

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-523034
(P2024-523034A)

(43)公表日 令和6年6月25日(2024.6.25)

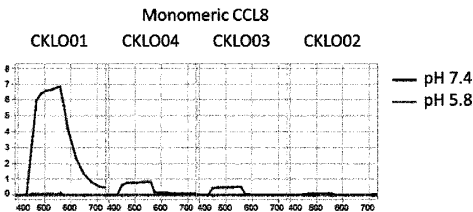
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全155頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-577644(P2023-577644)			(71)出願人	591003013
(86)(22)出願日	令和4年6月15日(2022.6.15)				エフ．ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和6年2月15日(2024.2.15)				F．HOFFMANN-LA ROCH
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/066289				E AKTIENGESSELLSCHA
(87)国際公開番号	WO2022/263501				FT
(87)国際公開日	令和4年12月22日(2022.12.22)				スイス・シーエイチー4070バーゼル
(31)優先権主張番号	21180204.6				・グレンツアーヘルストラツセ124
(32)優先日	令和3年6月18日(2021.6.18)			(74)代理人	110001508
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)				弁理士法人 津国
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(72)発明者	ベルティネッティーラパトゥキ, クリス ティーナ スイス国、4070 バーゼル、グレン ツァッハーシュトラーセ 124、ツェ ー／オー・エフ．ホフマンーラ・ロシュ ・アーゲー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 二重特異性抗CCL2抗体

(57)【要約】

本発明は、ヒトCCL2上の2つの異なるエピトープに結合する二重特異性抗CCL2抗体、その医薬組成物、それらの製造、並びにがん、炎症性疾患、自己免疫疾患及び眼科疾患の処置のための医薬品としての使用に関する。

Figure 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C C L 2 上の第 1 のエピトープに（特異的に）結合する第 1 の抗原結合部位と、ヒト C C L 2 上の第 2 の異なるエピトープに（特異的に）結合する第 2 の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、

前記二重特異性抗体が、

a) (N 末端から C 末端方向に) V H 1 - C H 1 - L 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 - L 2 - V L 1 - C L を含む、第 1 のポリペプチド鎖であって、

V H 1 は、第 1 の重鎖可変ドメインであり、V L 1 は、第 1 の可変軽鎖ドメインであり（両方が前記第 1 の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

C H 1 は、定常重鎖ドメイン 1 であり、

L 1 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一請求項では 5 ～ 10 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

C H 2 は、定常重鎖ドメイン 2 であり、

C H 3 は、定常重鎖ドメイン 3 であり、

L 2 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一請求項では 10 ～ 15 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

C L は、定常軽鎖ドメインである、

第 1 のポリペプチド鎖と、

b) (N 末端から C 末端方向に) V H 2 - C H 1 - L 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 - L 2 - V L 2 - C L を含む、第 2 のポリペプチド鎖であって、

V H 2 は、第 2 の重鎖可変ドメインであり、V L 2 は、第 2 の可変軽鎖ドメインであり（両方が前記第 2 の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

C H 1 は、定常重鎖ドメイン 1 であり、

L 1 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一請求項では 5 ～ 10 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

C H 2 は、定常重鎖ドメイン 2 であり、

C H 3 は、定常重鎖ドメイン 3 であり、

L 2 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一請求項では 10 ～ 15 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

C L は、定常軽鎖ドメインである、

第 2 のポリペプチド鎖と

を含み、

A) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 90 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 93 のアミノ酸配列を含むか、

又は

B) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 91 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 93 のアミノ酸配列を含むか、

又は

C) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 90 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 94 のアミノ酸配列を含むか、

又は

10

20

30

40

50

又は

50

- N) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

- O) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

- P) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、

二重特異性抗体。

【請求項 2】

- i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

- i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、
i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

- L 1 が、9 ～ 1 1 アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーであり、
L 2 が、9 ～ 1 1 アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーである、

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

L 1 及び L 2 が、

G S G G S G G S G G (配列番号 1 8 3)、G S G G G S G G G G (配列番号 1 8 4)、
G S G G G G S G G G (配列番号 1 8 5)、G G S G G S G G G G (配列番号 1 8 6)、
G G S G G G S G G G (配列番号 1 8 7)、G G S G G G G S G G (配列番号 1 8 8)、
G G G S G G S G G G (配列番号 1 8 9)、G G G S G G G S G G (配列番号 1 9 0)、
及び G G G G S G G S G G (配列番号 1 9 1)

の群から選択されるポリペプチドリンカーである、

請求項 4 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 6】

L 1 が、G G S G G G G S G G (配列番号 1 8 8) のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーであり、

L 2 が、G G S G G G G S G G (配列番号 1 8 8) のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーである、

請求項 4 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

前記定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 が、ヒト I g G アイソタイプ、好ましくはヒト I g G 1 アイソタイプのものである、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記二重特異性抗体が、

i) CCL2 のその受容体 CCR2 への結合を *in vitro* で遮断し (レポーターアッセイ、 $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$)、かつ／又は

ii) 骨髄系細胞の CCL2 媒介走化性を *in vitro* で阻害し ($IC_{50} = 1.5 \text{ nM}$)、かつ／又は

iii) カニクイザル (*cyno*) 及びヒト CCL2 に対して交差反応性である、先行する請求項のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 9】

前記二重特異性抗体が、CCL2 への結合と比較して、CCL8、CCL7 及び CCL13 の群から選択される他の CCL ホモログに対して交差反応性でない、先行する請求項のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 10】

前記二重特異性抗体が、pH 依存的様式でヒト CCL2 に結合し、前記第 1 の抗原結合部位及び前記第 2 の抗原結合部位の両方が、酸性 pH よりも中性 pH でより高い親和性で CCL2 に結合する、先行する請求項のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 11】

前記二重特異性抗体が、pH 7.4 において、pH 5.8 よりも 10 倍高い親和性でヒト CCL2 に結合する、先行する請求項のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 12】

前記定常重鎖ドメイン CH1、ヒンジ、CH2 及び CH3 が、ヒト IgG1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (Kabat EU ナンバリング)：

i) Q311R 及び／若しくは P343R、並びに／又は

ii) L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T 及び／若しくは A330K、並びに／又は

iii) M428L、N434A 及び／若しくは Y436T、並びに／又は

iv) Q438R 及び／若しくは S440E

の 1 つ以上を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 13】

前記定常重鎖ドメイン CH1、ヒンジ、CH2 及び CH3 が、ヒト IgG1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (Kabat EU ナンバリング)：

i) Q311R 及び／若しくは P343R、並びに／又は

ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T 及び／若しくは A330K、並びに／又は

iii) N434A、並びに／又は

iv) Q438R 及び／若しくは S440E

の 1 つ以上を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 14】

前記定常重鎖ドメイン CH1、ヒンジ、CH2 及び CH3 が、ヒト IgG1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (Kabat EU ナンバリング)：

i) Q311R 及び P343R、並びに

ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307V 及び A330K、並びに

iii) M428L、N434A 及び Y436T、並びに

iv) Q438R 及び S440E

の 1 つ以上を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 15】

前記定常重鎖ドメイン CH3 が、以下の変異 (Kabat EU ナンバリング)

K447G

10

20

30

40

50

を含む、請求項 12～14 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 16】

先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体をコードする、核酸。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 18】

抗体が産生されるように、請求項 17 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。

【請求項 19】

前記抗体を前記宿主細胞から回収することを更に含む、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬製剤。

【請求項 21】

医薬として使用するための、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 22】

がん、又は炎症性疾患若しくは自己免疫疾患の処置に使用するための、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 23】

医薬の製造における、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。

20

【請求項 24】

前記医薬が、がんの処置のためのものである、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記医薬が、炎症性疾患又は自己免疫疾患の処置のためのものである、請求項 24 に記載の使用。

【請求項 26】

がんを有する個体を処置する方法であって、前記個体に有効量の請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

【請求項 27】

炎症性疾患又は自己免疫疾患を有する個体を処置する方法であって、前記個体に有効量の請求項 1～15 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト CCL2 上の 2 つの異なるエピトープに結合する二重特異性抗 CCL2 抗体、その医薬組成物、それらの製造、並びにがん、炎症性疾患、自己免疫疾患及び眼科疾患の処置のための医薬品としての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

40

CCL2 / CCR2 軸は、腫瘍への未成熟骨髄細胞の動員の主なメディエータである。CCL2 は悪性細胞によって過剰発現され、化学誘引物質勾配を構築する細胞外マトリックス (ECM) に結合する。一旦腫瘍に達すると、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) は、抗腫瘍 T 細胞応答の開始を阻害する抗炎症性サイトカイン / 受容体を分泌 / 上方制御することによって腫瘍形成促進環境に寄与する。このようにして、MDSC は、任意の T 細胞活性化療法 (Meyer et al, 2014) の有効性を低下させるか、又は損なうことさえあり得る。したがって、これらの未成熟骨髄細胞の動員の特異的阻害は、チェックポイント阻害剤、T 細胞二重特異性抗体 (TCB) 又は他のがん免疫療法 (CIT) の有効性を高める。さらに、CCL2 は、血管新生、転移及び腫瘍成長の促進にも関与しており、CCL2 の中和がいくつかの抗腫瘍介入に寄与し得ることを示唆している。

50

【0003】

CCL2を標的化することは、その受容体とは対照的に、望ましくないCCL2媒介効果を特異的に阻害し、Th1及びNK細胞のような他の免疫細胞集団の動員に關与する同じ受容体(CCR2)であるが異なるリガンド(例えば、CCL7、CCL8、CCL13)を介してシグナル伝達し得るものを節約する。

【0004】

臨床的には、CCL2は、関節リウマチ(Haringman et al, Arthritis Rheum. 2006 Aug; 54(8): 2387-92)、特発性肺線維症(Raghu et al, Eur Respir J. 2015 Dec; 46(6): 1740-50)、糖尿病性腎症(Menne et al, Nephrol Dial Transplant (2017) 32: 307-315)、及びがん(Sandhu et al, Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Apr; 71(4): 1041-50)などの異なる炎症性疾患によって引き起こされるその上昇したレベルを中和することを目的としたいくつかの研究において好ましい抗体標的であった。しかし、その高い合成速度は、觀察された高いin vivo抗体-抗原解離定数(KD)と共に、臨床的に実行可能な用量での従来の抗体による遊離CCL2の抑制を妨げる主な障害であることが証明されている(Fetterly et al, J Clin Pharmacol. 2013 Oct; 53(10): 1020-7)。

【0005】

CCL2中和は、乳がん(BC)、卵巣がん(OvCa)、結腸直腸がん(CRC)、膵臓がん及び前立腺がんなどのいくつかの種類のがんで觀察されている、CCL2の血清レベルが上昇した患者においてより明らかに關連するようである。しかし、この血清学を提示しないが、腫瘍が骨髓系統の免疫細胞で高度に浸潤されているこれらの適応症内の患者であっても、上記のように腫瘍状況においてCCL2が果たす多くの役割のために、この新規治療から非常に利益を得ることができる。

