

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-519602

(P2023-519602A)

(43)公表日 令和5年5月11日(2023.5.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全29頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-559368(P2022-559368)				
(86)(22)出願日	令和3年3月29日(2021.3.29)				
(85)翻訳文提出日	令和4年11月24日(2022.11.24)				
(86)国際出願番号	PCT/IB2021/052589				
(87)国際公開番号	WO2021/198880				
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)				
(31)優先権主張番号	63/002,631				
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	504333972 メディミュン, エルエルシー アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーラン ド州, ゲイザーズバーグ, ワン メディ ミュン ウェイ				
(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子				
(74)代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子				
(72)発明者	ハンドログテン, マイケル ダブリュー アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド 州ゲイザーズバーグ, ワン・メディミュ ン・ウェイ, メディミュン・リミテ ッド・ライアビリティ・カンパニー				
(72)発明者	ダックア, ウィリアム 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 安定化 I g G 4 抗体及びその使用

(57)【要約】

本開示は、2本の重鎖を含む I g G 4 クラスの抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、抗体に関する。本開示は、さらに、2本の重鎖を含む I g G 4 抗体を使用して障害又は状態を処置する方法であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2本の重鎖を含むIgG4抗体であって、前記重鎖のそれぞれは、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基219又は220で少なくとも1つの変異を含むヒトIgG4定常領域を含む、IgG4抗体。

【請求項 2】

前記ヒトIgG4定常領域は、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基219でシステインを含む、請求項1に記載のIgG4抗体。

【請求項 3】

前記ヒトIgG4定常領域は、配列番号1のアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項2に記載のIgG4抗体。

【請求項 4】

前記ヒトIgG4定常領域は、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基220でシステインを含む、請求項1に記載のIgG4抗体。

【請求項 5】

前記ヒトIgG4定常領域は、配列番号2のアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項4に記載のIgG4抗体。

【請求項 6】

前記ヒトIgG4定常領域は、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基219でシステインを含み且つ残基220でシステインを含む、請求項1、2、及び4のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項 7】

前記ヒトIgG4定常領域は、配列番号3のアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項1、2、4、及び6のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項 8】

前記ヒトIgG4定常領域は、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基228でプロリンをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項 9】

2本の重鎖を含むIgG4抗体であって、前記重鎖のそれぞれは、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基219、220、及び228で変異を含むヒトIgG4定常領域を含む、IgG4抗体。

【請求項 10】

前記抗体は、ナンバリングのEUインデックスに従って前記重鎖の残基219でシステインを含み、残基220でシステインを含み、且つ残基228でプロリンを含む、請求項9に記載のIgG4抗体。

【請求項 11】

前記ヒトIgG4定常領域は、配列番号4のアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項9又は10に記載のIgG4抗体。

【請求項 12】

前記IgG4抗体は、2本の軽鎖を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項 13】

前記抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体である、請求項1～12のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項 14】

前記抗体は、エリスロポエチン、 β -アミロイド、トロンボポエチン、インターフェロ α (2a及び2b)、インターフェロ β (Ib)、インターフェロ γ 、TNFR I (CD120a)、TNFR II (CD120b)、IL-IR 1型 (CD121a)、IL-IR 2型 (CD121b)、IL-2、IL2R (CD25)、IL-2R- β (CD123)、IL-3、IL-4、IL-3R (CD123)、IL-

10

20

30

40

50

4 R (CD124)、IL-5R (CD125)、IL-6R- α (CD126)、IL-6R- β (CD130)、IL-8、IL-10、IL-11、IL-15、IL-15BP、IL-15R、IL-20、IL-21、TCR可変鎖、RANK、RANKL、CTLA4、CXCR4R、CCR5R、TGF- β 1、- β 2、- β 3、G-CSF、GM-CSF、MIF-R (CD74)、M-CSF-R (CD115)、GM-CSFR (CD116)、可溶性FcRI、sFcRII、sFcRIII、FcRn、第VII因子、第VII因子、第IX因子、VEGF、 α -4インテグリン、Cd11a、CD18、CD20、CD38、CD25、CD74、Fc α RI、Fc ϵ RI、アセチルコリン受容体、fas、fasL、TRAIL、肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのエンベロープE2、組織因子、組織因子及び第VII因子の複合体、EGFr、HER2、CD4、CD28、VLA-I、2、3、若しくは4、LFA-I、MAC-I、 α -セレクトリン、PSGL-I、ICAM-I、P-セレクトリン、ペリオスチン、CD33 (Siglec 3)、Siglec 8、TNF、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCLU、CCL13、CCL17、CCL18、CCL20、CCL22、CCL26、CCL27、CX3CL1、LIGHT、EGF、VEGF、TGF α 、HGF、PDGF、NGF、補体、MBL、B因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、CD32b、CD200、CD200R、OX-40、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR)、NKG2D、白血球関連免疫グロブリン様受容体 (LAIR)、Iv49、PD-L2、CD26、BST-2、ML-IAP (アポトーシスタンパク質のメラノーマ阻害剤)、カテプシンD、CD40、CD40R、CD86、B細胞受容体、CD79、PD-1、又はT細胞受容体に特異的に結合する、請求項1～13のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

10

20

30

40

50

【請求項15】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が改善されている、請求項1～14のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項16】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が3倍を超えている、請求項1～15のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項17】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が6倍を超えている、請求項1～16のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項18】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が減少している、請求項1～17のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項19】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が少なくとも40%少ない、請求項1～18のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項20】

前記抗体は、前記変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が少なくとも80%少ない、請求項1～19のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項21】

前記抗体は、二重特異性抗体である、請求項1～20のいずれか一項に記載のIgG4抗体。

【請求項22】

前記二重特異性抗体は、第1の抗原及び第2の抗原に特異的に結合する能力がある、請求項21に記載のIgG4抗体。

【請求項23】

請求項1～22のいずれか一項に記載のIgG4抗体と、薬物とを含む抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項24】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の I g G 4 抗体と、ペプチドとを含む抗体－ペプチドコンジュゲート。

【請求項 25】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の I g G 4 抗体と、タンパク質とを含む抗体－タンパク質コンジュゲート。

【請求項 26】

疾患又は状態を有する対象を処置する方法であって、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の I g G 4 抗体、請求項 23 に記載の抗体－薬物コンジュゲート、請求項 24 に記載の抗体－ペプチドコンジュゲート、又は請求項 25 に記載の抗体－タンパク質コンジュゲートの治療上有効な量を前記対象に投与することを含む方法。

10

【請求項 27】

前記疾患又は状態は、癌である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記癌は、黒色腫、乳癌、膵癌、肺癌、肝細胞癌、胆管細胞癌若しくは胆道癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、腎癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、又は尿路上皮癌である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記疾患又は状態は、神経疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記神経疾患は、虚血性脳卒中、脳梗塞、神経外傷、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリック病）、又はてんかんである、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 31】

前記疾患又は状態は、神経変性疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性認知症、又はハンチントン病である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記疾患又は障害は、自己免疫疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 34】

前記自己免疫疾患は、多発性硬化症、肺線維症、関節リウマチ、1 型糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、乾癬、グレーブス病、セリアック病、橋本甲状腺炎、血管炎、又はクローン病である、請求項 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記疾患又は状態は、循環器疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 36】

前記循環器疾患は、不整脈、冠動脈心疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患、リウマチ性心疾患、先天性心疾患、深部静脈血栓症、又は肺塞栓症である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記疾患又は状態は、代謝性疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 38】

前記代謝性疾患は、高血糖、インスリン抵抗性、糖尿病、脂質異常症、又は肥満である、請求項 37 に記載の方法。

40

【請求項 39】

前記疾患又は状態は、呼吸器疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 40】

前記呼吸器疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、肺気腫、肺癌、嚢胞性線維症、肺炎、又は胸水である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記疾患又は状態は、感染である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 42】

50

前記感染は、細菌感染又はウイルス感染である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の I g G 4 抗体、請求項 2 3 に記載の抗体－薬物コンジュゲート、請求項 2 4 に記載の抗体－ペプチドコンジュゲート、又は請求項 2 5 に記載の抗体－タンパク質コンジュゲートを使用する、対象の疾患又は状態のインビトロでの診断方法。

【請求項 4 4】

(a) 請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の I g G 4 抗体、請求項 2 3 に記載の抗体－薬物コンジュゲート、請求項 2 4 に記載の抗体－ペプチドコンジュゲート、又は請求項 2 5 に記載の抗体－タンパク質コンジュゲートの治療上有効な量と、

10

(b) 薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 4 5】

請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の抗体をコードする単離核酸分子。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本開示は、2本の重鎖を含む抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、抗体に関する。本開示は、さらに、2本の重鎖を含む抗体を使用して障害又は状態を処置する方法であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、方法に関する。

