

【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28年4月7日(2016.4.7)

【公開番号】特開2015-227386(P2015-227386A)

【公開日】平成27年12月17日(2015.12.17)

【年通号数】公開・登録公報2015-079

【出願番号】特願2015-187704(P2015-187704)

【国際特許分類】

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 1/22 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 16/18 Z N A

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 1/22

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月22日(2016.2.22)

【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】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a．N末端からC末端に向かって、第1のエピトープに選択的に結合する第1のヒトエピトープ結合領域と、第1のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第1のCH3領域がプロテインAに結合する、第1のポリペプチド；ならびに

b．N末端からC末端に向かって、第2のエピトープに選択的に結合する第2のヒトエピトープ結合領域と、第2のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、第2のポリペプチド；を含み、ここで、前記第2のCH3領域は、プロテインAへの前記第2のCH3領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 2】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG1重鎖である、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG2重鎖である、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG4重鎖である、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

前記改変が、I M G Tエキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 Rもしくは (b) 9 5 Rおよび9 6 F、またはE Uナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 Rもしくは (b ') 4 3 5 Rおよび4 3 6 Fである、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 6】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのインビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a . 第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する工程であって、ここで；

前記第 1 の核酸配列が、第 1 のエピトープを認識する第 1 の可変ドメインを含む第 1 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 1 の免疫グロブリン重鎖は、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 1 の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第 1 の C H 3 領域はプロテイン A に結合し；

前記第 2 の核酸配列が、第 2 のエピトープを認識する第 2 の可変ドメインを含む第 2 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 2 の免疫グロブリン重鎖は、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 2 の定常ドメインを含み、そしてここで前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み；

前記第 3 の核酸配列が、前記第 1 の免疫グロブリン重鎖および前記第 2 の免疫グロブリン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b . 前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c . 前記二重特異性抗体がプロテイン A に結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体を単離する工程
を包含する、方法。

【請求項 7】

前記改変が、I M G Tエキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 Rもしくは (b) 9 5 Rおよび9 6 F、またはE Uナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 Rもしくは (b ') 4 3 5 Rおよび4 3 6 Fである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記二重特異性抗体が、プロテイン A を備える固体支持体で単離される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記固体支持体が、プロテイン A アフィニティークラムを含み、前記二重特異性抗体が、p H 勾配を使用して単離される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変された C H 3 領域を有する、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、プロテイン A に結合する第 1 の C H 3 領域およびプロテイン A への第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第 2 の C H 3 領域を含み、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記二重特異性抗体は、プロテイン A に対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離される、方法。

【請求項 13】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒトIgG1であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第2のCH3領域に含む改変されたヒトIgG1であり、前記改変が、IMGTエキソナンバリングシステムにおける(a)H95Rもしくは(b)H95RおよびY96F、またはEUNナンバリングシステムにおける(a')H435Rもしくは(b')H435RおよびY436Fである、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記破壊された細胞がCHO細胞である、請求項12または13に記載の方法。

【請求項 15】

プロテインA結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a．N末端からC末端に向かって、第1のエピトープに選択的に結合する第1のヒトエピトープ結合領域と、第1のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第1のCH3領域がプロテインAに結合する、第1のポリペプチド；ならびに

b．N末端からC末端に向かって、第2のエピトープに選択的に結合する第2のヒトエピトープ結合領域と、第2のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、第2のポリペプチド；を含み、ここで、

前記第2のCH3領域は、プロテインAへの前記第2のCH3領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 16】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG1重鎖である、請求項15に記載の二重特異性抗体。

【請求項 17】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG2重鎖である、請求項15に記載の二重特異性抗体。

【請求項 18】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが各々、ヒトIgG4重鎖である、請求項15に記載の二重特異性抗体。

【請求項 19】

前記改変が、IMGTエキソナンバリングシステムにおける(a)95Rもしくは(b)95Rおよび96F、またはEUNナンバリングシステムにおける(a')435Rもしくは(b')435Rおよび436Fである、請求項15に記載の二重特異性抗体。