【0006】

Igawa et al, Immunological Reviews 270(2016) 132-151は、許容され得る薬物動態学的プロファイルを維持するために、生成された抗体が、pH依存性CDR(酸性エンドソーム内での抗体-抗原解離のために、抗原分解をもたらす)と、最適化された等電点(pI)及びFcガンマRIIbへの結合の増強(免疫複合体の細胞取り込みを促進する)及び新生児型Fc受容体に対する中程度の親和性を有する操作されたFc部分とを有する、掃攻技術(Sweeping technology)を記載している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ヒトCCL2上の2つの異なるエピトープに結合する特定の二重特異性抗CCL2抗体、その医薬組成物、それらの製造、並びにがん、炎症性疾患、自己免疫疾患及び眼科疾患の処置のための医薬品としての使用に關する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ヒトCCL2上の第1のエピトープに(特異的に)結合する第1の抗原結合部位と、ヒトCCL2上の第2の異なるエピトープに(特異的に)結合する第2の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、

二重特異性抗体が、

a) (N末端からC末端方向に) VH1-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL1-CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり(両方が第1の抗原結合部位を共に形成する(共に会合して形成する))、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L 1 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一実施形態では5 ～ 10 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH 2 は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH 3 は、定常重鎖ドメイン3であり、

L 2 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一実施形態では10 ～ 15 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

CL は、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、

b) (N末端からC末端方向に) VH 2 - CH 1 - L 1 - ヒンジ - CH 2 - CH 3 - L 2 - VL 2 - CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、

VH 2 は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL 2 は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH 1 は、定常重鎖ドメイン1であり、

L 1 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一実施形態では5 ～ 10 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH 2 は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH 3 は、定常重鎖ドメイン3であり、

L 2 は、5 ～ 15 アミノ酸の長さ（一実施形態では10 ～ 15 アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

CL は、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含み、

A) i) VH 1 ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

VL 2 ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

B) i) VH 1 ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号91のアミノ酸配列を含み、

VL 2 ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

C) i) VH 1 ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

VL 2 ドメインが、配列番号94のアミノ酸配列を含むか、

又は

D) i) VH 1 ドメインが、配列番号72のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

VL 2 ドメインが、配列番号94のアミノ酸配列を含むか、

又は

E) i) VH 1 ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

VL 2 ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

F) i) VH 1 ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、

VL 1 ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH 2 ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

P) i) V H 1ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
V L 1ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、

50

V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、二重特異性抗体を提供する。

【0009】

本発明の一実施形態は、上記二重特異性抗体であって、

i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、

V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、

V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、二重特異性抗体である。

【0010】

本発明の一実施形態は、上記二重特異性抗体であって、

i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、

V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、

V L 2 ドメインが、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む、二重特異性抗体である。

【0011】

本発明の一実施形態では、定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 は、ヒト I g G アイソタイプ、好ましくはヒト I g G 1 アイソタイプのものである。

【0012】

本発明の一実施形態では、二重特異性抗体は、

i) *in vitro* で C C L 2 のその受容体 C C R 2 への結合を遮断し（レポーターアッセイ、 $I C_{50} = 0.5 \text{ nM}$ ）、かつ／又は

i i) 骨髄系細胞の C C L 2 媒介走化性を *in vitro* で阻害し（ $I C_{50} = 1.5 \text{ nM}$ ）、かつ／又は

i i i) カニクイザル（*cyno*）及びヒト C C L 2 に対して交差反応性である。

【0013】

本発明の一実施形態では、二重特異性抗体は、

二重特異性抗体は、他の C C L ホモログに対して交差反応性ではない（C C L 2 への結合と比較して、他の C C L ホモログ（C C L 8、C C L 7 及び C C L 1 3 の群から選択される）に対して 1 0 0 倍少ない結合を示す）。

【0014】

本発明の一実施形態では、二重特異性抗体は、

二重特異性抗体は、ヒト C C L 2 上の第 1 及び第 2 のエピトープにイオン依存的に結合する。

【0015】

本発明の一実施形態では、二重特異性抗体は、

二重特異性抗体は、p H 依存的様式でヒト C C L 2 に結合し、第 1 の抗原結合部位及び第 2 の抗原結合部位はどちらも酸性 p H よりも中性 p H で、より高い親和性で C C L 2 に結合する。

【0016】

本発明の一実施形態では、二重特異性抗体は、

二重特異性抗体は、p H 7.4 において、p H 5.8 よりも 1 0 倍高い親和性でヒト C C L 2 に結合する。

【0017】

本発明の一実施形態では、定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 は、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（K a b a t E U ナンバリング）：

i) Q 3 1 1 R 及び／若しくは P 3 4 3 R（抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している）、並びに／又は

i i) L 2 3 5 W、G 2 3 6 N、H 2 6 8 D、Q 2 9 5 L、K 3 2 6 T 及び／若しくは A 3 3 0 K（ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している）、並びに／又は

10

20

30

40

50

i i i) N 4 3 4 A (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに／又は

i v) Q 4 3 8 R 及び／又は S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の一実施形態では、定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 は、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング) :

i) Q 3 1 1 R 及び P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに

i i) L 2 3 4 Y、P 2 3 8 D、T 2 5 0 V、V 2 6 4 I、T 3 0 7 V 及び A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに

i i i) M 4 2 8 L、N 4 3 4 A 及び Y 4 3 6 T (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

i v) Q 4 3 8 R 及び S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む。

【 0 0 1 9 】

本発明は更に、本明細書に記載の本発明による二重特異性抗体をコードする単離された核酸を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明は更に、そのような核酸を含む宿主細胞を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明は更に、そのような宿主細胞を培養して二重特異性抗体を製造することを含む、二重特異性抗体を産生する方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明は更に、本明細書中に記載の本発明による二重特異性抗体及び薬学的に許容され得る担体を含む医薬製剤を提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明は更に、医薬品として使用するための本明細書中に記載の本発明による二重特異性抗体を提供する。

【 0 0 2 4 】

本発明は更に、がんの処置における使用のための本明細書中に記載されるような本発明による二重特異性抗体を提供する。

【 0 0 2 5 】

本発明は更に、炎症性疾患又は自己免疫疾患の処置における使用のための本明細書中に記載の本発明による二重特異性抗体を提供する。

【 0 0 2 6 】

本発明は更に、医薬品の製造における本明細書に記載の本発明による二重特異性抗体の使用を提供する。

【 0 0 2 7 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の二重特異性抗体が、第 1 及び第 2 の抗原結合部位／部分として異なる抗 C C L 2 抗原結合部位を使用するという知見に部分的に基づく。これらの二重特異性抗 C C L 2 抗体は、C C L 2 の特定のエピトープに高い特異性で結合し、その受容体 C C R 2 への C C L 2 の結合を特異的に阻害する能力を有する。それらは、単一特異性抗体と比較して改善された免疫複合体形成及び i n v i v o での改善された C C L 2 抑制を示す。本明細書に記載のコントースボディフォーマットにおける特異的二重特異性抗 C C L 2 抗体は、更に、低粘度 (これは、例えば皮下投与に適した高濃度溶液を可能にする) のような有益な特性を示す。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】単一特異性抗CCL2抗体（CNT0888（=CNT0）、1A5、1G9及びヒト化11K2（=11k2）の組換えCCL2及びCCL2ホモログへの結合を示す表面プラズモン共鳴（Biacore（登録商標））センサーグラム。

【図2a】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体CNT0888-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体CNT0888-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

10

【図2b】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図2c】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体ABN912-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体ABN912-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

20

【図2d】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1A4-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1A4-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図2e】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1A5-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1A5-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

30

【図2f】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1G9-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体1G9-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

40

【図2g】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体2F6-SG1（野生型IgG1）、又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び単一特異性抗CCL2抗体2F6-SG105 20mg/kg（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のFcRnトランスジェニックマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図3a】a）実線：20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG1（野生型IgG1）及びb）点線：20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）のマウスにおけるi.v.注射後の

50

血清総マウスCCL2濃度（図3a）及び抗体－時間プロファイル（図3b）の時間経過を示す

【図3b】a）実線：20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG1（野生型IgG1）及びb）点線：20mg/kgの単一特異性抗CCL2抗体11K2-SG105（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）のマウスにおけるi.v.注射後の血清総マウスCCL2濃度（図3a）及び抗体－時間プロファイル（図3b）の時間経過を示す

【図4a】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体11K2//1G9-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体11K2//1G9-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4b】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体CNTO888//11K2-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体CNTO888//11K2-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4c】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体CNTO888//1G9-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体11K2//1G9-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4d】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体CNTO888//1A5-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体CNTO888//1A5-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4e】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A5//1G9-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A5//1G9-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4f】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体11K2//2F6-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体11K2//2F6-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4g】a）実線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体ABN912//11K2-WT IgG1（インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1）又はb）点線：0.1mg/kgのヒトCCL2（hCCL2）及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体ABN912//11K2-PGLALA（Fc受容体結合サイレンシングIgG1）からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

10

20

30

40

50

【図4h】a) 実線: 0.1mg/kgのヒトCCL2 (hCCL2) 及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A4//2F6-WT IgG1 (インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1) 又はb) 点線: 0.1mg/kgのヒトCCL2 (hCCL2) 及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A4//2F6-PGLALA (Fc受容体結合サイレンシングIgG1) からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図4i】a) 実線: 0.1mg/kgのヒトCCL2 (hCCL2) 及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A5//2F6-WT IgG1 (インタクトFc受容体結合を有する野生型IgG1) 又はb) 点線: 0.1mg/kgのヒトCCL2 (hCCL2) 及び20mg/kgの二重特異性抗CCL2抗体1A5//2F6-PGLALA (Fc受容体結合サイレンシングIgG1) からなる予め形成された免疫複合体のBalb/cマウスへのi.v.注射後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図5a】4つの改変11K2及び4つのCNTO888バリエーションのpH7.4 (黒線) 及びpH5.8 (灰色線) での単量体CCL2、並びに4つの改変11K2及び4つのCNTO888バリエーションのそれぞれの組み合わせ抗原結合部分から生じる16個の二重特異性抗CCL2抗体CKLO01~CKLO16への結合プロファイルを示すBiacore (登録商標) センサーグラム。

【図5b】4つの改変11K2及び4つのCNTO888バリエーションの単量体CCL2、並びに4つの改変11K2及び4つのCNTO888バリエーションのそれぞれの組み合わせ抗原結合部分から生じる16個の二重特異性抗CCL2抗体CKLO01~CKLO16への結合プロファイルを示すBiacore (登録商標) センサーグラム。pH5.8での更なる解離相を、pH7.4での解離相の直後にBIACORE (登録商標) アッセイに組み込んだ。