【背景技術】

【0002】

I g G 4 は、F a b－アーム交換と呼ばれるプロセスを受ける動的な分子である。重鎖間のジスルフィド結合は、一時的に減少し、その結果、他の I g G 4 半抗体とインタクトな抗体を再編成する2つの半抗体が生じる。インビボでは、治療用 I g G 4 は内因性 I g G 4 と再結合し得、その結果、二重特異性抗体の不均一な混合物が生じる。製造中に任意の治療用タンパク質に関して生じる可能性がある関連する問題は、鎖間ジスルフィド結合の減少である。I g G 4 の場合、これは主に、精製プロセスを通じて持続する高レベルの半 m A b をもたらす。S 2 2 8 P 変異を使用して、I g G 4 の半 m A b 形成が防止されている。しかしながら、S 2 2 8 P 変異を有する I g G 4 は、還元環境下では、半 m A b が形成される。そのため、製造中に還元されない及び／又はインビボで半抗体を形成しない抗体が依然として必要とされている。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本明細書で提供されるのは、2本の重鎖を含む I g G 4 抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、ナンバリングの E U インデックス (E U i n d e x o f n u m b e r i n g) に従って重鎖の残基 2 1 9 又は 2 2 0 で少なくとも1つの変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、I g G 4 抗体である。

40

【0004】

同様に本明細書で提供されるのは、2本の重鎖を含む I g G 4 抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、ナンバリングの E U インデックスに従って重鎖の残基 2 1 9、2 2 0、及び 2 2 8 で変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、I g G 4 抗体である。

【0005】

同様に本明細書で提供されるのは、疾患又は状態を有する対象を処置する方法であって

50

、本開示の I g G 4 抗体の治療上有効な量をこの対象に投与することを含む方法である。
【0006】

同様に本明細書で提供されるのは、本開示の I g G 4 抗体、抗体-薬物コンジュゲート、抗体-ペプチドコンジュゲート、又は抗体-タンパク質コンジュゲートの治療上有効な量と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】チオレドキシン系による還元に対する I g G の相対的安定性を示す。I g G 1、I g G 2、及び I g G 4 m A b を、チオレドキシン系の構成要素と共にインキュベートした。サンプルを、指定の時点で採取し、インタクトな m A b を、キャピラリ電気泳動を使用して定量した。

10

【図2 A-2 F】チオレドキシン系による還元中に形成された中間体種を示す。I g G 1、I g G 2、及び I g G 4 m A b を、チオレドキシン系の構成要素と共にインキュベートした。サンプルを、指定の時点で採取し、m A b 断片を、キャピラリ電気泳動を使用して定量した。全ての図面に関して、インタクトな m A b (L H H L) は、左軸上に存在しており、断片種 (H H L、H H、及び H L) は、右軸上に存在している。可視化を助けるために、遊離の重鎖及び軽鎖を示さなかった。

【図3】還元条件に曝露された場合に様々な I g G アイソタイプに関して形成される主要な中間体を示す。

【図4】ヒンジ変異により還元に対する I g G 4 m A b の安定性が上昇したことを示す。指定のヒンジ変異を有する I g G 4 m A b を、チオレドキシン系の構成要素と共にインキュベートした。サンプルを、指定の時点で採取し、インタクトな m A b を、キャピラリ電気泳動を使用して定量した。データは、3連の実験の平均±S Dを表す。

20

【図5 A-5 H】ヒンジ変異により半抗体形成が減少したことを示す。指定のヒンジ変異を有する I g G 4 m A b を、チオレドキシン系の構成要素と共にインキュベートした。サンプルを、指定の時点で採取し、m A b 断片を、キャピラリ電気泳動を使用して定量した。可視化を助けるために、遊離の重鎖及び軽鎖を示さなかった。データは、3連の実験の平均±S Dを表す。

【図6 A-6 C】ヒンジ変異がインビトロで抗原、F c R n、又は F c γ R I I I a 結合に影響を及ぼさなかったことを示す。図6 Aは、E L I S A アッセイにおける、非改変 I g G 4 と比較した場合の、指定のヒンジ変異を有する I g G 4 m A b の抗原結合を示す。アイソタイプコントロールは、5000 n M まで結合を示さなかった（データは示さない）。データは、2連の実験の平均±S Dを表す。図6 Bは、F c R n を示し、図6 Cは、A l p h a L I S A アッセイにおける、非改変 I g G 4 と比較した場合の、ヒンジ変異を有する I g G 4 に関する F c γ R I I I a 結合を示す。F c γ R I I I a A l p h a L I S A アッセイでは、既知の陽性コントロールとしてリツキシマブを実行した。データは、2連の独立した実験の平均±S Dを表す。

30

【図7 A-7 H】非改変 I g G 4 (図7 A)、I g G 4-S 2 2 8 P (図7 B)、I g G 4-G 2 2 0 C (図7 C)、I g G 4-Y 2 1 9 C (図7 D)、I g G 4-Y 2 1 9 C+G 2 2 0 C (図7 E)、I g G 4-Y 2 1 9 C+S 2 2 8 P (図7 F)、I g G 4-G 2 2 0 C+S 2 2 8 P (図7 G)、及び I g G 4-Y 2 1 9 C+G 2 2 0 C+S 2 2 8 P (図7 H) に関するデコンボリューションマスペクトル (d e c o n v o l u t e d m a s s s p e c t r a) を示す。

40

【図8】I g G 1、I g G 2、及び I g G 4 の定常重鎖間での配列アラインメントを示す。

【図9 A-9 C】様々な還元条件下での F a b-アーム交換の定量を示す。図9 Aは、第2の非改変 I g G 4 とのインキュベーション後での、指定のヒンジ変異を有する I g G 4 m A b に関するハイブリッド m A b 形成を示す。ハイブリッド m A b 形成を、キャピラリ電気泳動を使用して、全タンパク質に対する割合として定量した。データは、3連の実験の平均±S Dを表す。図9 Bは、非改変 I g G 4 のキャピラリ電気泳動からの電気泳動図

50

の一例を示す。図 9 C は、非改変 I g G 4 に関する質量分析データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本開示は、2本の重鎖を含む抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、抗体に関する。本開示は、さらに、2本の重鎖を含む I g G 4 抗体を使用して障害又は状態を処置する方法であって、これらの重鎖のそれぞれは、変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む、方法に関する。

【0009】

本開示に従って用いられる場合、別途指示されない限り、全ての技術用語及び科学用語は、当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有すると理解されるものとする。別途文脈により求められない限り、単数形の使用は複数を含むものとし、複数形の使用は単数を含むものとする。

【0010】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原を認識して特異的に結合する能力があるタンパク質を指す。通常の又は従来 of 哺乳類抗体は、テトラマーを含み、このテトラマーは、典型的には、ポリペプチド鎖の2つの同一の対で構成されており、各対は、1つの「軽」鎖（典型的には約 25 kDa の分子量を有する）及び1つの「重」鎖（典型的には約 50 ~ 70 kDa の分子量を有する）からなる。「重鎖」及び「軽鎖」という用語は、本明細書で使用される場合、標的抗原に対する特異性を付与するのに十分な可変ドメイン配列を有するあらゆる免疫グロブリンポリペプチドを指す。各軽鎖及び各重鎖のアミノ末端部分は、典型的には、抗原認識に通常関与する約 100 ~ 110 個又はより多くのアミノ酸の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシル末端部分は、典型的には、エフェクター機能に関与する定常ドメインを画定する。そのため、天然に存在する抗体では、完全長の重鎖免疫グロブリンポリペプチドは、可変ドメイン (V_H)、並びに3つの定常ドメイン (C_{H1}、C_{H2}、及び C_{H3})、並びに C_{H1} と C_{H2} との間のヒンジ領域を含み、V_H ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在しており、C_{H3} ドメインは、カルボキシル末端に存在しており、完全長の軽鎖免疫グロブリンポリペプチドは、可変ドメイン (V_L) 及び定常ドメイン (C_L) を含み、V_L ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在しており、C_L ドメインは、カルボキシル末端に存在している。

【0011】

完全長の軽鎖及び重鎖内では、可変ドメイン及び定常ドメインは、典型的には、約 12 個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結されており、重鎖は、約 10 個超のアミノ酸の「D」領域も含む。各軽鎖対／重鎖対の可変領域は、典型的には、抗原結合部位を形成する。天然に存在する抗体の可変ドメインは、典型的には、相補性決定領域又は CDR とも呼ばれる3つの超可変領域によって連結された、全体構造が同一の比較的保存されたフレームワーク領域 (FR) を示す。各対の2本の鎖由来の CDR は、典型的には、フレームワーク領域によって整列されており、これにより、特定のエピトープに結合することが可能となり得る。アミノ末端からカルボキシル末端まで、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメインは、典型的には、ドメイン FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及び FR4 を含む。

【0012】

本明細書で説明されているアミノ酸残基のナンバリングへの言及を、EU ナンバリングシステムに従って実施している (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) でも説明されている)。

【0013】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、2本の重鎖を含む I g G 4 抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、少なくとも1つの変異を含むヒト I g G 4 定常領域を

含む、I g G 4 抗体である。一部の実施形態では、重鎖は、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。他の実施形態では、重鎖は、1 つ又は複数の変異を有する配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。他の実施形態では、I g G 4 重鎖定常領域は、1 つ、2 つ、又は 3 つの変異を有する配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む。

【0014】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、2 本の重鎖を含む I g G 4 抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、ナンバリングの E U インデックスに従って重鎖の残基 2 1 9 又は 2 2 0 で少なくとも 1 つの変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒト I g G 4 定常領域は、重鎖の残基 2 1 9 でシステインを含む。一部の実施形態では、ヒト I g G 4 定常領域は、重鎖の残基 2 2 0 でシステインを含む。一部の実施形態では、ヒト I g G 4 定常領域は、重鎖の残基 2 1 9 でシステインを含み、且つ残基 2 2 0 でシステインを含む。一部の実施形態では、ヒト I g G 4 定常領域は、重鎖の残基 2 2 8 でプロリンをさらに含む。一部の実施形態では、重鎖のそれぞれは、ナンバリングの E U インデックスに従って重鎖の残基 2 1 9、2 2 0、及び 2 2 8 で変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体は、重鎖の残基 2 1 9 でシステインを含み、残基 2 2 0 でシステインを含み、且つ残基 2 2 8 でプロリンを含む。

