

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6022444号
(P6022444)

(45) 発行日 平成28年11月9日 (2016. 11. 9)

(24) 登録日 平成28年10月14日 (2016. 10. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A C

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

請求項の数 16 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-511236 (P2013-511236)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月13日 (2011. 5. 13)
 (65) 公表番号 特表2013-529084 (P2013-529084A)
 (43) 公表日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/036419
 (87) 国際公開番号 W02011/143545
 (87) 国際公開日 平成23年11月17日 (2011. 11. 17)
 審査請求日 平成26年5月8日 (2014. 5. 8)
 (31) 優先権主張番号 61/485, 097
 (32) 優先日 平成23年5月11日 (2011. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/345, 047
 (32) 優先日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505129415
 ライナット ニューロサイエンス コーポ
 レーション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, イ
 ー, グランド アベニュー 230
 (74) 代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚
 (72) 発明者 ウェイシェン ホー
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州 サウス・サンフランシスコ市 イ
 ースト・グランド・アヴェニュー 230
 ライナット・ニューロサイエンス・コー
 ポレーション内

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘテロ二量体タンパク質ならびにそれを生産および精製するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

共に相互作用して二量体ヒンジ境界を形成する第1の免疫グロブリン様ヒンジポリペ
 チドおよび第2の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含むヒンジ領域を含むヘテロ二
 量体タンパク質であって、

ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用が、2つの第1の
 ヒンジポリペプチド間または2つの第2のヒンジポリペプチド間の相互作用よりも第1の
 ヒンジポリペプチドと第2のヒンジポリペプチドとの間の相互作用に有利であり、それ
 によってホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成を促進し、

ヒンジ領域がヒト IgG ヒンジ領域であり、

第1のヒンジポリペプチドが、野生型ヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸修飾
 を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドが、第1のヒンジポリペプチドにおけるア
 ミノ酸修飾と同一の位置で、野生型 IgG ヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸
 修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドにおける野生型アミノ酸が、第1のヒ
 ンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸修飾と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換え
 られており、

かつ、第1のヒンジポリペプチドに融合した第1の CH3 ポリペプチドおよび第2のヒン
 ジポリペプチドに融合した第2の CH3 ポリペプチドを含む免疫グロブリン様 CH3 領域
 をさらに含み、

第1の CH3 ポリペプチドが、野生型 IgG 1 または IgG 2 の CH3 領域配列において

10

20

少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、かつ第2のCH3ポリペプチドが、野生型IgG1またはIgG2のCH3領域配列において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、

ここでヒンジ領域およびCH3領域におけるアミノ酸修飾が、

(1) IgG1の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり；IgG1の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの228位ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKababのEUNアンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではなく、または

(2) IgG2の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり；IgG2の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの225位および228位、ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKababのEUNアンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではない、

ヘテロ二量体タンパク質。

【請求項2】

抗体、マキシボディ、モノボディ、ペプチボディ、およびFc融合タンパク質からなる群から選択される、請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質。

【請求項3】

単一特異的な一価の、二重特異的な一価の、または二重特異的な二価の抗体である、請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質。

【請求項4】

請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質を発現する細胞系。

【請求項5】

請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質および担体を含む医薬組成物。

【請求項6】

癌を治療するための、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

ヘテロ二量体タンパク質を生産する方法であって、ヘテロ二量体タンパク質が、免疫グロブリン様ヒンジ領域を含む第1のポリペプチドおよび免疫グロブリン様ヒンジ領域を含む第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドのヒンジ領域および第2のポリペプチドのヒンジ領域が、共に相互作用してヒンジ境界を形成し、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸が、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利であり、

ヒンジ領域がヒトIgGヒンジ領域であり、

第1のヒンジポリペプチドが、野生型ヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドが、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾と同一の位置で、野生型IgGヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドにおける野生型アミノ酸が、第1のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸修飾と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられており、かつ、

10

20

30

40

50

第1のヒンジポリペプチドに融合した第1のCH3ポリペプチドおよび第2のヒンジポリペプチドに融合した第2のCH3ポリペプチドを含む免疫グロブリン様CH3領域をさらに含み、

第1のCH3ポリペプチドが、野生型IgG1またはIgG2のCH3領域配列において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、かつ第2のCH3ポリペプチドが、野生型IgG1またはIgG2のCH3領域配列において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、

ここでヒンジ領域およびCH3領域におけるアミノ酸修飾が、

(1) IgG1の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり；IgG1の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの228位ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKabatatのEUナンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではなく、または

(2) IgG2の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり；IgG2の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの225位および228位、ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKabatatのEUナンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではなく、

前記方法が、

a) 第1のポリペプチドをコードする核酸および第2のポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養するステップであって、培養された宿主細胞が第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを発現するステップ、および

b) 宿主細胞培養物からヘテロ二量体タンパク質を回収するステップを含む方法。

【請求項8】

ヘテロ二量体タンパク質を生産する方法であって、ヘテロ二量体タンパク質が、免疫グロブリン様ヒンジ領域を含む第1のポリペプチドおよび免疫グロブリン様ヒンジ領域を含む第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドのヒンジ領域および第2のポリペプチドのヒンジ領域が、共に相互作用して、ヘテロ二量体の形成を促進するように操作されたヒンジ境界を形成し、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸が、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利であり、

ヒンジ領域がヒトIgGヒンジ領域であり、

第1のヒンジポリペプチドが、野生型ヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドが、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾と同一の位置で、野生型IgGヒンジ領域において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドにおける野生型アミノ酸が、第1のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸修飾と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられており、かつ、

第1のヒンジポリペプチドに融合した第1のCH3ポリペプチドおよび第2のヒンジポリペプチドに融合した第2のCH3ポリペプチドを含む免疫グロブリン様CH3領域をさらに含み、

10

20

30

40

50

第1のCH3ポリペプチドが、野生型IgG1またはIgG2のCH3領域配列において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、かつ第2のCH3ポリペプチドが、野生型IgG1またはIgG2のCH3領域配列において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、

ここでヒンジ領域およびCH3領域におけるアミノ酸修飾が、

(1) IgG1の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり；IgG1の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Pro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG1の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Leu368GluまたはLys409Argであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの228位ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKabatのEUNナンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではなく、または

(2) IgG2の第1のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第1のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり；IgG2の第2のヒンジポリペプチドにおいて、Glu225ArgまたはGlu225、およびPro228ArgまたはPro228Gluであり、IgG2の第2のCH3ポリペプチドにおいて、Lys409ArgまたはLeu368Gluであり、ここで第1のヒンジポリペプチドの225位および228位、ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位（アミノ酸位置番号はいずれもKabatのEUNナンバリングスキームによる）のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではなく、

前記方法が、

a) 第1の宿主細胞において第1のポリペプチドを発現させるステップ、
b) 第2の宿主細胞において第2のポリペプチドを発現させるステップ、
c) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを単離するステップ、および
d) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを、二量体化に適した条件下でインキュベートして、ヘテロ二量体タンパク質を生産するステップを含む方法。

【請求項9】

ステップd)の条件が、ステップc)の2つのポリペプチドを還元剤とインキュベートすることである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

還元剤がグルタチオンである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質を精製する方法であって、精製がクロマトグラフィーステップを含む、方法。

【請求項12】

クロマトグラフィーステップがイオン交換クロマトグラフィーである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

完全長ヒト抗体であり、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインが、ヒト免疫エフェクター細胞上に位置する抗原に特異的に結合することによってヒト免疫エフェクター細胞の活性を動員することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第2の抗体可変ドメインが、標的抗原に特異的に結合することができる、請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質。

【請求項14】

第1のヒンジポリペプチドがGlu225およびPro228Gluを含み、第1のC

10

20

30

40

50

H3ポリペプチドがLeu368Gluを含み、第2のヒンジポリペプチドがGlu225ArgおよびPro228Argを含み、第2のCH3ポリペプチドがLys409Argを含む(アミノ酸位置番号はいずれもKabatatのEUNanバリングスキームによる)、請求項1に記載のヘテロ二量体蛋白質。

【請求項15】

I g G 2の第1のヒンジポリペプチドが、C y s 2 2 3 A r gまたはC y s 2 2 3 G l u、G l u 2 2 5 A r gまたはG l u 2 2 5、およびP r o 2 2 8 A r gまたはP r o 2 2 8 G l uを含み、I g G 2の第1のCH3ポリペプチドが、L y s 4 0 9 A r gまたはL e u 3 6 8 G l uを含み；I g G 2の第2のヒンジポリペプチドが、C y s 2 2 3 A r gまたはC y s 2 2 3 G l u、G l u 2 2 5 A r gまたはG l u 2 2 5、およびP r o 2 2 8 A r gまたはP r o 2 2 8 G l uを含み、I g G 2の第2のCH3ポリペプチドが、L y s 4 0 9 A r gまたはL e u 3 6 8 G l uを含み、ここで第1のヒンジポリペプチドの223位、225位および228位、ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位(アミノ酸位置番号はいずれもKabatatのEUNanバリングスキームによる)のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではない、請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質。

10

【請求項16】

I g G 1の第1のヒンジポリペプチドが、A s p 2 2 1 A r gまたはA s p 2 2 1 G l u、およびP r o 2 2 8 A r gまたはP r o 2 2 8 G l uを含み、I g G 1の第1のCH3ポリペプチドが、L e u 3 6 8 G l uまたはL y s 4 0 9 A r gを含み；I g G 1の第2のヒンジポリペプチドが、A s p 2 2 1 A r gまたはA s p 2 2 1 G l u、およびP r o 2 2 8 A r gまたはP r o 2 2 8 G l uを含み、I g G 1の第2のCH3ポリペプチドが、L e u 3 6 8 G l uまたはL y s 4 0 9 A r gを含み、ここで第1のヒンジポリペプチドの221位および228位、ならびに第1のCH3ポリペプチドの368位および409位(アミノ酸位置番号はいずれもKabatatのEUNanバリングスキームによる)のアミノ酸が、第2のヒンジポリペプチドおよびCH3ポリペプチドにおける対応するアミノ酸と同一ではない、請求項1に記載のヘテロ二量体タンパク質。

20

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2010年5月14日に出願された米国仮特許出願第61/345,047号および2011年5月11日に出願された米国仮特許出願第61/485,097号の利益を主張するものであり、これらは両方とも、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、操作されたヘテロ多量体タンパク質に、さらに具体的には、二重特異的抗体および免疫グロブリン様ヒンジ配列を含む他のヘテロ二量体タンパク質などのヘテロ二量体タンパク質を生産および精製するための方法に関する。このような操作されたヘテロ二量体タンパク質を生産および精製するための方法、ならびに診断および治療におけるそれらの使用もまた提供される。

40

【背景技術】

【0003】

抗体は、それにより治療分子として有用となる様々な特性を有する。高い特異性および選択性で細胞の内側または外側の分子標的に高い親和性で結合する能力に加えて、抗体は、その標的化された結合パートナーを、相補体誘導性経路およびADCC(抗体依存的細胞介在性細胞傷害性)に関連する活性などのエフェクター機能を介する、Fc受容体細胞介在性の食作用および死滅作用の影響を受けやすくさせる。

50

【0004】

さらに、抗体は、様々な手段で操作して、その治療的有用性をさらに増大させることができる。延長されたインビボでの半減期を有する抗体は、例えば、Fc融合分子を操作することによって、ポリエチレングリコール(PEG)などの生体適合性ポリマーで処理することによって、すなわち「ペグ化」によって、および当技術分野においてよく知られている他の操作方法によって、生産することができる。二重特異的抗体(BsAb)と呼ばれる、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する抗体もまた、操作されている。Nolan, O. および R. O' Kennedy (1990) *Biochim Biophys Acta* 1040(1): 1~11.; de Leij, L.ら、*Adv Drug Deliv Rev* 31(1~2): 105~129 (1998); ならびに Carter, P. J *Immunol Methods* 248(1~2): 7~15 (2001) を参照されたい。従来の抗体は、Y型分子の2つのアーム(Fab領域の抗原結合部位を含む)のそれぞれにおいて同一の配列を有するが、二重特異的抗体は、2つのFab領域のそれぞれにおいて異なる配列を有し、その結果、Y型分子のそれぞれのアームは、異なる抗原またはエピトープに結合する。

10

【0005】

2つの異なる抗原性分子または異なるエピトープに結合することができることによって、BsAbには、インビトロおよびインビボでの診断および免疫療法のための標的化物質としての広範な臨床用途がある。診断分野では、BsAbは、例えば、細胞表面分子の機能的特性、異なるFc受容体および細胞傷害性を仲介するその能力を研究するため(Fangerら、*Crit. Rev. Immunol.* 12: 101~124 (1992); Nolanら、*Biochem. Biophys. Acta* 1040: 1~11 (1990))、ならびに酵素および他の作用物質を固定して免疫診断および免疫アッセイの試薬および方法を得るために用いられている。

20

【0006】

二重特異的抗体はまた、癌を含む様々な病状をインビトロまたはインビボで診断するために用いることができる(Songssivilaiら、*Clin. Exp. Immunol.* 79: 315 (1990))。例えば、BsAbの一方のアームは、腫瘍関連抗原に結合するように操作することができ、他方のアームは、検出可能なマーカーに結合するように操作することができる。例えば、癌胎児性抗原(CEA)に結合した一方のアームとDPTAに結合したもう一方のアームとを有するBsAbが、結腸直腸癌および甲状腺癌の放射免疫検出のために用いられた、Le Doussalら、*J. Nucl. Med.* 34: 1662~1671 (1993) を参照されたい。また、放射免疫検出によってCEAを発現している結腸直腸癌を検出するための戦略を記載している、Stickneyら、*Cancer Res.* 51: 6650~6655 (1991) も参照されたい。

30

【0007】

癌の免疫療法のための二重特異的抗体の使用は概説されている(例えば、上記のNolanおよびO' Kennedy 1990; 上記のde Leijら(1998); ならびに上記のCarter, P. (2001) を参照されたい)。BsAbは、患者の細胞免疫防御機構を、腫瘍細胞または感染性病原体(例えば、HIVウイルスまたはインフルエンザウイルスなどのウイルスに感染した細胞; トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)などの原生動物)に特異的に向けるために用いることができる。特に、免疫調節された細胞傷害性を、BsAbの一方のアームを望ましい標的(例えば、腫瘍細胞または病原体)に結合するように操作し、BsAbの他方のアームをT細胞受容体またはFcガンマ受容体などの細胞傷害性誘発分子に結合するように操作する(それによって、下流の免疫エフェクター経路を活性化することによって、向け直すことができる。この戦略を用いて、FcガンマRIIIに結合するBsAbは、インビトロでナチュラルキラー(NK)細胞/大型顆粒リンパ球(LGL)細胞による腫瘍細胞死滅作用を仲介し、インビボで腫瘍の成長を阻害することが示されている(例えば、Segalら、*Chem. Immunol.* 47: 179 (1989); *Biologic Therapy o*

40

50

f Cancer 2 (4) DeVitaら編、J. B. Lippincott, Philadelphia (1992) p. 1. を参照されたい)。別の例において、FcガンマRIIIに結合する一方のアームとHER2受容体に結合するもう一方のアームとを有する二重特異的抗体が、HER2抗原を過剰発現する腫瘍を治療するために開発された(Hsieh-Maら、Cancer Research 52:6832~6839(1992); およびWeinerら、Cancer Research 53:94~100(1993))。また、抗p185(HER2)に結合した抗CD3を含む完全にヒト化されたF(ab')₂BsAbを用いてT細胞を標的化して、HER2受容体を過剰発現する腫瘍細胞を死滅させた、Shalabyら、J. Exp. Med. 175(1):217(1992)も参照されたい。

10

【0008】

二重特異的抗体の使用は、十分な量および純度でBsAbを得ることが困難であることによって遅れている。従来、BsAbは、ハイブリッドハイブリドーマ技術を用いて作製された(MillsteinおよびCuello、Nature 305:537~539(1983))。化学結合によってBsAbを作製するための方法がその後記載されている(例えば、Shalabyら、J. Exp. Med. 175:217~225(1992); Rodriguesら、Int. J. Cancers (Suppl.) 7:45~50(1992); Kostelnyら、J. Immunol. 148(5):1547~1553(1992)を参照されたい)。Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444~6448(1993)によって記載されたダイアボディ技術は、一本鎖Fv(sFv)二量体を利用して(例えば、Gruberら、J. Immunol. 152:5368(1994)を参照されたい)、BsAb断片を作製するための別の手順を提供している。

20

【0009】

多重特異的(例えば二重特異的)抗体のヘテロ多量体(例えばヘテロ二量体)を生産するために、ホモ多量体よりも所望のヘテロ多量体の形成に有利な方法を用いることが望ましい。Fcを含有するBsAbを得るための1つの方法は、依然として、2つの抗体が共発現するハイブリッドハイブリドーマ技術である(MillsteinおよびCuello、Nature 305:537~540(1983); Suresh, M. R.ら、Methods Enzymol 121:210~228(1986)を参照されたい)。しかし、これは収率および純度に関して不十分であることが多く、所望のヘテロ多量体はさらに精製することが困難であることが多い。ヘテロ多量体の形成に有利な他の技術が記載されており、これは、「ノブイントゥーホール」戦略と呼ばれる、CH3ドメイン境界にある多量体化ドメインにおける立体的に相補的な突然変異の操作を伴う(例えば、Ridgwayら、Protein Eng. 9:617~621(1996); Merchantら、Nat. Biotechnol. 16(7):677~81(1998)を参照されたい; また、米国特許第5,731,168号および米国特許第7,183,076号も参照されたい)。両CH3ドメインにおけるCH3-CH3境界を形成する1つまたは複数の残基を荷電アミノ酸で置き換えて、ヘテロ二量体の形成を促進することを伴う技術もまた、記載されている。WO2009/089004。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

組換え細胞培養物からのBsAbの直接的もしくは効率的な発現および回収を可能にする、かつ/または効率的な収率および純度で生産され得る、または当技術分野における二重特異的抗体と比較して増大した安定性を有するものなどの、二重特異的抗体断片および/または完全長のBsAbを操作するための新たな方法を見出すことが望ましいであろう。

【課題を解決するための手段】

【0011】

50

一態様において、本発明は、ヒンジ領域を含むヘテロ多量体（例えばヘテロ二量体）タンパク質を提供し、ここで、ヒンジ領域は、共に相互作用して二量体ヒンジ境界を形成する第1の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドおよび第2の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含み、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用は、2つの第1のヒンジポリペプチドの間または2つの第2のヒンジポリペプチドの間の相互作用よりも第1のヒンジポリペプチドと第2のヒンジポリペプチドとの間の相互作用に有利であり、それによってホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成を促進する。一部の実施形態において、ヒンジ領域は、I g G ヒンジ領域である。一部の実施形態において、ヒンジ領域は、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、またはI g G 4 ヒンジ領域である。一部の実施形態において、I g G ヒンジ領域は、ヒトI g G ヒンジ領域（例えば、ヒト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、またはI g G 4 ヒンジ領域）を含む。

10

【0012】

一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドは、野生型（WT）ヒンジ領域（例えばI g G ヒンジ領域）に対する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、ここで、野生型アミノ酸は、第2のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられている。

【0013】

一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドは、野生型ヒンジ領域（例えばI g G ヒンジ領域）において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、第2のヒンジポリペプチドは、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾に近接しているかまたはそれと同一の位置で、野生型ヒンジ領域（例えばI g G ヒンジ領域）において少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むものであり、ここで、第2のヒンジポリペプチドにおける野生型アミノ酸は、第1のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられている。一部の実施形態において、アミノ酸修飾は、荷電残基（例えば、L y s、A r g、H i s、G l u、およびA s p）または極性残基（例えば、S e rおよびT h r）であり得る。一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドはヒトI g G 1を含み、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾は、221および228からなる群から選択される位置にある。一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドはヒトI g G 2を含み、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾は、223、225、および228からなる群から選択される位置にある。一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドはヒトI g G 4を含み、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾は、228位にある。

20

30

【0014】

他の実施形態において、本発明のヘテロ二量体タンパク質はさらにC H 3領域を含み、C H 3領域は、共に相互作用してC H 3境界を形成する第1のC H 3ポリペプチドおよび第2のC H 3ポリペプチドを含み、C H 3境界内の1つまたは複数のアミノ酸は、ホモ二量体の形成を不安定化させ、かつホモ二量体の形成にとって静電的に不利ではない。

【0015】

一部の実施形態において、本発明のヘテロ多量体（例えばヘテロ二量体）タンパク質は、例えば、抗体、マキシボディ、モノボディ、ペプチボディ、およびF c融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、ヘテロ二量体タンパク質は、二重特異的抗体である。一部の実施形態において、ヘテロ二量体タンパク質は、単一特異的な一価、二重特異的な一価、または二重特異的な二価（例えば、単一特異的な一価抗体、二重特異的な一価抗体、または二重特異的な二価抗体）である。

40

【0016】

別の態様において、本発明は、第1の免疫グロブリン様F c領域と第2の免疫グロブリン様F c領域（例えば、ヒンジ領域および/またはC H 3領域）との間の境界を改変または操作することによって所望のヘテロ多量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質（例えば二重特異的抗体）の形成を増強するための戦略を提供する。一部の実施形態におい

50

て、ヒンジ境界を形成する１つまたは複数の残基は、荷電残基の間の静電氣的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電氣的に有利となるように、荷電残基で置き換えられている。さらなる実施形態において、ＣＨ３境界を形成する１つまたは複数の残基はさらに、ＣＨ３境界の間の相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成をさらに促進するように、荷電残基で置き換えられている。一部の実施形態において、操作されたＣＨ３境界は、ホモ二量体の形成を不安定化させる。一部の実施形態において、操作されたＣＨ３境界は、ホモ二量体の形成にとって静電氣的に不利ではない。一部の実施形態において、操作されたＣＨ３境界は、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に立体的に有利である。一部の実施形態において、操作されたＣＨ３境界は、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電氣的に有利である。

10

【 0 0 1 7 】

別の態様において、共に相互作用してＣＨ３境界を形成する第１のＣＨ３ポリペプチドおよび分離した第２のＣＨ３ポリペプチドを含む免疫グロブリン様ＣＨ３領域を含むヘテロ多量体（例えばヘテロ二量体）タンパク質が、本明細書において開示され、ここで、ＣＨ３境界内の１つまたは複数のアミノ酸は、ホモ二量体の形成を不安定化させ、かつホモ二量体の形成にとって静電氣的に不利ではない。一部の実施形態において、第１のＣＨ３ポリペプチドは、野生型ＣＨ３領域配列におけるアミノ酸修飾を含むものである。一部の実施形態において、第１のＣＨ３ポリペプチドはさらに、野生型ＣＨ３配列における第２のアミノ酸修飾を含むものである。一部の実施形態において、第１のＣＨ３ポリペプチドはさらに、野生型ＣＨ３配列における第３のアミノ酸修飾を含むものである。一部の実施形態において、第２のＣＨ３ポリペプチドは、野生型ＣＨ３領域配列におけるアミノ酸修飾を含むものである。一部の実施形態において、第２のＣＨ３ポリペプチドはさらに、野生型ＣＨ３領域配列における第２のアミノ酸修飾を含むものである。一部の実施形態において、第２のＣＨ３ポリペプチドはさらに、野生型ＣＨ３領域配列における第３のアミノ酸修飾を含むものである。

20

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態において、ＣＨ３領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ３領域である。一部の実施形態において、ＣＨ３領域は、ヒトＩｇＧのＣＨ３領域（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ３領域）を含む。

30

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態において、ＣＨ３ポリペプチドにおけるアミノ酸修飾は、３４９、３６８、４０５、および４０９からなる群から選択される位置にあるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、アミノ酸修飾は、Ｋ４０９Ｒ、Ｌ３６８Ｅ、およびＬ３６８Ｄからなる群から選択される。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態において、第１のＣＨ３ポリペプチドにおけるアミノ酸修飾はＫ４０９Ｒであり、第２のＣＨ３ポリペプチドにおけるアミノ酸修飾はＬ３６８ＥまたはＬ３６８Ｄである。

【 0 0 2 1 】

別の態様において、本発明はまた、a) 第１のポリペプチドをコードする核酸分子および第２のポリペプチドをコードする核酸分子を含む宿主細胞を培養するステップ（第１のポリペプチドおよび第２のポリペプチドは同一の核酸分子または１つもしくは複数の異なる核酸分子から発現される）であって、培養された宿主細胞が第１のポリペプチドおよび第２のポリペプチドを発現するステップ、およびb) 任意選択で、宿主細胞培養物からヘテロ二量体タンパク質を回収するステップを含む、本発明のヘテロ多量体（例えばヘテロ二量体）タンパク質を生産する方法を提供する。

40

【 0 0 2 2 】

別の態様において、本発明はまた、a) 第１の宿主細胞において第１のポリペプチドを発現させるステップ、b) 第２の宿主細胞において第２のポリペプチドを発現させるステ

50

ップ、c)任意選択で、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを単離するステップ、およびd)2つのポリペプチドを、二量体化に適した条件下で(例えば、例えばグルタチオンなどの還元剤を用いて)インキュベートして、ヘテロ二量体タンパク質を生産するステップを含む、本発明のヘテロ多量体(例えばヘテロ二量体)タンパク質を生産する方法を提供する。

【0023】

別の態様において、本発明は、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利な1つまたは複数のFc領域(例えば、ヒンジ領域および/またはCH3領域)を含むヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供する。

【0024】

別の態様において、本発明はまた、免疫グロブリン様Fc領域を含むヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供し、精製は、Fc領域における静電的相互作用の違いに基づく少なくとも1つのステップを含む。本発明の方法によって精製することができるヘテロ二量体タンパク質は、免疫グロブリン様ヒンジ領域および/または定常領域(例えば、CH2領域またはCH3領域)を含み得る。

【0025】

一部の実施形態において、本方法は、ヒンジ領域における静電的相互作用の違いに基づく少なくとも1つのステップを含む。一部の実施形態において、本方法は、定常領域における静電的相互作用の違いに基づく少なくとも1つのステップを含む。一部の実施形態において、定常領域は、重鎖定常領域、すなわちCH2領域またはCH3領域であり得る。一部の実施形態において、本方法は、クロマトグラフィーステップ(例えばイオン交換クロマトグラフィー)を含む。

【0026】

別の態様において、本発明は、本発明のヘテロ多量体(例えばヘテロ二量体)タンパク質の生産に関連するポリペプチド、核酸、ベクター、および宿主細胞を提供する。本発明はまた、本発明のヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体タンパク質を含む医薬組成物/製剤、ならびにこのような組成物の使用方法を提供する。

【0027】

別の態様において、対象における状態、障害、または疾患を治療する方法が提供され、本方法は、本発明のヘテロ多量体(例えばヘテロ二量体)タンパク質を含む効果的な量の医薬組成物を対象に投与するステップを含む。

【0028】

別の態様において、本発明はまた、免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、ここで、ヒンジポリペプチドは、野生型免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドに対する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、前記ポリペプチドは、野生型免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含むポリペプチドと比較して、第2のポリペプチドとヘテロ二量体タンパク質を形成する能力が増大している。

【0029】

別の態様において、本発明はまた、CH3ポリペプチドを含むポリペプチドを提供し、ここで、CH3ポリペプチドは、野生型CH3ポリペプチドに対する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、前記ポリペプチドは、野生型CH3ヒンジポリペプチドを含むポリペプチドと比較して、第2のポリペプチドとヘテロ二量体タンパク質を形成する能力が増大している。一部の実施形態において、アミノ酸修飾は、K409R、L368E、およびL368Dからなる群から選択される。

【0030】

本発明の別の態様において、本明細書において記載されるヘテロ二量体タンパク質(例えば二重特異的抗体)は、完全長ヒト抗体を含み、ここで、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインは、ヒト免疫エフェクター細胞上に位置するエフェクター抗原に特異的に結合することによってヒト免疫エフェクター細胞の活性を動員することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第2の抗体可変ドメインは、標的抗原に特異的に結合することが

10

20

30

40

50

できる。一部の実施形態において、ヒト抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 アイソタイプを有する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】ヘテロ二量体タンパク質を説明するために、本明細書によって用いられる命名法を説明するための、典型的な抗体突然変異体を示す図である。