【図6】pH7.4 (黒線) 及びpH5.8 (灰色線) での単量体CCL8に対する二重特異性抗CCL2抗体CKLO01、CKLO02、CKLO03及びCKLO04の結合プロファイルを示すBiacore (登録商標) センサーグラム。

【図7a】hCCL2及び二重特異性抗CCL2抗体 (親CNTO//11K2及びpH依存性バリエーションCKLO01、CKLO02、CKLO03及びCKLO04) からなる予め形成された免疫複合体をSCIDマウスに注射した後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図7b】hCCL2及びCKLO03 (IgG1野生型Fcを含む) 又はCKLO03-SG1099 (pI Fcが增強されたCKLO03) からなる予め形成された免疫複合体をSCIDマウスに注射した後の経時的なhCCL2の血清濃度。

【図8】走化性アッセイ: 同一のCDR及び可変領域VH/VL、すなわちCKLO2-IgG1野生型及びCKLO2-SG1095を有するが異なるFc部分を有する二重特異性抗CCL2抗体は、同一の効力でTHP-1細胞の遊走を阻害することができる (IC₅₀=0.2µg/ml; 図8、左パネル)。同様に、pH非依存性である、CKLO2の親非修飾二重特異性抗体CNTO888/11k2k2 IgG1であるCCL2-0048もまた、pH依存性が抗原掃攻に重要であるので、0.2µg/mlのIC₅₀を示し、このアッセイでは起こらない現象である。対応する単一特異性抗体CNTO888 IgG1及びヒト化11k2 IgG1は、それぞれ0.3及び0.7µg/mlのIC₅₀値を示すが、huIgG1アイソタイプコントロールは阻害を示さない (図8、右パネル)。

【図9】遺伝子改変マウスモデルにおけるin vivo抗腫瘍活性。MabCKLO2-IgG1 (Fc野生型IgG1) 及びCKLO2-SG1099 (=CKLO2 pI增強) によるマウス腫瘍モデルの処置。試験終了時の腫瘍体積 (左)、腫瘍重量 (中央) 及びM-MDSC浸潤物 (右)。(ビヒクルは黒色、CKLO2野生型IgG1は灰色、及びCKLO2 pI增強Fc (CKLO2-SG1099) は白色バー/点線)

【図10】二重特異性抗CCL2抗体 (ビヒクルは黒色、CKLO2野生型IgG1は灰色、及びpI增強Fc (CKLO2-SG1099) は白色バー/点線) で処置したin

10

20

30

40

50

v i v o 抗腫瘍活性試験（図 9 の有効性を参照）中の血清総レベル（左）及び遊離（右）C C L 2 レベル。

【図 1 1】カニクイザルにおける C C L 2 掃攻効率の概念実証研究。カニクイザルの血清中の総抗体濃度－時間プロファイル；左パネル：4 つの抗体の平均濃度－時間プロファイルを 7 日間にわたって示す；群 1：最大総 C C L 2 蓄積の対照としての単一特異性 C N T O 8 8 8－S G 1（= I g G 1 野生型）抗 C C L 2 抗体（n = 3 動物）；群 2：p H 依存性標的結合を有するが F c 修飾を有さないバイパラトピック性抗 C C L 2 抗体 C K L O 2－S G 1（I g G 1 野生型）（n = 3）；群 3：p H 依存性標的結合及び F c－p I 並びに更なる修飾を有するバイパラトピック抗 C C L 2 抗体 C K L O 2－S G 1 1 0 0（n = 4）、並びに群 4：p H 依存性標的結合、F c－p I 及び F c γ R I I b 親和性増強及び更なる修飾を有するバイパラトピック抗 C C L 2 抗体 C K L O 2－S G 1 0 9 5（n = 4）；右パネル：P K 試験期間（7 0 日間）にわたる個体 4（群 2）の個々の濃度－時間プロファイルを示す。

10

【図 1 2】カニクイザルにおける C C L 2 掃攻効率の概念実証研究。カニクイザルの血清中の総 C C L 2 濃度－時間プロファイル；左パネル：7 日間にわたって、4 つの抗体の平均総 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す；右パネル：P K 試験期間（7 0 日間）にわたって、個体 4（群 2）の個々の総 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す。

【図 1 3】カニクイザルの血清中遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイル；左パネル：7 日間にわたって、4 つの抗体の平均遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す；右パネル：P K 試験期間（7 0 日間）にわたって、個体 4（群 2）の個々の遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す；検出限界未満の試料については 0. 0 1 n g / m L（定量下限）の値を用いて平均プロファイル进行計算した。

20

【図 1 4】カニクイザルにおける C C L 2 掃攻効率の P K / P D 研究。カニクイザルの血清中の総 C K L O 2－S G 1 0 9 5 濃度－時間プロファイル（異なる濃度での C K L O 2－S G 1 0 9 5 処置（群 1～群 3））；左パネル：7 日間にわたって、3 つの用量レベルについての平均濃度－時間プロファイル（n = 4）を示す；右パネル：試験期間（9 8 日間）にわたって、2 匹の A D A 陰性個体動物（2 5 m g / k g 用量群）の個体濃度－時間プロファイルを示す。

【図 1 5】カニクイザルにおける C C L 2 掃攻効率の P K / P D 研究。異なる濃度での C K L O 2－S G 1 0 9 5 処置下のカニクイザルの血清中の総 C C L 2 濃度－時間プロファイル（群 1～群 3）及び C N T O 8 8 8－S G 1 処置との比較（群 4）；左パネル：7 日間にわたって、4 つの試験群の平均総 C C L 2 濃度－時間プロファイル（エラーバーは S D を示す）を提示する；右パネル：P K 試験期間（9 8 日間）にわたって、第 3 群（n = 2、エラーバーは範囲を示す）及び第 4 群（n = 3、エラーバーは S D を示す）の A D A 陰性動物の個々の総 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す。

30

【図 1 6】カニクイザルにおける C C L 2 掃攻効率の P K / P D 研究。カニクイザルの血清中遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイル；左パネル：7 日間にわたって、4 つの研究群の平均遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイル（エラーバーは S D を示す）を示す（異なる濃度での C K L O 2－S G 1 0 9 5 処置（群 1～3）及び C N T O 8 8 8－S G 1 処置（群 4）との比較）；右パネル：P K 試験期間（7 0 日間）にわたって、群 3（n = 2、エラーバーは範囲を示す）及び群 4（n = 3、エラーバーは S D を示す。）の A D A 陰性動物の平均遊離 C C L 2 濃度－時間プロファイルを示す；検出限界未満の試料については 0. 0 1 n g / m L（定量下限）の値を用いて平均プロファイル进行計算した。

40

【図 1 7】本発明の二重特異性抗 C C L 2 抗体の例示的なスキーム（いわゆるコントースボディ（C B）フォーマット）。

【図 1 8】S E C 複合体：バイパラトピック抗体 P 1 A F 8 1 3 9（3 9 と略す）及び P 1 A F 8 1 4 3（4 3 と略す）との C C L 2 複合体の S E C

【図 1 9 a】図 1 9 A～図 1 9 C：F c ガンマー I I a－F c R I I a を介した C C L 2 の細胞取り込み。図 1 9 A：参照抗体 P 1 A D 8 3 2 5 を有する Y 字形バイパラトピック抗体、図 1 9 B：参照抗体 P 1 A D 8 3 2 5 と一緒になったコントースボディ P 1 A F 8

50

142及びP1AF8143、並びに図19C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

【図19b】図19A～図19C：FcガンマーIIa-FcRIIaを介したCCL2の細胞取り込み。図19A：参照抗体P1AD8325を有するY字形バイパルトピック抗体、図19B：参照抗体P1AD8325と一緒にあったコントースボディP1AF8142及びP1AF8143、並びに図19C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

【図19c】図19A～図19C：FcガンマーIIa-FcRIIaを介したCCL2の細胞取り込み。図19A：参照抗体P1AD8325を有するY字形バイパルトピック抗体、図19B：参照抗体P1AD8325と一緒にあったコントースボディP1AF8142及びP1AF8143、並びに図19C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

10

【図20a】図20A～図20C：FcガンマーIIb-FcRIIbを介したCCL2の細胞取り込み。図20A：参照抗体P1AD8325を有するY字形バイパルトピック抗体、図20B：参照抗体P1AD8325と一緒にあったコントースボディP1AF8142及びP1AF8143、並びに図20C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

20

【図20b】図20A～図20C：FcガンマーIIb-FcRIIbを介したCCL2の細胞取り込み。図20A：参照抗体P1AD8325を有するY字形バイパルトピック抗体、図20B：参照抗体P1AD8325と一緒にあったコントースボディP1AF8142及びP1AF8143、並びに図20C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

【図20c】図20A～図20C：FcガンマーIIb-FcRIIbを介したCCL2の細胞取り込み。図20A：参照抗体P1AD8325を有するY字形バイパルトピック抗体、図20B：参照抗体P1AD8325と一緒にあったコントースボディP1AF8142及びP1AF8143、並びに図20C：参照セットとしての抗体P1AD8325、CNT0888-IgG1、CKLO2(=CKLO2-SG1(=IgG1 wt))、及び抗体の非存在。

30

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトCCL2上の2つの異なるエピトープに結合する二重特異性抗CCL2抗体、その医薬組成物、それらの製造、並びにがん、炎症性疾患、自己免疫疾患及び眼科疾患の処置のための医薬品としての使用に関する。

【0030】

本発明の一態様では、二重特異性抗CCL2抗体は、ヒトCC2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、異なる第2のエピトープに（特異的に）結合する第2の異なる抗原結合部位とを含み、二重特異性抗CCL2抗体は、

40

a) (N末端からC末端方向に) VH1-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL1-CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり（両方が第1の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリッカーであり、

50

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、
b）（N末端からC末端方向に）VH2-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL2-CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、
VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、
CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、
L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含む。

10

20

30

40

50

【0031】

本明細書で使用される場合、「MCP-1」とも呼ばれる「CCL2」、「ヒトCCL2」という用語は、NCBI記録アクセッション番号NP_002973で参照され、CCL2、MCP-1（単球走化性タンパク質1）、SMC-CF（平滑筋細胞走化性因子）、LDCF（リンパ球由来走化性因子）、GDCF（神経膠腫由来単球走化性因子）、TDCF（腫瘍由来走化性因子）、HCL1（ヒトサイトカイン11）、MCAF（単球走化性及び活性化因子）として様々に知られている76アミノ酸配列を意味する。遺伝子記号はSCYA2、ヒト17番染色体上のJE遺伝子であり、新たな名称はCCL2である（Zlotnik, Yoshie 2000. Immunity 12:121-127）。JEはヒトMCP-1/CCL2のマウスホモログである。