【0015】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、2 本の重鎖を含む I g G 4 抗体であって、これらの重鎖のそれぞれは、ヒンジ領域内で少なくとも 1 つの変異を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。「ヒンジ」又は「ヒンジ領域」という用語は、I g G 4 抗体の第 1 の定常ドメインと第 2 の定常ドメインとの間のアミノ酸を含む柔軟なポリペプチドを指す。ヒンジ領域中での変異を、当該技術分野で公知の方法により生じさせ得、例えば、アミノ酸の挿入、欠失、置換、及び再配置を使用する野生型ヒンジへの変異の導入により生じさせ得る。本明細書で開示されている変異ヒンジ領域を、抗体及びその断片が挙げられるがこれらに限定されない分子に組み込み得る。特定の実施形態では、I g G 4 抗体は、2 本の重鎖を含み、これらの重鎖のそれぞれは、このヒンジ領域内で少なくとも 1 つの変異を含む。特定の実施形態では、I g G 4 抗体は、2 本の軽鎖をさらに含む。いくつかの変異ヒンジのアミノ酸配列を、表 2 で詳述する。特定の実施形態では、I g G 4 抗体は、2 本の重鎖を含み、これらの重鎖のそれぞれは、

【化 1】

VESKCGPPCPSCP (配列番号1), VESKYCPPCPSCP (配列番号2),
 VESKYGPPCPPCP (配列番号8), VESKCGPPCPPCP (配列番号9),
 VESKYCPPCPPCP (配列番号10), VESKCCPPCPSCP (配列番号3), 又は
 VESKCCPPCPPCP (配列番号4)

のアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含むヒト I g G 4 定常領域を含む。

【0016】

「ベクター」という用語は、宿主細胞にコード情報を伝達するために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、又はウイルス）を指す。ベクターの 1 つのタイプは、「プラスミド」であり、このプラスミドは、追加の D N A セグメントが挿入され得る環状二本鎖 D N A 分子を指す。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、このベクターでは、追加の D N A セグメントは、ウイルスゲノムに挿入され得る。ある特定のベクターは、このベクターが導入された宿主細胞中で自律的に複製する能力がある（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、及びエピソードの哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソードの哺乳類ベクター）は、宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、それにより宿主ゲノムと共に複製される。加えて、ある特定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指示する能力がある。そのようなベクター

は、本明細書では「発現ベクター」と称される。

【0017】

本明細書で開示されている抗体を、所与の生物学的反応を改変する薬物又は治療薬にコンジュゲートさせ得る。好適な薬物として、化学治療薬、所望の生物活性（例えば、毒素、血栓剤若しくは抗血管新生剤、又は増殖因子）を有するタンパク質又はポリペプチドが挙げられる。加えて、この抗体を、放射性物質又は大環状キレート剤等の治療部分にコンジュゲートさせ得る。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されているIgG4抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートである。

【0018】

本開示のIgG4抗体を、タンパク質又はペプチドに融合させるか又は化学的にコンジュゲートさせて、融合タンパク質を生成し得る。この融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じてよい。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されているIgG4抗体を含む抗体-ペプチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されているIgG4抗体を含む抗体-タンパク質コンジュゲートである。

【0019】

本明細書で開示されている抗体として、二重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体が挙げられる。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、第1の抗原及び第2に抗原に特異的に結合する能力がある。

【0020】

「特異的に結合する」という用語は、特定の分子又はその断片（例えば抗原）に結合する抗体の能力を指す。例えば、分子又はその断片に特異的に結合する抗体は、例えば、免疫アッセイ、BIAcore、又は当該技術分野で既知の他のアッセイにより決定した場合に、より低い親和性で他の分子に結合するだろう。具体的には、少なくとも1つの分子又はその断片に特異的に結合する抗体（又はその抗原結合断片）は、この分子又はその断片に非特異的に結合する他の分子と競合し得る。本開示は、複数の特異性を有する抗体（例えば、2種以上の別々の抗原に対する特異性を有する抗体）を包含する。例えば、二重特異性抗体は、単一の標的抗原上の2つの隣接するエピトープに結合し得るか、又は2種の異なる抗原に結合し得る。

【0021】

一部の実施形態では、抗体は、下記に特異的に結合する：エリスロポエチン、 β -アミロイド、トロンボポエチン、インターフェロン- α （2a及び2b）、インターフェロン- β （Ib）、インターフェロン- γ 、TNFR I（CD120a）、TNFR II（CD120b）、IL-IR 1型（CD121a）、IL-IR 2型（CD121b）、IL-2、IL2R（CD25）、IL-2R- β （CD123）、IL-3、IL-4、IL-3R（CD123）、IL-4R（CD124）、IL-5R（CD125）、IL-6R- α （CD126）、IL-6R- β （CD130）、IL-8、IL-10、IL-IL、IL-15、IL-15BP、IL-15R、IL-20、IL-21、TCR可変鎖、RANK、RANK-L、CTLA4、CXCR4R、CCR5R、TGF- β 1、- β 2、- β 3、G-CSF、GM-CSF、MIF-R（CD74）、M-CSF-R（CD115）、GM-CSFR（CD116）、可溶性FcRI、sFcRII、sFcRIII、FcRn、第VII因子、第VII因子、第IX因子、VEGF、 α -4インテグリン、Cd11a、CD18、CD20、CD38、CD25、CD74、Fc α RI、Fc ϵ RI、アセチルコリン受容体、fas、fasL、TRAIL、肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのエンベロープE2、組織因子、組織因子及び第VII因子の複合体、EGFr、HER2、CD4、CD28、VLA-I、2、3、若しくは4、LFA-I、MAC-I、l-セレクチン、PSGL-I、ICAM-I、P-セレクチン、ペリオスチン、CD33（Siglec 3）、Siglec 8、TNF、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCLU、CCL13、CCL17、CCL18、CCL20、CCL22、CCL26、C

10

20

30

40

50

L27、CX3CL1、LIGHT、EGF、VEGF、TGF α 、HGF、PDGF、NGF、補体、MBL、B因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、CD32b、CD200、CD200R、OX-40、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）、NKG2D、白血球関連免疫グロブリン様受容体（LAIR）、Iv49、PD-L2、CD26、BST-2、ML-IAP（アポトーシスタンパク質のメラノーマ阻害剤）、カテプシンD、CD40、CD40R、CD86、B細胞受容体、CD79、PD-1、又はT細胞受容体。

【0022】

本明細書で開示されているIgG4抗体は、有利な特性を示す。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が改善されている。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が3倍を超えている。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、還元に対する安定性が6倍を超えている。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が減少している。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が少なくとも40%少ない。一部の実施形態では、この抗体は、本変異を含まないIgG4抗体と比較した場合に、半抗体形成が少なくとも80%少ない。

【0023】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、疾患又は状態を有する対象を処置する方法であって、本明細書で開示されているIgG4抗体の治療上有効な量をこの対象に投与することを含む方法である。

【0024】

「疾患」又は「状態」は、本開示の方法を使用する処置から利益を得るであろうあらゆる状態を指す。「疾患」及び「状態」は、本明細書では互換的に使用されており、問題の障害に患者をかかりやすくする病的状態等の慢性及び急性の障害又は疾患を含む。

【0025】

「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト動物（特に哺乳類）を含むことが意図されている。ある特定の実施形態では、対象は、ヒト患者である。

【0026】

「処置」又は「処置する」という用語は、本明細書で使用される場合、治療処置及び予防的（prophylactic）又は予防的（preventative）措置の両方を指す。処置を必要とする者として、疾患又は状態を有する対象、並びに疾患若しくは状態を有しやすい者、又は疾患若しくは状態を予防すべき者が挙げられる。

【0027】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、癌に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この癌は、黒色腫、乳癌、膵癌、肺癌、肝細胞癌、胆管細胞癌若しくは胆道癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、腎癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、又は尿路上皮癌である。

【0028】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、神経疾患に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この神経疾患は、虚血性脳卒中、脳梗塞、神経外傷、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリック病）、又はてんかんである。

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、神経変性疾患に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性認知症、又はハンチントン病である。

【0030】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、自己免疫疾患に関して対象を

10

20

30

40

50

処置することに関する。一部の実施形態では、この自己免疫疾患は、多発性硬化症、肺線維症、関節リウマチ、1型糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、乾癬、グレーブス病、セリアック病、橋本甲状腺炎、血管炎、又はクローン病である。

【0031】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、循環器疾患に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この循環器疾患は、不整脈、冠動脈心疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患、リウマチ性心疾患、先天性心疾患、深部静脈血栓症、又は肺塞栓症である。

【0032】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、代謝性疾患に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この代謝性疾患は、高血糖、インスリン抵抗性、糖尿病、脂質異常症、又は肥満である。

【0033】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、呼吸器疾患に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この呼吸器疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気管支炎、肺気腫、肺癌、嚢胞性線維症、肺炎、又は胸水である。

