用。

## 【請求項 17】

癌患者における腫瘍増殖の阻害剤を製造するための、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A または結合剤の使用であって、

前記阻害剤による癌患者における腫瘍増殖の阻害は、腫瘍細胞と、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A の濃縮物または結合剤を含有する液体とを接触させることを含み、前記 T F c B A の濃縮物または結合剤は、前記腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効である、使用。

## 【請求項 18】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A または結合剤、および薬学的担体を

含有する医薬組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、注射、静脈内注射、および／または、点滴に適した滅菌組成物である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記組成物が、薬学的に受容可能な容器にパッケージされている、請求項 18 または 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載タンパク質アミノ酸配列をコードする核酸分子。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の核酸分子を含有するベクター。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の核酸分子を含有するベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 24】

前記宿主細胞は、前記コードされたタンパク質を発現する、請求項 23 に記載の宿主細胞。

【請求項 25】

前記 T F c B A または結合剤が、細胞表面 c - M e t および細胞表面 E P C A M の両方を発現している細胞と接触した際に、接触後に細胞中で測定される総 c - M e t の量が、接触前に同等の細胞で計測された総 c - M e t の量よりも低い、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の T F c B A または結合剤。

【請求項 26】

前記 T F c B A または結合剤が、細胞表面 c - M e t および細胞表面 E P C A M の両方を発現している細胞と接触した際に、細胞中で測定される総 E P C A M の量が、本質的に変化しない、請求項 25 に記載の T F c B A または結合剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

本明細書において、たとえば、タンデム F c 抗体 ( T F c A s ) 等の改変抗体が開示される。例示的な T F c A s は、たとえば、米国仮特許出願 61 / 527, 802 ( 2011 年 8 月 26 日に出願 ) ; および同時係属されている P C T 国際特許出願 P C T / U S 2012 / 052490 ( 2012 年 8 月 27 日に出願。国際特許出願公開 W O 2013 / 033008 A 2 を参照のこと ) に開示されている、タンデム F c 二重特異性抗体 ( T F c B A s ) である。T F c B A は、第一の F c 領域および第二の F c 領域 ( 当該第一の F c 領域および第二の F c 領域の各々は C 末端と N 末端を有する ) を含有するポリペプチド部分であるタンデム F c を含有し ; 第一の F c 領域および第二の F c 領域は、C 末端および N 末端を有する T F c リンカーを介して 1 つのポリペプチド鎖として連結されている ( すなわち、第一の F c 領域の C 末端は、T F c リンカーの N 末端にペプチド結合により連結され、同様に、その T F c リンカーの C 末端は、第二の F c 領域の N 末端にペプチド結合により連結されている ) 。 T F c B A は、少なくとも 2 つの結合部位 ( 少なくとも第一の結合部位と第二の結合部位 ) を含有することができる。そのような結合部位の各々は、細胞表面受容体の特定の部分に特異的に結合する。例示的な細胞表面受容体は、癌細胞により発現、または過剰発現されているものである。例示的な結合部位としては、細胞表面受容体の細胞外ドメインに免疫特異的に結合する抗体由来の結合部位が挙げられる。T F c A もしくは T F c B A の第一の結合部位または第二の結合部位は、E r b B 2、E r b B 3 ( たとえば、米国特許第 7, 846, 440 号に開示されている結合部位 )、E r b B 4、I G F 1 R、I G F 2 R、インスリン受容体、R O N、c - M e t、E G F R、V