【0032】

Handel and others (Biochemistry. 1996; 35: 6569-6584)は、CCL2二量体の溶液構造を決定した。これらの研究は、CCL2の二次構造が4つのβシートからなることを示した。さらに、CCL2の二量体界面を担う残基は、Zhang and Rollins (Mol Cell Biol. 1995; 15: 4851-4855)によって記載されている。タンパク質複合体は、2つのモノマーが大きなポケットを形成するように配向された伸長したように見える。2つの結晶形態、いわゆるI及びP形態の単量体及び二量体CCL2の構造も決定されている（Lubkowski et al., Nat Struct Biol. 1997; 4: 64-69）。Paolini et al, (J Immunol. 1994 Sep 15; 153 (6): 2704-17)は、MCP1/CCL2が生理学的に適切な濃度でモノマーとして存在することを記載した：rec. CCL2タンパク質（Peprotechから購入）をサイズ排除HPLC、沈降平衡超遠心法、化学架橋で分析することにより、MCP-1の単量体及び二量体の重量分率がin vitroでの協働に依存することを示すことができた。最後に、Seo及び共同研究者（J Am Chem Soc. 2013 Mar 20; 135 (11): 4325-32)は、イオン移動度質量分析によって、生理学的条件下で単量体及び二量体の両方の形態の注入されたCCL2の存在を示すことができた。

【0033】

したがって、「野生型CCL-2」（wt CCL2）は単量体として存在することが

できるが、実際には生理学的濃度で二量体を形成することもできる。この単量体－二量体の平衡は確かに異なり、異なる濃度が使用され得る記載された全ての *in vitro* 実験について慎重に考慮する必要がある。不確実性を回避するために、本発明者らは点突然変異 CCL2 バリエーションを作製した：CCL2 の「P8A」バリエーションは、二量体化界面に突然変異を保有し、その結果、定義された純粋な CCL2 単量体をもたらす二量体を形成することができない。対照的に、CCL2 の「T10C」バリエーションは、CCL2 の固定二量体をもたらす (J Am Chem Soc. 2013 Mar 20; 135 (11) : 4325–32)。

【0034】

CCL2 / CCR2 軸は、腫瘍への未成熟骨髄細胞の動員の主なメディエータである。CCL2 は悪性細胞によって過剰発現され、化学誘引物質勾配を構築する細胞外マトリックス (ECM) に結合する。一旦腫瘍に達すると、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) は、抗腫瘍 T 細胞応答の開始を阻害する抗炎症性サイトカイン / 受容体を分泌 / 上方制御することによって腫瘍形成促進環境に寄与する。このようにして、MDSC は、任意の T 細胞活性化療法 (Meyer et al, 2014) の有効性を低下させるか、又は損なうことさえあり得る。したがって、これらの未成熟骨髄細胞の動員の特異的阻害は、チェックポイント阻害剤、T 細胞二重特異性及びがん免疫療法の有効性を高める。さらに、CCL2 は、血管新生、転移及び腫瘍成長の促進にも関与しており、CCL2 の中和がいくつかの抗腫瘍介入に寄与し得ることを示唆している。

【0035】

CCL2 を標的化することは、その受容体とは対照的に、望ましくない CCL2 媒介効果を特異的に阻害し、Th1 及び NK 細胞のような他の免疫細胞集団の動員に関与する同じ受容体 (CCR2) であるが異なるリガンド (例えば、CCL7、CCL8、CCL13) を介してシグナル伝達し得るものを節約する。

【0036】

臨床的には、CCL2 は、関節リウマチ (Haringman et al, 2006)、特発性肺線維症 (Raghu et al, 2015)、糖尿病性腎症 (Menne et al, 2016)、及び、がん (Sandhu et al, 2013) などの異なる炎症性疾患によって引き起こされるその上昇したレベルを中和することを目的としたいくつかの研究において好ましい抗体標的であった。しかし、その高い合成速度は、観察された高い *in vivo* 抗体－抗原解離定数 (KD) と共に、臨床的に実行可能な用量での従来の抗体による遊離 CCL2 の抑制を妨げる主な障害であることが証明されている (Fetterly et al, 2013)。

【0037】

CCL2 中和は、乳がん (BC)、卵巣がん (OvCa)、結腸直腸がん (CRC)、膵臓がん及び前立腺がんなどのいくつかの種類のがんで観察されている、CCL2 の血清レベルが上昇した患者においてより明らかに関連するようである。しかし、この血清学を提示しないが、腫瘍が骨髄系統の免疫細胞で高度に浸潤されているこれらの適応症内の患者であっても、上記のように腫瘍状況において CCL2 が果たす多くの役割のために、この新規治療から非常に利益を得ることができる。

【0038】

本明細書で使用される場合、「ヒト CCL2 に結合する」、「ヒト CCL2 に特異的に結合する」、「ヒト CCL2 に結合する」又は「抗 CCL2」抗体は、 $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 以下の KD 値、一実施形態では $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 以下の KD 値、一実施形態では $5.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ の KD 値の結合親和性で、ヒト CCL2 抗原に特異的に結合する抗体を指す。

【0039】

結合親和性は、例えば CCL2 細胞外ドメイン (例えば、その天然に存在する 3 次元構造) を含むコンストラクトを使用して、表面プラズモン共鳴技術 (BIAcore (登録商標)、GE-Healthcare ウプサラ、スウェーデン) 等の標準的な結合アッ

10

20

30

40

50

セイで決定される。一実施形態では、結合親和性は、例示的な可溶性 C C L 2 を使用する標準的な結合アッセイで決定される。

【0040】

抗体の特異性は、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を指す。例えば、天然抗体は単一特異性である。

【0041】

本明細書で使用される場合、「単一特異性」抗体という用語は、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する1つ以上の結合部位を有する抗体を示す。

【0042】

本明細書で使用される場合、「(ヒト) C C L 2 に結合する二重特異性抗体」、「(ヒト) C C L 2 に結合するバイパラトピック抗体」、「二重特異性抗 C C L 2 抗体」、「バイパラトピック抗 C C L 2 抗体」という用語は、抗体が(ヒト) C C L 2 上の少なくとも2つの異なるエピトープに特異的に結合することができることを意味する。典型的には、そのような二重特異性抗体は、2つの異なる抗原結合部位(2つの異なるパラトープ)を含んでおり、それぞれが(ヒト) C C L 2 の異なるエピトープに特異的である。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、C C L 2 上の2つの異なる重複しないエピトープに結合することができ、これは、2つの異なる抗原結合部位が C C L 2 への結合について競合しないことを意味する。

【0043】

本明細書の場合、「アクセプターヒトフレームワーク」とは、以下に定義するように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでいてもよく、又はアミノ酸配列の変更を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。いくつかの実施形態では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して、配列が同一である。

【0044】

「抗体」という用語は、本明細書では最も広い意味で使用され、限定されるものではないが、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を含めた、様々な抗体構造を包含する。

【0045】

「抗体断片」とは、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子である。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子(例えば scFv)；及び抗体断片から形成される多特異的抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

本明細書で使用される場合、「価」という用語は、抗体中の指定された数の抗原結合部位の存在を意味する。したがって、「抗原への一価結合」という用語は、抗体中の抗原に特異的な1つ(及び1つ以下)の抗原結合部位の存在を意味する。

【0047】

「抗原結合部位」という用語は、抗原との相互作用を提供する抗体の部位又は領域、すなわち1つ又はいくつかのアミノ酸残基を指す。例えば、抗体の抗原結合部位は、相補性決定領域(CDR)からのアミノ酸残基を含む。一実施形態では、抗体の抗原結合部位はVH及びVL由来のアミノ酸残基を含む。ネイティブ免疫グロブリン分子は、典型的には、2つの抗原結合部位を含み；Fab分子は、典型的には、1つの抗原結合部位を有する

10

20

30

40

50

。「抗原結合部分」は、抗原決定基に特異的に結合する抗原結合部位を含むポリペプチド分子を指す。抗原結合部分には、本明細書で更に定義される抗体及びその断片が含まれる。特定の抗原結合部分は、抗体重鎖可変領域と抗体軽鎖可変領域とを含む、抗体の抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、該抗原結合部分は、本明細書で更に定義され、かつ当技術分野において既知である抗体定常領域を含み得る。有用な重鎖定常領域は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 又は μ の5つのアイソタイプのいずれかを含む。有用な軽鎖定常領域には、2つのアイソタイプ： κ 及び λ のいずれかが含まれる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「抗原決定基」又は「抗原」という用語は、抗原結合部分／部位が結合して抗原結合部分－抗原複合体を形成するポリペプチド高分子上の部位を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面上に、ウイルス感染した細胞の表面上に、他の疾患細胞の表面上に、免疫細胞の表面上に、血清中で遊離して、及び／又は細胞外マトリックス（ECM）中に認めることができる。

【0049】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の供給源又は種に由来する抗体を指し、一方、重鎖及び／又は軽鎖の残りは、異なる供給源又は種に由来する。

【0050】

抗体の「クラス」とは、その重鎖によって保有される定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのいくつかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及び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 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる。好ましくは、本発明の二重特異性抗体はヒトIgGアイソタイプのものであり、より好ましくはヒトIgG₁アイソタイプのものである。本明細書で使用するIgGアイソタイプ及びIgG₁アイソタイプという用語は、ヒトIgGアイソタイプ及びヒトIgG₁アイソタイプを指す。典型的には、異なるIgGアイソタイプは、IgGサブクラス間の対立遺伝子変異に基づいてわずかに異なるアロタイプの形態で存在する（Vidarsson et al. ; Front Immunol 5 (2014) Article 520, 1-17を参照）。薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、所望の治療結果又は予防結果を達成するために必要な薬用量及び所要期間で有効な量を指す。

【0051】

本明細書の「Fcドメイン」又は「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語には、天然配列Fc領域及びバリエーションFc領域が含まれる。IgG重鎖のFc領域の境界は、わずかに変動してもよいが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226から、又はPro230から、重鎖のカルボキシ末端まで伸長するように定義されている。しかし、宿主細胞によって産生される抗体は、重鎖のC末端から1つ以上、特に1つ又は2つのアミノ酸の翻訳後切断を受けることがある。したがって、完全長重鎖をコードする特定の核酸分子の発現により、宿主細胞によって産生される抗体は、完全長重鎖を含むことも、完全長重鎖の切断されたバリエーション（本明細書では「切断されたバリエーション重鎖」とも呼ぶ）を含むこともある。これは、重鎖の最後の2つのC末端アミノ酸がグリシン（G446）及びリジン（K447、Kabata EUインデックスによるナンバリング）である場合に当てはまる。したがって、Fc領域のC末端リジン（Lys447）、又はC末端グリシン（Gly446）及びリジン（K447）が存在してもよく、又は存在していなくてもよい。Fcドメイン（又は本明細書に定義されるFcドメインのサブユニット）を含む重鎖のアミノ酸配列は、特に示されていない場合には、本明細書では、C末端グリシン－リジンジペプチドを含まずに示される。本発明の一実施形態では、本発明による抗体又は二重特異性抗体含まれる本明細書で特定されるFcドメインのサブユニットを含む重鎖