【0034】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法は、感染に関して対象を処置することに関する。一部の実施形態では、この感染は、細菌感染又はウイルス感染である。

【0035】

「投与」又は「投与すること」という用語は、本明細書で使用される場合、所望の効果を達成するのに適切なあらゆる経路により、化合物を提供すること、接触させること、且つ／又は送達することを指す。投与として下記が挙げられ得るが、これらに限定されない：経口、舌下、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、くも膜下腔内、病巣内、又は頭蓋内の注射）、経皮、局所、頬側、経直腸、経腔、経鼻、経眼、吸入を介した投与、及びインプラント。

【0036】

「共投与される」又は「組み合わせて」という用語は、本明細書で使用される場合、複数の化合物又は薬剤の同時投与又は逐次的投与を指す。第1の化合物又は薬剤を、第2の化合物又は薬剤の投与の前に、この投与と同時に、又はこの投与の後に投与し得る。第1の化合物又は薬剤と第2の化合物又は薬剤とを、同じ日に同時に又は逐次的に投与してもよいし、互いに1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、又は1ヶ月以内に逐次的に投与してもよい。一部の実施形態では、化合物又は薬剤を、これらの化合物又は薬剤のそれぞれが少なくとも何らかの生理学的効果を及ぼしている間に及び／又は有効性を保ったままである間に、共投与する。

【0037】

「医薬組成物」又は「治療用組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、対象に適切に投与された場合に所望の治療効果を誘導する能力がある化合物又は組成物を指す。一部の実施形態では、本開示は、薬学的に許容される担体と、本開示の少なくとも1種の抗体、抗体-薬物コンジュゲート、抗体-ペプチドコンジュゲート、又は抗体-タンパク質コンジュゲートの治療上有効な量とを含む医薬組成物を提供する。

【0038】

「治療上有効な用量」又は「治療用量」とは、所望の臨床結果をもたらすのに（即ち、治療効果を達成するのに）十分な量のことである。治療上有効な用量を、1回又は複数回の投与で投与し得る。

【0039】

「薬学的に許容される担体」又は「生理学的に許容される担体」という用語は、本明細書で使用される場合、本開示の1種又は複数種の抗体の送達を達成するのに又は増強するのに適した1種又は複数種の製剤材料を指す。

【0040】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書で開示されているIgG4抗体を、医薬組成物として、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤と共に製剤化し得る。ある特定の実施形態では、そのような医薬組成物は、当該技術分野で既知の方法を使用した任意の1つ又は複数の投与経路によるヒト又は非ヒト動物への投与に適している。「薬学的に許容される担体」という用語は、活性成分の生物活性の有効性に干渉しない1種又は複数種の非毒性物質を意味する。そのような調製物は、塩、緩衝剤、保存剤、適合性担体、及び任意選択的な他の治療剤を常に取り得る。そのような薬学的に許容される調製物はまた、ヒトへの投与に好適な適合性のある固体又は液体の充填剤、希釈剤、又は封入物質も取り得る。本明細書で説明されている製剤で利用され得る他の企図される担体、賦形剤、及び／又は添加剤として、例えば、香味剤、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、帯電防止剤、脂質、タンパク質賦形剤、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン、塩形成対イオン、例えばナトリウム、及び同類のものが挙げられる。本明細書で説明されている製剤での使用に好適なこれらの及びさらなる既知の医薬担体、賦形剤、及び／又は添加剤は、当該技術分野で既知であり、例えば、"Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)、及び"Physician's Desk Reference," 60th ed., Medical Economics, Montvale, N. J. (2005)で列挙された通りである。所望の又は必要な投与様式、溶解度、及び／又は安定性に好適な薬学的に許容される担体が選択され得る。

10

20

30

40

50

【0041】

一実施形態では、本開示の製剤は、エンドトキシン類及び／又は関連する発熱物質を実質的に含まないパイロジェンフリー製剤である。エンドトキシン類として、微生物の内部に閉じ込められており且つこの微生物が破壊されるか又は死んだときにのみ放出される毒素が挙げられる。発熱物質として、細菌及び他の微生物の外膜に由来する発熱誘発性の熱安定性物質（糖タンパク質類）も挙げられる。これらの物質は両方とも、ヒトに投与された場合には、発熱、低血圧、及びショックを引き起こす可能性がある。潜在的な有害作用に起因して、低量のエンドトキシンであっても、静脈内投与される医薬品薬物溶液から取り除かなければならない。食品医薬品局（「FDA」）は、静脈内薬物適用に関して単回1時間の間に体重1キログラム当たり1用量当たり5エンドトキシン単位（EU）という上限を設定している（米国薬局方コンベンション（The United States Pharmacopeial Convention）、薬局方フォーラム（Pharmacopeial Forum）26（1）：223（2000））。ある特定の実施形態では、本組成物中のエンドトキシン及びパイロジェンレベルは、10EU/mg未満、又は5EU/mg未満、又は1EU/mg未満、又は0.1EU/mg未満、又は0.01EU/mg未満、又は0.001EU/mg未満である。

【0042】

インビボ投与に使用される場合には、本開示の製剤は、無菌であるべきである。本開示の製剤を、例えば滅菌ろ過又は放射線照射等の様々な滅菌方法により滅菌し得る。一実施形態では、この製剤を、予め滅菌された0.22ミクロンフィルタでろ過滅菌する。注射用の無菌組成物を、"Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)で説明されているような従来の薬務に従って製剤化し得る。

【0043】

一部の実施形態では、治療用組成物を、経口、経鼻、経肺、局所（頬側及び舌下を含む）、経直腸、経膈、並びに／又は非経口投与等の特定の投与経路用に製剤化し得る。「非経口投与」及び「非経口的に投与される」という用語は、本明細書で使用される場合、経腸及び局所投与以外の、通常は注射による投与様式を指し、下記が挙げられるが、これらに限定されない：静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸

骨内の注射及び注入。局所又は経皮投与に適した本開示の製剤として、散剤、噴霧剤、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、及び吸入剤が挙げられる。抗体及び他の活性物質を、薬学的に許容される担体と、及び必要となる場合がある任意の保存剤、緩衝剤、又は噴射剤と、無菌条件下で混合し得る（例えば、米国特許第 7, 378, 110 号明細書；同第 7, 258, 873 号明細書；及び同第 7, 135, 180 号明細書；米国特許出願公開第 2004/0042972 号明細書；及び同第 2004/0042971 号明細書を参照されたい）。

【0044】

本製剤を、単位剤形で提供し得、且つ薬学の技術分野で既知の任意の方法により調製し得る。本開示の医薬組成物中における活性成分の実際の投薬量レベルは、患者にとって有毒であることなく特定の患者、組成物、及び投与様式に所望される治療応答を実現するのに有効な活性成分の量（例えば「治療上有効な量」）が得られるように様々であり得る。選択される投薬量レベルは、様々な薬物動態学的要因に依存しており、例えば、用いられる具体的な組成物の活性、投与経路、投与時間、用いられる具体的な化合物の排出速度、処置の継続期間、用いられる具体的な組成物と併用される他の薬物、化合物、及び／又は物質、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康、及び前病歴、並びに医学分野で公知の同様の要因に依存している。これらの投薬量を、投薬量、投与方法、処置される障害又は症状、及び個々の対象の特性に応じて、毎日、毎週、隔週、毎月、又はより少ない頻度で（例えば半年毎に）投与し得る。投薬量をまた、持続注入を介して（例えばポンプによって）も投与し得る。投与される用量はまた、投与経路にも依存し得る。例えば、皮下投与には、静脈内投与と比べて高い投薬量が必要であり得る。上述したように、任意の一般的に使用される投与レジメン（例えば、注射又は注入により毎日又は週 2 回投与される 1～10 mg/kg）が適合され得、且つヒト癌患者の処置に関する方法において好適であり得る。

【0045】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、対象の疾患又は状態のインビトロでの診断方法である。本明細書で開示されている抗体を、免疫アッセイにおいてインビトロで使用し得、この免疫アッセイでは、この抗体を、液相で用い得るか、又は固相担体に結合させ得る。加えて、この免疫アッセイでの抗体を、様々な方法で検出可能に標識し得る。本明細書で開示されている抗体を利用し得る免疫アッセイのタイプの例は、フローサイトメトリー、例えば、FACS、MACS、免疫組織化学、直接方式又は間接方式のいずれかでの競合免疫アッセイ及び非競合免疫アッセイである。

【0046】

本開示を限定することなく、本開示のいくつかの実施形態が、例示目的で本明細書で説明されている。

【実施例】

【0047】

下記の実施例は、本開示の具体的な実施形態及びその様々な用途を例示するものである。これらは、説明する目的でのみ記載されており、決して本開示の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0048】

材料及び方法

還元に対する安定性

チオレドキシン系による還元に対する mAb の相対的安定性を、10 mM EDTA を含むリン酸緩衝液、pH 7.4 中の 2 µM チオレドキシン (Abcam; Cambridge, MA)、0.1 µM チオレドキシンレダクターゼ (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI)、及び 0.24 mM NADPH (Millipore-Sigma; St. Louis, MO) を含む溶液に、1.2 mg/mL で精製済抗体を添加することにより評価した。インタクトな抗体及び形成された中間体の量を、LabChip GXII Touch HT (Perkin Elmer) を使用して定