EGFR1、VEGFR2、TNFR、FGFR1-4、PDGFR(αおよびβ)、c-Kit、EPCAMおよびEphA2からなる群から選択されるヒト受容体タンパク質に特異的に結合しても良い。通常、受容体は、受容体チロシンキナーゼである。一般的に、そのような結合は、受容体タンパク質の細胞外部分に特異的である。本明細書の有る実施態様において、TFcBAに包含される少なくとも2つの抗原結合部位のうちの1つは、c-Metに特異的な結合部位である(たとえば、抗c-Met Fab、または抗c-Met scFv)。例示的なある実施態様において、TFcBAは、1つの抗c-Met結合部位および、c-Metに結合しない第二の結合部位(たとえば、Erbb2、Erbb3、Erbb4、IGF1R、IGF2R、インスリン受容体、RON、EGFR、VEGFR1、VEGFR2、TNFR、FGFR1-4、PDGFR(αおよびβ)、c-Kit、EPCAMおよびEphA2に特異的な結合部位)を少なくとも1つ含有しており、ここで、当該抗c-Met結合部位および第二の結合部位は、TFcを介して連結され、連続的なポリペプチドを形成している。TFcBAは、1つの受容体または2つの異なる細胞表面受容体上の2つのエピトープ(たとえば、細胞外エピトープ)に結合しており、そのような結合によって、TFcBAが結合する少なくとも1つの細胞表面受容体の同族リガンドにより通常であれば刺激されるシグナル伝達が強く阻害される。たとえば、抗c-Met+抗EGFR TFcBAは、HGF(肝細胞増殖因子、c-Metの同族リガンド)およびEGF(上皮細胞増殖因子、EGFRの同族リガンド)のいずれかまたは両方により誘導されるシグナル伝達を阻害しうる。または、抗c-Kit+抗RON TFcBAは、マクロファージ刺激タンパク質(RONの同族リガンド)および幹細胞因子(c-Kitの同族リガンド)のいずれかまたは両方により誘導されるシグナル伝達を阻害しうる。または、抗c-Met+抗EPCAM TFcBAは、HGFにより誘導されるシグナル伝達を阻害し、もしくは、HGFの非存在下でc-Met受容体によるシグナル伝達を阻害しうる(たとえば、リガンド依存性c-Metシグナル伝達)。各阻害は、10nM以下のIC<sub>50</sub>、もしくは1nM以下のIC<sub>50</sub>、もしくは100pM以下のIC<sub>50</sub>、または、少なくとも70%、もしくは少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の最大阻害割合(TFcBAにより阻害されるシグナル伝達である、リガンド誘導性(または、HGF非存在下のc-Metシグナル伝達の場合には、リガンド非依存性)の受容体(複数含む)のリン酸化の阻害により示される)である。多くの実施態様において、本明細書に開示されるTFcBAを含有する抗c-Metは、c-Metを発現している細胞に対し、本質的に何らの刺激作用も与えない。他の実施態様において、本明細書に開示されるTFcBAを含有する抗c-Metは、c-Metを発現している細胞に対し、c-Met受容体のダウンレギュレートまたは分解を誘導する。他の実施態様において、本明細書の抗EPCAM TFcBAは、低レベルのEPCAM(細胞当たり、わずか100,000±5%のEPCAM分子)、または非常に低レベルのEPCAM(細胞当たり、わずか24,000±5%のEPCAM分子)を発現している細胞に、最も強いシグナル伝達阻害効果(たとえば、60%、70%、80%、90%または95%超)を与える。ある実施態様において、細胞におけるTFcBAの発現により、(i)同じ受容体(複数含む)に結合するが、TFcを含有していない多価抗体の発現と比較し、より多くの(すなわち、より高い割合で)正しく形成されたTFcAB分子が産生されるか、または、(ii)正しく形成されたTFcABが80%を超えて産生される(たとえば、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により測定される)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

たとえば、TFcBA等のTFcAにより含有されるTFcの第一のFc領域および第二のFc領域は、第一および第二のCH3ドメインをそれぞれ含有しても良く、当該CH

3ドメインの各々はC末端とN末端を有している。TFcAにより含有されているTFcの第一のFc領域と第二のFc領域は、それぞれ、第一のCH2ドメインおよび第二のCH2ドメインを含有してもよく、当該CH2ドメインの各々は、C末端とN末端を有している。TFcAにより含有されているTFcの第一のFc領域と第二のFc領域は、それぞれ、第一のヒンジと第二のヒンジを含有しても良く、当該第一のヒンジと第二のヒンジの各々は、C末端とN末端を有している。ある実施態様において、第二のヒンジは、上部ヒンジサブドメインを含有していない。TFcAに含有されているTFcは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有してもよい：第一のヒンジ、第一のCH2ドメイン、第一のCH3ドメイン、TFcリンカー、第二のCH2ドメイン、および第二のCH3ドメイン。TFcAに含有されているTFcは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有してもよい：第一のヒンジ、第一のCH2ドメイン、第一のCH3ドメイン、TFcリンカー、第二のヒンジ、第二のCH2ドメイン、および第二のCH3ドメイン。第一のヒンジは、上部ヒンジサブドメイン、コアヒンジサブドメイン、および下部ヒンジサブドメインを含有しても良く、および、第二のヒンジは、コアヒンジサブドメインおよび下部ヒンジサブドメインを含有しても良いが、上部ヒンジサブドメインは含有しなくても良く、当該ヒンジサブドメインの各々はC末端とN末端を有している。TFcAにより含有されているTFcは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有してもよい：第一のヒンジ（そのC末端は、第一のCH2ドメインのN末端に連結されており、次いで、そのC末端は第一のCH3ドメインのN末端に連結されており、次いで、そのC末端はTFcリンカーのN末端に連結されており、次いで、そのC末端は第二のヒンジのN末端に連結されており、次いで、そのC末端は第二のCH2ドメインのN末端に連結されており、次いで、そのC末端は第二のCH3ドメインのN末端に連結されている）。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