【請求項 20】

プロテインA結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのインビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a．第1の核酸配列、第2の核酸配列および第3の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する工程であって、ここで；

前記第1の核酸配列が、第1のエピトープを認識する第1の可変ドメインを含む第1のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第1の免疫グロブリン重鎖は、第1のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される第1の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第1のCH3領域はプロテインAに結合し；

前記第2の核酸配列が、第2のエピトープを認識する第2の可変ドメインを含む第2のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第2の免疫グロブリン重鎖は、第2のCH3領域を含む、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される第2の定常ドメインを含み、そしてここで前記第2のCH3領域は、プロテインAへの前記第2のCH3領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み；

前記第3の核酸配列が、前記第1の免疫グロブリン重鎖および前記第2の免疫グロブ

リン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b．前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c．前記二重特異性抗体がプロテインAに結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体を単離する工程
を包含し、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、方法。

【請求項 2 1】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記二重特異性抗体が、プロテインAを備える固体支持体で単離される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記固体支持体が、プロテインAアフィニティーカラムを含み、前記二重特異性抗体が、p H 勾配を使用して単離される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 2 0 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

プロテインA結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変された C H 3 領域を有する、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、プロテインAに結合する第 1 の C H 3 領域およびプロテインAへの第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第 2 の C H 3 領域を含み、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記二重特異性抗体は、プロテインAに対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離され、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、方法。

【請求項 2 7】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒト I g G 1 であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第 2 の C H 3 領域に含む改変されたヒト I g G 1 であり、前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) H 9 5 R もしくは (b) H 9 5 R および Y 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') H 4 3 5 R もしくは (b ') H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記破壊された細胞が C H O 細胞である、請求項 2 6 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

プロテインA結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a．N末端からC末端に向かって、第 1 のエピトープに選択的に結合する第 1 のヒトエピトープ結合領域と、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第 1 の C H 3 領域がプロテインAに結合する、第 1 のポリペプチド；ならびに

b．N末端からC末端に向かって、第 2 のエピトープに選択的に結合する第 2 のヒトエピトープ結合領域と、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G

4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含む、第 2 のポリペプチド；
を含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結
合を減少させるかまたは排除する改変を含み、ここで、前記改変は、前記抗体の血清半減
期を変更しない、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 3 0】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 1 重鎖であ
る、請求項 2 9 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 1】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 2 重鎖であ
る、請求項 2 9 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 2】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 4 重鎖であ
る、請求項 2 9 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 3】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (
b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R も
しくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 2 9 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 4】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのイ
ンビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a . 第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する
工程であって、ここで；

前記第 1 の核酸配列が、第 1 のエピトープを認識する第 1 の可変ドメインを含む第 1
のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 1 の免疫グロブリン
重鎖は、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域
から選択される第 1 の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第 1 の C H 3 領域はプロ
テイン A に結合し；

前記第 2 の核酸配列が、第 2 のエピトープを認識する第 2 の可変ドメインを含む第 2
のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 2 の免疫グロブリン
重鎖は、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域
から選択される第 2 の定常ドメインを含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテ
イン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、そして
ここで前記改変は、前記抗体の血清半減期を変更せず；

前記第 3 の核酸配列が、前記第 1 の免疫グロブリン重鎖および前記第 2 の免疫グロブ
リン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b . 前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c . 前記二重特異性抗体がプロテイン A に結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体
を単離する工程
を包含する、方法。

【請求項 3 5】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (
b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R も
しくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記二重特異性抗体が、プロテイン A を備える固体支持体で単離される、請求項 3 4 に
記載の方法。

【請求項 3 7】

前記固体支持体が、プロテイン A アフィニティーカラムを含み、前記二重特異性抗体が
、p H 勾配を使用して単離される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 34 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変された C H 3 領域を有する、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、プロテイン A に結合する第 1 の C H 3 領域およびプロテイン A への第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第 2 の C H 3 領域を含み、ここで、前記改変は、前記抗体の血清半減期を変更せず、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記二重特異性抗体は、プロテイン A に対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離される、方法。