量した。サンプルを、指定の時点で採取して -80°C にて凍結保存し、次いで、Perkin Elmerの標準プロトコルに従って非還元条件下で分析した。

【0049】

mAbの発現及び精製

既に説明されているような部位特異的変異誘発を使用して、同一のIgG4配列にヒンジ変異を全て組み込んだ(Peng et al., PLoS One 7:e36412 (2012); Beza beh et al., mAbs 9:240-56 (2017))。変異IgG4配列を、CHO細胞中での一過性トランスフェクションにより発現させ、プロテインAクロマトグラフィー及びその後のサイズ排除精製を使用して精製して、生成物凝集体を2%未満まで減少させた。

【0050】

抗原結合ELISA

96ウェルプレートを、 4°C で一晩にて、 $4\mu\text{g/mL}$ の標的抗原でコーティングした。このプレートを、0.5% Tween 20を含むPBS中の5% ミルク溶液でブロックした。この一次mAbを、二次抗ヒトIgG4 HRPコンジュゲート抗体(1:1000希釈、Invitrogen MH1742)で検出した。テトラメチルベンジジン(TMB)の添加後、この反応を0.2N 硫酸で停止させ、吸光度を450nmで読み取った。全ての工程の間に、ウェルを、0.05% Tween 20を含むPBSで4回洗浄した。

【0051】

FcRN結合AlphaLISA

AlphaLISA(登録商標)FcRN競合結合アッセイキット(PerkinElmer、カタログ#AL3095)を使用して、相対的なFcRN結合を測定した。FcRNに結合した抗体の濃度が高くなると、アクセプタービーズ及びドナービーズが近接して相互作用する能力が競合的にブロックされ、そのためアッセイシグナルが減少する。IgG4抗体サンプルを、MES緩衝液中における $100\mu\text{g/mL}$ の開始濃度に調製した。10点希釈系列を調製し、室温で45分にわたり、96ウェルプレート中においてビオチン化FcRNと共にインキュベートした。ストレプトアビジンでコーティングされたドナービーズと、ヒトIgGがコンジュゲートしたアクセプタービーズとを、 $20\mu\text{g/mL}$ に調製し、抗体-FcRN溶液に添加し、暗所において室温で60分にわたりインキュベートした。化学発光を、Envision分光計を使用して定量し、得られたデータを、4パラメータフィットを使用してSoftMaxソフトウェアでフィットさせた。

【0052】

FcγRIIIa Binding AlphaLISA

AlphaLISA(登録商標)FcγRIIIa競合結合アッセイキット(PerkinElmer、カタログ#AL348)を使用して、相対的なFcγRIIIa-158V結合を測定した。ビオチン化ヒトFcγRIIIa-158Vを、ストレプトアビジンでコーティングされたドナービーズで捕捉する。抗体サンプルの非存在下では、アクセプタービーズにコンジュゲートしたヒトIgG Fc領域は、FcγRIIIa-158Vに結合し、ドナービーズ及びアクセプタービーズを近接させ、化学発光を生じさせる。IgG4抗体サンプルを、HiBlock緩衝液で $20\mu\text{g/mL}$ の開始濃度に調製し、ビオチン化ヒトFcγRIIIa-158Vと共に室温で30分にわたり予めインキュベートして、結合を促進させた。アクセプタービーズ及びドナービーズを、 $20\mu\text{g/mL}$ に調製し、次いで抗体-受容体溶液に添加し、暗所にて室温で60分にわたりインキュベートした。化学発光を、Envision分光計を使用して定量し、得られたデータを、4パラメータフィットを使用してSoftMaxソフトウェアでフィットさせた。リツキシマブを、既知の陽性コントロールとして実行した。

【0053】

質量分析

インタクト質量分析を、UPLCシステムと併せてWaters SYNAPT G2

10

20

30

40

50

－S i H i g h D e f i n i t i o n M a s s S p e c t r o m e t e r (W a t e r s) で実施した。非還元インタクト質量分析のために、各サンプル 1 μ g を、逆相カラム (A c q u i t y U P L C B E H 3 0 0 、 C 4 、 1 . 7 μ m 、 2 . 1 m m $\times$ 5 0 m m ; W a t e r s) に直接注入し、水中の 0 . 1 % F A 及び 0 . 0 1 % T F A を含む移動相 A と、アセトニトリル中の 0 . 1 % F A 及び 0 . 0 1 % T F A を含む移動相 B とを使用して、線形勾配で溶出させた。マスペクトルを、5 0 0 ~ 4 , 5 0 0 m / z の範囲で収集した。分子量を、M a s s L y n x ソフトウェアの M a x E n t I (W a t e r s) を使用して、質量データのデコンボリューションにより決定した。

【 0 0 5 4 】

実施例 1 : I g G アイソタイプ間の還元キネティクス及び還元経路の比較

様々な m A b の還元に対する相対的安定性を、それぞれをチオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼ、及び N A D P H と共にインキュベートすることにより試験した。評価する m A b のライブラリには、I g G 1、I g G 2、及び I g G 4 が含まれていた。加えて、m A b の内の 4 つは、ラムダ軽鎖を有しており、5 つは、カップ軽鎖を有しており、I g G 4 の内の 1 つは、通常使用される S 2 2 8 P 変位を有していた。I g G 2 は、I g G 1 と比べて還元に対して安定であること、及びカップ軽鎖を有する m A b は、ラムダ軽鎖を有する m A b と比べて安定であることが分かった (図 1) (H u t t e r e r e t a l . , m A b s 5 : 6 0 8 - 1 3 (2 0 1 3)) 。興味深いことに、半 m A b を形成するという I g G 4 の傾向にもかかわらず、I g G 4 m A b は、I g G 1 と比べて還元に対して安定であることが分かった。半 m A b の形成を防止するために、いくつかの治療用 I g G 4 には S 2 2 8 P 変異が組み込まれている (K a p l o n e t a l . , m A b s 1 1 : 2 1 9 - 3 8 (2 0 1 9)) 。予想したように、S 2 2 8 P 変異を有する I g G 4 は、野生型ヒンジ配列を有する I g G 4 と比べて還元に対して安定であった。

【 0 0 5 5 】

次に、m A b のそれぞれに関して形成された中間体種を、チオレドキシン系によりインタクトな m A b から遊離した重鎖及び軽鎖へと還元された際に調べた。代表的なセット (I g G 1、I g G 2、及び I g G 4 (それぞれカップ軽鎖又はラムダ軽鎖を有する) を含む) の比較を、図 2 に示す。この結果は、I g G 1 及び I g G 2 に関して同様の中間体種が形成されていること、並びにこれらの種は軽鎖のタイプに依存していることを示す。ラムダ軽鎖を有する I g G 1 m A b 及び I g G 2 m A b に関して形成された主な中間体種は、重鎖二量体 (H H) であり、カップ軽鎖を有する I g G 1 m A b 及び I g G 2 m A b は、重鎖二量体 (H H) と比較した場合に同量以上の半 m A b (H L) を形成する。これらの結果は、ラムダ軽鎖と重鎖との間のジスルフィド結合が、カップ軽鎖と重鎖との間のジスルフィド結合と比べて容易に還元されたことを示す。

【 0 0 5 6 】

I g G 4 に関して形成された中間体は、軽鎖のアイソタイプに依存していないか、又は S 2 2 8 P ヒンジ変異の存在にさえも依存していなかった。図 2 に示すように、I g G 4 は両方とも、チオレドキシン系により還元された場合には、ほとんど半 m A b (H L) を形成した。S 2 2 8 P 変異を有する I g G 4 は、チオレドキシン系による還元に対してより安定であったが、結果は、還元時には、この m A b が依然として半 m A b (H L) のみを形成したことを示す。S 2 2 8 P 変異は、半 m A b の形成及び F a b - アーム交換を防止するように複数種の治療用 m A b へと操作されていることを考慮すると、このことは驚くべきことであった。しかしながら、この結果は、S 2 2 8 P 変異を含むヒンジ安定化 I g G 4 m A b が、非改変 I g G 4 に必要なものと比べてより還元条件下であるにもかかわらず F a b - アーム交換を受け得るという観察と一致している (L a b r i j n e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . 2 7 : 7 6 7 - 7 1 (2 0 0 9) ; S t u b e n r a u c h e t a l . , D r u g M e t a b . D i s p o s . 3 8 (1) : 8 4 - 9 1 (2 0 1 0)) 。加えて、これらの結果は、半 m A b 形成及び還元に対する安定性は全ての場合で相関関係を示さないことを示す。I g G 4 m A b は、I g G 1 と比べて還元に対して安定であったが、I g G 1 は、比較的低レベルの半 m A b を形成した。図 2

の結果を、様々なm A bタイプがチオレドキシン系により還元された際に形成されるこれらのm A bタイプの主要な中間体種を示す図3に示す。

【0057】

実施例2：ヒンジ変異により、半m A b形成が防止され、且つ還元に対する安定性が上昇する

I g G 1、I g G 2、及びI g G 4の重鎖ヒンジ配列を比較した（表1）。I g G 1 m A b及びI g G 2 m A bは両方とも、228位でプロリンを含み、I g G 4 m A bは、セリンを含む。S 228 P変異は、F a b－アーム交換を防止するために産業全体で広く使用されており、従って評価に含めた。