【図2】ヒトI g G 2 A F c領域配列（配列番号1）を示す図である。

【図3】p C i . D b . 3 x F L A G（またはH A）. A b 1 . h F c 1ベクターについてのベクターマップを示す図である。

【図4】ヒトI g G 1野生型F c領域配列（配列番号11）を示す図である。

10

【図5】ヒトI g G 4野生型F c領域配列（配列番号12）を示す図である。

【図6A】ヒトI g G 1、I g G 2、およびI g G 4ヒンジ領域のアラインメントを示す図である。

【図6B】ヒトI g G 4突然変異体およびI g G 1突然変異体の表である。

【図6C】ヒトI g G 2突然変異体の表である。

【図7A】I g G 4突然変異体からの二重特異的抗体の形成の分析を示す図である。

【図7B】I g G 4突然変異体からの二重特異的抗体の形成の分析を示す図である。

【図8A】I g G 2突然変異体からの二重特異的抗体の形成の分析を示す図である。

【図8B】I g G 2突然変異体からの二重特異的抗体の形成の分析を示す図である。

【図9A】K 4 0 9 RバックグラウンドにおけるI g G 2ヒンジ突然変異についてのスクリーニングの結果を示す図である。

20

【図9B】K 4 0 9 RバックグラウンドにおけるI g G 2ヒンジ突然変異についてのスクリーニングの結果を示す図である。

【図10】ヒトI g G 4、I g G 2、およびI g G 1のC H 3領域のアラインメントを示す図である。

【図11A】様々なヒトI g G 4突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

【図11B】様々なヒトI g G 4突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

【図12A】様々なヒトI g G 2突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

30

【図12B】様々なヒトI g G 2突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

【図13A】ヒンジ領域とC H 3領域との両方における突然変異がヒトI g G 2突然変異体のヘテロ二量体/二重特異的抗体の形成にとって重要であることを示す図である。

【図13B】ヒンジ領域とC H 3領域との両方における突然変異がヒトI g G 2突然変異体のヘテロ二量体/二重特異的抗体の形成にとって重要であることを示す図である。

【図14A】様々なヒトI g G 1突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

【図14B】様々なヒトI g G 1突然変異体に対する「G l u」スキンの結果を示す図である。

40

【図15A】異なるI g Gアイソタイプの間の二重特異的抗体の形成の比較を示す図である。

【図15B】異なるI g Gアイソタイプの間の二重特異的抗体の形成の比較を示す図である。

【図16A】h I g G 1突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。破線は、ヒンジ領域に2 2 1 R突然変異および2 2 8 R突然変異を有し重鎖のC H 3ドメインに4 0 9 R突然変異を有するA b 1抗体を表す。

【図16B】h I g G 1突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。点線は、ヒンジに2 2 1 E突然変異および2 2 8 E突然変異を有しC H 3ドメインに3 6 8 E

50

を有する A b 2 h I g G 1 抗体を表す。

【図 1 6 C】h I g G 1 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 1 変異体および A b 2 変異体を 1 m M のグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成される A b 1 - A b 2 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図 1 7 A】h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。点線は、ヒンジに 2 2 3 E 突然変異、2 2 5 E 突然変異、および 2 2 8 E 突然変異を有し C H 3 ドメインに 3 6 8 E を有する A b 2 h I g G 1 抗体を表す。

【図 1 7 B】h I g G 1 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。破線は、ヒンジ領域に 2 2 3 R 突然変異、2 2 5 R 突然変異、および 2 2 8 R 突然変異を有し重鎖の C H 3 ドメインに 4 0 9 R 突然変異を有する A b 1 抗体を表す。

【図 1 7 C】h I g G 1 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 1 変異体および A b 2 変異体を 2 m M のグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成される A b 1 - A b 2 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図 1 8 A】h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。ヒンジ突然変異を、図 1 7 A ~ 1 7 C において示される構築物に対して交換し、総電荷差が少ない 2 つの抗体を生じさせた。ヒンジ突然変異と異なる可変ドメインとを対にすることは、二重特異的抗体の形成に対して影響しなかった。点線は、ヒンジに 2 2 3 R 突然変異、2 2 5 R 突然変異、および 2 2 8 R 突然変異を有し C H 3 ドメインに 3 6 8 E を有する A b 2 h I g G 1 抗体を表す。

【図 1 8 B】h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。ヒンジ突然変異を、図 1 7 A ~ 1 7 C において示される構築物に対して交換し、総電荷差が少ない 2 つの抗体を生じさせた。ヒンジ突然変異と異なる可変ドメインとを対にすることは、二重特異的抗体の形成に対して影響しなかった。破線は、ヒンジ領域に 2 2 3 E 突然変異、2 2 5 E 突然変異、および 2 2 8 E 突然変異を有し重鎖の C H 3 ドメインに 4 0 9 R 突然変異を有する A b 1 抗体を表す。

【図 1 8 C】h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。ヒンジ突然変異を、図 1 7 A ~ 1 7 C において示される構築物に対して交換し、総電荷差が少ない 2 つの抗体を生じさせた。ヒンジ突然変異と異なる可変ドメインとを対にすることは、二重特異的抗体の形成に対して影響しなかった。実線は、A b 1 変異体および A b 2 変異体を 2 m M のグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成される A b 1 - A b 2 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図 1 9 A】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。破線は、A b 2 軽鎖と共に発現した、重鎖に 2 2 3 R 突然変異、2 2 5 R 突然変異、2 2 8 R 突然変異、および 4 0 9 R 突然変異を有する対照 A b 1 抗体を表す。

【図 1 9 B】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。点線は、2 2 3 E 突然変異、2 2 5 E 突然変異、2 2 8 E 突然変異、および 3 6 8 E 突然変異を有する対照抗体 A b 2 h I g G 2 を表す。

【図 1 9 C】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。二点鎖線は、h I g G 2 . R R R . K 4 0 9 R . A b 1 重鎖および h I g G 2 . E E E . L 3 6 8 E . A b 2 重鎖と A b 2 軽鎖とを共発現させることによって形成される二重特異的抗体のイオン交換クロマトグラフィーのトレースを表す。

【図 1 9 D】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。実線は、A b 2 軽鎖を有する精製された A b 1 (2 2 3 R 、 2 2 5 R 、 2 2 8 R 、 および 4 0 9 R) 重鎖および A b 2 (2 2 3 E 、 2 2 5 E 、 2 2 8 E 、 および 3 6 8 E) を 2 m M のグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成される A b 1 - A b 2 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図 2 0 A】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生

10

20

30

40

50

産することを示す図である。点線は、221E突然変異、228E突然変異、および368E突然変異を有する対照抗体Ab2 hIgG1を表す。

【図20B】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。破線は、Ab2軽鎖と共に共発現した、重鎖に221R突然変異、228R突然変異、および409R突然変異を有する対照Ab1抗体を表す。

【図20C】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。二点鎖線は、hIgG1・RR・K409R・Ab1重鎖およびhIgG1・EE・L368E・Ab2重鎖とAb2軽鎖とを共発現させることによって形成される二重特異的抗体のイオン交換クロマトグラフィーのトレースを表す。

【図20D】修飾されたヒンジポリペプチドと軽鎖配列との共発現が二重特異的抗体を生産することを示す図である。実線は、Ab2軽鎖を有する精製されたAb1(221R、228R、および409R)重鎖およびAb2(221E、228E、および368E)を1mMのグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成されるAb1 - Ab2二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図21A】本発明の方法が、可変ドメインの正体に依存せず、したがって広く適用可能であることを示す図である。点線は、ヒンジに221E突然変異および228E突然変異を有しCH3ドメインに368Eを有するAb3 hIgG1抗体を表す。

【図21B】本発明の方法が、可変ドメインの正体に依存せず、したがって広く適用可能であることを示す図である。破線は、ヒンジ領域に221R突然変異および228R突然変異を有し重鎖のCH3ドメインに409R突然変異を有するAb4抗体を表す。

【図21C】本発明の方法が、可変ドメインの正体に依存せず、したがって広く適用可能であることを示す図である。実線は、Ab4変異体およびAb3変異体を1mMのグルタチオンと共にインキュベーションした後に形成されるAb4 - Ab3二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

【図22A】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いてIgG1(221E、228E、および368E)突然変異体からIgG1突然変異体(221R、228R、および409R)を分離し得ることを示す図である。これらの2つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。点線は、ヒンジに221E突然変異および228E突然変異を有しCH3ドメインに368Eを有するAb4 hIgG1抗体を表す。

【図22B】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いてIgG1(221E、228E、および368E)突然変異体からIgG1突然変異体(221R、228R、および409R)を分離し得ることを示す図である。これらの2つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。破線は、ヒンジ領域に221R突然変異および228R突然変異を有し重鎖のCH3ドメインに409R突然変異を有するAb4抗体を表す。

【図22C】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いてIgG1(221E、228E、および368E)突然変異体からIgG1突然変異体(221R、228R、および409R)を分離し得ることを示す図である。これらの2つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。実線は、ヘテロ二量体hIgG1・RR・K409R・Ab4・Ab4/hIgG1・EE・L368E・Ab4・Ab4の溶出プロファイルを表す。

【図23A】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いてIgG1(221E、228E、および368E)突然変異体からIgG1突然変異体(221R、228R、および409R)を分離し得ることの別の例を示す図である。これらの2つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。点線は、ヒンジに221E突然変異および228E突然変異を有しCH3ドメインに368Eを有するAb3 hIgG1抗体を表す。

【図23B】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いてIgG1(221E、228E、および368E)突然変異体からIgG1突然変異体(2

10

20

30

40

50

2 1 R、2 2 8 R、および 4 0 9 R) を分離し得ることの別の例を示す図である。これらの 2 つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。破線は、ヒンジ領域に 2 2 1 R 突然変異および 2 2 8 R 突然変異を有し重鎖の C H 3 ドメインに 4 0 9 R 突然変異を有する A b 3 抗体を表す。

【図 2 3 C】可変ドメインが同一であっても、イオン交換クロマトグラフィーを用いて I g G 1 (2 2 1 E、2 2 8 E、および 3 6 8 E) 突然変異体から I g G 1 突然変異体 (2 2 1 R、2 2 8 R、および 4 0 9 R) を分離し得ることの別の例を示す図である。これらの 2 つの変異体のヘテロ二量体もまた、イオン交換クロマトグラフィーを用いてホモ二量体から分離することができる。実線は、ヘテロ二量体 h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3 の溶出プロファイルを表す。

10

【図 2 4 A】示された突然変異体 (B) についての二重特異的抗体の形成の比較 (A) を示す図である。

【図 2 4 B】示された突然変異体 (B) についての二重特異的抗体の形成の比較 (A) を示す図である。

【図 2 5 A】同様に、示された突然変異体 (B) についての二重特異的抗体の形成の比較 (A) を示す図である。

【図 2 5 B】同様に、示された突然変異体 (B) についての二重特異的抗体の形成の比較 (A) を示す図である。

【図 2 6 A】h I g G 1 突然変異体および h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 2 変異体および A b 1 変異体をグルタチオン (h I g G 1 では 1 m M、h I g G 2 では 2 m M) と共にインキュベーションした後に形成される A b 2 - A b 1 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。C H 3 のみの突然変異は、野生型 h I g G 1 と比較して約 1 2 % の I g G 1 のヘテロ二量体タンパク質の形成 (K 4 0 9 R および L 3 6 8 E での突然変異) をもたらした。

20

【図 2 6 B】h I g G 1 突然変異体および h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 2 変異体および A b 1 変異体をグルタチオン (h I g G 1 では 1 m M、h I g G 2 では 2 m M) と共にインキュベーションした後に形成される A b 2 - A b 1 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。C H 3 のみの突然変異は、野生型 h I g G 1 と比較して約 1 3 % の I g G 2 のヘテロ二量体タンパク質の形成 (K 4 0 9 R および L 3 6 8 E での突然変異) をもたらした。

30

【図 2 6 C】h I g G 1 突然変異体および h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 2 変異体および A b 1 変異体をグルタチオン (h I g G 1 では 1 m M、h I g G 2 では 2 m M) と共にインキュベーションした後に形成される A b 2 - A b 1 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。ヒンジ突然変異 (D 2 2 1 R、P 2 2 8 R、D 2 2 1 E、および P 2 2 8 E での突然変異) と C H 3 突然変異 (K 4 0 9 R および L 3 6 8 E での突然変異) との両方の組み合わせは、野生型 h I g G 1 と比較して約 9 0 % の I g G 1 ヘテロ二量体タンパク質の形成をもたらした。

【図 2 6 D】h I g G 1 突然変異体および h I g G 2 突然変異体のイオン交換溶出プロファイルを示す図である。実線は、A b 2 変異体および A b 1 変異体をグルタチオン (h I g G 1 では 1 m M、h I g G 2 では 2 m M) と共にインキュベーションした後に形成される A b 2 - A b 1 二重特異的抗体反応生成物の溶出プロファイルを表す。

40

【図 2 7】野生型 h I g G 1 抗体 (A b 5 および A b 6) について、親突然変異体単一特異的抗体 (h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 6 . A b 6 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 6 . A b 6) について、および二重特異的抗体 ((h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 5 . A b 5 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 6 . A b 6) についての示差走査熱量測定プロファイルを示す図である。

【図 2 8 A】二重特異的抗体の、アミン結合した (抗原 A) - h F c に対する結合、および「サンドイッチ」分析物 (または抗原) のパネルに対する結合を示すセンサーグラムを示す図である。

50

【図 28B】二重特異的抗体のアミン結合した（抗原 D）- h F c に対する結合、および「サンドイッチ」分析物（または抗原）のパネルに対する結合を示すセンサーグラムを示す図である。

【図 29】単一特異的および二重特異的な A b 3 および A b 4 による成長阻害を、C a l 27 細胞（上部のパネル）および F a D u 細胞（下部のパネル）においてアッセイしたことを示す図である。A b 3 . b i F c（バツ印）は、親突然変異抗体である（h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3）。A b 3 - A b 4 二重特異的抗体（白抜きの四角）は、二重特異的突然変異抗体である（h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4）。A b 3 / n c . b i F c（白抜きの丸）は、一方のアームに陰性対照抗体（A b 6）を有する一価の A b 3 である（h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6）。A b 3 . h I g G 1（黒い菱形）は、h I g G 1 における野生型二価 A b 3 である（A b 3 . 野生型 h I g G 1）。A b 4 . h I g G 1（白抜きの三角）は、h I g G 1 における野生型二価 A b 4 である（A b 4 . 野生型 h I g G 1）。A b 4 n c . b i F c（白抜きの菱形）は、一方のアームに陰性対照抗体（A b 6）を有する一価の A b 4 である（h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6）。「n c」は、陰性対照抗体を示す。

【図 30】C a l 27 細胞において測定された一価で二重特異的な A b 3 抗体および A b 4 抗体の解離速度定数を示す図である。二重特異的 A b 3 / A b 4 抗体（白抜きの四角）は、二重特異的突然変異抗体である（h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4）。A b 4 / n c . b i F c（バツ印）は、一方のアームに陰性対照（非特異的）抗体（A b 6）を有する一価の A b 4 である（h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6）。A b 3 / n c . b i F c（白抜きの三角）は、一方のアームに陰性対照抗体（A b 6）を有する一価の A b 3 である（h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6）。実線および点線は、単一指数方程式に適合されている。

【図 31A】ヘテロ二量体タンパク質（二重特異的な E p C A M / C D 3 抗体（（図において「h G 2 - E p C A M - C D 3」として表される））の、腫瘍細胞（S W 480）を死滅させる能力が、インビトロで細胞傷害性 T 細胞によって仲介されたことを示す図である。E / T は、エフェクター細胞と標的細胞との間の比率を示す。

【図 31B】ヘテロ二量体タンパク質（二重特異的な E p C A M / C D 3 抗体（（図において「h G 2 - E p C A M - C D 3」として表される））の、腫瘍細胞（S W 480）を死滅させる能力が、インビトロで細胞傷害性 T 細胞によって仲介されたことを示す図である。E / T は、エフェクター細胞と標的細胞との間の比率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明は、ヘテロ多量体複合体分子、さらに具体的には、例えば二重特異的抗体などの少なくとも 1 つの免疫グロブリン様ヒンジ領域を含むヘテロ二量体タンパク質を生成するための方法、組成物、キット、および製品を提供する。本発明は、実用的な収率および望ましい純度でヘテロ多量体複合体分子を作製および精製する方法を提供する。本発明は、多重特異的な性質であり高度に安定な分子の使用が望ましくかつ / または必要とされる、様々な障害または病理学的状態の診断および / または治療に用いることができる複合体分子の効率的な生産を可能にする。本発明の方法、組成物、キット、および製品の詳細は、本明細書において提供される。

【0033】

全体的な技術および定義

本明細書において別段の規定がない限り、本発明に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有する。さらに、文脈により別

段の定めがない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。全体として、本明細書において記載される細胞培養および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質化学および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して用いられる命名と、これらの技術とは、当技術分野においてよく知られており、一般的に用いられている。

【0034】

本発明の方法および技術は、別段の指示がない限り、全体として、当技術分野においてよく知られている従来の方法に従って、かつ本明細書の全体にわたり引用および議論される様々な一般的な参考文献およびさらに具体的な参考文献において記載されているように、実施される。例えば、Sambrook J. および Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); ならびに Coliganら、Short Protocols in Protein Science、Wiley, John & Sons, Inc. (2003) を参照されたい。酵素反応および精製技術は、当技術分野において一般に行われるように、または本明細書において記載されるように、製造者の仕様に従って行われる。本明細書において記載される分子生物学、生化学、免疫学、分析化学、合成有機化学、ならびに医化学および薬化学に関連して用いられる命名と、これらの実験手順および技術とは、当技術分野においてよく知られており、一般的に用いられている。本明細書および特許請求の範囲の全体を通して、「含む (comprise)」という単語または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」などの変型は、言及された整数または整数群を含むことを含意するがいかなる他の整数または整数群も排除するものではないことが理解される。

【0035】

「抗体」は、その可変領域内に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して糖質、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に特異的に結合し得る、免疫グロブリン分子である。本明細書において用いられる場合、文脈によって別段の指示がない限り、この用語は、無傷のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけではなく、その断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv など)、サメ抗体およびラクダ抗体を含む一本鎖抗体 (ScFv) およびドメイン抗体)、ならびに抗体部分を含む融合タンパク質、多価抗体、多重特異的抗体 (例えば、所望の生物学的活性を示す限りの二重特異的抗体) および本明細書において記載される抗体断片、そして抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子のあらゆる他の修飾された立体構造、例えば、限定はしないが、ミニボディ、マキシボディ、ナノボディ、ペプチボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR、および bis-scFv を含むことを意図する (例えば、Hollinger および Hudson、Nature Biotech 23 (9): 1126 ~ 1136 (2005) を参照されたい)。抗体には、IgG、IgA、またはIgMなどのあらゆるクラス (またはそのサブクラス) の抗体が含まれ、抗体は、いずれかの特定のクラスのものである必要はない。抗体の重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、これらのいくつかは、さらにサブクラス (アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2に分けることができる。異なるクラスの免疫グロブ

リンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置はよく知られている。

【0036】

「抗原断片」は、無傷抗体の一部分のみを含み、ここで、前記部分は、無傷抗体内に存在する場合の前記部分と通常関連している機能の少なくとも1つ、好ましくはほとんどまたは全てを好ましくは保持している。

【0037】

本願における残基の指定は、KabatのEUナンバリングスキームに基づく(Kabatら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、National Institutes of Health、Bethesda, Md.、第5版)。

【0038】

「二価抗体」は、分子(例えばIgG)当たり2つの抗原結合部位を含む。一部の場合において、2つの結合部位は同一の抗原特異性を有する。しかし、二価抗体は二重特異的であり得る(以下を参照されたい)。

【0039】

「一価抗体」は、分子(例えばIgG)当たり1つの抗原結合部位を含む。一部の場合において、一価抗体は2つ以上の抗原結合部位を有し得るが、結合部位は異なる抗原に由来する。

【0040】

「多重特異的抗体」は、2つ以上の抗原またはエピトープを標的化するものである。「二重特異的(bispecific)」、「二重特異的(dual-specific)」、または「二機能性」抗体は、2つの異なる抗原結合部位を有するハイブリッド抗体である。二重特異的抗体は、多重特異的抗体の一種であり、限定はしないが、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の結合を含む、様々な方法によって生産することができる。例えば、SongsivilaiおよびLachmann(1990)、Clin. Exp. Immunol. 79:315~321;ならびにKostelnyら、(1992)、J. Immunol. 148:1547~1553を参照されたい。二重特異的抗体の2つの結合部位は、同一のまたは異なるタンパク質標的上に存在し得る2つの異なるエピトープに結合する。

【0041】

表現「抗原結合アーム」、「標的分子結合アーム」、およびその変型は、本明細書において用いられる場合、目的の標的分子を特異的に結合する能力を有する本発明の抗体の構成部分を言う。通常、および好ましくは、抗原結合アームは、免疫グロブリンポリペプチド配列の複合体、例えば、免疫グロブリン軽鎖および重鎖のCDR配列および/または可変ドメイン配列である。

【0042】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において用いられる場合、ほぼ均質な抗体の集団から得られる抗体を言い、すなわち、集団を構成する個別の抗体は、微量で存在し得る考えられる天然の突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対するものである。さらに、異なる抗原決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に対するものである。

【0043】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、一部の実施形態において、所望の生物学的活性を示す限りの、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体における対応する配列に同一または相同であるが、鎖(単数または複数)の残りが、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体における対応する配列に同一または相同である、「

10

20

30

40

50

キメラ」抗体、およびこのような抗体の断片が具体的に含まれ得る（米国特許第4,816,567号、およびMorrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851~6855(1984)）。

【0044】

「ヒト化された」形態の非ヒト（例えばマウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域の残基によって置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部の場
10
合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体は、さらに、レシピエント抗体またはドナー抗体において見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに高めるために行われる。通常、ヒト化抗体は、全てまたはほぼ全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、かつ全てまたはほぼ全てのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインのほぼ全てを含む。ヒト化抗体はまた、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分を含んでいてよい。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 321:522~525(1986); Riechmannら、Nature 332:323~329(1988); およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593~596(1992)を参照されたい。また、以下の総説およびそれ
20
において引用される参考文献も参照されたい：VaswaniおよびHamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105~115(1998); Harris、Biochem. Soc. Transactions 23:1035~1038(1995); HurlleおよびGross、Curr. Op. Biotech. 5:428~433(1994)。

【0045】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する、かつ/または本明細書において開示されるヒト抗体を作製するための技術のいずれかを用いて作製されたものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に排除する。
30

【0046】

本明細書において用いられる場合、用語「イムノアドヘシン」は、異種タンパク質（「アドヘシン」、例えば、受容体、リガンド、または酵素）の「結合ドメイン」と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター構成要素とを組み合わせる、抗体様分子または免疫グロブリン様分子を指す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位（抗原組み合わせ部位）以外の（すなわち「異種の」）、所望の結合特異性を有するアドヘシンのアミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合体を含む。イムノアドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4サブタイプ、IgA、IgE、IgD、またはIgMなどのあらゆる免疫グロブリンから得ることができる。
40

【0047】

「ヘテロ多量体」、「ヘテロ多量体複合体」、または「ヘテロ多量体ポリペプチド」は、少なくとも第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む分子であり、第2のポリペプチドは、アミノ酸配列が、少なくとも1アミノ酸残基、第1のポリペプチドと異なる。ヘテロ多量体は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドによって形成される「ヘテロ二量体」を含み得るか、または、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドに加えてポリペプチドが存在する、さらに高次の三次構造を形成し得る。

【0048】

「ヘテロ二量体」、「ヘテロ二量体タンパク質」、「ヘテロ二量体複合体」、または「ヘテロ多量体ポリペプチド」は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む分
50

子であり、第2のポリペプチドは、アミノ酸配列が、少なくとも1アミノ酸残基、第1のポリペプチドと異なる。

【0049】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さの、好ましくは比較的短い（例えば、10～100アミノ酸）のアミノ酸鎖を言うために、区別せずに用いられる。鎖は、線状または分枝鎖状であってよく、これは、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、かつ/または非アミノ酸によって中断されていてよい。この用語はまた、天然にまたは介入によって修飾されている、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば標識構成要素とのコンジュゲーションによって修飾されているアミノ酸鎖を含む。同様にこの定義に含まれるものは、例えば、アミノ酸の1つまたは複数の類似体（例えば、非天然アミノ酸などを含む）および当技術分野において知られている他の修飾を含むポリペプチドである。ポリペプチドが一本鎖または会合鎖として生じ得ることが理解される。

【0050】

用語「Fc領域」は、本明細書において用いられる場合、通常、免疫グロブリン重鎖のC末端ポリペプチド配列を含む二量体複合体を言い、ここで、C末端ポリペプチド配列は、無傷抗体のパパイン消化によって得ることができるものである。Fc領域は、非変性Fc配列または変異体Fc配列を含み得る。免疫グロブリンのFc配列は、通常、2つの定常ドメイン、すなわちCH2ドメインおよびCH3ドメインを含み、CH4ドメインを含んでいてもよい。用語「Fcポリペプチド」は、Fc領域を形成するポリペプチドの1つを言うために本明細書において用いられる。一部の実施形態において、Fcポリペプチドは、適切な免疫グロブリンから、例えば、様々なIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4サブタイプの少なくとも1つから、またはIgA、IgE、IgD、もしくはIgMから得ることができるか、またはこれに由来し得る。一部の実施形態において、Fcポリペプチドは、（通常はそのN末端に）野生型ヒンジ配列の一部または全てを含む。一部の実施形態において、Fcポリペプチドは、野生型ヒンジ配列を含まない。Fcポリペプチドは、非変性Fc配列または変異体Fc配列を含み得る。

【0051】

「Fc融合体」は、本明細書において用いられる場合、1つまたは複数のポリペプチドがFcポリペプチドに機能可能に連結しているタンパク質を意味する。Fc融合体は、免疫グロブリンのFc領域と、通常は任意のタンパク質、ポリペプチド、または低分子であり得る融合パートナーとを組み合わせる。事実上、あらゆるタンパク質または低分子は、Fcに結合してFc融合体を生成し得る。タンパク質融合パートナーには、限定はしないが、受容体の標的結合領域、接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、ケモカイン、または一部の他のタンパク質もしくはタンパク質ドメインが含まれ得る。低分子融合パートナーには、Fc融合体を治療標的に向ける任意の治療物質が含まれ得る。このような標的は、任意の分子、例えば、限定はしないが、疾患に関連する細胞外受容体であり得る。

【0052】

「ヒンジ領域」、「ヒンジ配列」、およびその変型には、本明細書において用いられる場合、当技術分野において知られている意味が含まれ、それは、例えば、Janewayら、Immunobiology: the immune system in health and disease (Elsevier Science Ltd., NY) (第4版、1999); Bloomら、Protein Science (1997)、6: 407～415; Humphreysら、J. Immunol. Methods (1997)、209: 193～202において説明されている。

【0053】

「免疫グロブリン様ヒンジ領域」、「免疫グロブリン様ヒンジ配列」、およびその変型は、本明細書において用いられる場合、免疫グロブリン様分子または抗体様分子（例えば、イムノアドヘシン）のヒンジ領域およびヒンジ配列を言う。一部の実施形態において、

免疫グロブリン様ヒンジ領域は、そのキメラ形態、例えば、キメラIgG1/2ヒンジ領域を含む、あらゆるIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4サブタイプから、またはIgA、IgE、IgD、もしくはIgMから得ることができるか、またはこれに由来し得る。

【0054】

用語「ベクター」は、本明細書において用いられる場合、自らが結合している別の核酸を輸送し得る核酸分子を言うことを意図する。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントをその中にライゲーションすることができる環状二本鎖DNAループを言う。別のタイプのベクターは、ファージベクターである。別のタイプのベクターは、その中でさらなるDNAセグメントをウイルスゲノム内にライゲーションすることができる、ウイルスベクターである。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム性の哺乳動物ベクター）における自律的な複製が可能である。他のベクター（例えば、非エピソーム性の哺乳動物ベクター）は、宿主細胞内に導入する際に宿主細胞のゲノム内に組み込むことができ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能可能に連結している遺伝子の発現を指示し得る。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または単純に「組換えベクター」）と呼ばれる。通常、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられるベクター形態であるため、区別せずに用いられ得る。

【0055】

本明細書において区別せずに用いることができる「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、単離可能な、ポリマー形態の少なくとも10塩基長のヌクレオチドまたはヌクレオチドを言う。この用語には、一本鎖形態および二本鎖形態が含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、および/もしくはそれらの類似体、または、DNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによってもしくは合成反応によってポリマー内に組み込まれ得る、任意の基質であり得る。