10

20

30

40

50

は、更なるC末端グリシンーリジンジペプチド（G 4 4 6 及び K 4 4 7、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む。本発明の一実施形態では、本発明による抗体又は二重特異性抗体含まれる本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖は、更なるC末端グリシン残基（G 4 4 6、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む。本発明の組成物、例えば、本明細書に記載の医薬組成物は、本発明の抗体又は二重特異性抗体の集合を含む。抗体又は二重特異性抗体の集団は、完全長重鎖を有する分子及び切断されたバリエーション重鎖を有する分子を含み得る。抗体又は二重特異性抗体の集団は、完全長重鎖を有する分子と切断されたバリエーション重鎖を有する分子との混合物からなり得、抗体又は二重特異性抗体の少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % 又は少なくとも 9 0 % が切断されたバリエーション重鎖を有する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体又は二重特異性抗体の集合を含む組成物は、更なるC末端グリシンーリジンジペプチド（G 4 4 6 及び K 4 4 7、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む、本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖を含む抗体又は二重特異性抗体を含む。本発明の一実施形態では、本発明の抗体又は二重特異性抗体の集合を含む組成物は、更なるC末端グリシン残基（G 4 4 6、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む、本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖を含む抗体又は二重特異性抗体を含む。本発明の一実施形態では、そのような組成物は、本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖を含む分子、更なるC末端グリシン残基（G 4 4 6、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖を含む分子、更なるC末端グリシンーリジンジペプチド（G 4 4 6 及び K 4 4 7、K a b a t の E U インデックスによるナンバリング）を含む本明細書で特定される F c ドメインのサブユニットを含む重鎖を含む分子で構成される抗体又は二重特異性抗体の集合を含む。特定の実施形態では、K a b a t の E U インデックスに従う位置 4 4 7 のナンバリングのリジンは、グリシン（K 4 4 7 G）変異によって置き換えられており、分子は追加のC末端グリシンーグリジンジペプチド（G 4 4 6 及び G 4 4 7、ナンバリングは K a b a t の E U インデックスに従う）を含む。本明細書において別段の指定がない限り、F c 領域及び定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、K a b a t e t a l . , Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991（上記も参照）に記載されているように、「E U ナンバリングシステムに従った」ものであり、「K a b a t の E U インデックスに従ったナンバリング」又は「K a b a t E U ナンバリング」とも呼ばれる。本明細書で使用される場合、F c ドメインの「サブユニット」は、二量体 F c ドメインを形成する 2 つのポリペプチドのうちの 1 つ、すなわち、安定な自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチドを指す。例えば、I g G F c ドメインのサブユニットは、I g G C H 2 及び I g G C H 3 定常ドメインを含む。

10

20

30

40

【0052】

「フレームワーク」又は「F R」は、超可変領域（H V R）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインの F R は、一般に、4 つの F R ドメイン：F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4 の 4 つの F R ドメインからなる。したがって、C D R 及び F R 配列は、一般に、V H（又は V L）中で以下の配列：F R－H 1（L 1）－C D R－H 1（L 1）－F R－H 2（L 2）－C D R－H 2（L 2）－F R－H 3（L 3）－C D R－H 3（L 3）－F R－H 4（L 4）において現れる。

【0053】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」という用語は、本明細書で互換的に使用され、天然抗体構造と実質的に類似した構造を有する抗体、又は本明細書で定義される F c 領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0054】

50

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞により産生された抗体の、又はヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列、あるいは他のヒト抗体をコードする配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【0055】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV_L配列又はV_H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般に、配列のサブグループは、Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3におけるようなサブグループである。一実施形態では、V_Lについては、サブグループは、Kabatら（上記参照）におけるサブグループカッパIである。一実施形態では、V_Hについては、サブグループは、Kabatら（上記参照）におけるサブグループIIIである。

【0056】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトCDR由来のアミノ酸残基と、ヒトFR由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、CDRの全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のCDRに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のFRに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0057】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、配列が超可変であり、及び／又は構造的に明確なループ（「超可変ループ」）を形成し、及び／又は抗原接触残基（「抗原接触」）を含む抗体可変ドメインの各領域を指す。一般に、抗体は6つのCDRを含み、3つがV_H中にあり（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）、3つがV_L中にある（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3）。本明細書における例示的なCDRとしては、以下のものが挙げられる：

(a) アミノ酸残基26～32（CDR-L1）、50～52（CDR-L2）、91～96（CDR-L3）、26～32（CDR-H1）、53～55（CDR-H2）及び96～101（CDR-H3）で生じる超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）；

(b) アミノ酸残基24-34（CDR-L1）、50-56（CDR-L2）、89-97（CDR-L3）、31-35b（CDR-H1）、50-65（CDR-H2）、及び95-102（CDR-H3）で生じるCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）；

(c) アミノ酸残基27c-36（CDR-L1）、46-55（CDR-L2）、89-96（CDR-L3）、30-35b（CDR-H1）、47-58（CDR-H2）、及び93-101（CDR-H3）で生じる抗原接触（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)）；並びに

(d) CDRアミノ酸残基24～34（CDR-L1）、50～56（CDR-L2）、89～97（V_L3）、31～35（CDR-H1）、50～63（CDR-H2）及び95～102（CDR-H3）を含む(a)、(b)及び／又は(c)の組み合わせ。

【0058】

別段示されない限り、可変ドメイン中のCDR残基及び他の残基（例えばFR残基）は、本明細書ではKabat et al., Kabat et al., Sequenc

es of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に従ってナンバリングされる。

【0059】

「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳類としては、家畜化動物（例えば、牛、羊、猫、犬、馬等）、霊長類（例えば、ヒト、サル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット等）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態では、個体又は対象はヒトである。

【0060】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフ（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）によって決定される、95%超又は99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。

【0061】

「単離された」核酸は、その天然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離された核酸には、通常核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、核酸分子は、染色体外、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0062】

「単一又は二重特異性抗CCl2抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体の重鎖及び軽鎖（又はそれらの断片）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター中のそのような核酸分子、及び宿主細胞内の1つ以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

【0063】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は同一であり、かつ／又は同じエпитープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有するか、又はモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる、起こり得るバリエーション抗体は例外であり、かかるバリエーションは一般的に少量で存在する。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向する。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集合から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするように解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない種々の手法によって作製され得、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書中に記載される。

【0064】

「天然抗体」とは、様々な構造を持つネイティブに存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖で構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、これに定常軽（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カップ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つの種類の1つに割り当てられてもよい。

【0065】

「添付文書」という用語は、治療製品の市販パッケージに通常含まれる指示を指すために用いられ、そのような治療製品に関する適応症、使用、投薬量、投与、併用療法、禁忌及び／又は警告に関する情報を含む。

【0066】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のための整理は、当技術分野における技術の範囲内にある種々の方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェア等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成され得る。当業者は、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書での目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. が作成したものであり、ソースコードは、使用者用書類と共に、米国著作権局、Washington D.C.、20559に提出され、ここに米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (South San Francisco, California) から公的に入手可能であるか、又はそのソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステムにおける使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変わらない。

10

20

【0067】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性% (あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、特定のアミノ酸配列同一性%を有する又は含む、所与のアミノ酸配列Aとして記述され得る) は、以下のように計算される：

30

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのAとBのアラインメントにおいて同一のマッチとしてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に明記しない限り、本明細書で使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して直前の段落に記載されているように得られる。

40

【0068】

「医薬製剤」という用語は、そこに含まれる有効成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であり、かつ、製剤が投与されるであろう対象に許容できない毒性を有する追加成分を含まない製剤をいう。

【0069】

「薬学的に許容され得る担体」は、対象に対して非毒性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容され得る担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、又は防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0070】

本明細書で使用される場合、「処置」(及びその文法的な変形語、例えば、「処置する

50

」又は「処置すること」)は、治療される個体の本来の経過を変える試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の経過の間に行うことができる。処置の所望の効果としては、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減弱、転移を予防すること、疾患進行速度を低下させること、病状の寛解又は緩和、及び回復又は予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるため、又は疾患の進行を遅延させるために使用される。

【0071】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。自然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は、一般に、類似の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(CDR)とを含む。(例えばKindt, T. J. et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., N. Y. (2007), page 91を参照) 抗原結合特異性を付与するには、単一のVH又はVLドメインで十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のVH又はVLドメインを使用し、それぞれ、相補的VL又はVHドメインのライブラリをスクリーニングして、単離してもよい。例えば、Portolano, S. et al., *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628)を参照されたい。

【0072】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製する核酸構造としてのベクターだけでなく、ベクターが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターも含まれる。ある種のベクターは、動作可能に連結された核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターを、本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。

【0073】

I. 組成物及び方法

一態様では、本発明は、本明細書に記載の二重特異性抗体が、第1及び第2の抗原結合部位／部分として異なる抗CCl2抗原結合部位を使用するという知見に部分的に基づく。これらの二重特異性抗CCl2抗体は、CCl2の特定のエピトープに高い特異性で結合し、その受容体CCR2へのCCl2の結合を特異的に阻害する能力を有する。それらは、単一特異性抗体と比較して改善された免疫複合体形成及びin vivoでの改善されたCCl2抑制を示す。本明細書に記載のコントースボディフォーマットにおける特異的二重特異性抗CCl2抗体は、更に、低粘度(これは、例えば皮下投与に適した高濃度溶液を可能にする)のような有益な特性を示す。

【0074】

二重特異性抗CCl2抗体

二重特異性抗体

本明細書に記載の二重特異性抗体は、CCl2上の少なくとも2つの異なるエピトープに対して異なる結合特異性を有するモノクローナル抗体である。

【0075】

多特異性及び二重特異性の抗体を作製する技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現が含まれるが、これらに限定されない(Milstein and Cuello, *Nature* 305:537 (1983)を参照)及び「ノブインホール」エンジニアリング(例えば、米国特許第5,731,168号、及びAtwell et al., *J. Mol. Biol.* 270:26 (1997)を参照)。多重特異性抗体は、また、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果の操作(例えば、国際公開第2009/089004号参照);2つ以上の抗体若しくは断片の架橋(例えば、米国特許第4,676,980号及びBrenn

an et al., Science, 229:81 (1985) を参照)、ロイシンジッパーを使用した二重特異性抗体の産生 (例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992) 及び国際公開第2011/034605号を参照)、軽鎖の誤対合問題を回避するための一般的な軽鎖技術の使用 (例えば、国際公開第98/50431号参照)、二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用 (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) を参照)、及び一本鎖Fv (sFv) 二量体の使用 (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) を参照)、並びに例えば Tuttle et al., J. Immunol. 147:60 (1991) に記載されている三重特異性抗体の調製によって作製することができる。