【0058】

【表1】

表1. EUナンバリングを使用する、IgG1抗体、IgG2抗体、及びIgG4抗体のヒンジ領域のアミノ酸配列比較。評価する変異の位置を、太字テキストで示す。

位置	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
IgG1 HC (配列番号 5)	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
IgG2 HC (配列番号 6)	V	E	R	K	C	C	-	-	-	V	E	C	P	P	C	P
IgG4 HC (配列番号 7)	V	E	S	K	Y	G	-	-	-	P	P	C	P	S	C	P

【0059】

I g G 2 m A bのヒンジ配列に基づく2種の追加の新規変異を同定した。I g G 1 m A b、I g G 2 m A b、及びI g G 4 m A bは、226位及び229位でジスルフィド結合を含み、I g G 2は、219位及び220位で追加のジスルフィド結合を含む。I g G 2 m A bは、還元に対して最も安定であり、これは、I g G 1 m A b及びI g G 4 m A bの場合の2つのみのヒンジジスルフィド結合と比較してヒンジ領域中の4つのジスルフィド結合に少なくとも部分的に起因すると仮定した。配列アラインメント（表1）に基づいて、Y 219 C変異及びG 220 C変異をI g G 4で評価し、これらの変異のそれぞれが、ヒンジ領域中の重鎖間に追加のジスルフィド結合を追加した。

【0060】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. EU ナンバリングを使用する IgG4 抗体のヒンジ領域のアミノ酸配列。変異の位置を、太字テキストで示す。

位置(EU ナンバリング)	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
IgG4 HC 非改変 (配列番号 7)	V	E	S	K	Y	G	-	-	-	P	P	C	P	S	C	P
IgG4 HC Y219C (配列番号 1)	V	E	S	K	C	G	-	-	-	P	P	C	P	S	C	P
IgG4 HC G220C (配列番号 2)	V	E	S	K	Y	C	-	-	-	P	P	C	P	S	C	P
IgG4 HC S228P (配列番号 8)	V	E	S	K	Y	G	-	-	-	P	P	C	P	P	C	P
IgG4 HC Y219C + S228P (配列番号 9)	V	E	S	K	C	G	-	-	-	P	P	C	P	P	C	P
IgG4 HC G220C + S228P (配列番号 10)	V	E	S	K	Y	C	-	-	-	P	P	C	P	P	C	P
IgG4 HC Y219C + G220C (配列番号 3)	V	E	S	K	C	C	-	-	-	P	P	C	P	S	C	P
IgG4 HC Y219C + G220C + S228P (配列番号 4)	V	E	S	K	C	C	-	-	-	P	P	C	P	P	C	P

10

20

30

【0061】

IgG4のセット (IgG4、IgG4-Y219C、IgG4-G220C、及びIgG4-S228P) の相対的安定性を、チオレドキシン系による還元に対して調べた (図4)。図4の結果を、一次指数関数的崩壊モデルにフィットさせて、各mAbの半減期を算出した。mAbの半減期は、チオレドキシン系による還元に対するmAbの安定性を表し、ヒンジ変異を有するIgG4と非改変IgG4との半減期の比較により、安定性の相対的改善が示される (表3)。

40

【0062】

50

【表 3】

表 3. IgG4 の相対的安定性を、図 4 の結果を一次指数関数的崩壊にフィットさせて各 mAb の半減期を決定することにより評価した。

IgG4 ヒンジ領域の変異	50%減少(分)	倍数改善
非改変	12.3	NA
Y219C	15.9	1.3
G220C	27.5	2.2
S228P	37.3	3.0
Y219C+S228P	44.0	3.6
G220C+S228P	59.0	4.8
Y219C+G220C	32.1	2.6
Y219C+G220C+S228P	83.9	6.8
IgG1 λ	3.2	0.3
IgG2 λ	41.7	3.4

10

20

【0063】

この結果は、Y219C 変異による安定性の改善は最小限だけであったが、G220C 変異及び S228P 変異はそれぞれ、還元に対する安定性が 2 倍及び 3 倍を超えて上昇することを示す。次に、これら 4 種の mAb が還元された際に形成される中間体種を評価して、形成される半 mAb の量に差があるかどうかを決定した。先の結果（図 2）と一致して、非改変 IgG4 及び IgG4-S228P は両方とも、チオレドキシン系により還元された際に主に半 mAb を形成した。興味深いことに、野生型 IgG4 と比較すると、Y219C 変異は半 mAb 形成をほぼ排除し、G220C 変異は半 mAb の量を減少させた。要約すると、Y219C 変異は、還元に対する安定性の上昇が最小限だけであったが半 mAb 形成をほぼ排除し、G220C 変異は、還元に対する mAb の安定性を上昇させ、且つ半 mAb 形成を減少させ、S228P 変異は、還元に対する mAb の安定性を上昇させ、且つ形成される半 mAb の量に影響を及ぼさなかった。

30

【0064】

実施例 3：ヒンジ変異の効果は相加的である

ヒンジ変異の組合せを評価して、個々の変異の有益な効果が、同一分子中で組み合わされた場合に相加的であるかどうかを決定した。

【0065】

評価した第 1 の二重変異体は、Y219C 変異及び S228P 変異の両方を含んだ。個別に、Y219C 変異は、半 mAb 形成を防止し、且つ還元に対する安定性の上昇が最小限であり、S228P 変異は、形成される半 mAb の量を変化させることなく還元に対する安定性を上昇させた。IgG4-Y219C+S228P は、還元に対する安定性を顕著に改善し（図 4、表 3）、且つ非改変 IgG4 と比較した場合に半 mAb 形成を減少させた（図 5）。重要なことに、IgG4-Y219C+S228P は、IgG4-S228P mAb と比較した場合に還元に対する安定性をわずかに改善し、且つ IgG4-Y219C と比較して同等の半 mAb 形成であった。これらの結果は、これらの変異の効果が相加的であることを示しており、S228P 変異を含む IgG4 への Y219C 変異の追加により、半 mAb 形成もほぼ排除されつつ、還元に対する mAb の安定性がわずかに上昇した。

40

【0066】

評価した第 2 の二重変異体は、G220C 変異及び S228P 変異の両方を含んだ。個

50

別に、G 2 2 0 C 変異は、還元に対する安定性を上昇させ、且つ半 m A b 形成を減少させ、S 2 2 8 P 変異は、形成される半 m A b の量を変化させることなく還元に対する安定性を上昇させた。I g G 4 - G 2 2 0 C + S 2 2 8 P は、還元に対する安定性を顕著に改善し（図 4、表 3）、且つ非改変 I g G 4 と比較して半 m A b 形成を減少させた（図 5）。重要なことに、I g G 4 - G 2 2 0 C + S 2 2 8 P は、G 2 2 0 C I g G 4 又は S 2 2 8 P I g G 4 のいずれかの単独と比べて還元に対する安定性が高かった。加えて、I g G 4 - G 2 2 0 C + S 2 2 8 P は、I g G 4 - G 2 2 0 C で観察したように、半 m A b 形成を減少させた。これらの結果は、変異の効果が相加的であるというさらなる証拠を提供し、G 2 2 0 C 変異により、還元に対する安定性が上昇し、且つ半 m A b 形成が減少し、S 2 2 8 P 変異により、還元に対する安定性が上昇する。

10

【 0 0 6 7 】

評価した最後の二重変異体は、Y 2 1 9 C 変異及び G 2 2 0 C 変異の両方を含んだ。個別に、Y 2 1 9 C 変異は、半 m A b 形成を防止し、且つ還元に対する安定性の上昇が最小限であり、G 2 2 0 C 変異は、還元に対する安定性を上昇させ、且つ半 m A b 形成を減少させた。I g G 4 - Y 2 1 9 C + G 2 2 0 C は、還元に対する安定性を顕著に改善し（図 4、表 3）、且つ非改変 I g G 4 と比較して半 m A b 形成を減少させた（図 5）。I g G 4 - Y 2 1 9 C + G 2 2 0 C は、I g G 4 - G 2 2 0 C と比較した場合に還元に対する安定性を改善したが、形成された半 m A b の量も I g G 4 - G 2 2 0 C と同程度であった。この場合には、G 2 2 0 C m A b に対する Y 2 1 9 C 変異の追加により、安定性がわずかに改善されたが、半 m A b 形成のさらなる減少を観察しなかった。この分子のインタクト質量分析により、予想される 4 つではなく 2 つのジスルフィド結合のみがヒンジ領域中で形成されていることが明らかとなった（表 4、表 5、図 7 A ~ 7 H）。

20

【 0 0 6 8 】

【表 4】

表 4. ヒンジジスルフィド結合の数、還元に対する相対的安定性、及び半 mAb 形成に対する各変異の効果の概要。

IgG4 ヒンジ領域の変異	追加のヒンジ ジスルフィド 結合	還元に対する 安定性の 上昇	半 mAb 形成の減少	Fab-アーム 交換の減少
Y219C	1	±	+++	++
G220C	1	+	++	+++
S228P	0	+	-	+
Y219C+S228P	1	+	+++	+++
G220C+S228P	1	++	++	+++
Y219C+G220C	0	++	+	++
Y219C+G220C+S228P	2	+++	+++	+++