【0056】

ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびその類似体などの、修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前または後に行われ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断されていてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後に、標識とのコンジュゲーションなどによって、さらに修飾され得る。他のタイプの修飾には、例えば、「キャップ」、類似体での天然ヌクレオチドの1つまたは複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）および荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）でのヌクレオチド間修飾、例えばタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジンなど）などの懸垂部分を含有するヌクレオチド間修飾、インターカレーター（例えば、アクリジン、プソラレンなど）でのヌクレオチド間修飾、キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含有するヌクレオチド間修飾、アルキル化剤を含有するヌクレオチド間修飾、修飾された結合（例えば、アルファアノマー核酸など）でのヌクレオチド間修飾、ならびに未修飾形態のポリヌクレオチド（単数または複数）が含まれる。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、例えばホスホン酸基、リン酸基によって置き換えられ得るか、標準的な保護基によって保護され得るか、もしくはさらなるヌクレオチドへのさらなる結合を作るために活性化され得るか、または、固体もしくは半固体の担体にコンジュゲートされ得る。5'末端および3'末端のOHは、リン酸化され得るか、またはアミンもしくは1から20炭素原子の有機キャップ基部分で置換され得る。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドはまた、一般に当技術分野において知

られている類似の形態のリボース糖またはデオキシリボース糖を含有し得、これには、例えば、2'-O-メチルリボース、2'-O-アリルリボース、2'-フルオロリボース、または2'-アジドリボース、炭素環式の糖類似体、アルファアノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、および脱塩基ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。1つまたは複数のホスホジエステル結合は、代替的な結合基によって置き換えることができる。これらの代替的な結合基には、限定はしないが、ホスフェートが $P(O)S$ （「チオエート」）、 $P(S)S$ （「ジチオエート」）、 $(O)NR_2$ （「アミデート」）、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 、または CH_2 （「ホルムアセタール」）（式中、 R または R' のそれぞれは、独立して、 H であるか、または、エーテル（ $-O-$ ）結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、もしくはアラリジルを含有してよい、置換されたもしくは置換されていないアルキル（ $1 \sim 20C$ ）である）によって置き換えられている実施形態が含まれる。ポリヌクレオチド内の全ての結合が同一である必要はない。前述のことは、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0057】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において用いられる場合、通常、短い、通常は一本鎖の、通常は合成のポリヌクレオチドを言い、これは通常、約200ヌクレオチド未満の長さであるが、必ずしもそうではない。用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、相互排他的ではない。ポリヌクレオチドについての上記の記載は、オリゴヌクレオチドに等しくかつ完全に適用される。

【0058】

本明細書において用いられるヌクレオチド配列についての言及は、別段の特定がない限り、その相補体を含む。したがって、特定の配列を有する核酸への言及は、文脈によって別段の定義がない限り、その相補配列を有するその相補鎖を含むと理解される。

【0059】

「細胞」または「細胞系」には、本明細書において用いられる場合、本発明のヘテロ二量体タンパク質、ポリペプチド、または核酸を発現させるために用いることができる様々なタイプの細胞、例えば、原核細胞、真核細胞、哺乳動物細胞、ラット細胞、ヒト細胞が含まれる。

【0060】

用語「精製」およびその文法上の変型は、ポリペプチドおよび1つまたは複数の不純物を含有する混合物から少なくとも1つの不純物を完全にまたは部分的に除去し、それによって組成物におけるポリペプチドの純度レベルを向上させる（すなわち、組成物における不純物（単数または複数）の量（ppm）を減少させることによって）ことを意味するように用いられる。本発明によると、精製は、免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドまたは免疫グロブリン様ヒンジ領域および $CH3$ 領域のうちの1つまたは複数の静電気的狀態に基づいて分離する少なくとも1つの精製ステップを用いて行われる。一部の実施形態において、少なくとも1つの精製ステップは、イオン交換クロマトグラフィーを含むか、またはイオン交換クロマトグラフィーから本質的になる。

【0061】

用語「イオン交換」および「イオン交換クロマトグラフィー」は、目的のイオン化可能な溶質（例えば、混合物内の目的のタンパク質）が適切なpH条件および伝導性のもとで（例えば、共有結合による付着によって）固相イオン交換材料に結合している逆電荷のリガンドと相互作用して、その結果、目的の溶質が混合物内の溶質不純物または溶質汚染物質よりも多くまたは少なく荷電化合物と非特異的に相互作用するようになる、クロマトグラフィープロセスを言う。混合物内の汚染溶質は、イオン交換材料のカラムから洗浄され得るか、または樹脂に結合し得るか、または目的の溶質よりも速くもしくは遅く樹脂から除去され得る。「イオン交換クロマトグラフィー」には、具体的には、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、および混合モードクロマトグラフィー

10

20

30

40

50

ーが含まれる。

【0062】

「ブロック」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害するかまたは低減させる抗体である。「アゴニスト抗体」は、本明細書において用いられる場合、目的のポリペプチドの機能的活性の少なくとも1つを模倣する抗体である。

【0063】

用語「免疫エフェクター細胞」または「エフェクター細胞」は、本明細書において用いられる場合、標的細胞の生存能力に影響するように活性化され得る、ヒト免疫系における細胞の天然レパートリー内の細胞を言う。標的細胞の生存能力には、細胞の生存、増殖、および/または他の細胞と相互作用する能力が含まれる。

10

【0064】

本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体に向けられた実施形態を含む（および記載する）。例えば、「約X」と言及する記載には、「X」の記載が含まれる。数値範囲は、その範囲を規定する数値を含む。

【0065】

実施形態が「含む」という語を用いて本明細書において記載されている場合は常に、「からなる（consisting of）」および/または「から本質的になる（consisting essentially of）」という観点で記載されている他の類似の実施形態もまた提供されることが理解される。

20

【0066】

本発明の態様または実施形態がマーカッシュグループまたは選択肢の他のグルーピングの観点で記載されている場合、本発明は、列挙されるグループ全体をまとめて含むだけではなく、グループの各メンバーも個別に含み、メイングループの全ての考えられるサブグループも含み、また、グループメンバーの1つまたは複数が非存在のメイングループも含む。本発明はまた、特許請求の範囲に記載の発明におけるグループメンバーのいずれかの1つまたは複数を明確に排除することを想定する。

【0067】

別段の定義がない限り、本明細書において用いられる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。典型的な方法および材料が本明細書において記載されるが、本明細書において記載されるものに類似または同等の方法および材料もまた、本発明の実施または試験において用いることができる。本明細書において言及される全ての刊行物および他の参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。矛盾するケースでは、定義を含む、本明細書が優先される。多くの文献が本明細書において引用されるが、この引用は、これらの文献のいずれかが当技術分野における共通の一般知識の一部を形成することの承認を構成するものではない。本明細書および特許請求の範囲の全体を通して、「含む（comprise）」という語または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」などの変型は、言及された整数または整数群を含むことを含意するがいかなる他の整数または整数群も排除するものではないことが理解される。文脈により別段の定めがない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。材料、方法、および例は、例示的なものにすぎず、限定することを意図しない。

30

40

【0068】

ヘテロ多量体タンパク質

文脈により別段の指示がある場合を除き、用語「第1の」ポリペプチドおよび「第2の」ポリペプチドならびにその変型は、一般的な識別子にすぎず、本発明のヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体タンパク質の、特異的なまたは特定のポリペプチドまたは構成要素を同定すると考えられるものではない。

【0069】

一態様において、本発明は、ヒンジ領域を含むヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ

50

二量体タンパク質を提供し、ここで、ヒンジ領域は、共に相互作用して、ヘテロ二量体の形成を促進するように操作されたヒンジ境界を形成する、第1の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドおよび第2の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含み、すなわち、第1の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドおよび第2の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドは、第1の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドまたは第2の免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドが同様のヒンジ（すなわち、第1と第1、または第2と第2）ポリペプチドと相互作用してホモ二量体ヒンジ領域を形成するよりも速くかつ/または優れた親和性もしくは安定性で相互作用してヘテロ二量体ヒンジ領域を形成する傾向がある。本発明の一部の実施形態において、1つまたは複数の荷電アミノ酸は、それらがホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利となるようにヒンジ境界内の1つまたは複数の他のアミノ酸と相互作用するように、ヒンジ境界内で存在するかまたは操作されている。

10

【0070】

一部の実施形態において、ヒンジ領域は、IgG、IgA、IgE、IgD、またはIgMヒンジ領域である。一部の実施形態において、ヒンジ領域は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物のIgG領域である。一部の実施形態において、ヒンジ領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4ヒンジ領域、またはそのキメラ型である。

【0071】

本発明の一部の実施形態またはヘテロ二量体タンパク質において、第1のヒンジポリペプチドは、野生型IgGヒンジ領域に対する1つまたは複数のアミノ酸修飾を含み、ここで、野生型アミノ酸は、第2のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられている。本発明の一部の実施形態またはヘテロ二量体タンパク質において、第1のヒンジポリペプチドは、野生型IgGヒンジ領域に対する1つまたは複数のアミノ酸修飾を含み、第2のヒンジポリペプチドは、第1のヒンジポリペプチドにおけるアミノ酸修飾と近接しているか、並んでいるか、または同一の位置にある、野生型IgGヒンジ領域に対する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、ここで、第2のヒンジポリペプチドにおける野生型アミノ酸は、第1のヒンジポリペプチドにおける対応するアミノ酸と逆の電荷を有するアミノ酸で置き換えられている。当業者には容易に理解されるように、ヒンジポリペプチドは三次元構造を形成し、したがって、ヒンジ領域におけるアミノ酸は、必ずしも、帯電などによる非共有結合により「相互作用する」ために、ヒンジ領域における1つまたは複数の他のアミノ酸と近接するかまたは並ぶように線状配列で同一である必要も連続している必要もない。

20

30

【0072】

別の態様において、本発明はまた、ヒンジ領域およびCH3領域を含むヘテロ二量体タンパク質を提供する。一部の実施形態において、CH3領域は、ホモ二量体の形成を不安定化するようにおよびヘテロ二量体の形成を促進するように操作されている。一部の実施形態において、操作されたCH3領域は、ホモ二量体の形成にとって静電的に不利ではない。一部の実施形態において、ヒンジ領域およびCH3領域の両方は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利となるように操作されている。

【0073】

別の態様において、本発明はまた、ヒンジ領域を含むヘテロ多量体Fc融合タンパク質、例えばヘテロ二量体Fc融合タンパク質を提供し、ここで、ヒンジ領域は、遭遇して共に相互作用して、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の形成を促進するように操作されたヒンジ境界を形成する、第1の免疫グロブリンヒンジポリペプチドおよび第2の免疫グロブリンヒンジポリペプチドを含み、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸は、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の形成を静電的に促進する。ヘテロ二量体Fc融合タンパク質の例には、限定はしないが、二重特異的抗体、単一特異的抗体、および多重特異的抗体が含まれる。一部の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は抗体である。他の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は抗体ではない。

40

【0074】

別の態様において、本発明はまた、ヒンジ領域を含む二重特異的抗体を提供し、ここで

50

、ヒンジ領域は、遭遇して共に相互作用して、二重特異的抗体の形成を促進するように操作されたヒンジ境界を形成する、第1の免疫グロブリンヒンジポリペプチドおよび第2の免疫グロブリンヒンジポリペプチドを含み、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸は、二重特異的抗体の形成を静電的に促進する。

【0075】

別の態様において、本発明はまた、ヒンジ領域およびC H 3領域を含む二重特異的抗体またはFc融合ヘテロ二量体タンパク質を提供し、ここで、ヒンジ領域および/またはC H 3領域は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成に有利となるように操作されている。一部の実施形態において、ヒンジ領域は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利となるように操作されている。一部の実施形態において、操作されたC H 3領域は、ホモ二量体の形成にとって静電的に不利ではない。

10

【0076】

別の態様において、本発明はまた、ヒンジ領域およびC H 3領域を含む二重特異的抗体またはFc融合ヘテロ二量体タンパク質を提供し、ここで、C H 3領域は、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成に有利となるように操作されている。一部の実施形態において、操作されたC H 3領域は、ホモ二量体の形成にとって静電的に不利ではない。

【0077】

一部の実施形態において、本発明のヘテロ二量体タンパク質は、2つの抗体断片、例えばFcまたはFc融合ポリペプチドなどを含み得る。Fc融合ポリペプチドは、通常、異種ポリペプチド配列、例えば限定はしないが抗原結合ドメインなどに融合した、Fc配列（またはその断片）を含む。1つの典型的なFc融合ポリペプチドは、免疫グロブリンFc配列に融合した受容体細胞外ドメイン（ECD）（例えば、IgG2 Fcに融合したFit受容体ECD）である。

20

【0078】

一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、限定はしないが、ヒトIgG4、IgG2、またはIgG1ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、ヒンジ領域の任意の1つまたは複数の残基で生じる。一部の実施形態において、アミノ酸修飾（単数または複数）は、ヒンジ領域の216位、217位、218位、219位、220位、221位、222位、223位、224位、225位、226位、227位、228位、229位、および230位（Kabatのナンバリングスキーム）の1つまたは複数で生じる。

30

【0079】

一部の実施形態において、C H 3領域（例えば、限定はしないが、ヒトIgG4、IgG2、またはIgG1のC H 3領域）におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、C H 3領域の任意の1つまたは複数の残基で生じる。一部の実施形態において、アミノ酸修飾（単数または複数）は、C H 3領域の341位、342位、343位、344位、345位、346位、347位、348位、349位、350位、351位、352位、353位、354位、355位、356位、357位、358位、359位、360位、361位、362位、363位、364位、365位、366位、367位、368位、369位、370位、371位、372位、373位、374位、375位、376位、377位、378位、379位、380位、381位、382位、383位、384位、385位、386位、387位、388位、389位、390位、391位、392位、393位、394位、395位、396位、397位、398位、399位、400位、401位、402位、403位、404位、405位、406位、407位、408位、409位、410位、411位、412位、413位、414位、415位、416位、417位、418位、419位、420位、421位、422位、423位、424位、425位、426位、427位、428位、429位、430位、431位、432位、433位、434位、435位、436位、437位、438位、439位、440位、441位、442位、443位、444位、445位、446位、および447位（Kabatのナンバリングスキーム）の1つまたは複数で生じる。

40

50

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、ヒト I g G 1 ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、219、221、227、および228から選択される位置で生じる。一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、ヒト I g G 1 ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、221および228から選択される位置で生じる。一部の実施形態において、C H 3 領域（例えば、ヒト I g G 1 の C H 3 領域）におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、349、368、405、および409から選択される位置で生じる。一部の実施形態において、C H 3 領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）には、K 4 0 9 R、L 3 6 8 D、および / または L 3 6 8 E が含まれる。一部の実施形態において、アミノ酸修飾は、ヒンジ領域における221位および228位（例えば、（D 2 2 1 R または D 2 2 1 E）および（P 2 2 8 R または P 2 2 8 E））ならびにヒト I g G 1 の C H 3 領域における409位または368位（例えば、K 4 0 9 R または L 3 6 8 E）で生じる。

10

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、ヒト I g G 2 ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾は、222、223、225、227、および228から選択される位置にある。一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、ヒト I g G 2 ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾は、223、225、および228から選択される位置にある。一部の実施形態において、C H 3 領域（例えば、ヒト I g G 2 の C H 3 領域）におけるアミノ酸修飾は、349、368、405、および409から選択される位置にある。一部の実施形態において、C H 3 領域（例えば、ヒト I g G 2 の C H 3 領域）におけるアミノ酸修飾は、368および409から選択される位置にある。一部の実施形態において、C H 3 領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）には、K 4 0 9 R、L 3 6 8 D、および / または L 3 6 8 E が含まれる。一部の実施形態において、アミノ酸修飾は、ヒンジ領域における223位、225位、および228位（例えば、（C 2 2 3 E または C 2 2 3 R）、（E 2 2 5 E または E 2 2 5 R）、および（P 2 2 8 E または P 2 2 8 R））ならびにヒト I g G 2 の C H 3 領域における409位または368位（例えば、K 4 0 9 R または L 3 6 8 E）で生じる。

20

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態において、ヒンジ領域（例えば、ヒト I g G 4 ヒンジ領域）におけるアミノ酸修飾は、217および228から選択される位置にある。一部の実施形態において、ヒンジ領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）には、228位での修飾が含まれる。

30

【 0 0 8 3 】

別の態様において、本発明はまた、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利となるように操作されたヒンジ領域を含むポリペプチドを提供する。一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインを含む。一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、F c 領域（例えば、ヒンジ領域、またはヒンジ領域およびC H 3 領域）における1つまたは複数の修飾されたアミノ酸を含み、これは、ヘテロ二量体の形成を静電的に促進し得る。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、C H 3 領域に修飾を含まない。一部の実施形態において、F c 配列の一部（しかし全てではない）は、本発明の抗体に存在しない。これらの実施形態の一部において、存在しないF c 配列は、C H 2 ドメインおよび / またはC H 3 ドメインの少なくとも一部であり、一部のケースでは全てである。

40

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態において、ヘテロ二量体のヒンジ領域および / またはC H 3 領域は、表1の1～67行目において示される置換の組み合わせのいずれかを含む。一部の実施形態において、第1のヒンジポリペプチドおよび / またはC H 3 ポリペプチドは、表1において示される置換の組み合わせのいずれかを含む。一部の実施形態において、第2のヒンジポリペプチドおよび / またはC H 3 ポリペプチドは、表1において示される置換の組み合

50

わせのいずれかを含む。表 1 において、位置は太字で示される（すなわち、ヒンジの 2 2 1 位、2 2 3 位、2 2 5 位、および 2 2 8 位、ならびに C H 3 の 3 6 8 位および 4 0 9 位）。1 ~ 1 5 行目は、I g G 1 のヒンジおよび / または I g G 2 の C H 3 において生じる置換に対応する。1 6 ~ 6 3 行目は、I g G 2 のヒンジおよび / または C H 3 において生じる置換に対応する。6 4 ~ 6 7 行目は、I g G 4 のヒンジにおいて生じる置換に対応する。E / D は、C H 3 ポリペプチドにおける 3 6 8 位の、G l u または A s p での置換を示す。

【 0 0 8 5 】

【表 1 - 1】

表1

	第 1 のヒンジ-CH3 ポリペプチドに おける置換						第 2 のヒンジ-CH3 ポリペプチドに おける置換					
	221	223	225	228	368	409	221	223	225	228	368	409
1.	R			R			E			E		
2.	R			E			E			R		
3.	R			R		R	E			E		R
4.	R			E		R	E			R		R
5.	R			R	E/D		E			E	E/D	
6.	R			E	E/D		E			R	E/D	
7.	R			R	E/D		E			E		R
8.	R			E	E/D		E			R		R
9.	R			R		R	E			E	E	
10.	R			E		R	E			R	E	
11.	R			R		E	E			E	R	
12.	R			E		E	E			R	R	
13.						R						R
14.					E/D						E/D	
15.					E/D							R
16.		D	E	K				R	R	D		
17.		D	E	K		R		R	R	D		R
18.		D	E	K		R		R	R	D	E/D	
19.		D	E	K	E/D			R	R	D		R
20.		D	E	K				R	R	D		
21.		D	E	E				R	K	R		
22.		D	E	E		R		R	K	R		R
23.		D	E	E		R		R	K	R	E/D	
24.		D	E	E	E/D			R	K	R		R
25.		D	E	E	E/D			R	K	R	E/D	
26.		E	R	E				R	E	K		
27.		E	R	E		R		R	E	K		R
28.		E	R	E		R		R	E	K	E/D	
29.		E	R	E	E/D			R	E	K		R
30.		E	R	E	E/D			R	E	K	E/D	
31.		E	E	R				R	K	E		
32.		E	E	R		R		R	K	E		R
33.		E	E	R		R		R	K	E	E/D	
34.		E	E	R	E/D			R	K	E		R

【表 1 - 2】

	第 1 のヒンジ-CH3 ポリペプチドに おける置換						第 2 のヒンジ-CH3 ポリペプチドに おける置換					
	221	223	225	228	368	409	221	223	225	228	368	409
35.		E	E	R	E/D			R	K	E	E/D	
36.		D	R	E				K	E	R		
37.		D	R	E		R		K	E	R		R
38.		D	R	E		R		K	E	R	E/D	
39.		D	R	E	E/D			K	E	R		R
40.		D	R	E	E/D			K	E	R	E/D	
41.		D	E	R				R	R	E		
42.		D	E	R		R		R	R	E		R
43.		D	E	R		R		R	R	E	E/D	
44.		D	E	R	E/D			R	R	E		R
45.		D	E	R	E/D			R	R	E	E/D	
46.		E	E	E				R	R	R		
47.		E	E	E		R		R	R	R		R
48.		E	E	E		R		R	R	R	E/D	
49.		E	E	E	E/D			R	R	R		R
50.		E	E	E	E/D			R	R	R	E/D	
51.		E	K	E				R	E	R		
52.		E	K	E		R		R	E	R		R
53.		E	K	E		R		R	E	R	E/D	
54.		E	K	E	E/D			R	E	R		R
55.		E	K	E	E/D			R	E	R	E/D	
56.		D	E	E				R	K	R		
57.		D	E	E		R		R	K	R		R
58.		D	E	E		R		R	K	R	E/D	
59.		D	E	E	E/D			R	K	R		R
60.		D	E	E	E/D			R	K	R	E/D	
61.						R						R
62.					E/D						E/D	
63.					E/D							R
64.				R						E		
65.				K						E		
66.				R						D		
67.				K						D		

えば二重特異的抗体)は、完全長ヒト抗体を含み、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインはヒト免疫エフェクター細胞上に位置するエフェクター抗原に特異的に結合することによってヒト免疫エフェクター細胞の活性を動員することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第2の抗体可変ドメインは標的抗原に特異的に結合することができる。一部の実施形態において、ヒト抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。一部の実施形態において、ヘテロ二量体タンパク質は、免疫学的に不活性のFc領域を含む。

【0087】

ヒト免疫エフェクター細胞は、当技術分野において知られている様々な免疫エフェクター細胞のいずれかであり得る。例えば、免疫エフェクター細胞は、限定はしないがT細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、B細胞、およびナチュラルキラー(NK)細胞を含む、ヒトリンパ細胞系のメンバーであり得る。免疫エフェクター細胞はまた、例えば、限定はしないが、限定はしないが単球、好中性顆粒球、および樹状細胞を含む、ヒト骨髄系のメンバーであり得る。このような免疫エフェクター細胞は、標的細胞に対する細胞傷害効果もしくはアポトーシス効果、またはエフェクター抗原の結合による活性化での他の所望の効果をも有し得る。

【0088】

エフェクター抗原は、ヒト免疫エフェクター細胞上に発現する抗原(例えば、タンパク質またはポリペプチド)である。ヘテロ二量体タンパク質(例えば、ヘテロ二量体タンパク質または二重特異的抗体)によって結合され得るエフェクター抗原の例には、限定はしないが、ヒトCD3(またはCD3(分化クラスター)複合体)、CD16、NKGD2、NKp46、CD2、CD28、CD25、CD64、およびCD89が含まれる。

【0089】

標的細胞は、非変性のまたはヒトに対して外来の細胞であり得る。非変性標的細胞では、細胞は、悪性細胞となるように形質転換されているかまたは病理学的に修飾されている(例えば、ウイルス、マラリア原虫、または細菌に感染した非変性標的細胞)。外来標的細胞では、細胞は、細菌、マラリア原虫、またはウイルスなどの侵入病原体である。

【0090】

標的抗原は、病的状態(例えば、炎症性疾患、増殖性疾患(例えば癌)、免疫障害、神経疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患、感染性疾患(例えば、ウイルス感染または寄生体感染)、アレルギー反応、移植片対宿主疾患、または宿主対移植片疾患)にある標的細胞上で発現する。標的抗原は、エフェクター抗原ではない。標的抗原の例には、限定はしないが、EpCAM(上皮細胞接着分子)、CCR5(5型ケモカイン受容体)、CD19、HER(ヒト上皮成長因子受容体)-2/neu、HER-3、HER-4、EGFR(上皮成長因子受容体)、PSMA、CEA、MUC-1(ムチン)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、CIHCg、Lewis-Y、CD20、CD33、CD30、ガングリオシドGD3、9-O-アセチル-GD3、GM2、Globo H、フコシルGM1、Poly SA、GD2、カルボアンヒドラーゼIX(MN/CA IX)、CD44v6、Shh(ソニック・ヘッジホッグ)、Wue-1、血漿細胞抗原、(膜結合型)IgE、MCSF(黒色腫コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)、CCR8、TNF-アルファ前駆体、STEAP、メソテリン、A33抗原、PSCA(前立腺幹細胞抗原)、Ly-6、デスモグレイン4、E-カドヘリンネオエピトープ、胎児アセチルコリン受容体、CD25、CA19-9マーカー、CA-125マーカーおよびII型MIS(ミュー管阻害物質)受容体、sTn(シアル化型Tn抗原、TAG-72)、FAP(線維芽細胞活性化抗原)、エンドシアリン、EGFRvIII、LG、SAS、ならびにCD63が含まれる。

【0091】

一部の実施形態において、本明細書において記載されるヘテロ二量体タンパク質(例えば二重特異的抗体)は、完全長ヒト抗体を含み、ここで、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインは、ヒト免疫エフェクター細胞上に位置するエフェクター抗原(例え

10

20

30

40

50

ばCD3抗原)に特異的に結合することによってヒト免疫エフェクター細胞の活性を動員することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第2の抗体可変ドメインは、標的抗原(例えば、CD20抗原またはEpCAM)に特異的に結合することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインおよび第2の抗体可変ドメインの両方は、ヒンジ領域における221位および228位(例えば、(D221RまたはD221E)および(P228RまたはP228E))およびCH3領域における409位または368位(例えば、K409RまたはL368E)にアミノ酸修飾を含む。

【0092】

一部の実施形態において、本明細書において記載されるヘテロ二量体タンパク質(例えば二重特異的抗体)は、完全長ヒト抗体を含み、ここで、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインは、ヒト免疫エフェクター細胞上に位置するエフェクター抗原(例えばCD3抗原)に特異的に結合することによってヒト免疫エフェクター細胞の活性を動員することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第2の抗体可変ドメインは、標的抗原(例えば、CD20抗原またはEpCAM)に特異的に結合することができ、ヘテロ二量体タンパク質の第1の抗体可変ドメインおよび第2の抗体可変ドメインの両方は、ヒンジ領域における223位、225位、および228位(例えば、(C223EまたはC223R)、(E225EまたはE225R)、および(P228EまたはP228R))およびCH3領域における409位または368位(例えば、K409RまたはL368E)にアミノ酸修飾を含む。

【0093】

本発明の別の態様において、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質は、例えばPCT公開WO98/52976およびWO00/34317において記載されているような既知の技術を用いて、対象に投与する際の免疫原性が低減するように脱免疫化することができる。

【0094】

他の実施形態において、ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、別のポリペプチドまたは分子作用物質に結合した本明細書において開示されるヘテロ二量体ポリペプチド、例えば二重特異的抗体の全てまたは一部分を含む、融合抗体またはイムノアドヘシンを作製することなどによって、修飾または誘導体化することができる。本明細書において開示されるヘテロ多量体ポリペプチド、例えばヘテロ二量体ポリペプチド(例えば二重特異的抗体)は、例えばインビボでの半減期を延長するために、さらに安定な融合分子を生産することによって、および/または、一般に「ペグ化」と呼ばれる、ポリエチレングリコール(PEG)などの生体適合性ポリマーでの処理によって、または当技術分野においてよく知られている多くの他の操作方法のいずれかによって、修飾または誘導体化することができる。

【0095】

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質は、よく知られている技術を用いて、限定はしないがポリエチレングリコール(PEG)、メチル基またはエチル基、エステル、糖質基などを含有、化学基で誘導体化することができる。これらの化学基(および、インビボでの安定性治療化合物に用いられている、それと同様の他のもの)は、ヘテロ二量体ポリペプチドの生物学的特徴を向上させるため、例えば、血清での半減期および生物活性を増大させるために有用である。

【0096】

ヘテロ二量体Fc融合タンパク質はまた、当技術分野において知られている多数の方法のいずれかを用いて標識することができる。本明細書において用いられる場合、用語「標識」または「標識された」は、別の分子を抗体内に組み込むことを言う。一実施形態において、標識は、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の組み込み、または、ポリペプチドへの、マークされたアビジン(例えば、光学的方法または比色分析方法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)によって検出され得るビオチニル部分の付着である。別の実施形態において、標識ま

たはマーカーは治療的であってもよく、例えば、薬剤コンジュゲートまたは毒素であってもよい。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野において知られており、用いることができる。ポリペプチドの標識の例には、限定はしないが、放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、第2のレポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、第2の抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、磁気物質、例えばガドリニウムキレート、毒素、例えば百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体またはホモログが含まれる。一部の実施形態において、標識には様々な長さのスペーサーアームが付着して、潜在的な立体障害の可能性を低減させる。