10

【0076】

例えば、「オクトパス抗体」を含め、3つ以上の抗原結合部位を有する操作抗体、又はDVD-Igもまたここに含まれる (例えば、国際公開第2001/77342号及び国際公開第2008/024715号を参照)。3つ以上の抗原結合部位を有する多重特異性抗体の他の例は、国際公開第2010/115589号、国際公開第2010/112193号、国際公開第2010/136172号、国際公開第2010/145792号及び国際公開第2013/026831号に見出され得る。二重特異性抗体又はその抗原結合断片はまた、CCl₂、並びに別の異なる抗原又はCCl₂の2つの異なるエピトープ (例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号及び国際公開第2015/095539号を参照) に結合する抗原結合部位を含む「二重作用Fab」又は「DAF」を含む。

20

【0077】

多重特異性抗体は、同じ抗原特異性の1つ以上の結合アームにドメインクロスオーバーを有する非対称形態で、すなわちVH/VLドメイン (例えば、国際公開第2009/080252号及び国際公開第2015/150447号を参照)、CH1/CLドメイン (例えば、国際公開第2009/080253号を参照) 又は完全なFabアーム (例えば、国際公開第2009/080251号、国際公開第2016/016299号参照、Schaefer et al., PNAS, 108 (2011) 1187-1191 及び Klein et al., MAbs 8 (2016) 1010-20) も参照) (CrossMabとも呼ばれる) を交換することによっても提供され得る。非対称結合アームは、ドメイン界面に荷電又は非荷電アミノ酸変異を導入して正しいFab対合を誘導することによって操作することもできる。例えば、国際公開第2016/172485号を参照されたい。

30

【0078】

多重特異性抗体に対する様々な更なる分子フォーマットが、当該分野で公知であり、本明細書中に含まれる (例えば、Spiess et al., Mol Immunol 67 (2015) 95-106 を参照)。

【0079】

本発明の二重特異性抗体フォーマット:

本発明の好ましい二重特異性抗体は、以下のフォーマットのものである。

40

【0080】

二重特異性抗体は、

a) (N末端からC末端方向に) VH1-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL1-CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり (両方が第1の抗原結合部位を共に形成する (共に会合して形成する))、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5~15アミノ酸の長さ (一実施形態では5~10アミノ酸の長さ) を有するポリペプチドリンカーであり、

50

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と
b) (N末端からC末端方向に) VH2-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL2-CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、
VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、
CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、
L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含む。

10

20

【0081】

「コントースボディ (contorsbody)」(CB) というフォーマットを含むこの塩基性 (basic) 抗体Fcドメインは、例えば、Guy J. Georges et al, Computational and Structural Biotechnology Journal Volume 18, 2020, Pages 1210-1220. に記載されている。異なる領域及び構成要素を有する二重特異性コントースボディフォーマットの例が示されている図17のスキームも参照されたい。CH3ドメイン間の黒丸は、CH3ドメインの修飾／突然変異を促進する任意のヘテロ二量体化である（例えば、穴へのノブ、FC修飾を促進するヘテロ二量体化を参照するセクションで以下に更に詳細に記載される）。

30

【0082】

「ポリペプチドリinker」という用語は、天然及び／又は合成起源のリinkerを表す。ポリペプチドリinkerは、アミノ酸の直鎖からなり、20個の天然アミノ酸は、ペプチド結合によって連結されたモノマー構成要素である。鎖は、1～15アミノ酸残基の長さを有する。ポリペプチドリinkerは、天然に存在するポリペプチドの反復アミノ酸配列又は配列を含み得る。ポリペプチドリinkerは、二重特異性コントースボディの抗体ドメインが正しく折り畳まれ、適切に提示されることを可能にすることによって、それらの生物学的活性を確実に行うことができるようにする機能を有する。好ましくは、ポリペプチドリinkerは、グリシン及び／又はセリン残基が豊富であると指摘される「合成ペプチドリinker」である。これらの残基は、例えば最大5アミノ酸の小さな反復単位で配置される。

40

【0083】

リinkerL1及びL2は、好ましくはグリシン-セリンリinkerである。セリン残基は、リinkerに溶解性を提供するために鎖に何らかの極性をもたらしている。国際公開第2019233842号に記載されているように、リinkerセグメントと融合タンパク質断片との間の転移は、翻訳後修飾、すなわちO-糖化の可能性があるため、GSモチーフを含まないことが好ましい。次いで、本出願に記載されたコントースボディは、末端グリシンから構成される。長さ／組成の変動を試験した。L1とL2の任意の組み合わせが考えられる。反復グリシンは、最大4個の連続グリシンに制限される。リinkerを介して別のものに融合されるドメインのC末端セグメントが、例えば、1つ又は2つのグリシン（例えば、CH3ドメインのC末端がグリシンで終端するか、又は2つのグリシンで終端する

50

ように修飾されている場合) から作製される場合、これらの1つ又は2つのグリシンは、最大4つの連続するグリシンの限界を考慮しなければならない。多量体単位のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端において、6個までの更なる任意の天然に存在するアミノ酸を加えてもよい。10アミノ酸の長さを有する例示的なリンカーは、例えば、G S G G S G G S G G (配列番号183)、G S G G G S G G G G (配列番号184)、G S G G G G S G G G (配列番号185)、G G S G G S G G G G (配列番号186)、G G S G G G S G G G (配列番号187)、G G S G G G G S G G (配列番号188)、G G G S G G S G G G (配列番号189)、G G G S G G G S G G (配列番号190)、G G G G S G G S G G (配列番号191)、好ましくはG G S G G G G S G G (配列番号188)の群から選択される。同様に、5～9アミノ酸の長さ又は11～15アミノ酸の長さを有する更なるリンカーを構築することができる。

10

【0084】

Fcドメイン及び修飾

特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。二重特異性抗体に関連して本明細書中に記載されるFcドメインの特徴は、本発明の抗体に含まれるFcドメインに等しく適用され得ることが理解される。

【0085】

二重特異性抗体のFcドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖ドメインを含む一対のポリペプチド鎖からなる。例えば、免疫グロブリンG (IgG) 分子のFcドメインは、ダイマーであり、それぞれのサブユニットは、CH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む。Fcドメインの2つのサブユニットは、互いに安定な会合が可能である。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は1つを超えるFcドメインを含まない。

20

【0086】

一実施形態では、二重特異性抗体のFcドメインはIgG Fcドメインである。特定の実施形態では、Fcドメインは、IgG₁ Fcドメインである。別の実施形態では、Fcドメインは、IgG₄ Fcドメインである。より具体的な実施形態では、Fcドメインは、S228位 (Kabatt EUナンバリング) にアミノ酸置換、特にアミノ酸置換S228Pを含むIgG₄ Fcドメインである。このアミノ酸置換は、IgG₄抗体のin vivoでのFabアーム交換を減少させる (Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010) を参照)。更に特定の実施形態では、Fcドメインは、ヒトFcドメインである。更により特定の実施形態では、Fcドメインは、ヒトIgG₁ Fcドメインである。

30

【0087】

IgGアイソタイプのFcドメインは、例えばFcガンマ受容体又は新生児型Fc受容体 (FcRn) とのそれらの相互作用に基づいて様々な特性によって特徴付けられる (例えば、Vidarsson et al.; Front Immunol 5 (2014) Article 520, 1-17 を参照)。

【0088】

ヘテロ二量体化を促進するFcドメイン修飾

本発明による二重特異性抗体は、Fcドメインの2つのサブユニットの一方又は他方に融合し得る異なる抗原結合部分を含み、したがってFcドメインの2つのサブユニットは、典型的には2つの非同ポリペプチド鎖に含まれる。これらのポリペプチドの組換え同時発現及びその後の二量化によって、2つのポリペプチドのいくつかの可能な組み合わせが生じる。組換え産生における二重特異性抗体の収率及び純度を改善するため、二重特異性抗体のFcドメインに、所望のポリペプチドの会合を促進する修飾を導入することが有利である。

40

【0089】

したがって、特定の実施形態では、本発明による二重特異性抗体のFcドメインは、F

50

cドメインの第1のサブユニットと第2のサブユニットとの会合を促進する修飾を含む。ヒトIgG Fcドメインの2つのサブユニット間の最も長いタンパク質-タンパク質相互作用の部位は、FcドメインのCH3ドメイン内にある。したがって、一実施形態では、当該修飾は、FcドメインのCH3ドメインの中にある。

【0090】

ヘテロ二量体化を強化するために、FcドメインのCH3ドメイン中の修飾に複数の手法が存在し、それらは例えば、国際公開第96/27011号、国際公開第98/050431号、欧州特許第1870459号、国際公開第2007/110205号、国際公開第2007/147901号、国際公開第2009/089004号、国際公開第2010/129304号、国際公開第2011/90754号、国際公開第2011/143545号、国際公開第2012058768号、国際公開第2013157954号、国際公開第2013096291号に十分に記載されている。典型的には、全てのかかる手法において、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインと、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインが、両方とも、各CH3ドメイン（又はそれを含む重鎖）が、自身とホモ二量化せず、相補的に操作された他のCH3ドメインとヘテロ二量化するように仕向けられている相補的な様式で操作されている（その結果、第1のCH3ドメイン及び第2のCH3ドメインがヘテロ二量化し、2つの第1のCH3ドメイン又は2つの第2のCH3ドメインの間のホモ二量体は形成されない）。改善された重鎖ヘテロ二量体化のためのこれらの異なる手法は、重鎖/軽鎖の誤対合及びベンス・ジョーンズ型副生成物を低減する、二重特異性抗体における重鎖-軽鎖修飾との組み合わせでの異なる代替例として考慮される（例えば、1つの結合アームにおけるVH及びVLの交換/置き換え、並びにCH1/CL界面における反対の電荷を有する荷電アミノ酸の置換の導入）。

10

20

【0091】

具体的な実施形態では、Fcドメインの第1のサブユニット及び第2のサブユニットの会合を促進する当該修飾は、いわゆる「ノブ・イントゥ・ホール」修飾であり、Fcドメインの2つのサブユニットの1つに「ノブ」修飾と、Fcドメインの2つのサブユニットの他の1つに「ホール」修飾とを含む。

【0092】

ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば、米国特許第5,731,168号、米国特許第7,695,936号、Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001) に記載される。一般的に、この方法は、第1のポリペプチドの界面にある隆起（「ノブ」）と、第2のポリペプチドの界面にある対応する空洞（「ホール」）とを導入することを含み、その結果、隆起が、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨害するように空洞内に位置することができる。隆起は、第1のポリペプチドの接触面からの小さなアミノ酸側鎖をそれより大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置き換えることにより構築される。突起と同一又は同様の大きさの相補性空洞が、大きなアミノ酸側鎖を、より小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニン又はトレオニン）と置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作られる。

30

40

【0093】

したがって、特定の実施形態では、二重特異性抗体のFcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より大きな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第2のサブユニットのCH3ドメイン内の空洞内で位置換え可能な第1のサブユニットのCH3ドメイン内に突起を生成し、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より小さな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第2のサブユニットのCH3ドメイン内に空洞を生成し、その中で、第1のサブユニットのCH3ドメイン内の突起が位置換え可能である。