TFcA、たとえばTFcBA、たとえば抗c-Met + 抗EGFR TFcBAまたは抗c-Kit + 抗RON TFcBAまたは抗FGFR2 + 抗EPCAM TFcBAは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有する重鎖を含有しても良い：第一の重鎖可変(VH)ドメイン、TFc、連結リンカー、および第二のVHドメイン。重鎖は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有しても良い：第一のVHドメイン、CH1ドメイン、TFc、連結リンカーおよび第二のVHドメイン。重鎖は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有しても良い：第一のVHドメイン、CH1ドメイン、TFc、連結リンカー、第二のVHドメイン、scFvリンカー、および第二の軽鎖可変(VL)ドメイン。ここで、当該第二のVHおよびVLドメインは、結合し、第二の結合部位を形成している。TFcAは、第一のVHドメインと二量体化し第一の結合部位を形成する第一のVLドメインを含有する軽鎖を含有しても良い。軽鎖は、VLドメインのカルボキシル末端に連結されている軽鎖定常(CL)ドメインを含有しても良い。第一の結合部位は、抗c-Met、抗c-Kit、抗Erbb2、抗Erbb3、抗Erbb4、抗IGF1R、抗IGF2R、抗インスリン受容体、抗RON、抗EGFR、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗TNFR、抗FGFR1、抗FGFR2、抗FGFR3、抗FGFR4、抗PDGFR $\alpha$ 、抗PDGFR $\beta$ 、抗EPCAM、または、抗EphA2の結合部位であっても良く、および、第二の結合部位は、抗c-Met、抗c-Kit、抗Erbb2、抗Erbb3、抗Erbb4、抗IGF1R、抗IGF2R、抗インスリン受容体、抗RON、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗TNFR、抗FGFR1、抗FGFR2、抗FGFR3、抗FGFR4、抗PDGFR $\alpha$ 、抗PDGFR $\beta$ 、抗EphA2、または、抗EGFRの結合部位であっても良い。TFcAが一価のTFcAである場合、結合部位は、抗c-Met、抗c-Kit、抗Erbb2、抗Erbb3、