【0097】

核酸、ペクター、および細胞

本発明はまた、修飾された免疫グロブリン様ヒンジ配列またはFc関連配列を含む本明細書において開示されるポリペプチドをコードする核酸分子および核酸配列を含む。一部の実施形態において、異なる核酸分子が、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質、例えば二重特異的抗体の、1つまたは複数の鎖または一部をコードする。他の実施形態において、同一の核酸分子が、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質をコードする。

【0098】

一態様において、本発明は、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質の鎖の1つまたは上記のその一部をコードする核酸配列を提供する。本発明の核酸分子には、本発明の核酸配列に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%、またはそれ以上同一なものなどの、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸が含まれる。

【0099】

核酸配列の文脈における用語「配列同一性パーセント」は、最大の対応でアラインした場合に同一である、2つの配列における残基を意味する。配列同一性の比較の長さは、少なくとも約9ヌクレオチド、通常は少なくとも約18ヌクレオチド、さらに通常は少なくとも約24ヌクレオチド、典型的には少なくとも約28ヌクレオチド、さらに典型的には少なくとも約32ヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも約36、48、またはそれ以上のヌクレオチドの長さにより得る。ヌクレオチド配列の同一性を測定するために用いることができる、当技術分野において知られている多くの異なるアルゴリズムが存在する。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.0、Genetics Computer Group (GCG)、Madison、Wisconsinのプログラムである、FASTA、Gap、またはBestfitを用いて比較することができる。例えばプログラムFASTA2およびFASTA3を含むFASTAは、クエリー配列とおよびサーチ配列との間の最良のオーバーラップの領域のアラインメントおよび配列同一性パーセントを提供する（参照によって本明細書に組み込まれる、Pearson、Methods Enzymol. 183:63~98 (1990); Pearson、Methods Mol. Biol. 132:185~219 (2000); Pearson、Methods Enzymol. 266:227~258 (1996); Pearson、J. Mol. Biol. 276:71~84 (1998)）。別段の特定がない限り、特定のプログラムまたはアルゴリズムの

デフォルトパラメータが用いられる。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、FASTAをそのデフォルトパラメータ（語長6およびスコアリングマトリクスのためのNOPAM因子）と共に用いて、またはGapを、参照によって本明細書に組み込まれるGCCG Version 6.1において提供されるそのデフォルトパラメータと共に用いて、決定することができる。

【0100】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において開示されるヘテロ多量体タンパク質もしくはヘテロ二量体タンパク質の鎖もしくは一部の1つもしくは複数または本明細書において記載されるその一部をコードする核酸配列を含むベクターを提供する。

【0101】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質の鎖もしくは一部の1つもしくは複数または本明細書において記載されるその一部を発現させるために適切なベクターを提供する。

【0102】

別の実施形態において、本発明の核酸分子は、特定のアミノ酸配列のプロブまたはPCRプライマー、例えばヒンジ配列および重鎖ドメイン配列などにおける特異的抗体配列として用いられる。例えば、核酸は、診断方法におけるプロブとして、または、有用な配列をコードするさらなる核酸分子を単離するためにとりわけ用いることができるDNA領域を増幅するためのPCRプライマーとして用いることができる。一部の実施形態において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、目的の抗体の重鎖および軽鎖のヒンジ領域および定常ドメイン領域に由来する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において記載される本発明のヘテロ二量体ポリペプチド、例えば二重特異的抗体、またはその断片の修飾されたヒンジ領域の1つまたは複数の全てまたは一部分をコードする。

【0103】

本発明の組換え発現ベクターは、一部の実施形態において、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有し得る。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、タンパク質の所望の発現レベルなどなどの因子に依存し得ることは、当業者に理解されよう。哺乳動物宿主細胞の発現のための好ましい調節配列には、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、例えば、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーなど)、シミアンウイルス40(SV40)(SV40プロモーター/エンハンサーなど)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマに由来する、プロモーターおよび/またはエンハンサー、ならびに強力な哺乳動物プロモーター、例えば非変性免疫グロブリンプロモーターおよびアクチンプロモーターが含まれる。ウイルスの調節エレメントのさらなる説明およびその配列については、例えば、米国特許第5,168,062号、米国特許第4,510,245号、および米国特許第4,968,615号を参照されたい。プロモーターおよびベクターの記載を含む、植物において抗体を発現させるための方法、および植物の形質転換は、当技術分野において知られている。例えばUS6,517,529を参照されたい。細菌細胞または真菌細胞、例えば酵母細胞においてポリペプチドを発現させる方法もまた、当技術分野においてよく知られている。

【0104】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列(例えば、複製起点)および選択マーカー遺伝子などの、さらなる配列を有し得る。選択マーカー遺伝子によって、ベクターが導入されている宿主細胞の選択が容易になる(例えば、米国特許第4,399,216号、米国特許第4,634,665号、および米国特許第5,179,017号を参照されたい)。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与する。例え

ば、選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（メトトレキサートの選択／増幅と共に dhfr⁺ 宿主細胞において用いるため）、neo 遺伝子（G418 の選択のため）、およびグルタミン酸合成酵素遺伝子が含まれる。

【0105】

用語「発現制御配列」は、本明細書において用いられる場合、それらがライゲーションされるコード配列の発現およびプロセッシングを生じさせるために必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列には、適切な転写開始配列、転写終結配列、プロモーター配列、およびエンハンサー配列；スプライシングシグナルおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的な RNA プロセッシングシグナル；細胞質の mRNA を安定化させる配列；翻訳の効率を増強させる配列（すなわち、Kozak コンセンサス配列）；タンパク質の安定性を増強させる配列；ならびに必要な場合には、タンパク質の分泌を増強させる配列が含まれる。このような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なり、原核生物においては、このような制御配列には通常、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が含まれ、真核生物においては、通常、このような制御配列にはプロモーターおよび転写終結配列が含まれる。用語「制御配列」は、最低でも、その存在が発現およびプロセッシングに必須である、全ての構成要素を含み、また、その存在が有利であるさらなる構成要素、例えばリーダー配列および融合パートナー配列を含み得ることが意図される。

10

【0106】

ヘテロ多量体タンパク質を生産する方法

一態様において、本発明は、第1の免疫グロブリン様Fc領域と第2の免疫グロブリン様Fc領域（例えば、ヒンジ領域、CH3領域、またはヒンジ領域およびCH3領域）との間の境界を改変または操作することによって、所望のヘテロ多量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質、例えばFc融合タンパク質の形成を増強するための戦略を提供する。一部の実施形態において、ヒンジ境界を形成する1つまたは複数の残基は、荷電残基の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利となるように、荷電残基で置き換えられている。さらなる実施形態において、CH3境界を形成する1つまたは複数の残基は、CH3境界の間の相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成をさらに促進するように、荷電残基でさらに置き換えられている。一部の実施形態において、操作されたCH3境界は、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に静電的に有利である。一部の実施形態において、操作されたCH3境界は、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体形成に立体的に有利である。他の実施形態において、操作されたCH3境界は、ホモ二量体の形成を不安定化させるが、ホモ二量体の形成にとって静電的に不利ではない。

20

30

【0107】

一部の実施形態において、本明細書において開示される第1のヒンジ領域および第1のCH3領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体タンパク質の形成は、このような修飾を有さない野生型ヘテロ二量体タンパク質と比較して実質的に増大している。一部の実施形態において、第1のヒンジ領域および第1のCH3領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体タンパク質の形成は、このような修飾を有さない野生型ヘテロ二量体タンパク質と比較して、少なくとも約51%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または100%のいずれかである。一部の実施形態において、ヒンジ領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、217、218、219、221、222、223、224、225、226、227、および228から選択される位置で生じる。一部の実施形態において、CH3領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、349、368、405、および409から選択される位置で生じる。

40

【0108】

一部の実施形態において、本明細書において開示される第1のヒンジ領域および第2のヒンジ領域の両方ならびに第1のCH3領域および第2のCH3領域の両方に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体タンパク質の形成は、このような修飾を有さない

50

野生型ヘテロ二量体タンパク質と比較して実質的に増大している。一部の実施形態において、第1のヒンジ領域および第2のヒンジ領域の両方ならびに第1のCH3領域および第2のCH3領域の両方に1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むヘテロ二量体タンパク質の形成は、このような修飾を有さない野生型ヘテロ二量体タンパク質と比較して、少なくとも約51%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または100%のいずれかである。一部の実施形態において、ヒンジ領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、217、218、219、221、222、223、224、225、226、227、および228から選択される位置で生じる。一部の実施形態において、CH3領域におけるアミノ酸修飾（単数または複数）は、349、368、405、および409から選択される位置で生じる。

10

【0109】

別の態様において、本発明はまた、本発明のヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体タンパク質を生産する方法を提供する。

【0110】

一部の実施形態において、本方法は、a)修飾されたFc領域（例えば、ヒンジ領域および/またはCH3領域）を含む第1のポリペプチドをコードする核酸分子、および修飾されたFc領域（例えば、ヒンジ領域および/またはCH3領域）を含む第2のポリペプチドをコードする同一のまたは異なる核酸分子を含む宿主細胞を培養するステップであって、培養された宿主細胞が第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを発現するステップ、ならびにb)宿主細胞培養物からヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体タンパク質を回収するステップを含む。一部の実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、2つの異なるFc融合ポリペプチドである。一部の実施形態において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、2つの異なる抗体重鎖である。一部の実施形態において、宿主細胞はさらに、別のポリペプチド、例えば軽鎖を発現する。一部の実施形態において、軽鎖は、両方の重鎖と会合し得る。2つの異なる重鎖と単一の軽鎖を共発現させる方法は、例えば以下の実施例3において詳細に記載される。

20

【0111】

一部の実施形態において、本方法は、a)第1の宿主細胞において第1のポリペプチドを発現させるステップ、b)第2の宿主細胞において第2のポリペプチドを発現させるステップ、c)ステップa)の第1のポリペプチドおよびステップb)の第2のポリペプチドを単離するステップ、ならびにd)ステップc)の2つのポリペプチドおよびステップc)の単離されたポリペプチドを多量体の形成、例えば二量体化に適した条件下でインキュベートして、ヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体タンパク質を生産するステップを含む。一部の実施形態において、分子または抗体は、適切な還元剤（例えばグルタチオン）を含有する生理食塩水内に混合することができる。任意の適切な生理食塩水および適切なpH、例えば、ダルベッコリン酸緩衝溶液（D-PBS）を含むものを用いることができる。一部の実施形態において、第1の宿主細胞および/または第2の宿主細胞はさらに、別のポリペプチド、例えば軽鎖を発現する。

30

【0112】

当業者は、よく知られている技術を用いて、明細書において開示される方法に従って用いるための、分子または抗体の相対量を容易に決定することができる。

40

【0113】

本明細書において開示される方法において、インキュベーションは、様々な温度で行うことができる。このような温度は、当業者によって認識され、例えば、混合された分子または抗体において変性または分解などの有害な物理的变化が生じないインキュベーション温度を含む。一部の実施形態において、インキュベーションは37℃で行われる。

【0114】

多くの宿主細胞のいずれも、本発明の方法において用いることができる。このような細胞は、当技術分野において知られている（このうちの一部は、本明細書において記載されている）か、または、当技術分野において知られている通常の技術を用いて、本発明の方

50

法における使用に対する適合性に関して経験的に決定することができる。一部の実施形態において、宿主細胞は原核細胞である。一部の実施形態において、宿主細胞はグラム陰性細菌細胞である。他の実施形態において、宿主細胞は大腸菌 (*E. coli*) である。一部の実施形態において、大腸菌 (*E. coli*) は、内因性プロテアーゼ活性を欠いた株のものである。一部の実施形態において、大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞の遺伝子型は、*degP* 遺伝子および *prc* 遺伝子を欠き、突然変異 *spr* 遺伝子を有する。本発明の他の実施形態において、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (*CHO*) 細胞である。

【0115】

一部の実施形態において、本発明の方法はさらに、宿主細胞におけるその発現が本発明の二重特異的抗体またはヘテロ二量体タンパク質の収率を増強させる分子をコードするポリヌクレオチドまたは組換えベクターを宿主細胞において発現させるステップを含む。例えば、このような分子は、シャペロンタンパク質であり得る。一実施形態において、前記分子は、*DsbA*、*DsbC*、*DsbG*、および *FkpA* からなる群から選択される原核性ポリペプチドである。これらの方法の一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、*DsbA* および *DsbC* の両方をコードする。

【0116】

非ハイブリドーマ宿主細胞、およびタンパク質を組換え的に生産する方法

一態様において、本発明は、本発明の抗体またはその一部の組換え発現を可能にする組換え宿主細胞を提供する。このような組換え宿主細胞においてこのような組換え発現によって生産される抗体は、本明細書において、「組換え抗体」と呼ばれる。本発明はまた、このような宿主細胞の子孫細胞、およびこれによって生産される抗体を提供する。用語「組換え宿主細胞」(または単純に「宿主細胞」)は、本明細書において用いられる場合、組換え発現ベクターが導入されている細胞を意味する。「組換え宿主細胞」および「宿主細胞」が特定の対象細胞だけではなくこのような細胞の子孫も意味することを理解されたい。特定の修飾が突然変異または環境的影響に起因してその後の世代において生じ得るため、このような子孫は、実際は、親細胞に同一ではない可能性があるが、本明細書において用いられる用語「宿主細胞」の範囲内にやはり含まれる。このような細胞は、上記の本発明に従ったベクターを含み得る。

【0117】

別の態様において、本発明は、上記の抗体またはその一部を作成するための方法を提供する。一実施形態に従うと、前記方法は、上記のベクターでトランスフェクトまたは形質転換された細胞を培養するステップ、および前記抗体またはその一部を回収するステップを含む。抗体をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含むベクターを、適切な哺乳動物宿主細胞、植物宿主細胞、細菌宿主細胞、または酵母宿主細胞のトランスフェクションに用いることができる。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための任意の既知の方法によるものであり得る。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は、当技術分野においてよく知られており、デキストランを用いるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンを用いるトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム内へのポリヌクレオチド(単数または複数)のカプセル化、および核内へのDNAの直接的なマイクロインジェクションを含む。さらに、核酸分子は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞内に導入することができる。細胞を形質転換する方法は、当技術分野においてよく知られている。例えば、米国特許第4,399,216号、米国特許第4,912,040号、米国特許第4,740,461号、および米国特許第4,959,455号を参照されたい。植物細胞を形質転換する方法は、当技術分野においてよく知られており、例えば、アグロバクテリウムを用いる形質転換、微粒子銃形質転換、直接的な注射、エレクトロポレーション、およびウイルス形質転換を含む。細菌細胞および酵母細胞を形質転換する方法もまた、当技術分野においてよく知られている。

【0118】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当技術分野においてよく知られており、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞系を含む。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NS0 細胞、SP2 細胞、HEK-293T 細胞、293 Freestyle 細胞 (Invitrogen)、NIH-3T3 細胞、HeLa 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞 (例えば、Hep G2)、A549 細胞、および多くの他の細胞系が含まれる。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するかを決定することを介して選択される。用いることができる他の細胞系は、昆虫細胞系、例えば Sf9 細胞または Sf21 細胞である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現を、またはさらに好ましくは、宿主細胞が成長する培地内への抗体の分泌を可能にするために十分な時間にわたり、宿主細胞を培養することによって生産される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収することができる。適切な植物宿主細胞には、例えば、タバコ属 (Nicotiana)、シロイヌナズナ属 (Arabidopsis)、アオウキクサ、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモなどが含まれ得る。適切な細菌宿主細胞には、例えば、大腸菌 (E. coli) およびストレプトマイセス属 (Streptomyces) 種が含まれ得る。適切な酵母宿主細胞には、例えば、シゾサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、およびピキア・パストリス (Pichia pastoris) が含まれ得る。

10

20

【0119】

生産細胞系からの本発明のポリペプチドまたはその一部の発現は、多くの既知の技術を用いて増強させることができる。例えば、グルタミン合成酵素遺伝子発現系 (GS 系) は、特定の条件下での発現を増強させるための一般的なアプローチである。GS 系は、欧州特許第 0216846 号、欧州特許第 0256055 号、欧州特許第 0323997 号、および欧州特許第 0338841 号に関連して、全体または一部が議論されている。

【0120】

異なる細胞系によってまたはトランスジェニック動物において発現される、Fc ポリペプチドまたは Fc 領域および免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドを含むポリペプチド、例えば抗体は、そのグリコシル化パターンが互いに異なる可能性が高い。免疫グロブリン様ヒンジ配列を含むポリペプチドの全てのヘテロ二量体、二重特異的ポリペプチド、抗体などを含む、本発明のポリペプチドの全てのこのような「糖型」は、そのグリコシル化状態にかかわらず、さらに一般的にはいかなる翻訳後修飾 (単数または複数) の存在または非存在にかかわらず、本発明の一部であると考えられる。

30

【0121】

ヘテロ多量体タンパク質を精製する方法

別の態様において、本発明は、クロマトグラフィーによって免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドもしくは免疫グロブリン様ヒンジ領域および / または CH3 領域の 1 つまたは複数の静電的状態 (例えば、電荷の差) に基づいてヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供する。免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドもしくは免疫グロブリン様ヒンジ領域および / または CH3 領域の 1 つまたは複数の静電的状態 (例えば、電荷の差) に基づいてヘテロ二量体タンパク質およびホモ二量体タンパク質を含む混合物からヘテロ二量体タンパク質を単離するクロマトグラフィー方法が、本明細書において開示される。静電的状態または電荷の差は、イオン強度および / または pH レベルによって影響され得る。

40

【0122】

クロマトグラフィーには、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、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、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および吸着クロマ

50

トグラフィーが含まれる。液相クロマトグラフィー（例えば、HPLC（高性能（または高圧）液体クロマトグラフィー）およびFPLC（高速タンパク質液体クロマトグラフィー））を用いて、上記に開示されるクロマトグラフィーを実施することができる。アフィニティークロマトグラフィーのためのカラムの例には、タンパク質A（合成の、組換えの、または非変性の）カラムおよびプロテインG（合成の、組換えの、または非変性の）カラムが含まれる。

【0123】

一部の実施形態において、クロマトグラフィーから得られる精製されたヘテロ二量体タンパク質調製物は、純度が高く、すなわち、存在するホモ二量体は約10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.1、0.01パーセントのいずれか未満から0%である。一部の実施形態において、クロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィーである。

【0124】

一部の実施形態において、精製されるヘテロ二量体タンパク質は、Fc領域が共に相互作用してFc境界を形成する第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含み、Fc境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である、免疫グロブリン様Fc領域を含み、ここで、精製は、免疫グロブリン様ヒンジポリペプチドもしくは免疫グロブリン様ヒンジ領域およびCH3領域の1つまたは複数の静電的状态に基づいて分離する少なくとも1つの精製ステップを用いて行われる。一部の実施形態において、少なくとも1つの精製ステップは、イオン交換クロマトグラフィー方法の1つのステップを含むかまたはこれから本質的になる。一部の実施形態において、精製ステップは、イオン交換クロマトグラフィー方法の1つのステップからなる。Fc領域が共に相互作用してFc境界を形成する第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含み、Fc境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である免疫グロブリン様Fc領域を含むヘテロ二量体タンパク質を精製するための任意の他の適切な方法を用いて、本明細書において開示され本発明によって包含されるヘテロ多量体タンパク質、例えばヘテロ二量体を精製することができる。

【0125】

一部の実施形態において、精製されるヘテロ二量体タンパク質は、ヒンジ領域が共に相互作用してヒンジ境界を形成する第1のヒンジポリペプチドおよび第2のヒンジポリペプチドを含み、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である、免疫グロブリン様ヒンジ領域を含み、ここで、精製は、ヒンジ領域が共に相互作用してヒンジ境界を形成する第1のヒンジポリペプチドおよび第2のヒンジポリペプチドを含み、ヒンジ境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である免疫グロブリン様ヒンジ領域を含むヘテロ二量体タンパク質を精製するイオン交換クロマトグラフィー方法の1つのステップを含むかまたはこれから本質的になる。一部の実施形態において、精製ステップは、イオン交換クロマトグラフィー方法のステップからなる。

【0126】

一部の実施形態において、精製されるヘテロ二量体タンパク質は、CH3領域が共に相互作用してCH3境界を形成する第1のCH3ポリペプチドおよび第2のCH3ポリペプチドを含み、CH3境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である、免疫グロブリン様CH3領域を含み、ここで、精製は、CH3領域が共に相互作用してCH3境界を形成する第1のCH3ポリペプチドおよび第2のCH3ポリペプチドを含み、CH3境界内の1つまたは複数の荷電アミノ酸の間の静電的相互作用がホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成に有利である免疫グロブリン様CH3領域を含むヘテロ二量体タンパク質を精製するイオン交換クロマトグラフィー方法のステップを含むかまたはこれから本質的になる。一部の実施形態において、精製ステップは、イオン交換クロマトグラフィー方法のステップからな

る。

【 0 1 2 7 】

ヘテロ多量体タンパク質を用いる方法

本発明はまた、本明細書において記載されるヘテロ多量体タンパク質（例えば、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異的抗体）のための様々な治療用途を提供する。一態様において、ヘテロ多量体タンパク質は、第1のタンパク質（例えば、第1のヒト抗体可変ドメイン）をエフェクター抗原に結合させることによって、および第2のタンパク質（例えば、第2のヒト抗体可変ドメイン）を標的抗原に結合させることによって様々な疾患（例えば、癌、自己免疫疾患、またはウイルス感染）を治療するために用いることができる。例えば、ヘテロ多量体タンパク質（例えば、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異的抗体）は、細胞傷害性を向け直すため、血栓溶解剤を凝血塊に送達するため、免疫毒素を腫瘍細胞に送達するため、または酵素活性化されたプロドラッグを標的部位（例えば腫瘍）で変換させるために用いることができる。

10

【 0 1 2 8 】

別の態様において、ヘテロ多量体タンパク質（例えば、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異的抗体）は、治療物質の特異性を増大させるためおよび/または相乗的なもしくはさらなる経路（例えば、代謝経路または生化学的経路）を調節するために用いることができる。例えば、ヘテロ多量体タンパク質（例えば、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異的抗体）は、受容体/受容体、受容体/リガンド、リガンド/リガンド、細胞/細胞、リガンド/ペイロード、受容体/ペイロード、または単一受容体を結びつけることができる。

20

【 0 1 2 9 】

医薬組成物

一態様において、本発明は、薬学的に許容できる担体内に本発明のヘテロ多量体ポリペプチド、例えばヘテロ二量体ポリペプチド、例えば二重特異的抗体、または上記のその一部を含む、医薬組成物を提供する。一部の実施形態において、本発明のポリペプチドは、中性形態（両性イオン形態を含む）で存在し得るか、または正もしくは負に荷電した種として存在し得る。一部の実施形態において、ポリペプチドは、対イオンと複合して、1つまたは複数のポリペプチドおよび1つまたは複数の対イオンを含む複合体を言う「薬学的に許容できる塩」を形成してもよく、ここで、対イオンは、薬学的に許容できる無機および有機の酸および塩基に由来する。

30

【 0 1 3 0 】

ヘテロ二量体タンパク質またはその一部は、単独で、または本発明の1つもしくは複数の他のポリペプチドと組み合わせて、または1つもしくは複数の他の薬剤と組み合わせて（またはその任意の組み合わせとして）投与することができる。したがって本発明の医薬組成物、方法、および使用はまた、以下に詳述されるように、他の活性物質との組み合わせ（同時投与）の実施形態を含む。

【 0 1 3 1 】

本明細書において用いられる場合、本発明の抗体および1つまたは複数の他の治療物質に関する、用語「同時投与」、「同時投与された」、および「と組み合わせて」は、以下を意味し、言い、かつ含むことを意図する：（i）本明細書において開示されるヘテロ二量体および治療物質（単数または複数）のこのような組み合わせの、治療を必要としている前記患者への同時投与（この場合、前記構成要素はこれらの構成要素を患者にほぼ同時に放出する単回剤形に共に製剤化されている）、（ii）本明細書において開示されるヘテロ二量体および治療物質（単数または複数）のこのような組み合わせの、治療を必要としている前記患者へのほぼ同時の投与（この場合、前記構成要素は、患者によってほぼ同時に取り込まれ、そうすると前記構成要素が前記患者にほぼ同時に放出される、個別の剤形に互いに分かれて製剤化されている）、（iii）本明細書において開示されるヘテロ二量体および治療物質（単数または複数）のこのような組み合わせの、治療を必要としている前記患者への連続投与（この場合、前記構成要素は、各投与間の十分な時間間隔を伴

40

50

って患者によって連続的な時点で取り込まれ、そうすると、前記構成要素が前記患者に実質的に異なる時点で放出される、個別の剤形に互いに分かれて製剤化されている)、ならびに(i v)本明細書において開示されるヘテロ二量体および治療物質(単数または複数)のこのような組み合わせの、治療を必要としている前記患者への連続投与(この場合、前記構成要素は、制御された様式で前記構成要素を放出し、そうすると、これらが、患者に同時におよび/または異なる時点で同時放出、連続放出、および/またはオーバーラップ放出され、ここで、各部分は、同一のまたは異なる経路で投与されてもよい、単回剤形に共に製剤化されている)。

【0132】

通常、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質またはその一部は、1つまたは複数の薬学的に許容できる賦形剤(単数または複数)と組み合わせた製剤として投与されることに適している。用語「賦形剤」は、本発明の化合物(単数または複数)以外の任意の成分を記載するために本明細書において用いられる。賦形剤(単数または複数)の選択は、特定の投与態様、溶解度および安定性に対する賦形剤の影響、ならびに剤形の性質などの因子に大きく依存する。本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容できる賦形剤」には、生理学的に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒質、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に許容できる賦形剤の一部の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝溶液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組み合わせである。多くのケースにおいて、組成物内に等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。薬学的に許容できる物質のさらなる例は、抗体の保存期間または有効性を増強させる、湿潤剤または微量の補助物質、例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、防腐剤、または緩衝剤である。

【0133】

本発明の医薬組成物およびその調製方法は、当業者に容易に明らかとなる。このような組成物およびその調製方法は、例えば、Remington's Pharmaceuticals Sciences、第19版(Mack Publishing Company、1995)において見ることができる。医薬組成物は、好ましくは、GMP条件下で製造される。

【0134】

本発明の医薬組成物は、大量に、1つの単一単位用量で、または複数の単一単位用量で、調製、包装、または販売することができる。本明細書において用いられる場合、「単位用量」は、所定の量の活性成分を含む、医薬組成物の個別の量である。活性成分の量は、通常、対象に投与される活性成分の投与量、またはこのような投与量の都合の良い画分、例えばこのような投与量の2分の1または3分の1に等しい。当技術分野において認められている、ペプチド、タンパク質、または抗体を投与するためのあらゆる方法を、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質およびその一部に適切に採用することができる。

【0135】

本発明の医薬組成物は、典型的には、非経口投与に適している。本明細書において用いられる場合、医薬組成物の「非経口投与」には、対象組織の物理的破壊および破壊を介する組織への医薬組成物の投与によって特徴付けされる、したがって通常は、血流内、筋肉内、または内臓内への直接的な投与をもたらす、あらゆる投与経路が含まれる。非経口投与には、したがって、限定はしないが、組成物の注射による、外科的切開を介する組成物の適用による、組織を貫通する非外科的な創傷を介する組成物の適用などによる、医薬組成物の投与が含まれる。具体的には、非経口投与には、限定はしないが、皮下の、腹腔内の、筋肉内の、胸骨内の、静脈内の、動脈内の、髄腔内の、脳室内の、尿道内の、頭蓋内の、滑液嚢内の注射または注入、および腎臓透析注入技術が含まれると考えられる。好ましい実施形態には、静脈内経路および皮下経路が含まれる。