【請求項 41】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒト I g G 1 であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第 2 の C H 3 領域に含む改変されたヒト I g G 1 であり、前記改変が、I M G T エキソナンバリングシステムにおける (a) H 9 5 R もしくは (b) H 9 5 R および Y 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') H 4 3 5 R もしくは (b ') H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記破壊された細胞が C H O 細胞である、請求項 40 または 41 に記載の方法。

【請求項 43】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a . N 末端から C 末端に向かって、第 1 のエピトープに選択的に結合する第 1 のヒトエピトープ結合領域と、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第 1 の C H 3 領域がプロテイン A に結合する、第 1 のポリペプチド；ならびに

b . N 末端から C 末端に向かって、第 2 のエピトープに選択的に結合する第 2 のヒトエピトープ結合領域と、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、第 2 のポリペプチド；を含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、ここで、前記改変は、前記抗体の血清半減期を変更せず、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 44】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 1 重鎖である、請求項 43 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 45】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 2 重鎖である、請求項 43 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 46】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 4 重鎖である、請求項 43 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 47】

前記改変が、I M G T エキソナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R も

しくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 4 3 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4 8】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのインビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a . 第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する工程であって、ここで；

前記第 1 の核酸配列が、第 1 のエピトープを認識する第 1 の可変ドメインを含む第 1 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 1 の免疫グロブリン重鎖は、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 1 の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第 1 の C H 3 領域はプロテイン A に結合し；

前記第 2 の核酸配列が、第 2 のエピトープを認識する第 2 の可変ドメインを含む第 2 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 2 の免疫グロブリン重鎖は、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 2 の定常ドメインを含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、そしてここで前記改変は、前記抗体の血清半減期を変更せず；

前記第 3 の核酸配列が、前記第 1 の免疫グロブリン重鎖および前記第 2 の免疫グロブリン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b . 前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c . 前記二重特異性抗体がプロテイン A に結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体を単離する工程
を包含し、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、方法。

【請求項 4 9】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記二重特異性抗体が、プロテイン A を備える固体支持体で単離される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記固体支持体が、プロテイン A アフィニティーカラムを含み、前記二重特異性抗体が、p H 勾配を使用して単離される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 4 8 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変された C H 3 領域を有する、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、プロテイン A に結合する第 1 の C H 3 領域およびプロテイン A への第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第 2 の C H 3 領域を含み、ここで、前記改変は、前記抗体の血清半減期を変更せず、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記

二重特異性抗体は、プロテイン A に対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離され、

前記抗体は、ヒトにおいて免疫原性でない、方法。

【請求項 55】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒト I g G 1 であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第 2 の C H 3 領域に含む改変されたヒト I g G 1 であり、前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) H 9 5 R もしくは (b) H 9 5 R および Y 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') H 4 3 5 R もしくは (b ') H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記破壊された細胞が C H O 細胞である、請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 57】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a . N 末端から C 末端に向かって、第 1 のエピトープに選択的に結合する第 1 のヒトエピトープ結合領域と、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第 1 の C H 3 領域がプロテイン A に結合する、第 1 のポリペプチド；ならびに

b . N 末端から C 末端に向かって、第 2 のエピトープに選択的に結合する第 2 のヒトエピトープ結合領域と、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、第 2 のポリペプチド；を含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、

前記抗体における 2 つの軽鎖は同一である、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 58】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 1 重鎖である、請求項 57 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 59】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 2 重鎖である、請求項 57 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 60】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 4 重鎖である、請求項 57 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 61】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 57 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 62】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのインビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a . 第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する工程であって、ここで；

前記第 1 の核酸配列が、第 1 のエピトープを認識する第 1 の可変ドメインを含む第 1 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 1 の免疫グロブリン重鎖は、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 1 の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第 1 の C H 3 領域はプロテイン A に結合し；

前記第 2 の核酸配列が、第 2 のエピトープを認識する第 2 の可変ドメインを含む第 2 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 2 の免疫グロブリン重鎖は、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 2 の定常ドメインを含み、そしてここで前記第 2 の C H 3 領域は、プロ

テイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み；

前記第 3 の核酸配列が、前記第 1 の免疫グロブリン重鎖および前記第 2 の免疫グロブリン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b．前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c．前記二重特異性抗体がプロテイン A に結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体を単離する工程

を包含し、

前記抗体における 2 つの軽鎖は同じである、方法。

【請求項 6 3】

前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記二重特異性抗体が、プロテイン A を備える固体支持体で単離される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記固体支持体が、プロテイン A アフィニティーカラムを含み、前記二重特異性抗体が、p H 勾配を使用して単離される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 6 2 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変された C H 3 領域を有する、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、プロテイン A に結合する第 1 の C H 3 領域およびプロテイン A への第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第 2 の C H 3 領域を含み、ここで、前記識別的に改変された C H 3 領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記二重特異性抗体は、プロテイン A に対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離され、前記抗体における 2 つの軽鎖は同じである、方法。

【請求項 6 9】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒト I g G 1 であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第 2 の C H 3 領域に含む改変されたヒト I g G 1 であり、前記改変が、I M G T エキソンナンバリングシステムにおける (a) H 9 5 R もしくは (b) H 9 5 R および Y 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') H 4 3 5 R もしくは (b ') H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記破壊された細胞が C H O 細胞である、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体であって、以下：

a．N 末端から C 末端に向かって、第 1 のエピトープに選択的に結合する第 1 のヒトエピトープ結合領域と、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含み、ここで前記第 1 の C H 3 領域がプロテイン A に結合する、第 1 のポリペプチド；ならびに

b . N 末端から C 末端に向かって、第 2 のエピトープに選択的に結合する第 2 のヒトエピトープ結合領域と、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域とを含む、第 2 のポリペプチド；
を含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、ここで、前記改変は、I M G T エキソナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F である、ヒト二重特異性抗体。

【請求項 7 2】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 1 重鎖である、請求項 7 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7 3】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 2 重鎖である、請求項 7 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7 4】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが各々、ヒト I g G 4 重鎖である、請求項 7 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7 5】

プロテイン A 結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を作製するためのインビトロの方法であって、前記方法は、以下：

a . 第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を哺乳動物細胞に導入する工程であって、ここで；

前記第 1 の核酸配列が、第 1 のエピトープを認識する第 1 の可変ドメインを含む第 1 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 1 の免疫グロブリン重鎖は、第 1 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 1 の定常ドメインを含み、そしてここで、前記第 1 の C H 3 領域はプロテイン A に結合し；

前記第 2 の核酸配列が、第 2 のエピトープを認識する第 2 の可変ドメインを含む第 2 のヒト免疫グロブリン重鎖をコードし、ここで、前記コードされる第 2 の免疫グロブリン重鎖は、第 2 の C H 3 領域を含む、ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の定常領域から選択される第 2 の定常ドメインを含み、ここで、前記第 2 の C H 3 領域は、プロテイン A への前記第 2 の C H 3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含み、そしてここで前記改変は、I M G T エキソナンバリングシステムにおける (a) 9 5 R もしくは (b) 9 5 R および 9 6 F、または E U ナンバリングシステムにおける (a ') 4 3 5 R もしくは (b ') 4 3 5 R および 4 3 6 F であり；

前記第 3 の核酸配列が、前記第 1 の免疫グロブリン重鎖および前記第 2 の免疫グロブリン重鎖と対形成する免疫グロブリン軽鎖をコードする、工程；

b . 前記細胞に二重特異性抗体を発現させる工程；ならびに

c . 前記二重特異性抗体がプロテイン A に結合する能力に基づいて前記二重特異性抗体を単離する工程
を包含する、方法。

【請求項 7 6】

前記二重特異性抗体が、プロテイン A を備える固体支持体で単離される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記固体支持体が、プロテイン A アフィニティーカラムを含み、前記二重特異性抗体が、p H 勾配を使用して単離される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 p H 勾配が、p H 3 と p H 5 との間の 1 またはそれより多い p H 段階を含む段階勾配である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 79】