抗ErbB4、抗IGF1R、抗IGF2R、抗インスリン受容体、抗RON、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗TNFR、抗FGFR1、抗FGFR2、抗FGFR3、抗FGFR4、抗PDGFR $\alpha$ 、抗PDGFR $\beta$ 、抗EPCAM、抗EphA2、または、抗EGFRの結合部位であっても良い。例示的な抗c-Met結合部位としては、a)配列番号223または287のVH相補性決定領域(CDR)3(VHCDR3)のaa配列、および、b)配列番号231または289のVLCDR3のaa配列を含有するVLCDR3、のいずれか、または両方を含有するVHドメインを含有するものが挙げられる。他の例示的な抗c-Met結合部位としては、VHCDR1、VCDR2およびVHCDR3を含有する3つのVHCDRのセットを含有するVHドメイン(ここで、VHCDR1、VHCDR2、および、VHCDR3は、配列番号223または231のVHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3のaa配列を含有する)；ならびに、VLCDR1、VLCDR2、および、VLCDR3を含有する3つのVLCDRのセットを含有するVLドメイン(ここで、VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3は、それぞれ、配列番号287または289のVLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3のaa配列を含有する)、を含有するものが挙げられる。例示的な抗EGFR結合部位としては、a)配列番号233、237、258、275、277、または279のVHCDR3のaa配列を含有するVHCDR3、および、b)配列番号233、237、258、275、277、または279のVLCDR3のaa配列を含有するVLCDR3、のいずれか、または両方を含有するものが挙げられる。例示的な抗EGFR結合部位としては、VHCDR1、VCDR2およびVHCDR3を含有する3つのVHCDRのセットを含有するVHドメイン(ここで、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3は、配列番号233、237、258、275、277または279のVHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3のaa配列を含有する)；ならびに、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含有する3つのVLCDRのセットを含有するVLドメイン(ここで、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3は、配列番号233、237、258、275、277、または279のVLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3のaa配列を含有する)、を含有するものが挙げられる。抗c-Met、抗c-Kit、抗ErbB2、抗ErbB3、抗ErbB4、抗IGF1R、抗IGF2R、抗インスリン受容体、抗RON、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗TNFR、抗FGFR1、抗FGFR2、抗FGFR3、抗FGFR4、抗PDGFR $\alpha$ 、抗PDGFR $\beta$ 、抗EPCAM、抗EphA2、または、抗EGFRの結合部位は、重鎖のN末端部分および軽鎖のN末端部分を含有しても良い。抗EGFR、抗c-Kit、抗ErbB2、抗ErbB3、抗ErbB4、抗IGF1R、抗IGF2R、抗インスリン受容体、抗RON、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗TNFR、抗FGFR1、抗FGFR2、抗FGFR3、抗FGFR4、抗PDGFR $\alpha$ 、抗PDGFR $\beta$ 、抗EPCAM、抗EphA2、または抗c-Met結合部位は、重鎖により全体的に包含され、連続的なポリペプチドを形成するC末端scFvにより包含されても良い。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

また、癌を有する対象を治療する方法が開示され、当該方法には、TFcAもしくはTFcBA、核酸分子、またはベクターの治療有効量を対象に投与することが含まれる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 0 0 3 1 】

10．当該第一のヒンジが、上部ヒンジサブドメイン、コアヒンジサブドメイン、および下部ヒンジサブドメインを含有し、ならびに、第二のヒンジが、コアヒンジサブドメインおよび下部ヒンジサブドメインを含有するが、上部ヒンジドメインは含有せず、当該各ヒンジサブドメインはC末端およびN末端を有している、実施態様9のTFcBA。

11．当該TFcBAに含有されているTFcが、アミノ末端からカルボキシ末端へ、以下の順で含有する、実施態様1～10のいずれか1つのTFcBA：第一のヒンジがあり、そのC末端で第一のCH2ドメインのN末端に連結され、次いで、そのC末端で第一のCH3ドメインのN末端に連結され、次いで、そのC末端でTFcリンカーのN末端に連結され、次いで、そのC末端で第二のヒンジのN末端に連結され、次いで、そのC末端で第二のCH2ドメインのN末端に連結され、次いで、そのC末端で第二のCH3ドメインのN末端に連結される。

12．当該TFcリンカーが20～50aaを含有する、実施態様1～11のいずれか1つのTFcBA。

13．当該TFcリンカーが、Gly-Serリンカーである、実施態様12のTFcBA。

14．当該TFcリンカーが、 $(Gly_4Ser)_n$ を含有し、ここで、nは、4、5、6、7または8である、実施態様13のTFcBA。

## 【 手 続 補 正 7 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 3 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

## 【 0 0 3 4 】

26．当該Dis修飾は、Disモジュール1またはDisモジュール2により含有される、実施態様23～25のいずれか1つのTFcBA。

27．当該第一のCH3ドメインおよび第二のCH3ドメインの各々が、1以上のAEMおよび1以上のDis修飾を含有する、実施態様1～26のいずれか1つのTFcBA。

28．当該第一のCH3ドメインおよび第二のCH3ドメインのいずれか、または両方が、配列番号27～98からなる群から選択されるaa配列に少なくとも70%同一であるか、または、最大で30aaの付加、欠失または置換という点でそれらから異なっているaa配列を含有する、実施態様1～27のいずれか1つのTFcBA。