【0136】

非経口投与に適した医薬組成物の製剤は、典型的には、通常、滅菌水または無菌の等張生理食塩水などの薬学的に許容できる担体と組み合わせられた活性成分を含む。このような製剤は、ボーラス投与または連続投与に適した形態で、調製、包装、または販売することができる。注射可能な製剤は、単位剤形で、例えばアンプル、または防腐剤を含有する多回用量容器で、調製、包装、または販売することができる。非経口投与のための製剤には、限定はしないが、懸濁液、溶液、油性媒体または水性媒体内のエマルジョン、ペーストなどが含まれる。このような製剤はさらに、限定はしないが懸濁剤、安定剤、または分散剤を含む、1つまたは複数のさらなる成分をさらに含み得る。非経口投与のための製剤の一実施形態において、活性成分は、適切な媒体（例えば、発熱性物質を有さない滅菌水）で再構成して、その後、再構成された組成物を非経口投与するために、乾燥（すなわち、粉末または粒状）形態で提供される。非経口製剤にはまた、塩、炭水化物、および緩衝剤（好ましくは3から9のpHまで）などの賦形剤を含有し得る水性溶液が含まれるが、一部の適用では、非経口製剤は、無菌の非水性溶液として、または発熱性物質を有さない滅菌水などの適切な媒体と組み合わせるための乾燥形態として、さらに適切に製剤化することができる。典型的な非経口投与形態には、無菌の水溶液、例えば水性プロピレングリコール溶液またはデキストロース溶液内の、溶液または懸濁液が含まれる。このような剤形は、必要に応じて、適切に緩衝することができる。有用な他の非経口投与可能な製剤には、微晶質形態のまたはリポソーム調製物内の活性成分を含むものが含まれる。非経口投与のための製剤は、即時放出および/または調節放出となるように製剤化することができる。調節放出製剤には、制御放出製剤、遅延放出製剤、持続放出製剤、パルス放出製剤、標的放出製剤、およびプログラム放出製剤が含まれる。例えば、一態様において、無菌の注射可能な溶液は、所要の量のヘテロ二量体タンパク質、例えば二重特異的抗体を、上記に列挙された成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒内に組み込み、必要であればその後、濾過滅菌することによって、調製することができる。通常、分散は、活性化化合物を、塩基性分散媒質および上記に列挙されたもののうち所要の他の成分を含有する無菌媒体内に組み込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための無菌粉末のケースでは、好ましい調製方法は、活性成分の粉末と、先に無菌濾過されたその溶液からの任意のさらなる所望の成分とをもたらす、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどの被覆を用いることによって、分散のケースでは所要の粒子サイズを維持することによって、および境界活性剤を用いることによって、維持することができる。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物内に含めることによってもたらされ得る。

【0137】

本発明の典型的な非限定的な医薬組成物は、約5.0から約6.5の範囲のpHを有し、約1mg/mLから約200mg/mLの本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質、約1ミリモル濃度から約100ミリモル濃度のヒスチジン緩衝液、約0.01mg/mLから約10mg/mLのポリソルベート80、約100ミリモル濃度から約400ミリモル濃度のトレハロース、および約0.01ミリモル濃度から約1.0ミリモル濃度のEDTA二ナトリウム二水和物を含む無菌水溶液としての製剤である。

【0138】

投薬レジメンは、最適な所望の応答をもたらすように調節することができる。例えば、単一のボーラスを投与することができるか、複数の分割用量を経時的に投与することができるか、または用量を、急迫的な治療的状況によって指示されたように比例的に低減もしくは増大させることができる。投与の容易性および投与量の均一性のために、非経口組成物を投薬単位形態に製剤化することが、基本的に有利である。投薬単位形態は、本明細書において用いられる場合、治療される患者/対象のための単位投与量として適した物理的に個別の単位を言い、各単位は、所要の薬学的担体と組み合わせられた、所望の治療効果をもたらすように計算された所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の投薬単位形態の仕様は、通常、(a)化学療法物質の固有の特徴および達成されるべき特定の治療的効果ま

たは予防的効果、ならびに（b）個体における感受性の治療のためのこのような活性化化合物の配合の当技術分野に特有の限定によって、およびこれらに直接的に応じて、決定される。

【0139】

したがって、当業者には、本明細書において提供される開示に基づいて、用量および投薬レジメンが治療分野においてよく知られている方法に従って調節されることが理解されよう。すなわち、最大耐用量を容易に確定することができ、検出可能な治療的利益を患者にもたらす効果的な量もまた、検出可能な治療的利益を患者にもたらすために各作用物質を投与するための時間的要件と同様に、確定することができる。したがって、特定の用量および投与レジメンが本明細書において例示されるが、これらの例は、本発明の実施において患者に提供され得る用量および投与レジメンを限定するものではない。

10

【0140】

投与量値が、軽減されるべき状態のタイプおよび重症度で変化し得、単回用量または複数回用量を含み得ることに留意されたい。任意の特定の対象について、特異的な投薬レジメンが、個体の要求および組成物を投与するかまたは投与を監督する人の専門的な判断に従って経時的に調節されるべきであること、ならびに本明細書において説明される投与量範囲は典型的なものにすぎず、特許請求される組成物の範囲または実施を限定することを意図しないこともまた理解されたい。さらに、本発明の組成物を用いる投薬レジメンは、疾患のタイプ、患者の年齢、体重、性別、医学的状态、状態の重症度、投与経路、および採用される特定の抗体を含む、様々な因子に基づき得る。したがって、投薬レジメンは広く変化し得るが、標準的な方法を用いて通常通りに決定することができる。例えば、用量は、毒性効果などの臨床効果および/または実験値を含み得る薬物動態学的または薬力学的なパラメータに基づいて調節することができる。したがって、本発明は、当業者によって決定される、患者内での用量増加を含む。適切な投与量およびレジメンの決定は、関連する分野においてよく知られており、本明細書において開示される教示を提供された当業者には、包含されることが理解されよう。

20

【0141】

ヒト対象への投与では、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質の毎月用量の全量は、典型的には、当然のことながら投与態様に応じて、患者当たり約0.5から約1200mgの範囲である。例えば、静脈内の毎月用量は、患者当たり約1から約1000mgを要し得る。毎月用量の全量は、単回用量または分割用量で投与することができ、医師の指示で、本明細書によって示される典型的な範囲から外れてもよい。

30

【0142】

本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質、例えば二重特異的抗体またはその一部の治療上または予防上効果的な量の典型的な非限定的範囲は、1カ月当たり患者当たり約1から約1000mgである。一部の実施形態において、ヘテロ二量体タンパク質は、1カ月当たり患者当たり約1から約200または約1から約150mgで投与することができる。

【実施例】

【0143】

以下の実施例は、ヒンジ領域のみに、ヒンジ領域およびCH3領域の両方に、またはCH3領域のみに突然変異を含むヘテロ二量体タンパク質の構築、生成、および精製を記載する。以下の実施例は、本発明の方法および材料を説明するためのものである。当業者には自明の、当技術分野において通常見られる、記載された条件およびパラメータの適切な変更および適合は、本発明の趣旨および範囲の内にある。

40

【0144】

【表 1 - 3】

実施例において用いられる抗体

抗体の識別子	抗体の説明*
Ab1	抗抗原A抗体
Ab2	ラムダ軽鎖を含む抗抗原B抗体
Ab3	抗抗原C抗体
Ab4	抗抗原D抗体
Ab5	非抗原結合抗体
Ab6	非抗原結合抗体

*抗原Aはホルモンタンパク質であり、抗原BおよびCは2つの異なる成長因子受容体タンパク質であり、抗原Dはカルシウムシグナルトランスデューサータンパク質である。

10

【0145】

(実施例1) ヒトIgG1、IgG2、およびIgG4抗体突然変異体クローンの生成
PCR突然変異生成

この実施例および以下の他の実施例において、ヒトIgG1抗体、IgG2抗体、およびIgG4抗体の突然変異体クローンをPCR突然変異生成によって生成した。ヒトIgG2抗体の突然変異体クローンでは、IgG2 A Fc領域(図2の配列番号1)を有する抗抗原A抗体(Ab1とも呼ばれる)を、PCR反応の2つのステップで鋳型として用いた(反応当たり約0.05 μg)(図4)。野生型IgG2のFc領域と比較して、このIgG2 Aは、A330S置換およびP331S置換を有する。この実施例において記載される全てのPCR反応で、PfuTurbo(登録商標)DNA Polymerase Kit(カタログ番号600250)を用い、最終dNTP濃度は0.5 mMであった。

20

【0146】

第1のステップにおいて、2つの個別のPCR反応AおよびBが存在した。反応Aにおいて、第1のプライマー対hFc2.f(フォワードプライマー、表2の配列番号2)およびhFc2.ヒンジ.r(リバースプライマー、表2の配列番号3)をそれぞれ40 pmolで用いた。反応Bにおいて、第2のプライマー対hFc2.ヒンジ.mutA1.f(突然変異を含有するフォワードプライマー、表2の配列番号4)およびNot.hFc2.r(リバースプライマー、表2の配列番号5)をそれぞれ40 pmolで用いた。フォワードプライマーhFc2.ヒンジ.mutA1.fは、野生型IgG2ヒンジ領域と比較して、突然変異した核酸を含み、所望の突然変異がヒンジ領域内に導入されていた。本明細書において記載されるPCR反応のアニーリング温度は54 °Cである。PCR反応において用いられるプライマーは、縮重ヌクレオチドを含み、すなわち、配列内の「S」はプライマー内のCまたはGを表し、「R」はプライマー内のAまたはGを表す。

30

【0147】

反応Aおよび反応Bから得られるPCR産物を、QIAquick Gel Extraction Kit(カタログ番号28706)によってゲル精製し、30 μlのEB緩衝液内でさらに溶出した。

40

【0148】

PCR反応の第2のステップにおいて、反応Aおよび反応Bから得られる2.5 μlの精製されたPCR産物をそれぞれ、まずプライマーを加えずに8サイクル増幅し、次に、以下のプライマー(それぞれ40 pmol)を用いて20サイクルを行った: フォワードプライマー: hFc2.f(配列番号2)およびリバースプライマー: Not.hFc2.r(配列番号5)。本明細書において記載されるPCR反応のアニーリング温度は54 °Cである。

【0149】

50

第2のステップから得られるPCR産物を、QIAquick Gel Extraction Kit (カタログ番号28706)によってゲル精製し、30 µlのEB緩衝液内にさらに溶出した。精製されたPCR産物をApaIおよびNotIによって消化し、pCi.Db.3XFLAG.Ab1.hFc1ベクターまたはpCi.Db.HA.Ab1.hFc1ベクター内にさらにクローニングした(図3)。

【0150】

多くの異なる突然変異含有プライマー(配列番号6~10)を用いて、第1のステップのPCR反応においてhFc2.hinge.mutA1.fを置き換え、異なる突然変異をヒンジ領域内に導入した。CH3領域にK409R置換を有するヒトIgG2 A抗体の突然変異体であるIgG2 A(K409)もまた、ヒトIgG2 A抗体の鑄型を置き換えるための鑄型として用いて、異なる突然変異をヒンジ領域内に生じさせた。

10

【0151】

IgG1およびIgG4抗体突然変異体を、先に記載した手順と基本的に同一の手順を用いて、PCR突然変異生成プロセスによって生成させた。ヒトIgG1抗体の突然変異体クローンでは、CH3領域にK409R置換を有する抗体Ab1 IgG1をコードするDNA(図4の配列番号11)をPCR鑄型として用いた。ヒトIgG4抗体の突然変異体クローンでは、野生型抗体Ab1 IgG4のFc領域(図5の配列番号12)をPCR鑄型として用いた。IgG1およびIgG4突然変異体クローンの生成に用いたプライマーを、表2に列挙する。

【0152】

20

突然変異体クローン

複数の突然変異体クローンを、ヒンジ領域に突然変異残基を有するヒトIgG1抗体、IgG2抗体、およびIgG4抗体について生成した。ヒトIgG4抗体の突然変異体クローンでは、野生型Fcヒンジ領域内の残基Ser228(図6Aの下線を引かれた残基を参照されたい)を、図6Bの表に列挙する突然変異体クローンにおける正に荷電した残基(LysまたはArg、グループA)または負に荷電した残基(AspまたはGlu、グループB)に突然変異させた。グループA IおよびB IにおけるヒトIgG2抗体の突然変異体クローンでは、IgG2と比較してA330S置換およびP331S置換を有するヒトIgG2 A抗体を鑄型として用いた。グループA IおよびB Iにおける突然変異体クローンでは、CH3領域にK409R置換を有するヒトIgG2 A抗体突然変異体であるIgG2 A(K409)を鑄型として用いた。図6Aにおいて下線を引かれている、抗体鑄型のヒンジ領域内の3つの残基Cys223、Glu225、およびPro228を、正に荷電した残基(ArgまたはLys)または負に荷電した残基(GluまたはAsp)にそれぞれ突然変異させて、図6Bの表に列挙する突然変異体クローンを生産した。上記のヒトIgG1抗体の突然変異体クローンでは、ヒトIgG1(K409R)突然変異体を鑄型として用い、図6Aにおいて下線を引かれている、ヒンジ領域内の残基Ser221およびPro228をそれぞれ、正に荷電した残基(ArgまたはLys)または負に荷電した残基(GluまたはAsp)に突然変異させて、図6Bの表に列挙する突然変異体クローンを生成させた。

30

【0153】

40

異なるFc領域を有する突然変異体を区別するために、IgG4のグループAの突然変異体ならびにIgG2のグループA IおよびA IIの突然変異体を、N末端3xFLAGタグ(DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGLE、配列番号53)をさらに含むように操作し、一方、IgG4のグループBの突然変異体ならびにIgG2のグループB IおよびB IIの突然変異体を、N末端HAタグ(YPYDVPDYALE、配列番号54)をさらに含むように操作した。

【0154】

【表 2】

表2:ヒンジ領域の突然変異を生じさせるためのPCRプライマーの配列

プライマー名	プライマー配列	配列番号
hFc2.f	GCCTCCACCAAGGGCCCATC	配列番号:2
Not.hFc2.r	ATACAAGCGGCCGCCTATTTACCC GGAGACAGGGA	配列番号:5
hFc2.ヒンジ.mutA1.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTG ASGTGGAGTGTCCAARGTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:4
hFc2.ヒンジ.mutA2.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTG ASGTGGAGTGTCCAGASTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:6
hFc2.ヒンジ.mutA3.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTG ASGTGARGTGTCCAGASTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:7
hFc2.ヒンジ.mutB1.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTA RGGTGARGTGTCCAGASTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:8
hFc2.ヒンジ.mutB2.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTA RGGTGARGTGTCCAARGTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:9
hFc2.ヒンジ.mutB3.f	ACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTA RGGTGGAGTGTCCAARGTGTCCAG CCCCTCCAGTGG	配列番号:10
hFc2.ヒンジ.r	CTTTCTCTCCACGGTCTTG	配列番号:3
hFc4.f	GCCTCCACCAAGGGCCCATC	配列番号:13
Not.hFc4.r	ATACAAGCGGCCGCCTATTTACCCA GAGACAGGGAGA	配列番号:14
hFc4.ヒンジ.mutA.f	GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC CCAARGTGCCCAGCACCTGAGTTC CT	配列番号:15
hFc4.ヒンジ.mutB.f	GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC CCAGASTGCCAGCACCTGAGTTC CT	配列番号:16
hFc4.ヒンジ.mut.r	TGGGGGACCATATTTGGACT	配列番号:17
hFc1.f	GCCTCCACCAAGGGCCCATC	配列番号:18
Not.hFc1.r	ATACAAGCGGCCGCCTATTTACCC GGAGACAGGGA	配列番号:19
hFc1.ヒンジ.EE.f	GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAG AAAACCTCACACATGCCAGAGTGC CCAGCACCTGAACTCC	配列番号:20
hFc1.ヒンジ.RR.f	GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTAGG AAAACCTCACACATGCCCAAGGTGC CCAGCACCTGAACTCC	配列番号:21
hFc1.ヒンジ.r	ACAAGATTTGGGCTCAACTTTC	配列番号:22

【0155】

(実施例2) IgG4 ヒンジ含有ヘテロ二量体

この実施例は、突然変異体 IgG4 ヒンジを含有するヘテロ二量体タンパク質を記載する。

【0156】

ヒト IgG4 抗体のグループ A およびグループ B の突然変異体を共に混合して、4つの

10

20

30

40

50

異なる組み合わせ対（図7Bに示される）とした。各対を、懸濁培養液内で成長させた293F細胞内に、抗体Ab1軽鎖と共にコトランスフェクトした。簡潔に述べると、293F細胞を、三角フラスコ（8%CO₂、120rpm）内の293Freestyle培地内に1×10⁶個細胞/mlで播種した。トランスフェクション（50mlのトランスフェクションに基づく量は、必要に応じて増やすことができる）のために、2.5mlのOptiMEMをまず2×15mlの試験管に添加した。50μgのDNA（重鎖A：重鎖B：軽鎖＝1.5：1.5：2）を次に試験管Aに添加した。1mg/mlのトランスフェクション試薬溶液100μlを試験管Bに添加した。試験管Aおよび試験管B内の材料を共に混合し、RTで15分間インキュベートした。DNA-トランスフェクション試薬複合体溶液を細胞に添加し、次に、細胞をインキュベーターに戻した。24時間後、Tryptone N1の20%w/vのストック1.25mlを添加し、細胞をインキュベーターに戻した。上清を5日後に採取した。トランスフェクション試薬を、それを水中に1mg/mlまで溶解し、pHをHClで2.5未満に調節することによって、調製した。溶解した後、pHをさらに7.0に調節し、その後、0.22μmの濾過を行った（分注および-20℃での保管）。Tryptone N1を293Freestyle培地内で20%w/vのストックとし、その後、0.22μmの濾過を行った（4℃での保管）。

10

【0157】

各調製物における全タンパク質を、プロテインGカラム上でのイムノアフィニティー精製を用いて分離した（Protein Gアガロース、Pierceカタログ番号20399；IgG溶出緩衝液、Pierceカタログ番号21004；例えば、BjorckおよびKronvall、J. Immunol. (133)：969～974（1984）を参照されたい）。各調製物における二重特異的抗体のパーセンテージを、標準的なサンドイッチELISAアッセイによって測定した。簡潔に述べると、プレートを抗HAで被覆し、検出抗体は抗FLAGであった。野生型IgG4領域を有する抗体Ab1を、同じ様式で発現および精製し、また、野生型IgG4は約50%の二重特異的抗体を天然に形成するため、前記抗体をELISAアッセイのための標準対照として用いた（vander Neut Kolfschoten Mら、Science (317)：1554～1557（2007）；Aalberse RCら、Immunology (105)：9～19（2002））。

20

30

【0158】

二重特異的抗体を検出するために、各調製物から精製された全タンパク質0.1μg/mlを、1μg/mlの抗HAタグ抗体を有する各ELISAプレートに添加した。各調製物における二重特異的抗体を、HRPにコンジュゲートした抗FLAG抗体と反応させることによって検出した。

【0159】

ELISAアッセイの結果（図7A）は、ヒトIgG4のヒンジ領域におけるホモ二量体と比較してヘテロ二量体のヒンジ領域の間の有利な静電的相互作用に基づいてヘテロ二量体の形成を進めるための、1つまたは複数の突然変異の導入が、ヘテロ二量体抗体の形成の安定化を促進し、したがって、野生型IgG4抗体のみを用いる同一の手順よりも多くの二重特異的抗体を生産したことを示す。

40

【0160】

（実施例3）IgG2ヒンジ含有ヘテロ二量体

ヒトIgG2抗体のグループA Iの突然変異体およびグループB Iの突然変異体を共に混合して、3つの異なる組み合わせ対1A、1B、および1C（図8Bに示される）とした。各対を、293細胞内に、抗体Ab1軽鎖と共にコトランスフェクトした。ヒトIgG2抗体のグループA I Iの突然変異体およびグループB I Iの突然変異体もまた共に混合して、3つの異なる組み合わせ対2A、2B、および2C（図8Bに示される）とした。各対を、懸濁293細胞内に、抗体Ab1軽鎖と共にコトランスフェクトした。上清を5日後に採取した。各調製物内の全タンパク質を、プロテインGカラムによって精製した

50

。各調製物における二重特異的抗体のパーセンテージを、サンドイッチ E L I S A によって測定した。野生型 I g G 2 の F c 領域を有する抗体 A b 1 を、同じ様式で発現および精製し、E L I S A アッセイのための標準対照として用いた。実施例 1 において記載されているように、1 A、1 B、および 1 C における全ての突然変異体は、野生型 I g G 2 A の C H 3 領域を有し、2 A、2 B、および 2 C における全ての突然変異体は、I g G 2 A の C H 3 領域に K 4 0 9 R 突然変異を有する。

【 0 1 6 1 】

二重特異的抗体を検出するために、各調製物から精製された全タンパク質 0 . 1 μ g / m l を、1 μ g / m l の抗 H A タグ抗体を有する E L I S A プレートに添加した。各調製物における二重特異的抗体を、H R P にコンジュゲートした抗 F L A G 抗体によって検出した。

10

【 0 1 6 2 】

E L I S A アッセイの結果 (図 8 A) は、ヒト I g G 2 A 抗体の C H 3 領域における K 4 0 9 突然変異の導入が、ヘテロ二量体抗体の形成の促進を助けたことを示す。

【 0 1 6 3 】

(実施例 4) K 4 0 9 R バックグラウンドにおけるヘテロ二量体の形成を促進する I g G 2 ヒンジ突然変異のスクリーニング

ヒト I g G 2 抗体のグループ A I I の突然変異体およびグループ B I I の突然変異体を組み合わせて、6 つの異なる組み合わせ対 A ~ F (図 9 B に示される) とした。クローンの各対を、2 9 3 細胞内に、抗体 A b 1 軽鎖と共にコトランスフェクトした。上清を 5 日後に採取した。各調製物内の全タンパク質を、プロテイン G カラムによって精製した。各調製物における二重特異的抗体のパーセンテージを、サンドイッチ E L I S A によって測定した。野生型 I g G 2 の F c 領域を有する抗体 A b 1 および野生型 I g G 4 の F c 領域を有する抗体 A b 1 を、同じ様式で発現および精製し、両者を対照として E L I S A アッセイに用いた。この実施例における全ての突然変異体クローンは、I g G 2 A の C H 3 領域に K 4 0 9 R 突然変異を有する。

20

【 0 1 6 4 】

二重特異的抗体を検出するために、各調製物から精製された全タンパク質 0 . 1 7 μ g / m l を、1 μ g / m l の抗 H A タグ抗体を有する E L I S A プレートに添加した。各調製物における二重特異的抗体を、H R P にコンジュゲートした抗 F L A G 抗体によって検出した。

30

【 0 1 6 5 】

E L I S A アッセイの結果 (図 9 A) は、K 4 0 9 R バックグラウンドにおいて、3 つのヒンジ突然変異 C 2 2 3 E、E 2 2 5 E、および P 2 2 8 E が 3 つのヒンジ突然変異 C 2 2 3 R、E 2 2 5 R、および P 2 2 8 R と組み合わせられている場合、すなわち、図 9 A のカラム D の場合、本発明者らが、試験された他の突然変異の組み合わせよりも多い二重特異的抗体を観察したことを示す。

【 0 1 6 6 】

(実施例 5) ヒト I g G 4 の C H 3 領域の「G l u」スキャン

ヒト I g G 4 抗体の C H 3 領域の 1 4 個の位置を、一連の「G l u」スキャン実験を実施するために選択した。これらの 1 4 個の位置を選択するための基準は、基本的に、W . D a l l ' A c q u a ら、B i o c h e m i s t r y (3 7) : 9 2 6 6 ~ 9 2 7 3 (1 9 9 8) において記載されている通りであった。「G l u」スキャンのために選択された位置を、図 1 0 に示すように 1 ~ 1 4 とナンバリングした。全ての突然変異体は、S t r a t a g e n e (Q u i k C h a n g e (登録商標) I I X L S i t e - D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t、カタログ番号 2 0 0 5 2 2) の部位特異的突然変異生成キットを用いて生成した。C H 3 領域における特異的突然変異を生じさせるために用いたプライマーを表 3 に列挙する。

40

【 0 1 6 7 】

I g G 4 突然変異体を生じさせるために用いた鋳型クローンは、N 末端の 3 × F L A G

50

タグを有しそのヒンジ領域に S 2 2 8 R 突然変異を有する、A b 1 . 3 . 1 1 A であった。

【 0 1 6 8 】

図 1 1 B に列挙する全ての突然変異体クローンおよび鑄型クローンを、個別に発現および精製した。等量の、ヒンジ領域に S 2 2 8 E 突然変異を有し N 末端の H A タグを有する、A b 1 . 3 . 2 A タンパク質、および様々な A b 1 . 3 . 1 1 A C H 3 突然変異体を共に混合して、様々な組み合わせ (図 1 1 B) とし、0 . 5 m M のグルタチオン (G S H) と共に 3 7 ° で 2 4 時間にわたりさらにインキュベートした。C H 3 領域突然変異を有さない A b 1 . 3 . 1 1 A 鑄型もまた、等量の A b 1 . 3 . 2 A タンパク質と混合し、0 . 5 m M のグルタチオン (G S H) と共に 3 7 ° で 2 4 時間にわたりさらにインキュベートした (図 1 1 A のカラム 1 5) 。 G S H 反応のためのプロトコールは、基本的に、L a b r i j n ら、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 、 (2 7) 、 7 6 7 ~ 7 7 1 (2 0 0 9) において記載されている通りであった。

【 0 1 6 9 】

【表 3】

表3:CH3領域の突然変異を生じさせるためのPCRプライマー配列

プライマー名	hFc1プライマー配列	配列番号
Fc1.Q347E.f	CCCCGAGAACCAGAGGTGTACACCCTG	配列番号:23
Fc1.Q347E.r	CAGGGTGTACACCTCTGGTTCTCGGGG	配列番号:24
Fc1.Y349E.f	GAGAACCACAGGTGGAGACCCTGCCCCCAT	配列番号:25
Fc1.Y349E.r	ATGGGGGGCAGGGTCTCCACCTGTGGTTCTC	配列番号:26
Fc1.T350E.f	AACCACAGGTGTACGAGCTGCCCCCATCCC	配列番号:27
Fc1.T350E.r	GGGATGGGGGCAGCTCGTACACCTGTGGTT	配列番号:28
Fc1.L351E.f	CACAGGTGTACACCGAGCCCCCATCCCGGG	配列番号:29
Fc1.L351E.r	CCCGGGATGGGGGCTCGGTGTACACCTGTG	配列番号:30
Fc1.T366E.f	CCAGGTCAGCCTGGAGTGCCTGGTCAAAGG	配列番号:31
Fc1.T366E.r	CCTTTGACCAGGCACTCCAGGCTGACCTGG	配列番号:32
Fc1.L368E.f	CAGCCTGACCTGCGAGGTCAAAGGCTTCTA	配列番号:33
Fc1.L368E.r	TAGAAGCCTTTGACCTCGCAGGTCAGGCTG	配列番号:34
Fc1.K370E.f	TGACCTGCCTGGTTCGAGGGCTTCTATCCCA	配列番号:35
Fc1.K370E.r	TGGGATAGAAGCCCTCGACCAGGCAGGTCA	配列番号:36
Fc1.K392E.f	GGAGAACAACCTACGAGACCACGCCTCCCGT	配列番号:37
Fc1.K392E.r	ACGGGAGGCGTGGTCTCGTAGTTGTTCTCC	配列番号:38
Fc1.T394E.f	CAACTACAAGACCGAGCCTCCCGTGCTGGA	配列番号:39
Fc1.T394E.r	TCCAGCACGGGAGGCTCGGTCTTGTAGTTG	配列番号:40
Fc1.V397E.f	GACCACGCCTCCCGAGCTGGACTCCGACGG	配列番号:41
Fc1.V397E.r	CCGTCCGAGTCCAGCTCGGGAGGCGTGGTC	配列番号:42
Fc1.L398E.f	ACGCCTCCCGTGGAGGACTCCGACGGCTCC	配列番号:43
Fc1.L398E.r	GGAGCCGTCCGAGTCCACGGGAGGCGT	配列番号:44
Fc1.F405E.f	GACGGCTCCTTCGAGCTGTACAGCAAGCTC	配列番号:45
Fc1.F405E.r	GAGCTTGCTGTACAGCTCGAAGGAGCCGTC	配列番号:46
Fc1.Y407E.f	CTCCTTCTTCCTCGAGAGCAAGCTCACCG	配列番号:47
Fc1.Y407E.r	CGGTGAGCTTGCTCTCGAGGAAGAAGGAG	配列番号:48
Fc1.K409E.f	TTCCTCTACAGCGAGCTGACCGTGACAAAGA	配列番号:49
Fc1.K409E.r	TCTTGTCACGGTCAGCTCGCTGTAGAGGAA	配列番号:50
Fc1.K409R.f	TTCCTCTACAGCAGGCTGACCGTGACAAAGA	配列番号:51
Fc1.K409R.r	TCTTGTCACGGTCAGCCTGCTGTAGAGGAA	配列番号:52

【 0 1 7 0 】

各 G S H 反応から得られたサンプルを、氷冷した P B S - T B (0 . 2 % B S A 、 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を有する P B S) 内に希釈し、二重特異的抗体の量を、実施例 2 において記載されているようにサンドイッチ E L I S A によって測定した。野生型 I g G 4 の F c 領域を有する抗体 A b 1 をまた同じ様式で発現および処理し、E L I S A アッセイにおける標準対照 (図 1 1 A のカラム 1 6) として用いた。