【0094】

50

好ましくは、より大きな側鎖量を有する当該アミノ酸残基は、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）及びトリプトファン（W）からなる群から選択される。

【0095】

好ましくは、より小さな側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）及びバリン（V）からなる群から選択される。

【0096】

突起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を変えることによって、例えば、部位特異的変異導入法によって、又はペプチド合成によって作り出すことができる。

【0097】

具体的な実施形態では、Fcドメインの第1のサブユニット（「ノブ」サブユニット）（のCH3ドメイン）において、位置366のトレオニン残基が、トリプトファン残基と置き換わっており（T366W）、Fcドメイン（「ホール」サブユニット）の第2のサブユニット（のCH3ドメイン）において、位置407のチロシン残基は、バリン残基と置き換わっている（Y407V）。一実施形態では、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて、更に、位置366のトレオニン残基が、セリン残基と置き換わっており（T366S）、位置368のロイシン残基が、アラニン残基と置き換わっている（L368A）（Kabata EUインデックスによるナンバリング）。

【0098】

なお更なる実施形態では、Fcドメインの第1のサブユニットにおいて、更に、位置354のセリン残基が、システイン残基と置き換わっている（S354C）か、又は位置356のグルタミン酸残基が、システイン残基と置き換わっており（E356C）（特に、位置354のセリン残基がシステイン残基と置き換わっており）、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて、更に、位置349のチロシン残基が、システイン残基と置き換わっている（Y349C）（Kabata EUインデックスによるナンバリング）。これら2つのシステイン残基の導入により、Fcドメインの2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、更にダイマーを安定させる（Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)）。

【0099】

特定の実施形態では、Fcドメインの第1のサブユニットは、アミノ酸置換S354C及びT366Wを含み、Fcドメインの第2のサブユニットは、アミノ酸置換Y349C、T366S、L368A及びY407Vを含む（Kabata EUインデックスによるナンバリング）。

【0100】

特定の実施形態では、第2の抗原に結合する抗原結合部分は、Fcドメインの第1のサブユニット（「ノブ」修飾を含む）に融合（任意に、CC12に結合する第1の抗原結合部分及び／又はペプチドリinkerを介して）される。理論に拘束されることを望むものではないが、第2の抗原（例えば、活性化T細胞抗原）に結合する抗原結合部分の、Fcドメインのノブ含有サブユニットへの融合は、活性化T細胞抗原に結合する2つの抗原結合部分を含む抗体の生成を（更に）最小限に抑える（2つのノブ含有ポリペプチドの立体衝突）。

【0101】

ヘテロ二量体化を強化するCH3修飾のための他の技術が本発明による代替例として考慮され、例えば、国際公開第96/27011号、国際公開第98/050431号、欧州特許第1870459号、国際公開第2007/110205号、国際公開第2007/147901号、国際公開第2009/089004号、国際公開第2010/129304号、国際公開第2011/90754号、国際公開第2011/143545号、国際公開第2012/058768号、国際公開第2013/157954号、国際公開第2013/096291号に記載されている。

【0102】

10

20

30

40

50

一実施形態では、欧州特許第1870459号に記載されるヘテロ二量体化手法を代わりに使用する。この手法は、Fcドメインの2つのサブユニット間のCH3／CH3ドメイン界面における特定のアミノ酸位置における反対の電荷を有する荷電アミノ酸の導入に基づく。本発明の二重特異性抗体の好ましい一実施形態は、(Fcドメインの)2つのCH3ドメインの一方におけるアミノ酸変異R409D、K370E及びFcドメインのCH3ドメインの他方におけるアミノ酸変異D399K、E357Kである(Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

【0103】

別の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異T366W及びFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異T366S、L368A、Y407Vを含み、追加的に、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異R409D、K370E及びFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異D399K、E357Kを含む(Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

【0104】

別の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異S354C、T366W及びFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおけるアミノ酸変異Y349C、T366S、L368A、Y407Vを含むか、又は当該二重特異性抗体は、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメイン内のアミノ酸変異Y349C、T366W及びFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメイン内のアミノ酸変異S354C、T366S、L368A、Y407Vを含み、追加的に、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメイン内のアミノ酸変異R409D、K370E及びFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメイン内のアミノ酸変異D399K、E357Kを含む(全てKabat EUインデックスによるナンバリング)。

【0105】

一実施形態では、国際公開第2013／157953号に記載されるヘテロ二量体化手法を代わりに使用する。一実施形態では、第1のCH3ドメインは、アミノ酸変異T366Kを含み、第2のCH3ドメインは、アミノ酸変異L351Dを含む(Kabat EUインデックスによるナンバリング)。更なる実施形態では、第1のCH3ドメインは、更なるアミノ酸変異L351Kを含む。更なる実施形態では、第2のCH3ドメインは、更に、Y349E、Y349D及びL368E(好ましくはL368E)(Kabat EUインデックスによるナンバリング)から選択されるアミノ酸変異を含む。

【0106】

一実施形態では、国際公開第2012／058768号に記載されるヘテロ二量体化手法を代わりに使用する。一実施形態では、第1のCH3ドメインは、アミノ酸変異L351Y、Y407Aを含み、第2のCH3ドメインは、アミノ酸変異T366A、K409Fを含む。更なる実施形態では、第2のCH3ドメインは、位置T411、D399、S400、F405、N390又はK392にある更なるアミノ酸変異、例えば、(a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E又はT411W、(b) D399R、D399W、D399Y又はD399K、(c) S400E、S400D、S400R又はS400K、(d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405V又はF405W、(e) N390R、N390K又はN390D、(f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392F又はK392E(ナンバリングはKabatのEUインデックスによる)を含む。更なる実施形態では、第1のCH3ドメインは、アミノ酸変異L351Y、Y407Aを含み、第2のCH3ドメインは、アミノ酸変異T366V、K409Fを含む。更なる実施形態では、第1のCH3ドメインは、アミノ酸変異Y407Aを含み、第2のCH3ドメインは、アミノ酸変異T366A、K409Fを含む。更なる実施形態では、第2のCH3ドメインは、更に、

アミノ酸変異 K 3 9 2 E、T 4 1 1 E、D 3 9 9 R 及び S 4 0 0 R を含む (K a b a t E U インデックスによるナンバリング)。

【0107】

一実施形態では、国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 3 5 4 5 号に記載されるヘテロ二量化手法が代わりに使用され、例えば、3 6 8 及び 4 0 9 からなる群から選択される位置にアミノ酸修飾を有する (K a b a t E U インデックスによるナンバリング)。

【0108】

一実施形態では、上に記載するホールにノブを入れる技術も使用する、国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 0 7 6 2 号に記載されるヘテロ二量化手法が、代わりに使用される。一実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインは、アミノ酸変異 T 3 6 6 W を含み、第 2 の C H 3 ドメインは、アミノ酸変異 Y 4 0 7 A を含む。一実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインはアミノ酸変異 T 3 6 6 Y を含み、第 2 の C H 3 ドメインはアミノ酸変異 Y 4 0 7 T を含む (K a b a t E U インデックスによるナンバリング)。

【0109】

一実施形態では、二重特異性抗体又はその F c ドメインは、I g G 2 サブクラスのものであり、国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4 号に記載されているヘテロ二量体化手法が代替的に使用される。

【0110】

代替的な実施形態では、F c ドメインの第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットの会合を促進する修飾は、例えば、P C T 国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号に記載されるように、静電操縦効果に介在する修飾を含む。一般的に、この方法は、2 つの F c ドメインサブユニットの界面に、ホモ二量体形成が静電的に望ましくないが、ヘテロ二量化が静電的に望ましいように、帯電したアミノ酸残基による 1 つ以上のアミノ酸残基の置き換えを含む。そのような一実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインは、K 3 9 2 又は N 3 9 2 の負に帯電したアミノ酸 (例えば、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D)、好ましくは K 3 9 2 D 又は N 3 9 2 D) によるアミノ酸置換を含み、第 2 の C H 3 ドメインは、D 3 9 9、E 3 5 6、D 3 5 6 又は E 3 5 7 の正に帯電したアミノ酸によるアミノ酸置換 (例えば、リジン (K) 又はアルギニン (R)、好ましくは D 3 9 9 K、E 3 5 6 K、D 3 5 6 K 又は E 3 5 7 K、より好ましくは D 3 9 9 K 及び E 3 5 6 K) を含む。更なる実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインは、更に、K 4 0 9 又は R 4 0 9 の負に帯電したアミノ酸によるアミノ酸置換 (例えば、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D)、好ましくは K 4 0 9 D 又は R 4 0 9 D) を含む。更なる実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインは、更に、又はこれに代えて、K 4 3 9 及び / 又は K 3 7 0 の負に帯電したアミノ酸 (例えば、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D)) (全て K a b a t E U インデックスによるナンバリング) によるアミノ酸置換を含む。

【0111】

なお更なる実施形態では、国際公開第 2 0 0 7 / 1 4 7 9 0 1 号に記載されるヘテロ二量体化手法を代わりに使用する。一実施形態では、第 1 の C H 3 ドメインは、アミノ酸変異 K 2 5 3 E、D 2 8 2 K 及び K 3 2 2 D を含み、第 2 の C H 3 ドメインは、アミノ酸変異 D 2 3 9 K、E 2 4 0 K 及び K 2 9 2 D を含む (K a b a t E U インデックスによるナンバリング)。

【0112】

更に別の実施形態では、国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 0 2 0 5 号に記載されるヘテロ二量体化手法を代わりに使用してもよい。

【0113】

一実施形態では、F c ドメインの第 1 のサブユニットは、アミノ酸置換 K 3 9 2 D 及び K 4 0 9 D を含み、F c ドメインの第 2 のサブユニットは、アミノ酸置換 D 3 5 6 K 及び D 3 9 9 K (ナンバリングは K a b a t の E U インデックスによる) を含む。

【0114】

二重特異性抗 C C L 2 抗体について本明細書で使用される場合、「野生型 (W T) I g

10

20

30

40

50

G又はIgG1」という用語は、ヘテロ二量体化を促進する上記の修飾／変異を含み得るが、以下に記載されるFc受容体結合及び／又はエフェクター機能を増加又は減少させる更なるFcドメイン修飾／変異を含まないIgG又はIgG1重鎖を含む二重特異性抗体を指す。

【0115】

Fc受容体結合及び／又はエフェクター機能を増加又は減少させるFcドメイン修飾／変異：

掃攻技術による二重特異性抗CCl2抗体の修飾

二重特異性抗CCl2抗体を、掃攻技術を使用して修飾し、二重特異性抗CCl2抗体が遊離CCl2を長期間にわたって消失させて、*in vivo*での抗がん効果のような生物学的効果を持続させることを可能にした。