29．当該第一のCH3ドメインまたは第二のCH3ドメインが、配列番号27～98からなる群から選択されるaa配列を含有する、実施態様28のTFcBA。

30．当該第一のCH3ドメインおよび第二のCH3ドメインが共に、2つの異なるメンバーの対を含有し、各メンバーは、CH3のaa配列であり、各対は、配列番号31および35、配列番号33および37、配列番号39および43、配列番号41および45、配列番号47および51、配列番号49および53、配列番号55および59、配列番号57および61、配列番号63および67、配列番号65および69、配列番号71および73、配列番号72および74、配列番号75および79、配列番号77および81、配列番号83および85、配列番号84および86、配列番号87および89、配列番号88および90、配列番号91および93、配列番号92および94、配列番号95および97、ならびに配列番号96および98からなる対の群から選択され、各メンバーのaa配列は、各当該対の各配列と少なくとも70%同一であるか、または、最大で30のaa付加、欠失または置換という点で各当該対の各配列から異なっており、ここで、当該第一のCH3ドメインは、第二のCH3ドメインにより含有される対とは異なるメンバーを含有する、実施態様1～28のいずれか1つのTFcBA。

## 【 手 続 補 正 8 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【補正対象項目名】 0 0 5 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 5 1 】

8 6 . 当該第一の C H 3 ドメインおよび第二の C H 3 ドメインのいずれか、または両方が、配列番号 2 7 ~ 9 8 からなる群から選択される a a 配列に少なくとも 7 0 % 同一である a a 配列か、または、最大で 3 0 a a の付加、欠失または置換という点でそれらから異なっている a a 配列を含有する、実施態様 1 ~ 8 5 のいずれか 1 つの T F c B A 。

8 7 . 当該第一の C H 3 ドメインまたは第二の C H 3 ドメインが、配列番号 2 7 ~ 9 8 からなる群から選択される a a 配列を含有する、実施態様 2 8 の T F c B A 。

8 8 . 当該第一の C H 3 ドメインおよび第二の C H 3 ドメインが共に、2 つの異なるメンバーの対を含有し、各メンバーは、C H 3 の a a 配列であり、各対は、配列番号 3 1 および 3 5、配列番号 3 3 および 3 7、配列番号 3 9 および 4 3、配列番号 4 1 および 4 5、配列番号 4 7 および 5 1、配列番号 4 9 および 5 3、配列番号 5 5 および 5 9、配列番号 5 7 および 6 1、配列番号 6 3 および 6 7、配列番号 6 5 および 6 9、配列番号 7 1 および 7 3、配列番号 7 2 および 7 4、配列番号 7 5 および 7 9、配列番号 7 7 および 8 1、配列番号 8 3 および 8 5、配列番号 8 4 および 8 6、配列番号 8 7 および 8 9、配列番号 8 8 および 9 0、配列番号 9 1 および 9 3、配列番号 9 2 および 9 4、配列番号 9 5 および 9 7、ならびに配列番号 9 6 および 9 8 からなる対の群から選択され、各メンバーの a a 配列は、各当該対の各配列と少なくとも 7 0 % 同一であるか、または、最大で 3 0 の a a 付加、欠失または置換という点で各当該対の各配列から異なっており、ここで、当該第一の C H 3 ドメインは、第二の C H 3 ドメインにより含有されるものとは異なる対のメンバーを含有する、実施態様 1 ~ 8 6 のいずれか 1 つの T F c B A 。

【 手 続 補 正 9 】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 6 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 6 1 】

1 1 1 . 当該電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A は、2 9 7 位の電荷相補対および 2 9 9 位の電荷相補対の両方を含有し、ここで、2 9 7 位の電荷相補対の当該第一および第二のアミノ酸残基は、2 9 9 位の電荷相補対の当該第一および第二のアミノ酸残基と同一、または異なっている、実施態様 1 1 0 の電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A 。

1 1 2 . 当該電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A は、2 9 7 位の電荷相補対を含有し、および、ここで、当該電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A は、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A ではない T F c A または T F c B A よりも安定であるが、第一および第二のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基は両方とも、同じ荷電アミノ酸からなる残基であることを除き、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A と同一であり、当該同じ荷電アミノ酸は、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A の 2 9 7 位の電荷相補対のアミノ酸のうちの 1 つである、実施態様 1 1 0 または 1 1 1 の電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A 。