【 0 1 7 1 】

図 1 1 A に示すように、I g G 4 の C H 3 領域における 1 4 個の突然変異のいずれも、

10

20

30

40

50

C H 3 領域突然変異を有さない鑄型クローンと比較して、二重特異的抗体の形成において有意な増大をもたらさなかった。

【 0 1 7 2 】

(実施例 6) ヒト I g G 2 の C H 3 領域の「 G l u 」スキャン

ヒト I g G 2 抗体の C H 3 領域の 1 4 個の位置を、一連の「 G l u 」スキャン実験を実施するために選択した。これらの 1 4 個の位置を選択するための基準は、基本的に、実施例 5 に記載した通りであった。「 G l u 」スキャンのために選択された位置を、図 1 0 に示すように 1 ~ 1 4 とナンバリングした。全ての突然変異体は、 S t r a t a g e n e の部位特異的突然変異生成キットによって生成した。

【 0 1 7 3 】

I g G 2 突然変異体を生じさせるために用いた鑄型は、N 末端の H A タグを有し、野生型 I g G 2 A の C H 3 領域を有し、かつ I g G 2 A のヒンジ領域に 3 つの突然変異 C 2 2 3 R、E 2 2 5 R、および P 2 2 8 R を有する、A b 1 . 1 . 3 D であった。

【 0 1 7 4 】

図 1 2 B に列挙する全ての突然変異体および野生型対照を、個別に発現および精製した。等量の、ヒンジ領域に 3 つの突然変異 C 2 2 3 E、E 2 2 5 E、および P 2 2 8 E を有し、N 末端の H A タグを有する、A b 1 . 2 . 2 H タンパク質、ならびに様々な A b 1 . 1 . 3 D C H 3 突然変異体 (F L A G タグ) を共に混合して、様々な組み合わせ (図 1 2 B) とし、0 . 5 m M の G S H と共に 3 7 ° C で 2 4 時間にわたりさらにインキュベートした。各 G S H 反応から得られたサンプルを、氷冷した P B S - T B (0 . 2 % B S A、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を有する P B S) 内に希釈し、形成された二重特異的抗体の量を、実施例 2 において記載されているようにサンドイッチ E L I S A によって測定した。野生型 I g G 4 の F c 領域を有する抗体 A b 1、野生型 I g G 2 A の F c 領域を有する抗体 A b 1、および突然変異体 I g G 2 A (K 4 0 9 R) の F c 領域を有する抗体 A b 1 を同じ様式で発現および処理し、E L I S A アッセイにおける対照として用いた。

【 0 1 7 5 】

図 1 2 A に示すように、A b 1 . 2 . 2 H タンパク質 (3 つの突然変異 C 2 2 3 E、E 2 2 5 E、および P 2 2 8 E) と A b 1 . 1 . 3 D、L 3 6 8 E タンパク質 (3 つの突然変異 C 2 2 3 R、E 2 2 5 R、および P 2 2 8 R) とを混合すると、二重特異的抗体の生産 (図 1 2 A のカラム 6) は、他の組み合わせおよび対照と比較して有意に増大した。

【 0 1 7 6 】

(実施例 7) ヒンジ突然変異および C H 3 突然変異はヘテロ二量体の形成に寄与し得る

一部の突然変異体の A b 1 重鎖可変領域を、ラムダ軽鎖を含む抗抗原 B 抗体である、異なる抗体 A b 2 の重鎖可変領域で置き換えた。

【 0 1 7 7 】

図 1 3 B に列挙する全ての突然変異体および野生型対照を、個別に発現および精製した。等量の、図 1 3 B に列挙する抗体 1 および図 1 3 B に列挙する抗体 2 を共に混合し、0 . 5 m M の G S H の存在下または非存在下で、3 7 ° C で 2 4 時間にわたりインキュベートした。各 G S H 反応から得られたアリコート、氷冷した P B S - T B (0 . 2 % B S A、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を有する P B S) 内に希釈し、二重特異的抗体の量を、基本的には実施例 2 において記載されているように、サンドイッチ E L I S A によって測定した。

【 0 1 7 8 】

二重特異的抗体を検出するために、各 G S H 反応物から精製された全タンパク質 0 . 2 5 μ g / m l を、1 μ g / m l の抗原 B で被覆した E L I S A プレートに添加した。各調製物における二重特異的抗体の量を、H R P にコンジュゲートした抗カッパ抗体によって検出した。抗体 A b 1 は、カッパ軽鎖を含む抗抗原 A 抗体である。

【 0 1 7 9 】

図 1 3 A に示すように、2 つの異なる野生型ヒト I g G 2 A 抗体を穏やかな還元条件下で共に混合した場合 (A) (1 m M の G S H)、二重特異的抗体は対照と比較して検出

10

20

30

40

50

されなかった。実施例4の結果と同様に、K409Rバックグラウンドにおいて、3つのヒンジ突然変異C223E、E225E、およびP228Eを3つヒンジ突然変異C223R、E225R、およびP228Rと組み合わせた場合、すなわち、図13Aの(B)の場合、二重特異的抗体の形成の増大が観察された。実施例7の結果と同様に、重鎖CH3領域の1つにおいてK409R突然変異をL368Eで置き換えると、二重特異的抗体の形成がさらに増大した(C)。クローンをCH3領域における突然変異のみと組み合わせると(D)、二重特異的抗体はあまり検出されなかった。野生型ヒトIgG4を、ELISAのための標準対照として用いた(カラムE)。

【0180】

(実施例8) ヒトIgG1のCH3領域の「Glu」スキャン

10

ヒトIgG1抗体のCH3領域の14個の位置を、一連の「Glu」スキャン実験を実施するために選択した。これらの14個の位置を選択するための基準は、基本的に、実施例5に記載した通りである。「Glu」スキャンのために選択された位置を、図10に示すように1~14とナンバリングした。全ての突然変異体は、Stratageneの部位特異的突然変異生成キットによって生成した。

【0181】

IgG1突然変異体を生じさせるために用いた鋳型は、野生型IgG1のCH3領域、IgG1ヒンジ領域における2つの突然変異D221EおよびP228Eを有する、Ab2-hFc1-EEであった。

【0182】

20

図14Bに列挙する全ての突然変異体および野生型対照を、個別に発現および精製した。等量の、CH3領域にK409R突然変異を有し、ヒンジ領域に2つの突然変異D221RおよびP228Rを有する、Ab1-hFc1-RR-K409R IgG1タンパク質、ならびに様々なAb2-hFc1-EE IgG1 CH3突然変異体を共に混合し、0.5mMのGSHの存在下または非存在下で、37℃で24時間にわたりインキュベートした。各GSH反応から得られたサンプルを、氷冷したPBS-TB(0.2%BSA、0.05%Tween-20を有するPBS)内に希釈し、二重特異的抗体の量を、実施例2において記載されているようにサンドイッチELISAによって測定した。野生型IgG4のFc領域を有するAb1およびAb2を同じ様式で発現および処理し、ELISAにおける対照として用いた。野生型IgG4のFc領域を有する抗体11Aを同じ様式で発現および処理し、ELISAアッセイにおける対照として用いた。

30

【0183】

図14Bに示すように、IgG1のCH3ドメインにおける非常にわずかな位置、すなわち、Y349、L368、およびF405が、Gluによって置換され、EE(K409R)突然変異体と組み合わせられると、二重特異的抗体の形成をさらに増大させる(カラム2、6、および12)。

【0184】

(実施例9) 二重特異的抗体の形成の比較

40

この実施例は、IgG1ヒンジ含有ヘテロ二量体の調製を説明し、二重特異的抗体の形成を他のアイソタイプと比較する。

【0185】

図15Bに示す全ての突然変異体および野生型対照を、個別に発現および精製した。等量の抗体1および抗体2を共に混合し、0.5mMのGSHの存在下または非存在下で、37℃で24時間にわたりインキュベートした。各GSH反応から得られたサンプルを、氷冷したPBS-TB(0.2%BSA、0.05%Tween-20を有するPBS)内に希釈し、二重特異的抗体の量を、先に記載したようにサンドイッチELISAによって測定した。

【0186】

図15Aに示すように、IgG1ヒンジ領域の2つの位置D221およびP228での

50

突然変異の導入は、I g G 1 二重特異的抗体の形成のレベルに顕著に影響した。位置 D 2 2 1 における突然変異を除去すると、C H 3 突然変異と組み合わされていても（カラム 1）、二重特異的抗体の形成が劇的に減少した。3 つ全てのアイソタイプにおいて、I g G 1 突然変異体は、最大レベルの二重特異的抗体を生成した（カラム 2、3、および 4 を比較されたい）。標準対照は、先の実施例と同一であった。

【 0 1 8 7 】

（実施例 1 0）ヘテロ二量体抗体の生成および精製

I g G 1 ヘテロ二量体を、2 2 1 R、2 2 8 R、および 4 0 9 R 突然変異を有する抗体 1 と、2 2 1 E、2 2 8 E、および 3 6 8 E 突然変異を有する抗体 2 とを、P B S において 1 m M の G S H と共に 2 4 時間にわたり 3 7 でインキュベートすることによって調製した。異なる抗体可変領域 A b 1、A b 2、A b 3、および A b 4 をヘテロ二量体の調製に用いた。I g G 2 ヘテロ二量体を、2 2 3 R、2 2 5 R、2 2 8 R、および 4 0 9 R 突然変異を有する抗体 1 と、2 2 3 E、2 2 5 E、2 2 8 E、および 3 6 8 E 突然変異を有する抗体 2 とを、P B S において 2 m M の G S H と共に 2 4 時間にわたり 3 7 でインキュベートすることによって調製した。ヘテロ二量体を、以下に記載するようにイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。I g G 4 ヘテロ二量体を、2 2 8 R 突然変異を有する抗体 1 と、2 2 8 E 突然変異を有する抗体 2 とを、P B S において 1 m M の G S H と共に 2 4 時間にわたり 3 7 でインキュベートすることによって調製した。

【 0 1 8 8 】

全てのヘテロ二量体を、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。簡潔に述べると、F c ヘテロ二量体および F c ホモ二量体の分析的イオン交換分離を、弱陽イオン交換 D I O N E X P r o p a c W C X - 1 0 G (4 × 5 0 m m) カラムを備えた A g i l e n t 1 1 0 0 4 ポンプ L C 系 (A g i l e n t I n c、S a n t a C l a r a、C A、U S A) で実施した。タンパク質を 5 % 緩衝液 A (2 0 m M の M E S、p H 5 . 4) 内に注入し、2 5 % から 7 5 % の勾配の緩衝液 B (2 0 m M の M E S、p H 5 . 4、および 5 0 0 m M の N a C l) 内で、1 m l / 分の流量で 2 0 分間にわたり溶出した。F c ヘテロ二量体の大規模な精製を、弱陽イオン交換 D I O N E X P r o p a c W C X - 1 0 G (4 × 2 5 0 m m) カラムを備えた A k t a E x p l o r e r (G E) で行った。タンパク質を 5 % 緩衝液 A (2 0 m M の M E S、p H 5 . 4) 内に注入し、1 5 % から 7 5 % の勾配の緩衝液 B (2 0 m M の M E S、p H 5 . 4、および 5 0 0 m M の N a C l) 内で、1 m l / 分の流量で 6 0 分間にわたり溶出した。図 1 6 A ~ 2 3 C を参照されたい。

【 0 1 8 9 】

（実施例 1 1）ヘテロ二量体の形成に対する C H 3 突然変異の効果

この実施例は、ヘテロ二量体タンパク質の形成に対する様々な C H 3 突然変異および / またはヒンジ突然変異の効果を説明する。

【 0 1 9 0 】

a) L 3 6 8 D、L 3 6 8 E、および K 4 0 9 R での C H 3 突然変異、ならびに野生型ヒンジまたは突然変異体ヒンジ

図 2 4 B に示す抗体突然変異体をコードするプラスミドベクターを、上記の方法を用いて調製した。抗体 A b 2 は、ラムダ軽鎖を含む抗抗原 B 抗体であり、抗体 A b 1 は、カッパ軽鎖を含む抗抗原 A 抗体である。この実施例において、突然変異が I g G 1 ヒンジにおいて生じた場合、突然変異は D 2 2 1 位および P 2 2 8 位にあった。突然変異が I g G 2 ヒンジにおいて生じた場合、突然変異は C 2 2 3、E 2 2 5、および P 2 2 8 にあった。この実施例において、突然変異体の一部は、C H 3 突然変異および野生型 (w t) ヒンジを含有していた。他の突然変異体は、ヒンジ領域および C H 3 領域の両方に突然変異を含有していた。この実施例において、C H 3 突然変異は、K 4 0 9 R、L 3 6 8 D、および L 3 6 8 E から選択された。

【 0 1 9 1 】

図 2 4 B に示すグループ A およびグループ B の突然変異体を、個別に発現および精製し

た。組み合わせ対 1 ~ 1 1 を二重特異的抗体の形成について試験した。組み合わせ対 1 ~ 1 1 のそれぞれで、等量の、特定されたグループ A 抗体および対応するグループ B 抗体を共に混合し、0.5 mM の G S H の存在下または非存在下で、37 で 24 時間にわたりインキュベートした。各 G S H 反応から得られたサンプルを、氷冷した P B S - T B (0.2 % B S A、0.05 % T w e e n - 20 を有する P B S) 内に希釈し、二重特異的抗体の量をサンドイッチ E L I S A によって測定した。二重特異的抗体を検出するために、各 G S H 反応物から精製された全タンパク質 0.25 μ g / m l を、1 μ g / m l の抗原 B で被覆した E L I S A プレートに添加した。各調製物における二重特異的抗体の量を、H R P にコンジュゲートした抗カッパ抗体によって検出した。

【 0 1 9 2 】

図 2 4 A に示すように、I g G 1 における K 4 0 9 R C H 3 突然変異の導入は、一部の二重特異的抗体形成を促進するために十分であった (カラム 1)。逆に、L 3 6 8 E C H 3 突然変異単独では、顕著な量の二重特異的抗体形成をもたらさなかった (カラム 2)。

【 0 1 9 3 】

b) L 3 6 8 E および / または K 4 0 9 R での C H 3 突然変異、ならびに野生型ヒンジまたは突然変異体ヒンジ

図 2 5 B に示す抗体突然変異体をコードするプラスミドベクターを、上記の方法を用いて調製した。この実施例において、突然変異が I g G 1 ヒンジにおいて生じた場合、突然変異は D 2 2 1 位および P 2 2 8 位にあった。突然変異が I g G 2 ヒンジにおいて生じた場合、突然変異は C 2 2 3、E 2 2 5、および P 2 2 8 にあった。この実施例において、突然変異体の一部は、C H 3 突然変異および野生型 (w t) ヒンジを含有していた。他の突然変異体は、ヒンジ領域および C H 3 領域の両方に突然変異を含有していた。この実施例において、C H 3 突然変異は、K 4 0 9 R および L 3 6 8 E から選択された。

【 0 1 9 4 】

図 2 5 B に示すグループ A およびグループ B の突然変異体を、個別に発現および精製した。組み合わせ対 1 ~ 1 5 を、セクション (a) における上記の方法を用いて、二重特異的抗体の形成について試験した。

【 0 1 9 5 】

h I g G 1 ヘテロ二量体および h I g G 2 ヘテロ二量体を、実施例 1 0 に記載した方法を用いて、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。図 2 6 A ~ 2 6 D は、C H 3 のみの突然変異が、野生型 h I g G 1 と比較して約 12 % の I g G 1 または 13 % の I g G 2 のヘテロ二量体タンパク質の形成 (K 4 0 9 R および L 3 6 8 E での突然変異) をもたらすこと、およびヒンジ突然変異 (D 2 2 1 R、P 2 2 8 R、D 2 2 1 E、および P 2 2 8 E での突然変異) と C H 3 突然変異 (K 4 0 9 R および L 3 6 8 E での突然変異) との両方の組み合わせが、野生型 h I g G 1 ヘテロ二量体と比較して約 90 % の I g G 1 ヘテロ二量体タンパク質の形成をもたらすことを説明する。

【 0 1 9 6 】

(実施例 1 2) 二重特異的抗体およびその親の突然変異単一特異的抗体の安定性を測定する示差走査熱量測定

二重特異的抗体の安定性を測定する示差走査熱量測定 (D S C) を、全ての抗体試料、すなわち 1) 野生型 h I g G 1 抗体 5 および 6 (A b 5、野生型 h I g G 1 および A b 6、野生型 h I g G 1)、2) ヒンジ突然変異 (D 2 2 1 E および P 2 2 8 E) と C H 3 突然変異 (L 3 6 8 E) とを有する親 h I g G 1 抗体 5、およびヒンジ突然変異 (D 2 2 8 R および P 2 2 8 R) と C H 3 突然変異 (K 4 0 9 R) とを有する親 h I g G 1 抗体 6 (h I g G 1、E E、L 3 6 8 E、A b 5、A b 5 または h I g G 1、R R、K 4 0 9 R、A b 6、A b 6)、ならびに 3) D 2 2 1 R、P 2 2 8 R、D 2 2 1 E、P 2 2 8 E、L 3 6 8 E、および K 4 0 9 R での突然変異を有する二重特異的 h I g G 1 抗体 5 + 6 (h I g G 1、E E、L 3 6 8 E、A b 5、A b 5 / h I g G 1、R R、K 4 0 9 R、A b 6、A b 6) について実施した。測定は、M I C R O C A L (商標) V P キャピラリー D S

10

20

30

40

50

Cシステム (GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) で、PBS 緩衝液内で pH 7.2 の 1.0 mg/mL の濃度で行った。試料を、90 / 時間の速度で 30 から 110 でスキャンした。データ分析を、OriginLab ソフトウェア (OriginLab Corporation、Northampton、MA、USA) を用いて行った。

【0197】

野生型 hIgG1 抗体は、約 86 の CH3 ドメインの融解温度 (T_m) を示し、一方、親 hIgG1 突然変異抗体 5 または 6 は、60 という低減した T_m を有する。Ab6 突然変異体 (hIgG1.RR.K409R.Ab6.Ab6/hIgG1.RR.K409R.Ab6.Ab6) の T_m は、約 75 の CH3 の T_m を有する Fab ドメインに類似していると考えられる。二重特異的抗体が形成されると、CH3 ドメインの T_m は約 75 である。図 27。

【0198】

(実施例 13) 二重特異的抗体による 2 つの異なる抗原の同時の結合

この実施例は、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質の、2 つの異なる抗原を同時に結合する能力を説明する。

【0199】

抗原 A および B

Biacore 3000 SPR バイオセンサー機器 (GE Healthcare、Piscataway、NJ、USA) をこの分析に用いた。(抗原 A) - hFc 抗原を、アミン結合手順を用いて、Biacore CM5 センサーチップの表面に結合させた。固定手順のためのランニング緩衝液は、HBS-T + (10 mM の HEPES、150 mM の NaCl、0.05 % Tween-20、pH 7.4) であった。CM5 センサーの表面を、400 mM の EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド) および 100 mM の NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) の 1:1 (v/v) の混合物を 10 μ l / 分で 7 分間にわたり注入することによって活性化した。次に、(抗原 A) - hFc を pH 5.0 の 10 mM の酢酸緩衝液内に 50 μ g/mL まで希釈し、20 μ l / 分で 7 分間にわたり注入した。表面を、1 M のエタノールアミン (pH 8.5) を 10 μ l / 分でセンサー表面上に注入することによってブロックした。

【0200】

固定した後、まず、2 μ g/mL の二重特異的抗体 (hIgG1.EE.L368E.Ab1.Ab1/hIgG1.RR.K409R.Ab2.Ab2; D221R、P228R、D221E、および P228E のヒンジ領域ならびに K409R および L368E の CH3 領域での突然変異) を 10 μ l / 分で 1 分間にわたり注入した。第 2 に、「サンドイッチ分析物」を 10 μ l / 分で 2 分間にわたり注入した。試験した「サンドイッチ分析物」は、972 nM の抗原 B、1000 nM の (抗原 A) - ECD-his、およびランニング緩衝液であった。表面を、Pierce 溶出緩衝液および 4 M の NaCl の 2:1 (v/v) の混合物 (Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、USA) の 6 秒間の注入を 2 回行って再生した。

【0201】

図 28A は、二重特異的抗体 hIgG1.EE.L368E.Ab1.Ab1/hIgG1.RR.K409R.Ab2.Ab2 が抗原 A および抗原 B を同時に結合し得ること、ならびに非二重特異的抗体が検出されなかったことを示す。

【0202】

Biacore CM5 センサーチップ表面への抗原 B の結合を用いる類似の実験も行った。全ての実験条件は、2 μ g/mL の二重特異的抗体を 1 分間ではなく 4 分間にわたり 10 μ l / 分で注入したことを除いて、上記の (抗原 A) - hFc と同一であった。二重特異的抗体もまた、抗原 A および抗原 B に同時に結合することができた。

【0203】

抗原 C および抗原 D

Biacore 3000 SPRバイオセンサー機器もまた、この分析に用いた。(抗原D) - hFcを、アミン結合手順を用いて、Biacore CM5センサーチップの表面に結合させた。固定手順のためのランニング緩衝液はまた、HBS-T+であった。CM5センサーの表面を、400mMのEDCおよび100mMのNHSの1:1(v/v)の混合物を10ul/分で7分間にわたり注入することによって活性化した。次に、(抗原D) - hFcをpH6.5の10mMのリン酸ナトリウム緩衝液内に30μg/mLまで希釈し、20ul/分で7分間にわたり注入した。表面を、1Mのエタノールアミン(pH8.5)を10ul/分でセンサー表面全体に注入することによってブロックした。

【0204】

固定した後、ランニング緩衝液を、1mg/mLのBSA(10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.05%Tween-20、1mg/mLのBSA、pH7.4)を有するHBS-T+に変えた。まず、1μg/mLの二重特異的抗体(hIgG1.EE.L368E.Ab4.Ab4/hIgG1.RR.K409R.Ab3.Ab3;D221R、P228R、D221E、およびP228Eのヒンジ領域ならびにK409RおよびL368EのCH3領域での突然変異)を10ul/分で2分間にわたり注入した。第2に、「サンドイッチ分析物」を10ul/分で2分間にわたり注入した。試験した「サンドイッチ分析物」は、20nMの抗原C、200nMの(抗原D) - ECD-his、およびランニング緩衝液であった。表面を、Pierce溶出緩衝液および4MのNaClの2:1(v/v)の混合物の15秒間の注入を2回行って再生した。

【0205】

図28Bは、二重特異的抗体hIgG1.EE.L368E.Ab4.Ab4/hIgG1.RR.K409R.Ab3.Ab3が抗原Dおよび抗原Cを同時に結合し得ること、ならびに非二重特異的抗体が検出されなかったことを示す。

【0206】

Biacore CM5センサーチップ表面への(抗原C) - hFcの結合を用いる類似の実験も行った。全ての実験条件は、(抗原C) - hFcをpH6の10mMのリン酸ナトリウム緩衝液内に30ug/mLまでではなくpH5.0の10mMの酢酸緩衝液内に10μg/mLまで希釈し、20ul/分で7分間にわたり注入したことを除いて、上記の(抗原D) - hFcと同一であった。二重特異的抗体もまた、抗原Cおよび抗原Dに同時に結合することができた。

【0207】

(実施例14)Fcガンマ受容体およびFcRn受容体への二重特異的抗体の結合

この実施例は、本明細書において開示されるヘテロ二量体タンパク質の、Fc受容体に結合する能力を説明する。

【0208】

相互作用分析を、GLCセンサーチップを備えた、PROTEON(商標)XPR36表面プラズモン共鳴に基づくバイオセンサー、およびアミン結合試薬(BioRad、Hercules、CA)を用いて、25℃で行った。Fcガンマ受容体の固定および分析のためのランニング緩衝液は、PBS(pH7.4)+0.05%Tween-20であった。緩衝液を30ul/分で流した。IgGのパネルを、標準的なEDC/スルホンHS介在性化学を用いて、個別の「リガンド」チャンネル上に、約300~700RUのレベルまでアミン結合した。IgGには、D221R、P228R、D221E、P228E、L368E、およびK409Rに突然変異を有する二重特異的hIgG1抗体1+2(hIgG1.EE.L368E.Ab1.Ab1/hIgG1.RR.K409R.Ab2.Ab2)、C223E、E225E、P228E、C223R、E225R、P228R、L368E、およびK409Rに突然変異を有するhIgG2抗体1+2(hIgG2.EEE.L368E.Ab1.Ab1/hIgG2.RRR.K409R.Ab2.Ab2)、ならびにカップ軽鎖を含むhIgG1抗体およびhIgG2抗体(Sigma-Aldrich、St.Louis、MO、USA)が含まれる。簡潔に述べると、

10

20

30

40

50

これは、水中にそれぞれ 1 / 6 0 0 に希釈されたストック溶液 (0 . 4 M の E D C および 0 . 1 M のスルホ N H S を補った) の混合物で 2 分間にわたり活性化すること、p H 4 . 5 の 1 0 m M の酢酸ナトリウム内に 2 0 u g / m L で 3 分間にわたり I g G に結合させること、および最後に p H 8 . 5 の 1 M のエタノールアミン H C l で 3 分間にわたりあらゆる過剰反応基を不活性化することを伴う。F c ガンマ受容体はそれぞれ、受容体ごとに最適化した (典型的には、ヒト F c ガンマ 1 では 2 0 0 n M 、他の受容体では 1 0 u M) 、様々な最高濃度を有する 5 倍連続希釈物として調製した。緩衝液ブランクを含む、各受容体の、5 つの要素からなる連続希釈物を、「分析物」方向に 3 分間にわたり「ワンショット」モードで注入し、最大 3 0 分の解離時間を可能にした。可能となった解離時間内で完全に解離しなかった受容体では、表面を、Pierce Gentle 溶出緩衝液 / 4 M の N a C l の 2 : 1 (v / v) の混合物 (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) の 1 8 秒間の注入を 2 回行って、1 0 0 u L / 分で再生した。一部の受容体を、結合サイクルに 2 重に注入して、アッセイが再現可能であることを確認した。

10

【 0 2 0 9 】

固定された I g G とヒト F c R n (新生児 F c 受容体) との相互作用を、異なる様式で行った。用いた I g G は、上記と同一の二重特異的 h I g G 1 抗体および h I g G 2 抗体 1 + 2 である。用いた対照抗体は、ヒト I g G 2 A である。I g G をチャネル (A b d i c h e r a 、 A n a l . B i o c h e m . 4 1 1 (1) : 1 3 9 ~ 1 5 1 (2 0 1 1)) ではなく個別の反応スポット上に結合させ、分析ランニング緩衝液は、P B S + 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 (p H 6 . 0) であり、ヒト F c R n は、それぞれ 9 0 0 n M の最大濃度を有する 5 倍および 3 倍の連続希釈物の両方として動態滴定モードで注入した。会合時間および解離時間は、それぞれ 3 分および 5 分であり、再生は不要であった。データの処理および分析は、P R O T E O N (商標) M a n a g e r ソフトウェア v 2 . 1 内で行った。各相互作用についての応答データを、インタースポット (未修飾のチップ) から応答を差し引き、かつ緩衝液ブランクから応答を差し引くことによって二重参照し、そして単純ラングミュア動態モデルに全体的に適合させた。平衡解離定数 (K_D) を、運動速度定数の比 ($K_D = k_d / k_a$) から推定した。会合相内で迅速に平衡結合応答に達した相互作用では、 K_D は平衡結合モデルを介して推定した。

20

【 0 2 1 0 】

表 4 は、I g G 1 二重特異的抗体および I g G 2 二重特異的抗体の、F c ガンマ (F c) 受容体への結合が、対照 h I g G 1 抗体および h I g G 2 抗体に類似していることを示す。表 5 は、I g G 1 二重特異的抗体および I g G 2 二重特異的抗体の F c R n 結合もまた対照 h I g G 2 A 抗体に類似していることを示す。

30

【 0 2 1 1 】

【表 4】

表4

結合した IgG	Fcγ 受容体(溶液内)							
	hFcγ 1	hFcγ 2A	hFcγ 2B	hFcγ 3A	hFcγ 3B	mFcγ 1	mFcγ 2B	mFcγ3
hIgG1 カップ (対照)	0.2 nM	弱い	3uM	272nM	弱い	120 nM	弱い	弱い
hIgG1.EE.L368 E.Ab1.Ab1/ hIgG1.RR.K40 9R.Ab2.Ab2	0.4 nM	弱い	6uM	671nM	弱い	260 nM	弱い	弱い
hIgG2 カップ (対照)	なし	非常に 弱い	>10uM	1930 nM	非常に 弱い	なし	非常に 弱い	非常に 弱い
hIgG2.EEE.L36 8E.Ab1.Ab1/ hIgG2.RRR.K4 09R.Ab2.Ab2	なし	非常に 弱い	>10uM	なし	なし	なし	なし	なし