30

40

【 0 0 6 9 】

50

【表 5】

表 5. ヒンジ領域変異を有する IgG4 mAb 及び有しない IgG4 mAb のインタクト質量分析の概要。

IgG4 ヒンジ領域の変異	ピーク ID	追加のヒンジジスルフィド結合	予想される質量(Da)	検出された質量(Da)	精度 (ppm)	Da
WT	GOF	0	147378.5	147379.6	-7.5	-1.1
S228P	GOF	0	147398.6	147398.7	-0.7	-0.1
G220C	GOF	1	147468.7	147468.0	4.7	0.7
Y219C	GOF	1	147256.4	147255.9	3.4	0.5
Y219C + G220C	GOF	0	147346.6	147350.9	-2.0	-0.3
Y219C + S228P	GOF	1	147276.5	147276.4	0.7	0.1
G220C + S228P	GOF	1	147488.7	147488.2	3.4	0.5
Y219C + G220C + S228P	GOF	2	147366.7	147367.1	-2.7	-0.4

10

20

【0070】

評価した最後の mAb は、3 種全ての変異を含んだ。IgG4-Y219C+G220C+S228P は、還元に対する全体的な安定性が最高であり（図 4、表 3）、半 mAb もほとんど形成されなかった（図 5）。この mAb の 3 種の変異の効果は相加的であったが、IgG4-Y219C+G220C という二重変異の場合には、効果は相加的ではなかった。三重変異 mAb のインタクト質量分析により、4 つ全てのヒンジジスルフィド結合が形成されていることが示された。この試験での全ての mAb は、IgG4-Y219C+G220C を除いて、意図した数のヒンジジスルフィド結合を有していた（表 4、表 4、図 7）。S228P 変異を有する IgG4 mAb のこれまでの分析から、安定性の

30

40

【0071】

実施例 4：ヒンジ変異は、抗原結合、FcRn 結合、又は Fc エフェクター機能に影響を及ぼさない

評価した 3 種の変異は全て、ヒンジ領域中に存在しており、従って、抗原結合に影響を及ぼさないと予想される。しかしながら、IgG4 のヒンジ領域中の追加のジスルフィド結合が mAb のコンフォメーションを変化させて抗原結合を損なう可能性がある。そのため、ELISA アッセイにおいて、ヒンジ領域の変異を有する 7 種全ての mAb に関する抗原結合を、非改変 IgG4 と比較した図 6A に示すように、7 種全ての mAb は、非改変 IgG4 と同様の抗原結合を示した。この結果は、これらの変異が、抗原結合に影響を及ぼすことなく IgG4 に組み込まれ得ることを示す。

【0072】

新生児 Fc 受容体（FcRn）への結合により、血清半減期が長い IgG が得られ、毎月又はさらに少ない頻度の投与が可能となる（Pyzik et al., J. Immunol. 194: 4595-603 (2015)）。FcRn 結合部位は、CH3 ドメインと CH2 ドメインとの間の重鎖上に存在しており、従って、ヒンジ変異による影響を受

50

けないと予想された。しかしながら、治療用mAbの有効性へのFcRn結合の重要性に起因して、ヒンジ変異がFcRn結合を阻害しないことを示すことが重要であった。図6Bの結果が示すように、ヒンジ変異を有するIgG4は全て、非改変IgG4と同様にFcRnに結合する。この結果は、ヒンジ変異がインビトロでのFcRn結合を減少させないことを示す。加えて、Fab部分が変化していないことから、ヒンジ変異は、非改変IgG4と比較した場合に薬物動態に悪影響を及ぼす可能性が低い。

【0073】

ヒンジ改変がADCC活性を増加させる可能性が低いことを確認するために、RcγRIIIa結合を評価した。図6Cの結果は、本試験で評価した全てのIgG4に関してFcγRIIIa結合がごくわずかであることを示す。そのため、図6に示す結果は、ヒンジ変異がインビボでのFcエフェクター機能に影響を及ぼす可能性が低いことを示す。

10

【0074】

実施例5：ヒンジ変異はFab-アーム交換を減少させる

各IgG4 mAbのFab-アーム交換を、下記の様々な酸化還元条件下で評価した：(1)酸化；(2)弱酸化；及び(3)還元。酸化条件を、酸化型グルタチオン(GSSG)を使用して作り出した。弱酸化条件を、1：1の比の酸化型グルタチオン及び還元型グルタチオン(GSSG：GSH)を使用して作り出した。還元条件を、還元型グルタチオン(GSH)を使用して作り出した。各IgG4を別々に、様々な酸化還元条件下で非改変IgG4と共にインキュベートした。Fab-アーム交換を、キャピラリー電気泳動を使用して総タンパク質の割合としてハイブリッドmAb形成の量を定量することにより測定し(図9A)、質量分析を使用して確認した(図9C)。

20

【0075】

図9Aの結果は、ヒンジ変異を有する全てのIgG4 mAbが、非改変IgG4と比較してFab-アーム交換が顕著に減少したことを示す。IgG4-Y219C mAbは、弱還元条件下では低レベルのFab-アーム交換を示しており、このレベルは、より還元的なGSH条件下では上昇した。IgG4-G220C mAbは、全ての酸化還元条件下で検出不能なレベルのFab-アーム交換を示した。IgG4-S228P mAbは、酸化条件及び弱参加条件下で検出不能なレベルのFab-アーム交換を示したが、より還元的なGSH条件下では、中程度のレベルのFab-アーム交換を示した。S228P変異を有する別のIgG4(S228P-2)を比較のために含めており、同様の結果が得られた。

30

【0076】

さらに、ヒンジ変異の組合せは、Fab-アーム交換の減少において相加効果を示した。IgG4-Y219C+S228P mAbは、IgG4-S228P mAbと比較して還元に対する安定性のわずかな上昇を示しており、且つIgG4-Y219C mAb又はIgG4-S228P mAbのいずれかの単独と比べてFab-アーム交換が少なかった。IgG4-G220C+S228P mAbは、IgG4-G220C mAbと一致して、全ての酸化還元条件にわたりFab-アーム交換が検出不能なレベルであった。IgG4-Y219C+G220C mAbは、酸化条件及び弱酸化条件下でFab-アーム交換が検出不能であったが、最も還元的な条件下でのFab-アーム交換のレベルは、同一条件下でIgG4-Y219C mAbにより観察されたレベルと同程度であった。IgG4-Y219C+G220C+S228P mAbは、還元に対する最高の安定性を示しており、且つ全ての酸化還元条件にわたりFab-アーム交換が検出不能であった。これらの結果は、ヒンジ変異の効果がFab-アーム交換の量の減少において相加的であることを示す。

40

【図面】
【図 1】

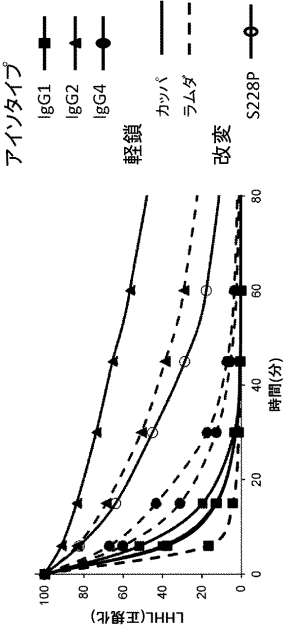
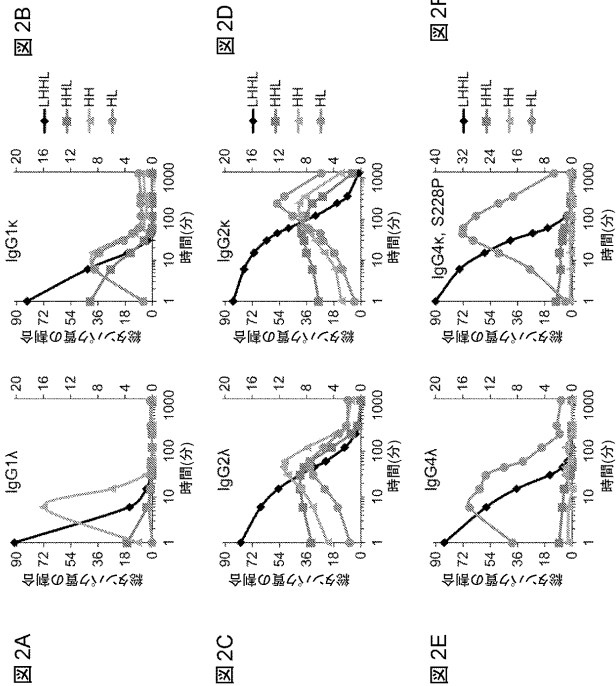