1 1 3 . 当該電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A は、2 9 9 位の電荷相補対を含有し、および、ここで、当該電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A は、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A ではない T F c A または T F c B A よりも安定であるが、第一および第二のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基は両方とも、同じ荷電アミノ酸からなる残基であることを除き、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A と同一であり、当該同じ荷電アミノ酸は、電荷相補的に対形成された T F c A または T F c B A の 2 9 9 位の電荷相補対のアミノ酸のうちの 1 つである、実施態様 1 1 0、1 1 1 または 1 1 2 の電荷相補的に対形成された T F c A または T F

c B A。

1 1 4 . 当該第一または第二の結合部位は、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4、I G F 1 R、I G F 2 R、インスリン受容体、R o n、c - M e t、E G F R、V E G F R 1、V E G F R 2、T N F R、F G F R 1 F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、P D G F R  $\alpha$ 、P D G F R  $\beta$ 、c - K i t、E P C A MおよびE p h A 2 からなる群から選択されるヒトタンパク質に特異的に結合する、実施態様 5 9 ~ 1 1 3 のいずれか 1 つの T F c A または T F c B A。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 1】

また、C H 2 ドメインは、例えば、a a 欠失、付加、または置換のような 1 以上の a a 修飾において、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 のそれと異なる a a 配列を含むこととしてもよい。所定の実施形態では、C H 2 ドメインは、天然由来の（または野生型）C H 2 ドメイン（例えば、配列番号 2 6 1 および 2 6 2）または多くて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、2 5、または 3 0 a a において配列番号 2 5 または 2 6 のそれとは異なる a a 配列を含む。所定の実施形態では、C H 2 ドメインは、天然由来の C H 2 ドメイン（例えば、配列番号 2 6 1 および 2 6 2）のそれまたは配列番号 2 5 もしくは 2 6 と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一性または類似である a a 配列を含む。代表的な変更は、a a 2 9 7 でのグリコシル化を低減または除去するための他の変更を含む。概して、変更は、哺乳類の細胞において発現される場合に、変異体を実質的にアグリコシル化されるように、E U 位置 2 9 7 ~ 2 9 9（a a モチーフ N X T）のいずれかにおけるアミノ酸置換を含むこととしてもよい。T 2 9 9 K に加えて、a a 2 9 7 でグリコシル化を低減するために a a 2 9 9 でなされる他の置換は、例えば、W O / 2 0 0 5 / 0 1 8 5 7 2 に記載されるように、T 2 9 9 S、T 2 9 9 A、T 2 9 9 N、T 2 9 9 G、T 2 9 9 Y、T 2 9 9 C、T 2 9 9 H、T 2 9 9 E、T 2 9 9 D、T 2 9 9 R、T 2 9 9 G、T 2 9 9 I、T 2 9 9 L、T 2 9 9 M、T 2 9 9 F、T 2 9 9 P、T 2 9 9 W、および T 2 9 9 V を含む。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 4】

T F c A において使用される F c 領域は、また、例えば、a a 欠失、付加、または置換のような 1 以上の a a 修飾における、例えば、配列番号 9 9 ~ 1 6 6 のような本明細書に記載されるものとは異なる a a 配列を含むこととしてもよい。所定の実施形態では、F c 領域は、多くて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、または 5 0 a a において、例えば、配列番号 9 9 ~ 1 6 6 からなる群から選択される配列のような、本明細書で述べられる配列とは異なる a a 配列を含む。所定の実施形態では、F c 領域は、例えば、配列番号 9 9 ~ 1 6 6 からなる群から選択される配列のような、本明細書で述べられる配列のそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一である a a 配列を含む。例えば、配列番号 9 9 ~ 1 6 6 からなる群から選択される a a 配列からなる F c 領域の C H 3 ドメインは、C 末端リジンおよび / または E 3 5 6 D および / または M 3 5 8 L の欠失を含むこととしてもよい。例えば、A D C C および C D C のような、いくつかの抗体エフェクタ機能は、F c 領域により媒介され、F c 領域をなし得る a a 変化は、F c 領域の

エフェクタ機能（複数を含む）に影響を及ぼす変化を含む。これらのドメインに対する代表的な突然変異が本明細書で述べられる。これらの a a 修飾のいくつかは、F c 領域が、例えば、生物学的活性、安定性、および低免疫原性のような所望の特性を保持することを提供することを可能にする。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 0 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 0 9】