10

20

【 0 2 1 2 】

【表 5】

表5

結合した IgG	Kd (uM)
hIgG1.EE.L368E.Ab1.Ab1/hIgG1.RR.K409R.Ab2.Ab2	0.826
hIgG2.EEE.L368E.Ab1.Ab1/ hIgG2.RRR.K409R.Ab2.Ab2	0.60
hIgG2ΔA (対照)	0.983

30

【 0 2 1 3 】

(実施例 15) 二重特異的抗体のインビトロでの成長阻害アッセイおよび解離速度の測定
この実施例は、ヘテロ二量体タンパク質の、インビトロで細胞の成長を阻害する能力を説明する。

【 0 2 1 4 】

その親の二価単一特異的抗体およびその一価対応物と比較した、細胞の成長に対する A b 3 + A b 4 I g G 1 二重特異的抗体のインビトロでの活性を決定した。

40

【 0 2 1 5 】

成長阻害アッセイ

C a l 2 7 舌癌細胞または F a D u 頭頸部癌細胞を 3 0 0 0 個細胞 / ウェルで R P M I 1 6 4 0 培地 + 2 % F B S (ウシ胎児血清) 内に播種し、96 ウェルプレート内で一晩成長させた。R P M I 1 6 4 0 培地 + 2 % F B S 内の抗体の連続希釈物を次に各ウェルに添加し、細胞を 3 7 °C で 5 日間成長させた。アッセイの最後に、細胞の量を、製造者のプロトコルの通りに、C e l l T i t e r G l o キット (P r o m e g a、M a d i s o n、W I、U S A) によって測定した。各抗体濃度での細胞の量を、対照ヒト I g G 1 での処理のものに対して正規化し、用量応答曲線の作成に用いた。全ての試料について 3 例ずつ行った。

50

【0216】

細胞に基づく抗体解離速度定数の測定

Ca127舌癌細胞を、DMEM+10%FBS内で、ポリ-D-リジンで被覆した96ウェルプレート上で、コンフルエントに近づくまで成長させた。ウェルをPBSで洗浄し、その後、2%パラホルムアルデヒドで、15分間にわたり室温で固定した。全てのその後のインキュベーションは室温で行った。免疫蛍光染色のために、ウェルを、DMEM/B(DMEM+5%BSA)で1時間にわたりブロックした。DMEM/B内に希釈した、Dylight800で標識した(Thermo Scientific、Rockford、IL、USAの標識キット)標的特異的抗体をウェルに添加し、1時間にわたりインキュベートした。ウェルを次に250ulのDMEM/Bで3回洗浄した。抗体-抗原の解離を測定するために、50ug/mLの未標識の標的特異的抗体150ulを各ウェル(時点「0」のウェルを除く)に添加し、室温で最大21時間の様々な時間にわたりインキュベートした。インキュベーションの最後に、抗体溶液を廃棄し、10uMのDRAQ5(商標)(Biostat Limited、United Kingdom)100ulで置き換え、さらに8分間にわたりインキュベートした。その後、DRAQ5(商標)溶液を廃棄し、ウェルを、光から保護しながら空気乾燥した。時点「0」では、ウェルは、未標識の抗体とのインキュベーションは行わずに、DRAQ5(商標)で直接染色した。全ての試料について3例ずつ行った。

10

【0217】

プレートを次に、Li-Cor ODYSSEY(登録商標)赤外線イメージングシステム(LI-COR Biotechnology、Lincoln、NE)によって読み取って、細胞表面上に結合したままのDylight800標識抗体の量に相当する800nmでの蛍光強度、および、DNAを染色し、したがって各ウェル内の細胞数と相関する、700nm(DRAQ5)での蛍光強度を測定した。各ウェルについて800nmでの蛍光強度を700nmでの値によって正規化して、ウェルごとの細胞総数の変動を説明した。その後、各ウェルについての正規化された蛍光強度を、時点「0」での対応値によって再び正規化し、次に、解離時間に対してプロットして、指数関数的減衰曲線を作成した。この曲線を次に、GraphPad Prismを用いて単一指数減衰方程式に適合させて、見かけの解離速度定数を得た。

20

【0218】

Ab3/Ab4二重特異的抗体はCa127細胞およびFaDu細胞の成長を効果的に阻害する

30

細胞の成長に対するAb3/Ab4二重特異的抗体のインビトロでの活性を調べるために、二重特異的抗体を、その親の二価単一特異的抗体およびその一価対応物と比較した。図29に示すように、一価のAb4/nc.bifc(hIgG1.RR.K409R.Ab4.Ab4/hIgG1.EE.L368E.Ab6.Ab6;D221R、P228R、D221E、P228E、L368E、およびK409Rでの突然変異)および二価のAb4.hIgG1(Ab4.野生型hIgG1)は、試験した全ての濃度で細胞の成長に対して有意な効果を有さず、一方、一価のAb3/nc.Fc(hIgG1.RR.K409R.Ab3.Ab3/hIgG1.EE.L368E.Ab6.Ab6;D221R、P228R、D221E、P228E、L368E、およびK409Rでの突然変異)は、1ug/mLより高い濃度でCa127細胞およびFaDu細胞の成長を阻害した(>10%)。それでも、一価のAb3/nc.bifc抗体の陰性対照(nc)アームをAb4で置き換えて二重特異的抗体(hIgG1.EE.L368E.Ab3.Ab3/hIgG1.RR.K409R.Ab4.Ab4)を生じさせると、これは、Ab3のアームの成長阻害活性を、二価単一特異的Ab3抗体(Ab3.hIgG1およびAb3.bifc)に匹敵するレベルまで顕著に上昇させた。この効果は、Ab4のアームがその細胞表面標的に結合した結果、親和力が増大したためであると仮定され、その結果、細胞表面上のAb3の局所的濃度、したがってAb3標的の占有率を増大させる。図29。

40

50

【0219】

A b 3 / A b 4 二重特異的抗体はその一価対応物よりも遅い見かけの解離速度定数を有する

二重特異的抗体における親和力の獲得の証拠を得るために、二重特異的抗体およびその一価対応物の見かけの解離速度定数を、C a l 2 7 細胞で測定した。図30に示すように、A b 3 / A b 4 . b i F c (h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4) の見かけの解離速度定数は、一価抗体 A b 3 / n c . b i F c (h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 3 . A b 3 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6) および A b 4 / n c . b i F c (h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 4 . A b 4 / h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 6 . A b 6) の見かけの解離速度定数よりも約2倍遅かった。総合すると、このデータは、A b 3 のアームおよび A b 4 のアームの両方が細胞表面に結合することを介して二重特異的抗体が親和力を獲得したことを示唆する。

10

【0220】

(実施例16) 標的発現細胞の異種移植モデルに対する二重特異的抗体のインビボでの有効性研究

この実施例は、本明細書において記載される方法を用いて調製されたヘテロ二量体タンパク質のインビボでの有効性を説明する。

【0221】

二重特異的抗体のインビボでの有効性研究は、野生型の二価単一特異的抗体と比較して、標的発現細胞の異種移植モデルで行う。さらに具体的には、免疫不全 n u / n u マウスまたは S C I D (重症複合免疫不全) マウスにおける皮下腫瘍増殖曲線(限定はしないが脾臓癌、頭頸部癌、結腸癌、胃癌、乳癌、前立腺癌、または肺癌を含む、代表的な腫瘍タイプ)を有効性研究の前に確定して、腫瘍移植のための最適な細胞数を得る。典型的な有効性は、以下のステップで実施する: 1) 腫瘍細胞を、腫瘍サイズが $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ に達するまで、5 ~ 8 週齢の免疫不全マウス内に皮下移植するステップ、2) ボーラス尾静脈注射を介して投薬を行うステップ。治療に対する腫瘍の応答に応じて、動物に、 $1 \sim 100 \text{ mg/kg}$ の二重特異的抗体(例えば、h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . A b 4 . A b 4 / h I g G 1 . R R . K 4 0 9 R . A b 3 . A b 3 ; D 2 2 1 R、P 2 2 8 R、D 2 2 1 E、P 2 2 8 E、L 3 6 8 E、および K 4 0 9 R での突然変異)または野生型抗体(h I g G 1 A b 3 または h I g G 1 A b 4)を1週間に最大3回注射する。3) 対照群における腫瘍サイズが 2000 mm^3 に達するまで投薬を続けるステップ。全ての実験動物を体重の変化について毎日モニタリングする。腫瘍容積をキャリパー装置によって週に2回測定し、以下の式で計算する: 腫瘍容積 = (長さ × 幅²) / 2。有効性は、腫瘍成長阻害のパーセンテージ(% T G I)で表し、方程式 $100 - (T / C \times 100)$ (式中、Tは治療群の M T V (腫瘍容積の中央値)であり、Cは対照群の M T V である)を用いて計算する。二重特異的抗体は、腫瘍成長阻害において、野生型の二価単一特異的抗体と同程度に有効である。さらに、親和性を正常な組織まで低減させると、二重特異的抗体に対する M T D (最大耐量)は高くなり、それによって、優れた、最大耐量 / 最小治療量として定義される治療指数が得られる。

20

30

40

【0222】

(実施例17) C D 2 0 陽性 B 細胞の T 細胞介在性の死滅作用に対する二重特異的抗体のインビボでの研究

この実施例は、C D 2 0 陽性 B 細胞の T 細胞介在性の死滅に対する、本明細書において記載される二重特異的抗体のインビボでの有効性を説明する。

【0223】

マウス C D 2 0 および C D 3 に特異的な完全長二重特異的抗体 (I g G 2 A) (例えば、h I g G 2 . E E E . L 3 6 8 E . C D 3 . C D 3 / h I g G 2 . R R R . K 4 0 9 R . C D 2 0 . C D 2 0 (C 2 2 3 E、E 2 2 5 E、P 2 2 8 E、C 2 2 3 R、E 2 2 5 R、P 2 2 8 R、L 3 6 8 E、および K 4 0 9 R での突然変異))を、本明細書において

50

記載される方法を用いて生成した。用量応答実験を野生型 C 5 7 / B 1 6 マウスにおいて行い、C D 1 9 陽性リンパ球を、二重特異的 C D 3 / C D 2 0 抗体を単回静脈内投与した 5 日後に、末梢血において測定した。2 0 0 μ g / k g 以上の用量は、C D 1 9 陽性リンパ球の集団を効果的に激減させた。表 6 を参照されたい。

【 0 2 2 4 】

【表 6】

表6

CD19(+)リンパ球(%)

用量	採血前	5日目
PBS	40.9	41.8
PBS	31.5	46.2
PBS	51.4	37
PBS	36.9	30.1
PBS	43.9	35.1
8 μ g/kg	43.9	39.1
8 μ g/kg	41.1	38.8
8 μ g/kg	37.5	25.8
40 μ g/kg	45.4	32.7
40 μ g/kg	37.3	28.6
40 μ g/kg	51	42.7
200 μ g/kg	43.1	3.49
200 μ g/kg	48.6	1.56
200 μ g/kg	41.5	0.74
1mg/kg	47.5	0
1mg/kg	50.5	0
1mg/kg	37.6	0
5mg/kg	44.5	0
5mg/kg	37.2	0
5mg/kg	43	0

10

20

30

40

【 0 2 2 5 】

(実施例 1 8) E p C A M 陽性腫瘍細胞の T 細胞介在性の死滅作用に対する二重特異的抗体のインビトロでの研究

この実施例は、細胞傷害性 T 細胞によって仲介される、ヘテロ二量体タンパク質の、インビトロでの腫瘍細胞を死滅させる能力を説明する。

【 0 2 2 6 】

E p C A M および C D 3 (例えば、h I g G 2 . E E E . L 3 6 8 E . E p C A M . E p C A M / h I g G 2 . R R R . K 4 0 9 R . C D 3 . C D 3 (C 2 2 3 E 、 E 2 2 5 E

50

、P 2 2 8 E、C 2 2 3 R、E 2 2 5 R、P 2 2 8 R、L 3 6 8 E、およびK 4 0 9 Rでの突然変異)) に特異的な完全長ヒト二重特異的 I g G 2 A 抗体を、本明細書において記載される方法を用いて生成した。二重特異的 E p C A M / C D 3 抗体の有効性を、エフェクター細胞と標的細胞との異なる比 (例えば、E / T 5 および E / T 1 0) および 4 日間の時間経過 (例えば、2 4 時間目、4 8 時間目、7 2 時間目、9 6 時間目に測定した) で細胞死滅アッセイセットを用いて決定した。E p C A M 陽性腫瘍細胞 (S W 4 8 0) を標的細胞として用い、P B M C (末梢血単核球) を、健康なドナーの血液からエフェクター細胞として単離した。二重特異的 E p C A M / C D 3 抗体の細胞傷害性の可能性を、C Y T O T O X 9 6 (登録商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (P r o m e g a、M a d i s o n、W I、U S A) によって評価した。図 3 1 A および図 3 1 B は、この実施例において生成された二重特異的 E p C A M / C D 3 抗体遺伝子が E p C A M 陽性腫瘍細胞 (S W 4 8 0) の死滅を誘発したことを示す。さらに具体的には、S W 4 8 0 細胞と P B M C とを少なくとも 7 2 時間にわたり共培養した後、S W 4 8 0 細胞の有意な溶解が、二重特異的 E p C A M / C D 3 抗体 (図において「h G 2 - E p C A M - C D 3」として表示されている) を 1 0 n M で添加した後に観察された。S W 4 8 0 細胞を 2 0 0 n M 超の濃度で定量的に死滅させた。二重特異的 E p C A M / C D 3 I g G 1 抗体 (例えば、h I g G 1 . E E . L 3 6 8 E . E p C A M . E p C A M / h 1 g G 1 . R R . K 4 0 9 R . C D 3 . C D 3 ; D 2 2 1 R、P 2 2 8 R、D 2 2 1 E、P 2 2 8 E、L 3 6 8 E、および K 4 0 9 R での突然変異) を用いる類似の細胞溶解の結果もまた観察された。

10

【 0 2 2 7 】

20

開示される教示は様々な適用、方法、および組成物に関して記載されているが、本明細書における教示および以下の特許請求の範囲に記載の発明から逸脱することなく、様々な変化および変更を行うことができることが理解されよう。前述の実施例は、開示される教示をより良く説明するために提供されており、本明細書において提示される教示の範囲を限定することを意図しない。本教示はこれらの典型的な実施形態に関して記載されているが、当業者であれば、これらの典型的な実施形態の多くの変型および変更が、不必要な試験を伴わずに可能であることが容易に理解されよう。全てのこのような変型および変更は、本教示の範囲内である。

【 0 2 2 8 】

特許、特許出願、出版物、教科書などを含む、本明細書において引用される全ての参考文献、およびそれにおいて引用される参考文献は、いまだそうでない限りにおいて、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。限定はしないが定義される用語、用語の使用法、記載される技術などを含む、組み込まれる文献および類似の材料の 1 つまたは複数が本願と異なるかまたは矛盾する場合、本願が優先される。

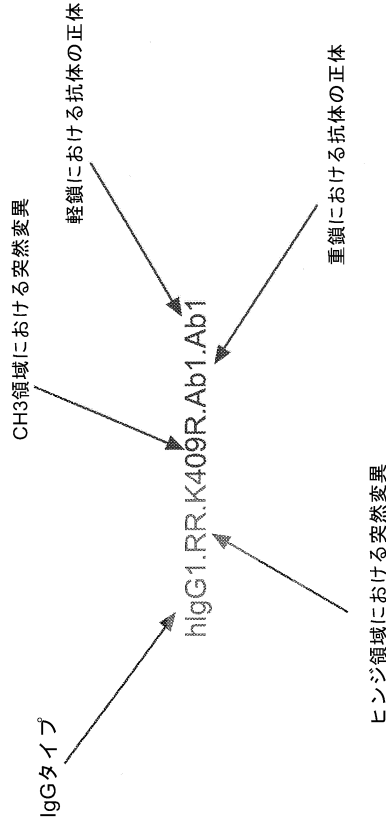
30

【 0 2 2 9 】

前述の記載および実施例は、本発明の特定の具体的な実施形態を詳述し、本発明者によって考えられる最良の態様を記載するものである。しかし、前述のものが文章中でいかに詳細に記載されていても、本発明は多くの方法で実施され得、本発明は添付の特許請求の範囲およびあらゆるその同等物に従って解釈されるべきであることが理解されよう。

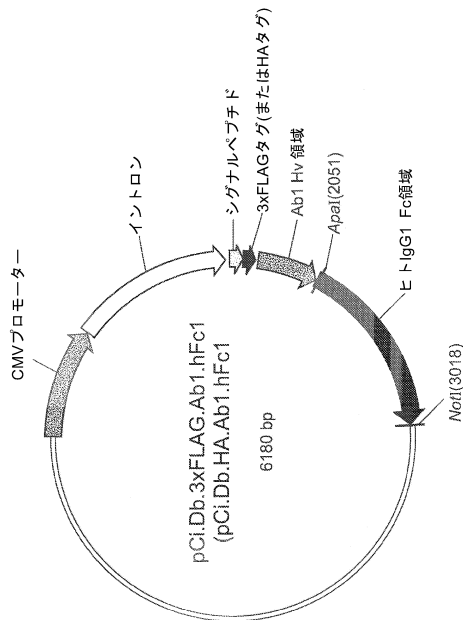
【図 1】

図 1



【図 3】

図 3



【図 2】

図 2

ヒトIgG2AのFc領域配列(配列番号1)

```

GCCTCCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCATGCTCCCGACGACCTCCGAGAGACAGGGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCAGAACCTGTGACCGTGTCTGTGAACTCTGGCGCTCTGACCAAGGGGTGCACACCTCCAGAGCTGTCTGCAG
TCCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACGTGCCATCCAGCACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTTAGATCAC
AAGCCAAACACACCAAGGTGCAAGACGCTGGAGAGAAAGTGTGTGGAGTGTCCACCTTGTCCAGGCCCTCCAGTGGCC
GGACCATCGGTTCCTGTTCCTTCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCTCCAGAACCCCAAGAGGTGAOCTGTGTGGTGGAC
GTGTCCACAGGACCCAGAGGTGCAAGTTCACCTGGTATGTGGACGGAGTGGAGGTGCACACGCCCAAGACCAAGCAAGCAAGAGG
AGCAGTTCACTCCACCTTCACAGAGTGTGAGGTGCTGACCGTGGTGCACAGGACCTGGCTGACGGAAAGGAGTAAAGTAAAG
GTGTCCAAAGGAGCTGCCATCCAGATCGAGAAAGACCATCTCCAGAGCAAGGAGGACCAAGAGAGCAGAGGTATATATATATATAT
TGCCCATCCAGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTGCTGACCTGTCTGTGAGGGATCTATATATATATATATATATATATATATAT
GAGTGGGAGTCCAAAGGAGAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
AAGCTGACCGTGGAGCAAGTCCAGATGCGACAGGGAAACAGTGTCTTCTGTTCCGTGATGCAAGGCGCTGCAACCAACTATAC
CCAGAAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCGGGTAAATAGCGGCGCG

```

ヒンジ領域

NotIFc2.1

【図 4】

図 4

ヒトIgG1野生型Fc領域配列(配列番号1)

```

GGGTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCCCTCTCCCAAGAG
CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGGCCCTGACCGAGCGGGGT
GCACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCTACAG
CGTGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCAGCACACCAAGGTGACAGAAAGTTGAGGCC
AAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAATC
CTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCGCCAAAGCCCAAGGACACCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGTCACTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ACGAAGCCCTGAGGTGAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCAGTACCG
TGTGGTCAAGGTCTCAGCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAG
AGTCAAGTGCAGAGGTCTCCAAAGCCCTCCCGACCCCTCGAGAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTTG
CCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTG
GGTCAAGGCTTCTATCCAGGAGATCGCGTGGAGTGGAGAGGAAATG
GGCAGCGGAGAACCAACTCAAGACACCGCTCCCGTGTGAGCTCCGAC
GGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAAGCTTCTCATGTCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCAACAG
ACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAATAGCGGCGCG

```

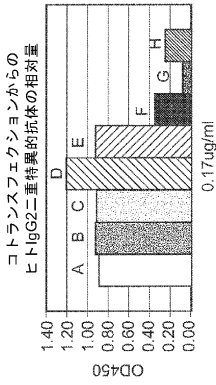



図9A

図9B

グループAのクローン		グループBのクローン	
2.11H		2.11F	
A	(hlgG2ΔA.EER.K409R.Ab1.Ab1)	E_E_R_	1.5F (hlgG2ΔA.RKE.K409R.Ab1.Ab1)
B	2.9C (hlgG2ΔA.DRE.K409R.Ab1.Ab1)	D_R_E_	2.10A (hlgG2ΔA.KER.K409R.Ab1.Ab1)
2.11F		2.10F	
C	(hlgG2ΔA.DER.K409R.Ab1.Ab1)	D_E_R_	1.10F (hlgG2ΔA.RRE.K409R.Ab1.Ab1)
D	2.2H (hlgG2ΔA.EEE.K409R.Ab1.Ab1)	E_E_E_	1.10H (hlgG2ΔA.RRR.K409R.Ab1.Ab1)
2.10B		2.9A	
E	(hlgG2ΔA.EKE.K409R.Ab1.Ab1)	E_K_E_	2.9A (hlgG2ΔA.RER.K409R.Ab1.Ab1)
F	2.5H (hlgG2ΔA.DEE.K409R.Ab1.Ab1)	D_E_E_	1.11H (hlgG2ΔA.RKR.K409R.Ab1.Ab1)
Ab1野生型hlgG2ΔA		Ab1野生型hlgG2ΔA	
Ab1野生型hlgG4		Ab1野生型hlgG4	
G			
H			

コトランスフェクションからの
ヒトIgG4二重特異的抗体の相対量

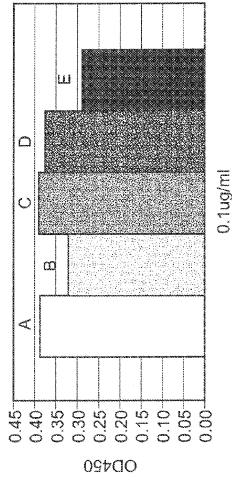


図7A

図7B

グループAのクローン		グループBのクローン	
3.11A (hlgG4.R.wt.Ab1.Ab1)		3.2A (hlgG4.E.wt.Ab1.Ab1)	
A	—R_	—R_	—E_
B	3.9A (hlgG4.K.wt.Ab1.Ab1)	—K_	—E_
C	3.11A (hlgG4.R.wt.Ab1.Ab1)	—R_	—D_
D	3.9A (hlgG4.K.wt.Ab1.Ab1)	—K_	—D_
E	3.9A (hlgG4.K.wt.Ab1.Ab1)	—K_	—D_

図10
hlgG1, hlgG2, およひhlgG4のCH3ドメインにおける「Glu」スキャン

hlgG1	CH3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E
hlgG2ΔA	CH3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E
hlgG4	CH3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E
Ab1野生型hlgG2ΔA																																	
Ab1野生型hlgG4																																	

図8A

コトランスフェクションからの
ヒトIgG2二重特異的抗体の相対量

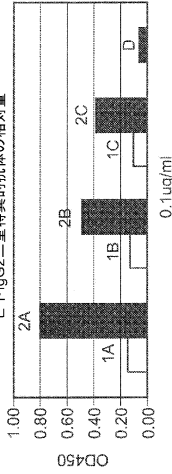


図8B

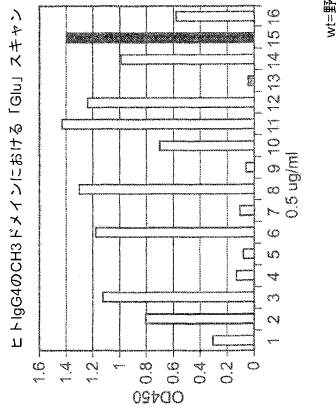
グループAのクローン		グループBのクローン	
2.2F (hlgG2ΔA.DEK.wt.Ab1.Ab1)		1.12B (hlgG2ΔA.RRD.wt.Ab1.Ab1)	
1A	—D_E_K_	—D_E_K_	—R_R_D_
2.11G		1.9F (hlgG2ΔA.RRD.K409R.Ab1.Ab1)	
2A	(hlgG2ΔA.DEK.K409R.Ab1.Ab1)	D_E_K_	R_R_D_
1B	2.3G (hlgG2ΔA.DEE.wt.Ab1.Ab1)	D_E_E_	R_R_D_
2B	2.5H (hlgG2ΔA.DEE.K409R.Ab1.Ab1)	D_E_E_	R_R_D_
1C	2.10D (hlgG2ΔA.ERE.wt.Ab1.Ab1)	E_R_F_	R_R_D_
2C	2.2C (hlgG2ΔA.ERE.K409R.Ab1.Ab1)	E_R_E_	R_R_D_
Ab1野生型hlgG2ΔA		Ab1野生型hlgG2ΔA	
Ab1野生型hlgG4		Ab1野生型hlgG4	
Ab1野生型hlgG2ΔA		Ab1野生型hlgG2ΔA	
Ab1野生型hlgG4		Ab1野生型hlgG4	

【図 1 1】

	抗体1(FLAGタグ)	抗体2(HAタグ)
1	hlgG4.R.Q347E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
2	hlgG4.R.Y349E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
3	hlgG4.R.T350E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
4	hlgG4.R.L351E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
5	hlgG4.R.T366E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
6	hlgG4.R.L368E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
7	hlgG4.R.K370E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
8	hlgG4.R.K392E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
9	hlgG4.R.T394E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
10	hlgG4.R.M397E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
11	hlgG4.R.L398E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
12	hlgG4.R.F405E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
13	hlgG4.R.Y407E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
14	hlgG4.R.K409E.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
15	hlgG4.R.wt.Abl.Abl	hlgG4.E.wt.Abl.Abl
16	Ab1 野生型hlgG4Fc	Ab1 野生型hlgG4Fc

図11B

図11A



【図 1 3】

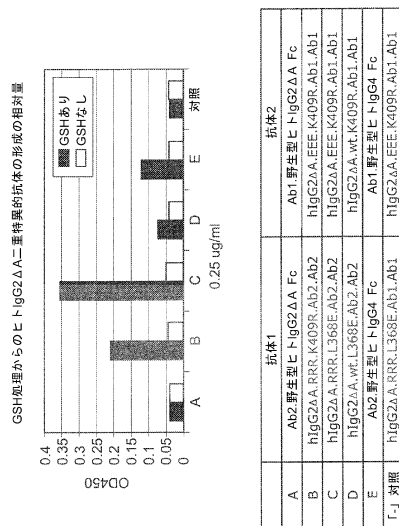


図13B

	抗体1	抗体2
A	Ab2 野生型ヒトIgG2A Fc	Ab1 野生型ヒトIgG2A Fc
B	hlgG2A.A.R.R.R.K409R.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
C	hlgG2A.A.R.R.R.L368E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
D	hlgG2A.A.wt.L368E.Abl.Abl	hlgG2A.A.wt.K409R.Abl.Abl
E	Ab2 野生型ヒトIgG4 Fc	Ab1 野生型ヒトIgG4 Fc
F-J	hlgG2A.A.R.R.R.L368E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl

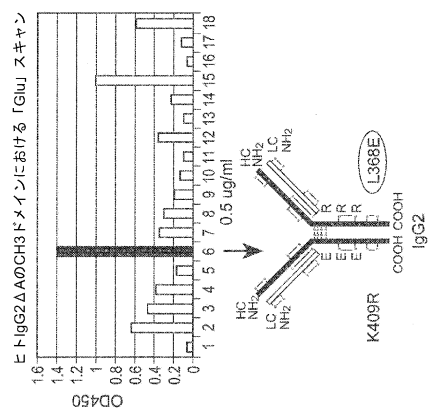
Ab1: K 軽鎖を有する抗原A抗体
Ab2: L 軽鎖を有する抗原B抗体

【図 1 2】

	抗体1(HAタグ)	抗体2(FLAGタグ)
1	hlgG2A.A.R.R.R.Q347E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
2	hlgG2A.A.R.R.R.Y349E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
3	hlgG2A.A.R.R.R.T350E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
4	hlgG2A.A.R.R.R.L351E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
5	hlgG2A.A.R.R.R.T366E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
6	hlgG2A.A.R.R.R.L368E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
7	hlgG2A.A.R.R.R.K370E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
8	hlgG2A.A.R.R.R.K392E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
9	hlgG2A.A.R.R.R.T394E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
10	hlgG2A.A.R.R.R.M397E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
11	hlgG2A.A.R.R.R.L398E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
12	hlgG2A.A.R.R.R.F405E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
13	hlgG2A.A.R.R.R.Y407E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
14	hlgG2A.A.R.R.R.K409E.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
15	hlgG2A.A.R.R.R.K409R.Abl.Abl	hlgG2A.A.EEE.K409R.Abl.Abl
16	Ab1 野生型hlgG2A A	Ab1 野生型hlgG2A A
17	Ab1 hlgG2A.A (K409R)	Ab1 hlgG2A.A (K409R)
18	Ab1 野生型hlgG4	Ab1 野生型hlgG4