図 1

【図 2 A - 2 F】



10

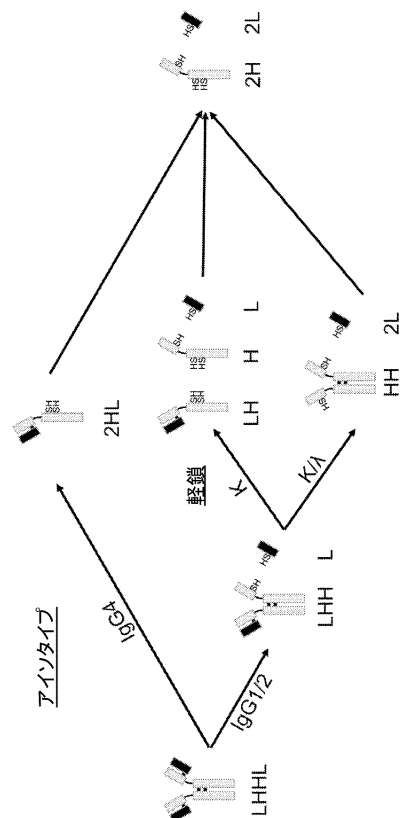
20

30

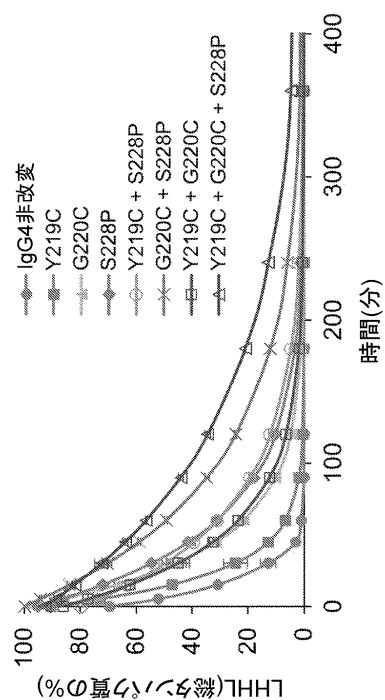
40

50

【図 3】

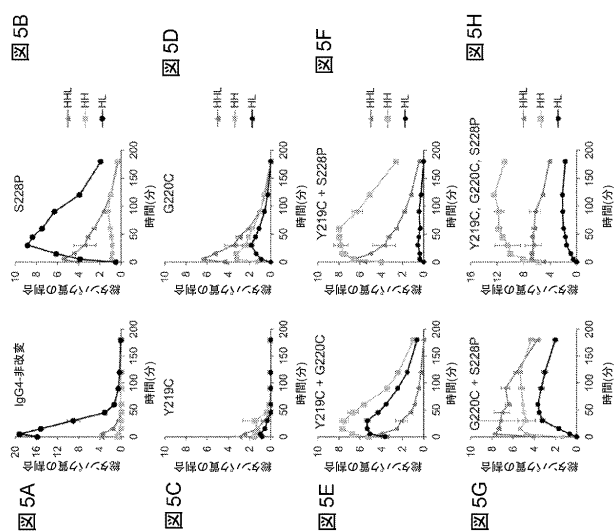


【図 4】

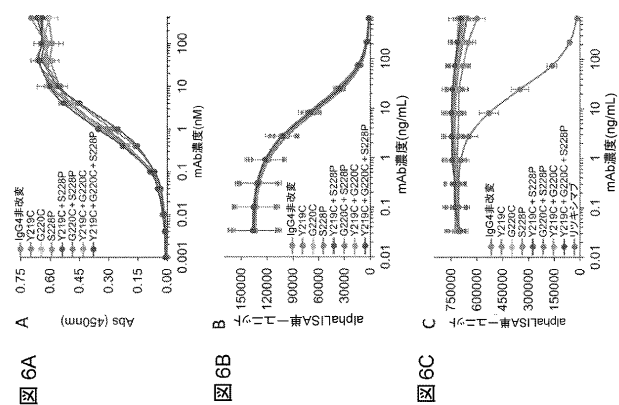


☒ 4

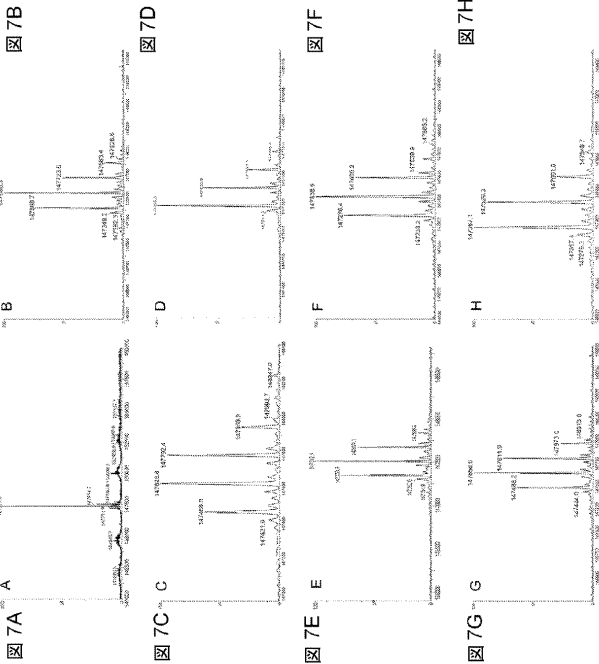
【図 5 A - 5 H】



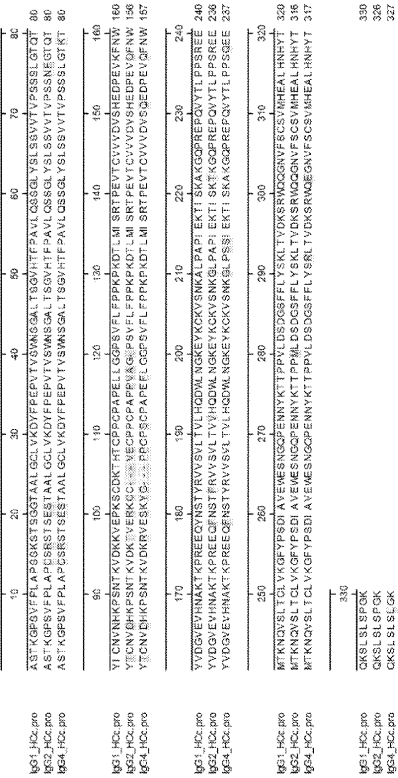
【圖 6 A - 6 C】



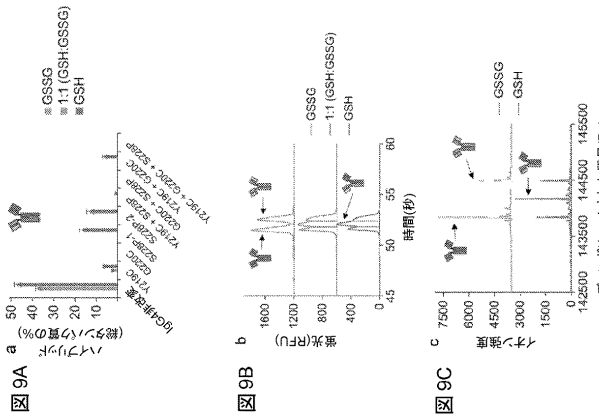
【図 7 A - 7 H】



【図 8】



【図 9 A - 9 C】



【配列表】

2023519602000001.app

図 8

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2021/052589
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; C07H 21/04; C07K 16/00; C12P 21/00; C12P 21/02; C12P 21/08 (2021.01) CPC - C07K 16/00; C07K 2317/52; C07K 2317/522; C07K 2317/53; C07K 2317/92 (2021.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) see Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched see Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) see Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0202937 A1 (UCB BIOPHARMA SPRL) 04 July 2019 (04.07.2019) entire document	1-6, 9-11
A	WO 2013/124450 A1 (UCB PHARMA S.A.) 29 August 2013 (29.08.2013) entire document	1-6, 9-11
A	US 2015/0017169 A1 (UCB PHARMA S.A.) 15 January 2015 (15.01.2015) entire document	1-6, 9-11
A	US 2019/0225708 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 25 July 2019 (25.07.2019) entire document	1-6, 9-11
P, A	HANDLOGTEN et al. "Prevention of Fab-arm exchange and antibody reduction via stabilization of the IgG4 hinge region," MABS, 07 July 2020 (07.07.2020), Vol. 12, No. 1, Pgs. 1-11. entire document	1-6, 9-11
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 June 2021		Date of mailing of the international search report JUL 08 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/052589

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-11 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/052589

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7, 8, 12-47
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 47/55 (2017.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/18 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)
A 6 1 P 1/02 (2006.01)
A 6 1 P 11/02 (2006.01)
A 6 1 P 11/04 (2006.01)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)
A 6 1 P 13/02 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 25/16 (2006.01)
A 6 1 P 21/00 (2006.01)
A 6 1 P 25/08 (2006.01)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)
A 6 1 P 25/14 (2006.01)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 21/04 (2006.01)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/06 (2006.01)
A 6 1 P 7/02 (2006.01)
A 6 1 P 3/00 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)
A 6 1 P 31/00 (2006.01)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 47/55
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 11/04
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 13/02
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/14
A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 43/00
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 21/04
A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 9/06
A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/12
C 1 2 P 21/08

N
L

1 0 5
1 0 1

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、ワン・メディミューン・ウェイ、メ
ディミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

(72)発明者 アフジャ, サンジープ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、ワン・メディミューン・ウェイ、メ
ディミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

(72)発明者 ペン, リ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、ワン・メディミューン・ウェイ、メ
ディミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01

4B065 AA90Y AB04 CA25 CA44

4C076 CC01 CC04 CC07 CC09 CC10 CC11 CC15 CC16 CC17 CC18

CC20 CC21 CC26 CC27 CC31 CC32 CC35 EE41 EE59 FF34

4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA021 ZA061 ZA151 ZA161 ZA341 ZA361 ZA541

ZA591 ZA661 ZA671 ZA681 ZA701 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB081

ZB111 ZB151 ZB211 ZB261 ZB321 ZB331 ZB351 ZC211 ZC331 ZC351 ZC541

4C085 AA14 AA16 AA25 BB36 CC23 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA05 BA10 CA40 DA76 EA20 EA65

FA72 FA74 GA26