前記哺乳動物細胞がCHO細胞である、請求項75～78のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 80】

プロテインA結合に関してヘテロ二量体であるヒト二重特異性抗体を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗体の混合物から、識別的に改変されたCH3領域を有する、ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4の定常領域から選択される重鎖定常領域を含むヒト二重特異性抗体を単離する工程を包含し、ここで、前記識別的に改変されたCH3領域は、プロテインAに結合する第1のCH3領域およびプロテインAへの第2のCH3領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む第2のCH3領域を含み、ここで、前記改変は、IMGTエキソナンバリングシステムにおける(a)95Rもしくは(b)95Rおよび96F、またはEUNナンバリングシステムにおける(a')435Rもしくは(b')435Rおよび436Fであり、

前記識別的に改変されたCH3領域は、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でなく、そしてここで、前記二重特異性抗体は、プロテインAに対するその親和性に基づいて、前記破壊された細胞または前記混合物から単離される、方法。

【請求項 81】

前記重鎖定常領域の一方のモノマーが、ヒトIgG1であり、前記重鎖定常領域の他方のモノマーが、改変を前記第2のCH3領域に含む改変されたヒトIgG1であり、前記改変が、IMGTエキソナンバリングシステムにおける(a)H95Rもしくは(b)H95RおよびY96F、またはEUNナンバリングシステムにおける(a')H435Rもしくは(b')H435RおよびY436Fである、請求項80に記載の方法。

【請求項 82】

前記破壊された細胞がCHO細胞である、請求項80または81に記載の方法。

【請求項 83】

二重特異性抗原結合タンパク質を単離するための方法であって、前記方法は、以下：

イオン調節物質の存在下で、破壊された細胞または抗原結合タンパク質の混合物と、プロテインA親和性支持体とを接触させる工程；および

pH勾配によって二重特異性抗原結合タンパク質を溶出する工程；

を包含し、ここで、

前記二重特異性抗原結合タンパク質は、各々プロテインAに対して異なる親和性を有する第1のIgG CH3ドメインおよび第2のIgG CH3ドメインを含むヘテロ二量体IgG CH3領域を含む、方法。

【請求項 84】

前記イオン調節物質が、以下：

(a)酢酸のベリリウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩もしくはカリウム塩；重炭酸ナトリウムもしくは重炭酸カリウム；炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムもしくは炭酸セシウム；塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化セシウムもしくは塩化マグネシウム；フッ化ナトリウムもしくはフッ化カリウム；硝酸ナトリウム、硝酸カリウムもしくは硝酸カルシウム；リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウム；または硫酸カルシウムもしくは硫酸マグネシウム、

(b)アルカリ金属、アルカリ土類金属、またはハロゲンの塩、

(c)NaCl、KCl、LiCl、CaCl₂またはMgCl₂、あるいは

(d)NaCl

である、請求項83に記載の方法。

【請求項 85】

(a)前記イオン調節物質が、約0.15～約0.5モル濃度の濃度で存在するか、

(b)前記イオン調節物質が、NaClであり、そして少なくとも約150mMの濃度で存在するか、または

(c) 前記イオン調節物質が、約 0.5 ~ 約 1.0 モル濃度の濃度で存在する、請求項 83 または 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記 pH 勾配が、pH 約 3.9 ~ pH 約 4.5、pH 約 4.0 ~ pH 約 4.4、または pH 約 4.1 ~ pH 約 4.3 である、請求項 83 ~ 85 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

(a) 前記 pH 勾配が直線勾配であるか、または

(b) 前記 pH 勾配が段階勾配であり、ここで、前記方法が、pH 約 3.9、pH 約 4.0、pH 約 4.1、pH 約 4.2、pH 約 4.3 または pH 約 4.4 の段階を、平衡化されたプロテイン A カラムに適用する工程をさらに包含する、請求項 83 ~ 86 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

前記二重特異性抗原結合タンパク質が、以下：

(a) pH 約 3.9 ~ pH 約 4.4、pH 約 4.0 ~ pH 約 4.3、pH 約 4.1 ~ pH 約 4.2、もしくは pH 約 4.2 の pH、または