いくつかの実施形態において、T F c A は、例えば、野生型 F c 領域と比較してポリペプチドの抗原依存性エフェクタ機能、特に A D C C または補体活性を変化させる a a 変化を含む F c 変異体を含む。代表的な実施形態では、前記抗体は、F c ガンマレセプター（例えば、C D 1 6）に対する変化した結合を示す。このような抗体は、野生型ポリペプチドと比較した場合に、F c γ R n に対する増加したまたは減少した結合を示し、よって、増強されたまたは低減されたエフェクタ機能をそれぞれ媒介する。F c γ R についての改善された親和性を有する F c 変異体は、エフェクタ機能を増強することが予想され、このようなタンパク質が、例えば、腫瘍治療のような、標的分子の破壊が所望される哺乳類を治療する方法における有用なアプリケーションを有することとしてもよい。これに対して、減少した F c γ R 結合親和性を有する F c 変異体は、エフェクタ機能を低減することが期待される。一実施形態では、T F c A が、野生型 F c 領域を含む T F c A と比較して、最適化、食作用、補体依存性細胞障害、抗原依存性細胞傷害活性 (A D C C)、またはエフェクタ細胞調整からなる群から選択される、少なくとも 1 つの変更された抗原依存性エフェクタ機能を含む。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 5 8】

所定の実施形態では、T F c A 組成物は、1 以上の、以下の特徴、1) 少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、またはそれより多いタンパク質が、タンパク質での精製後の S D S - P A G E で目に見える、2) S D S - P A G E ゲルで観察される種の少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、またはそれより多くが正しい分子量である、3) 示差走査蛍光測定により測定される熱安定性プロファイルが溶解した球状の挙動を示さない、4) S E C により可視化される 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、もしくは 9 9 %、またはそれより多い単量体を含まない、および 5) p E G F R 抑制により測定される外因性の E G F リガンドの付加により活性化された E G F レセプターシグナルの 9 5 % より多くを阻害する、を含む。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 8 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 8 6】

異なる核酸（配列番号 2 9 2、2 9 4、2 9 6、2 9 8、3 0 0、3 0 2、3 0 4、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、または、3 2 8 を有する）を、F r e e s t y l e 2 9 3 F 細胞 (I n v i t r o g e n) へと一過性にトランスフェクトし、原則的に以下の通りに、ワンステップのプロテイン A 精製を用いて精製した。タンパク質をコードする核酸を、1 つのタンパク質として、標準的な組換え D N A 技術を用いて発現プラスミ

ドへとクローニングした。用いた発現プラスミドは、pCEP4 (Invitrogen) である。発現プラスミドを、ポリエチレンジオキサン(2.5 µg/ml 培養物)およびDNA (1 µg/ml 細胞培養物)を用いてトランスフェクトする。トランスフェクトした細胞を、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で6日間インキュベートして回収した。すべてのタンパク質を、メーカーの説明書に従いプロテインAアフィニティプロトコルを用いて精製した。プロテインAアフィニティ工程を用いて、回収した細胞培養液(HCCF)から融合タンパク質を選択的に、効率的に結合させた。これにより、95 %を超える不純物を一回の工程で除去し、高い収率と高いスループットを得ることができる。この工程の後、融合タンパク質として所望される分子形態の分画は、60 ~ 98 パーセントの範囲にあった。GEのMABSELECTを、プロテインAアフィニティ樹脂として用いる。精製した物質を濃縮し、PBSへと透析した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0309

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0309】

一過性のトランスフェクション：核酸を、Freestyle293F細胞(Invitrogen)へと一過性にトランスフェクトし、原則的に以下の通りに、ワンステップのプロテインA精製を用いて精製する。タンパク質をコードする核酸を、1つのタンパク質として、標準的な組換えDNA技術を用いて発現プラスミドへとクローニングする。用いた例示的な発現プラスミドは、pCEP4 (Life Technologies cat # R790-07) である。発現プラスミドを、ポリエチレンジオキサン(2.5 µg/ml 培養物)およびDNA (1 µg/ml 細胞培養物)を用いてトランスフェクトする。トランスフェクトした細胞を、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で6日間インキュベートして回収する。すべてのタンパク質を、メーカーの説明書に従いプロテインAアフィニティプロトコルを用いて精製する。プロテインAアフィニティ工程を用いて、培養した細胞培養液(HCCF)から融合タンパク質を選択的に、効率的に結合させた。これにより、95 %を超える不純物を一回の工程で除去し、高い収率と高いスループットを得ることができる。GEのMABSELECTを、プロテインAアフィニティ樹脂として用いる。精製した物質を濃縮し、PBSへと透析する。