図12B

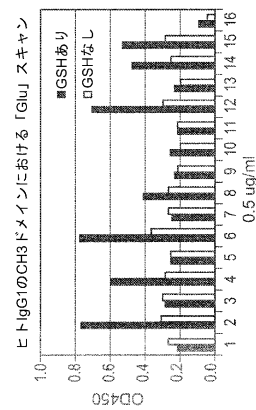
図12A



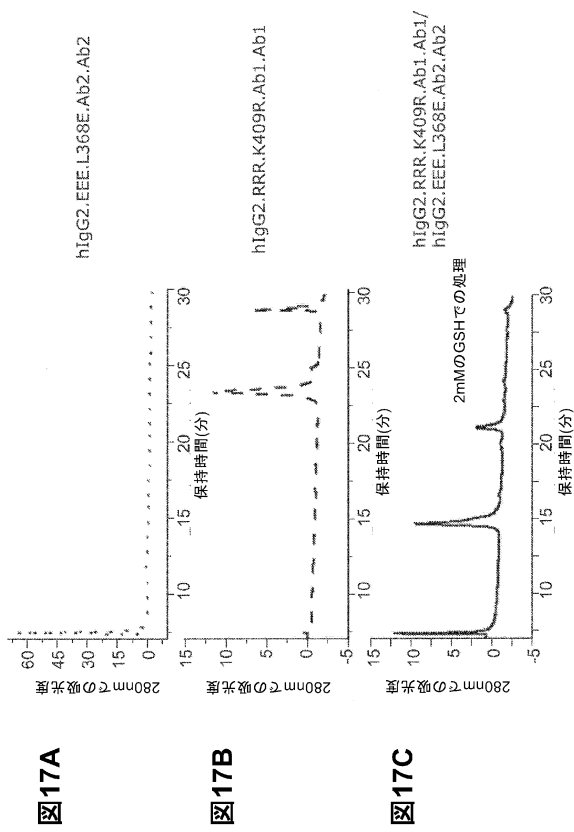
【図 1 4】

	抗体1	抗体2
1	hlgG1.EE.Q347E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
2	hlgG1.EE.Y349E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
3	hlgG1.EE.T350E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
4	hlgG1.EE.L351E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
5	hlgG1.EE.T366E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
6	hlgG1.EE.L368E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
7	hlgG1.EE.K370E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
8	hlgG1.EE.K392E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
9	hlgG1.EE.T394E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
10	hlgG1.EE.M397E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
11	hlgG1.EE.L398E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
12	hlgG1.EE.F405E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
13	hlgG1.EE.Y407E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
14	hlgG1.EE.K409E.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
15	hlgG1.EE.K409R.Abl.Abl	hlgG1.RR.K409R.Abl.Abl
16	Ab2 野生型hlgG4 Fc	Ab1 野生型ヒトIgG4 Fc

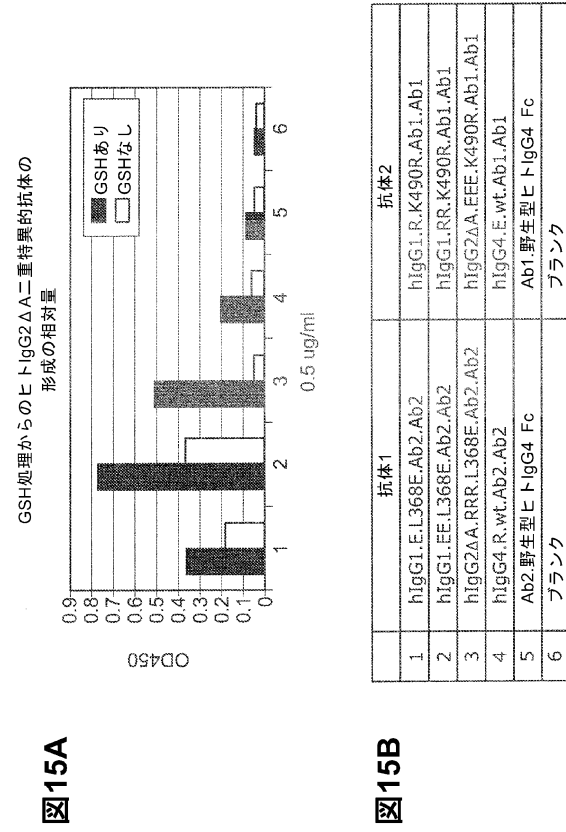
図14A



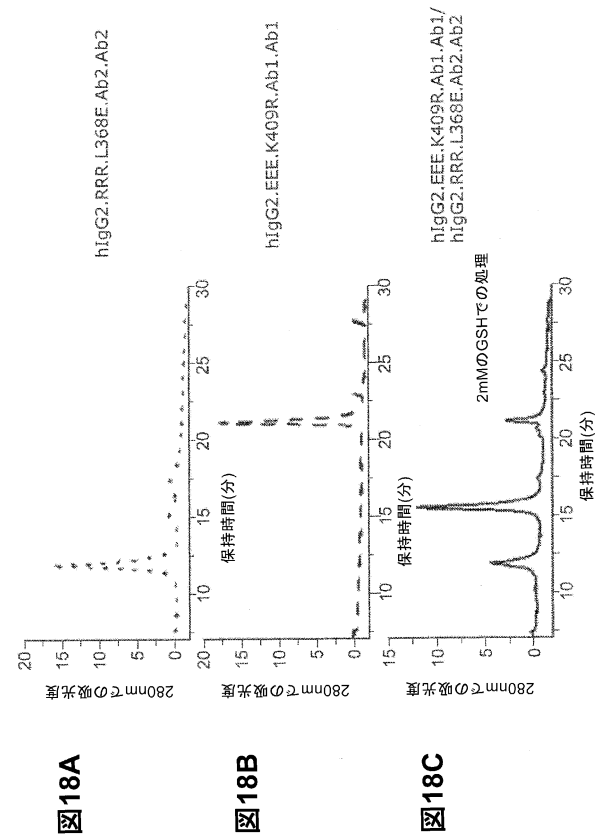
【 図 1 7 】



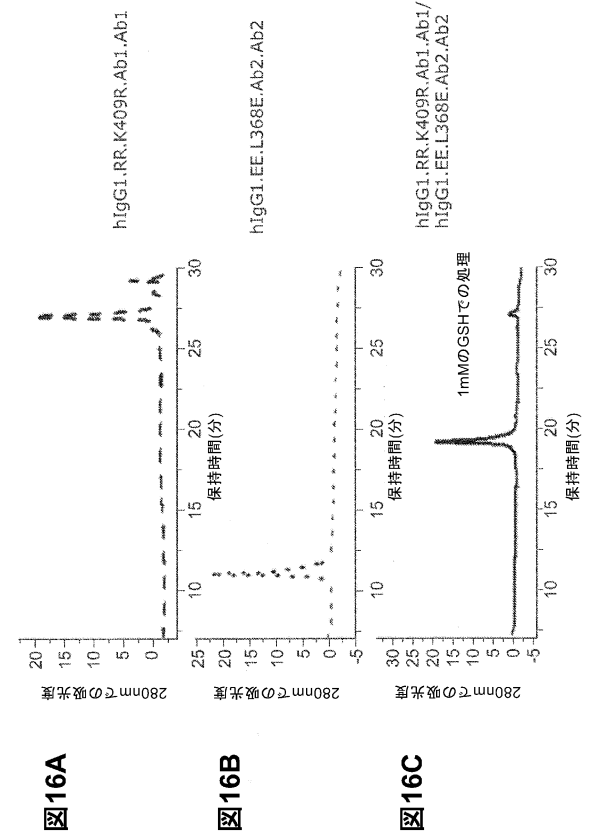
【 図 1 5 】



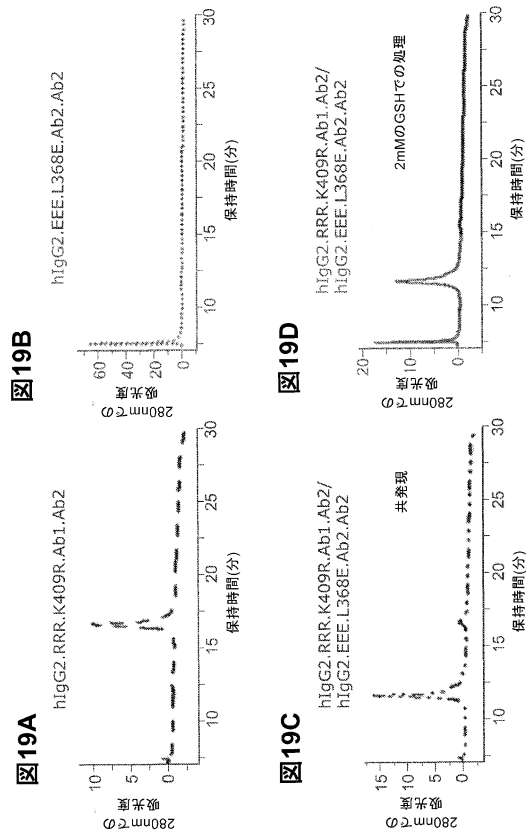
【 図 1 8 】



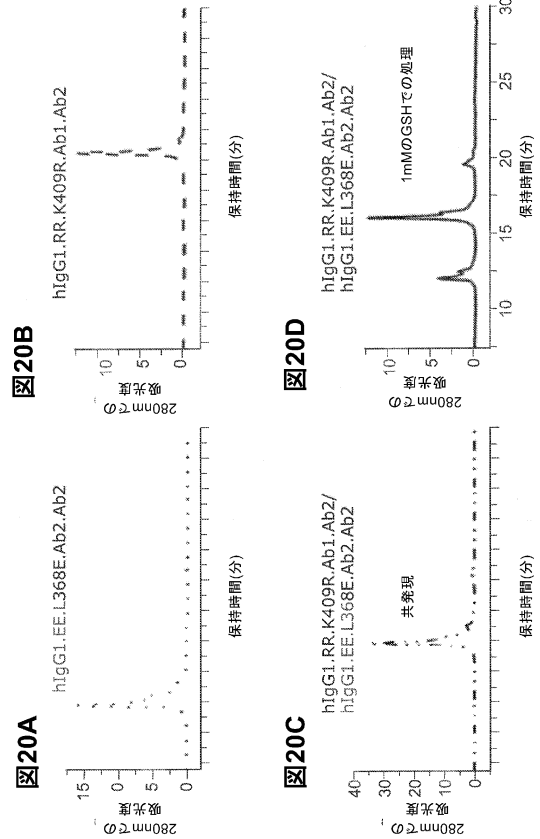
【 図 1 6 】



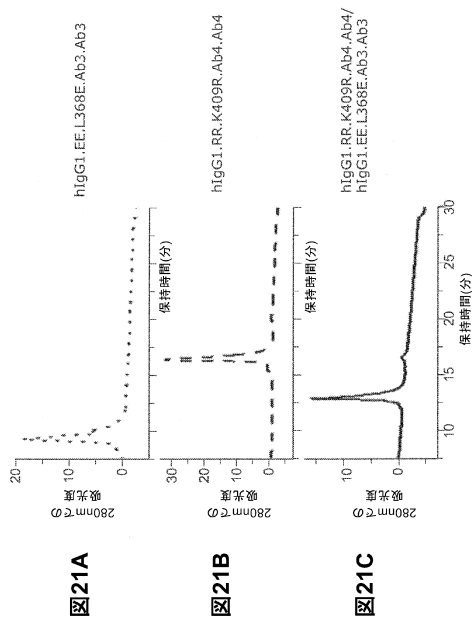
【図 19】



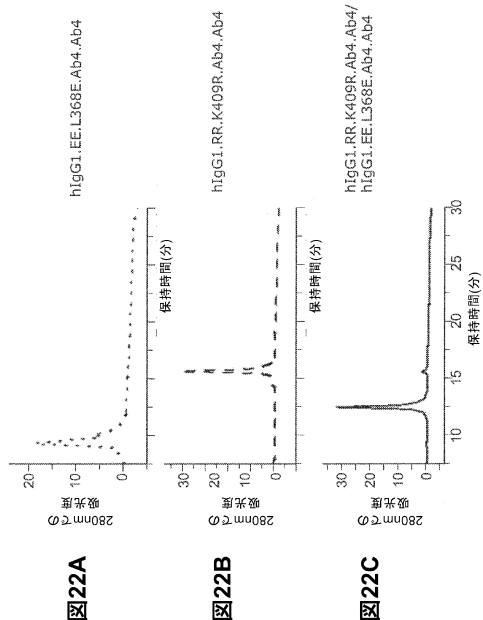
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【 図 2 3 】

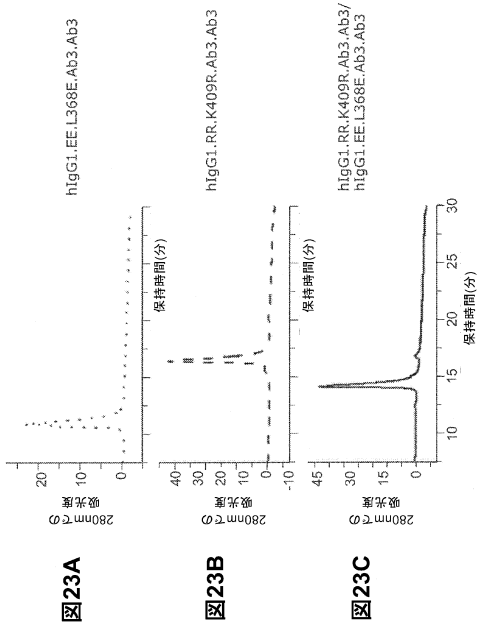


図23A

図23B

図23C

【 図 2 4 】

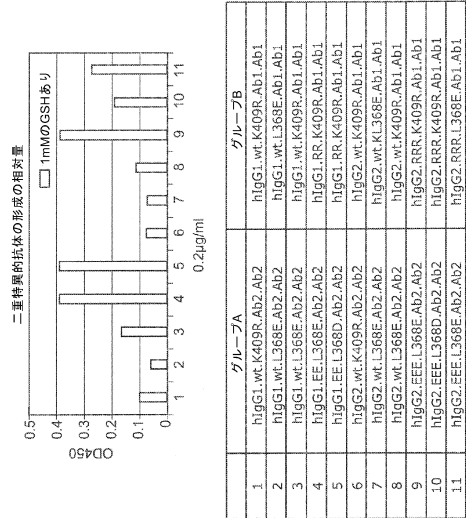


図24A

図24B

【 図 2 5 - 1 】

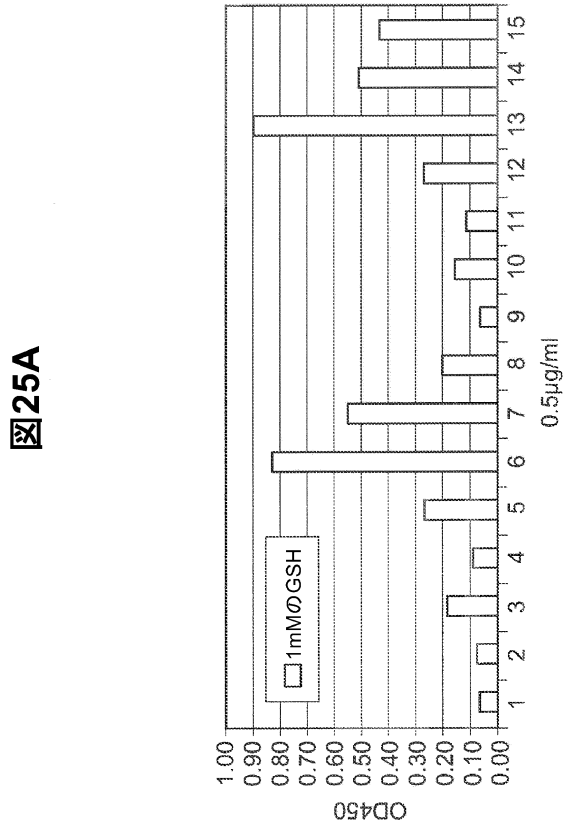


図25A

【 図 2 5 - 2 】

図25B

	グループA	グループB
1	Ab2.野生型hlgG2	Ab1.野生型hlgG1
2	hlgG1.EE.野生.Ab2.Ab2	hlgG1.RR.野生.Ab1.Ab1
3	hlgG1.野生.K409R.Ab2.Ab2	hlgG1.野生.K409R.Ab1.Ab1
4	hlgG1.野生.L368E.Ab2.Ab2	hlgG1.野生.L368E.Ab1.Ab1
5	hlgG1.野生.L368E.Ab2.Ab2	hlgG1.野生.K409R.Ab1.Ab1
6	hlgG1.EE.L368E.Ab2.Ab2	hlgG1.RR.K409R.Ab1.Ab1
7	hlgG1.EE.K409R.Ab2.Ab2	hlgG1.RR.K409R.Ab1.Ab1
8	hlgG1.EE.L368E.Ab2.Ab2	hlgG1.RR.L368E.Ab1.Ab1
9	Ab2.野生型.hlgG2	Ab1.野生型.hlgG2
10	hlgG2.野生.K409R.Ab2.Ab2	hlgG2.野生.K409R.Ab1.Ab1
11	hlgG2.野生.L368E.Ab2.Ab2	hlgG2.野生.L368E.Ab1.Ab1
12	hlgG2.野生.L368E.Ab2.Ab2	hlgG2.野生.K409R.Ab1.Ab1
13	hlgG2.EEE.L368E.Ab2.Ab2	hlgG2.RRR.K409R.Ab1.Ab1
14	hlgG2.EEE.L368E.Ab2.Ab2	hlgG2.RRR.L368E.Ab1.Ab1
15	hlgG2.EEE.K409R.Ab2.Ab2	hlgG2.RRR.K409R.Ab1.Ab1

【図26】

図26A

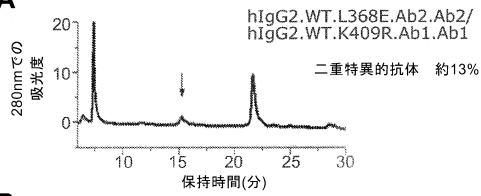


図26B

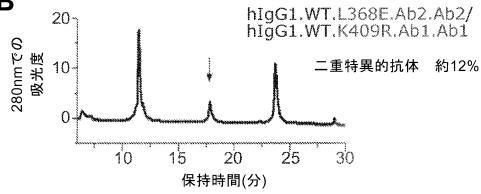


図26C

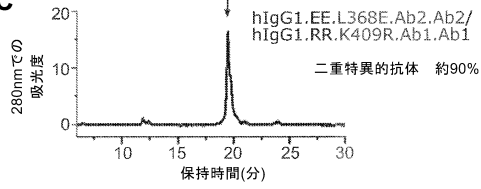
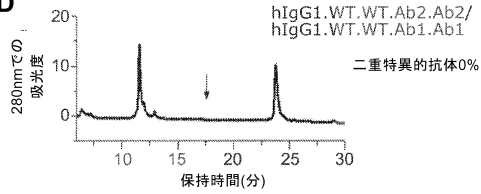


図26D



【図27】

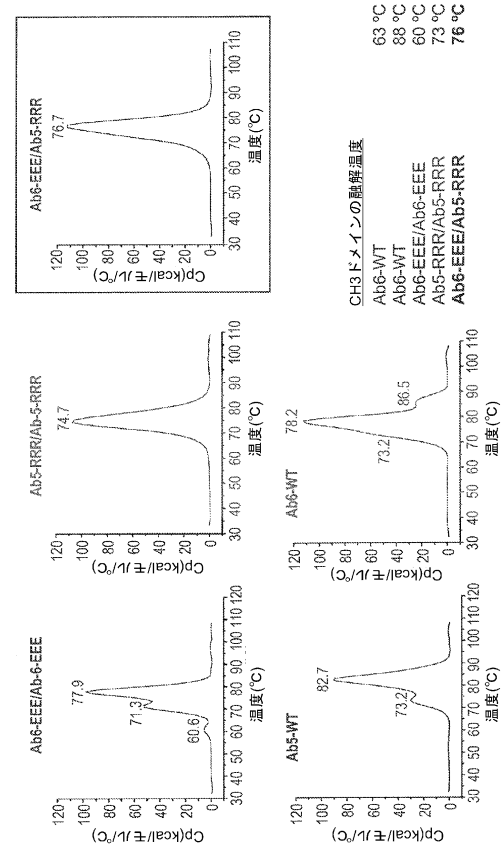
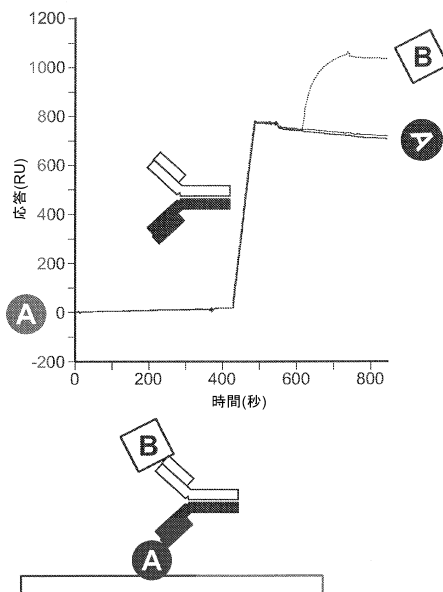


図27

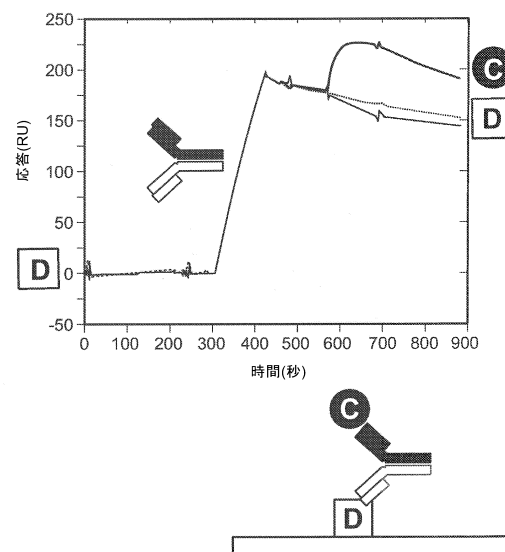
【図28-1】

図28A

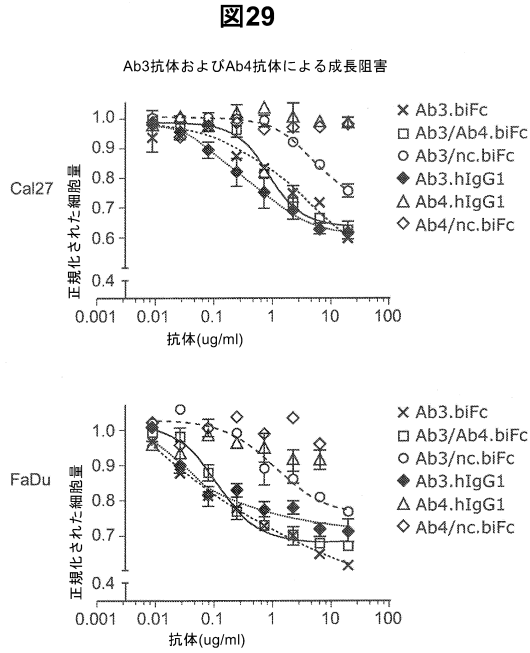


【図28-2】

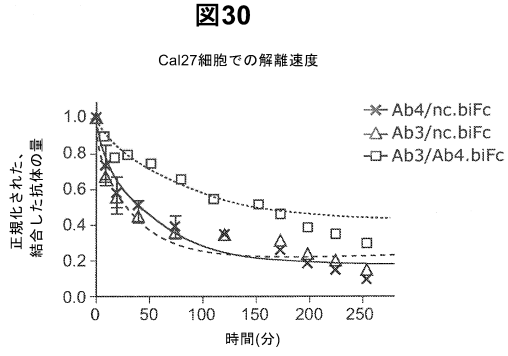
図28B



【図 29】

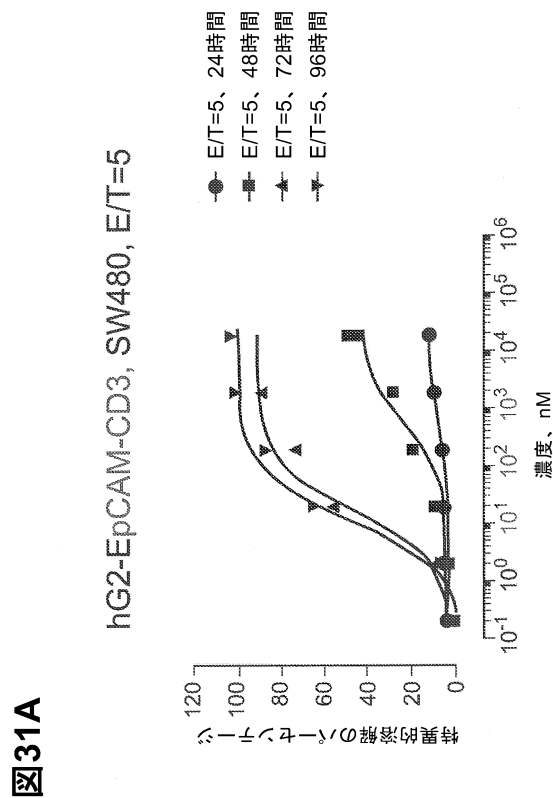


【図 30】

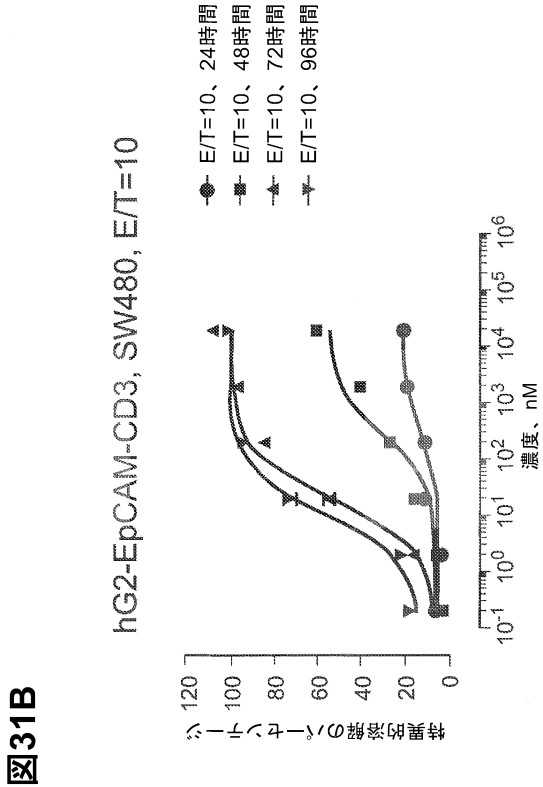


抗体	Ab3/nc.biFc	Ab4/nc.biFc	Ab3/Ab4.biFc
解離速度、 $K_d(\text{分}^{-1})$	0.0303	0.0204	0.012
半減期(分)	22.9	34.0	58.1

【図 31 - 1】



【図 31 - 2】



【配列表】

0006022444000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 W
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 Y
		A 6 1 P	35/00

- (72)発明者 ジョーム ボンズ
 アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ市 イースト・グラ
 ンド・アヴェニュー 2 3 0 ライナット・ニューロサイエンス・コーポレーション内
- (72)発明者 アーヴィンド ラジュパル
 アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ市 イースト・グラ
 ンド・アヴェニュー 2 3 0 ライナット・ニューロサイエンス・コーポレーション内
- (72)発明者 パヴェル ストラップ
 アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ市 イースト・グラ
 ンド・アヴェニュー 2 3 0 ライナット・ニューロサイエンス・コーポレーション内

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 0 9 / 0 0 6 5 2 0 (W O , A 1)
 特表平 1 1 - 5 0 0 9 1 5 (J P , A)
 K GUNASEKARAN, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 1 0 年 4 月 1 6 日, V285 N25, P196
 37-19646

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 6 / 0 0
 P u b M e d