(b) 4、4.1、4.2、4.3、4.4 もしくは 4.5 の pH で溶出する、請求項 83 ~ 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 89】

前記混合物が培養液である、請求項 83 ~ 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記ヘテロ二量体 IgG CH3 領域を含む前記二重特異性抗原結合タンパク質が、プロテイン A に関して同一の親和性を有する CH3 ドメインを含むホモ二量体 IgG CH3 領域を含む抗体である全タンパク質の約 1 重量%未満、0.5 重量%未満または 0.1 重量%未満を含む画分に溶出する、請求項 83 ~ 89 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

前記第 2 の IgG CH3 領域が、プロテイン A への前記第 2 の CH3 領域の結合を減少させるかまたは排除する改変を含む、請求項 83 ~ 90 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

前記第 1 の IgG CH3 ドメインおよび前記第 2 の IgG CH3 ドメインが各々、ヒト IgG 1 重鎖 CH3 ドメイン、ヒト IgG 2 重鎖 CH3 ドメインおよびヒト IgG 4 重鎖 CH3 ドメインからなる群から選択されるヒト IgG 重鎖 CH3 ドメインである、請求項 83 ~ 91 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 93】

前記改変が、IMGT エキソナンバリングシステムにおける (a) 95R もしくは (b) 95R および 96F、または EU ナンバリングシステムにおける (a') 435R もしくは (b') 435R および 436F である、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記第 2 の IgG CH3 ドメインが、以下：

ヒト IgG 1 CH3 ドメインであり、そして、IMGT エキソナンバリングシステムにおける 16E、18M、44S、52N、57M および 82I、または EU ナンバリングシステムにおける 356E、358M、384S、392N、397M および 422I からなる群から選択される 1 から 5 つの改変をさらに含むか、

ヒト IgG 2 CH3 ドメインであり、そして、IMGT エキソナンバリングシステムにおける 44S、52N および 82I、または EU ナンバリングシステムにおける 384S、392N および 422I からなる群から選択される改変をさらに含むか、あるいは

ヒト IgG 4 CH3 ドメインであり、そして、IMGT エキソナンバリングシステムにおける 15R、44S、52N、57M、69K、79Q および 82I、または EU ナンバリングシステムにおける 355R、384S、392N、397M、409K、419Q および 422I からなる群から選択される改変をさらに含む、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記第2のIgG CH3ドメインがヒトIgG4 CH3ドメインであり、そして、IMGTエキソナンバリングシステムにおける105PまたはEUNナンバリングシステムにおけ445Pの改変をさらに含む、請求項93または94に記載の方法。

【請求項 96】

(a) 前記第1のIgG CH3ドメインおよび前記第2のIgG CH3ドメインが同一のアイソタイプである；

(b) 前記二重特異性抗原結合タンパク質の前記ヘテロ二量体CH3領域が、ヒトにおいて免疫原性でないかまたは実質的に免疫原性でない；

(c) 前記二重特異性抗原結合タンパク質が2つの軽鎖を含み、前記2つの軽鎖は同じである；

(d) 前記二重特異性抗原結合タンパク質が、ホモ二量体IgG CH3領域を有する同じ二重特異性抗原結合タンパク質と等価な薬物動態学的プロファイルを示す；あるいは

(e) 前記プロテインA親和性支持体がプロテインAカラムである、請求項83～95のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

請求項83～96のいずれか一項に記載の方法に従って単離された二重特異性抗原結合タンパク質。

【請求項 98】

二重特異性抗体を作製するための方法であって、前記方法は、以下：

破壊された細胞または抗原結合タンパク質の混合物とプロテインA親和性支持体とを接触させる工程；および

イオン調節物質の存在下で、pH勾配によって二重特異性抗原結合タンパク質を溶出する工程；

を包含し、ここで、

前記二重特異性抗体は、各々プロテインAに対して異なる親和性を有する第1のIgG CH3ドメインおよび第2のIgG CH3ドメインを含むヘテロ二量体IgG CH3領域を含む、方法。