10

【0116】

掃攻の概念は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるIgawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151、国際公開第2012/122011号、国際公開第2016/098357及び国際公開第2013/081143号に記載されている。

【0117】

本発明は、上記抗体の酸性pH範囲における抗原結合活性（結合能）を中性pH範囲におけるその抗原結合活性よりも低下させることによって、細胞への抗体媒介性抗原取り込みを促進するための方法を提供する。これは、細胞への抗原取り込みを促進する。本発明はまた、細胞への抗原取り込みを促進する上記抗体の抗原結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることに基づく、細胞への抗体媒介抗原取り込みを促進する方法を提供する。本発明はまた、細胞への抗原取り込みを促進するための方法であって、少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換すること、又は細胞への抗原取り込みを促進する上記抗体の抗原結合ドメインに少なくとも1つのヒスチジンを挿入することに基づく方法を提供する。

20

【0118】

本明細書において、抗体が介在する「細胞への抗原取り込み」とは、エンドサイトーシスによって抗原が細胞内に取り込まれることを意味する。なお、本明細書において「細胞への取り込みを促進する」とは、血漿中の抗原に結合した抗体の細胞内取り込み速度が亢進していること、及び／又は取り込まれた抗原の血漿への再利用量が低下していることを意味する。これは、中性pH範囲で抗体のヒトFcRn結合活性を増加させる前、又はヒトFcRn結合活性を増加させ、酸性pH範囲での抗体の抗原結合活性（結合能）を中性pH範囲でのその抗原結合活性よりも低下させる前に、抗体と比較して細胞への取り込み速度が促進されることを意味する。この速度は、好ましくはインタクトヒトIgGと比較して、より好ましくはインタクトヒトIgGと比較して改善される。したがって、本発明では、細胞への抗原取り込みが抗体によって促進されるかどうかを、細胞への抗原取り込み速度の増加に基づいて評価することができる。細胞への抗原取り込み速度は、例えば、ヒトFcRn発現細胞を含む培地に抗原及び抗体を添加した後の培地中の抗原濃度の経時的な減少をモニタリングすることによって、又はヒトFcRn発現細胞への抗原取り込み量を経時的にモニタリングすることによって計算することができる。細胞への抗体媒介抗原取り込み速度を促進するための本発明の方法を使用して、例えば、血漿からの抗原除去速度を、抗体を投与することによって高めることができる。したがって、細胞への抗体媒介性抗原取り込みが促進されるかどうかは、例えば、血漿からの抗原除去速度が加速されるかどうか、又は抗体を投与することによって血漿中の総抗原濃度が低下するかどうかを試験することによっても評価することができる。

30

40

【0119】

本明細書において、「血漿中の総抗原濃度」とは、抗体結合抗原と非結合抗原濃度の和、又は抗体非結合抗原濃度である「血漿中の遊離抗原濃度」を意味する。「血漿中の総抗原濃度」又は「血漿中の遊離抗原濃度」を測定する様々な方法は、以下に記載されるよう

50

に当技術分野で周知である。

【0120】

本明細書で使用される場合、「インタクトなヒトIgG」（又は「野生型（WT）ヒトIgG」）は、未修飾（上記のヘテロ二量体化の潜在的な修飾に関してを除く）ヒトIgGを意味し、IgGの特定のクラスに限定されない。これは、酸性のpH範囲でヒトFcRnに結合できる限り、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4を「インタクトなヒトIgG」として使用できることを意味する。好ましくは、「インタクトなヒトIgG」はヒトIgG1であり得る。

【0121】

本発明はまた、単一の抗体が結合することができる抗原の数を増加させるための方法を提供する。より具体的には、本発明は、中性pH領域における抗体のヒトFcRn結合活性を増大させることにより、酸性pH領域におけるヒトFcRn結合活性を有する単一の抗体が結合可能な抗原の数を増大させる方法を提供する。本発明はまた、抗体のヒトFcRn結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることによって、酸性pH範囲のヒトFcRn結合活性を有する単一の抗体が結合することができる抗原の数を増加させる方法を提供する。

【0122】

本発明は、細胞への抗体媒介性抗原取り込みを促進する方法を提供する。より具体的には、本発明は、酸性pH範囲においてヒトFcRn結合活性を有する抗体による細胞への抗原取り込みを促進するための方法であって、中性pH範囲において抗体のヒトFcRn結合活性を増加させることに基づく方法を提供する。本発明はまた、酸性pH範囲でヒトFcRn結合活性を有する抗体による細胞への抗原取り込みを改善する方法であって、抗体のヒトFcRn結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることに基づく方法を提供する。

【0123】

本発明はまた、酸性pH範囲でヒトFcRn結合活性を有する抗体による細胞への抗原取り込みを促進する方法であって、親IgGのFcドメインを含むヒトFcRn結合ドメインの親IgG Fcドメインにおいて、位置237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、及び436（EUNANBARING）のものから選択される少なくとも1つのアミノ酸が異なるアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含むヒトFcRn結合ドメインを使用することに基づく方法を提供する。

【0124】

本発明はまた、上記抗体の酸性pH範囲における抗原結合活性（結合能）を中性pH範囲におけるその抗原結合活性よりも低下させることによって、細胞への抗体媒介性抗原取り込みを促進するための方法を提供する。これは、細胞への抗原取り込みを促進する。本発明はまた、細胞への抗原取り込みを促進する上記抗体の抗原結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることに基づく、細胞への抗体媒介抗原取り込みを促進する方法を提供する。本発明はまた、細胞への抗原取り込みを促進するための方法であって、少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換すること、又は細胞への抗原取り込みを促進する上記抗体の抗原結合ドメインに少なくとも1つのヒスチジンを挿入することに基づく方法を提供する。

【0125】

本明細書において、抗体が介在する「細胞への抗原取り込み」とは、エンドサイトーシスによって抗原が細胞内に取り込まれることを意味する。なお、本明細書において「細胞への取り込みを促進する」とは、血漿中の抗原に結合した抗体の細胞内取り込み速度が亢進していること、及び／又は取り込まれた抗原の血漿への再利用量が低下していることを

10

20

30

40

50

意味する。これは、中性pH範囲で抗体のヒトFcRn結合活性を増加させる前、又はヒトFcRn結合活性を増加させ、酸性pH範囲での抗体の抗原結合活性（結合能）を中性pH範囲でのその抗原結合活性よりも低下させる前に、抗体と比較して細胞への取り込み速度が促進されることを意味する。この速度は、好ましくはインタクトヒトIgGと比較して、より好ましくはインタクトヒトIgGと比較して改善される。したがって、本発明では、細胞への抗原取り込みが抗体によって促進されるかどうかを、細胞への抗原取り込み速度の増加に基づいて評価することができる。細胞への抗原取り込み速度は、例えば、ヒトFcRn発現細胞を含む培地に抗原及び抗体を添加した後の培地中の抗原濃度の経時的な減少をモニタリングすることによって、又はヒトFcRn発現細胞への抗原取り込み量を経時的にモニタリングすることによって計算することができる。細胞への抗体媒介抗原取り込み速度を促進するための本発明の方法を使用して、例えば、血漿からの抗原除去速度を、抗体を投与することによって高めることができる。したがって、細胞への抗体媒介性抗原取り込みが促進されるかどうかは、例えば、血漿からの抗原除去速度が加速されるかどうか、又は抗体を投与することによって血漿中の総抗原濃度が低下するかどうかを試験することによっても評価することができる。

10

【0126】

本明細書において、「血漿中の総抗原濃度」とは、抗体結合抗原と非結合抗原濃度の和、又は抗体非結合抗原濃度である「血漿中の遊離抗原濃度」を意味する。「血漿中の総抗原濃度」及び「血漿中の遊離抗原濃度」を測定する様々な方法は、以下に記載されるように当技術分野で周知である。

20

【0127】

本明細書で使用される場合、「インタクトなヒトIgG」（又は「野生型IgG」）は、未修飾ヒトIgG（（上記のヘテロ二量体化の潜在的修飾に関するものを除く）を意味し、IgGの特定のクラスに限定されない。これは、酸性のpH範囲でヒトFcRnに結合できる限り、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4を「インタクトなヒトIgG」として使用できることを意味する。好ましくは、「インタクトなヒトIgG」はヒトIgG1であり得る。

【0128】

本明細書で使用される場合、「親IgG」は、親IgGの修飾バリエーションが酸性pH範囲（したがって、親IgGは、酸性条件下でヒトFcRnに対する結合活性を必要としない）でヒトFcRnに結合することができる限り、バリエーションを生成するように後で修飾される未修飾IgGを意味する。親IgGは、天然に存在するIgG、又は天然に存在するIgGのバリエーション若しくは操作されたバージョンであってもよい。親IgGは、ポリペプチド自体、親IgGを含む組成物、又はそれをコードするアミノ酸配列を指す場合がある。「親IgG」は、以下に概説するように、公知の市販の組換え産生IgGを含むことに留意すべきである。「親IgG」の起源は限定されず、非ヒト動物又はヒトの任意の生物から得られ得る。好ましくは、生物は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、及び非ヒト霊長類から選択される。別の実施形態では、「親IgG」は、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、チンパンジー又はヒトからも得ることができる。好ましくは、「親IgG」は、ヒトIgG1から得られるが、IgGの特定のクラスに限定されない。このことは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4を「親IgG」として適宜用いることができることを意味する。同様に、上記の任意の生物由来の任意のクラス又はサブクラスのIgGを、好ましくは「親IgG」として使用することができる。天然に存在するIgGのバリエーション又は操作されたバージョンの例は、Curr Opin Biotechnol. 2009 Dec; 20(6): 685-91、Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460-70、Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 195-202、国際公開第2009/086320号、国際公開第2008/092117号、国際公開第2007/041635号及び国際公開第2006/105338号に記載される。

30

40

50

【0129】

本発明はまた、抗体を投与することによって血漿抗原を排除する能力を増加させる方法を提供する。本発明において、「血漿抗原を排除する能力を増加させるための方法」は、「血漿から抗原を除去する抗体の能力を増強する方法」と同義である。より具体的には、本発明は、中性pH範囲での抗体のヒトFcRn結合活性を増加させることにより、酸性pH範囲でのヒトFcRn結合活性を有する抗体による血漿抗原除去能を増加させる方法を提供する。本発明はまた、酸性pH範囲でヒトFcRn結合活性を有する抗体による血漿抗原を排除する能力を増加させる方法であって、抗体のヒトFcRn結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることに基づく方法を提供する。

【0130】

本発明はまた、親IgGのFcドメインを含むヒトFcRn結合ドメインの親IgGFcドメインにおいて、位置237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434及び436（EUナンバリング）から選択される少なくとも1つのアミノ酸が異なるアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含むヒトFcRn結合ドメインを使用することにより、酸性pH範囲でヒトFcRn結合活性を有する抗体による血漿抗原を排除する能力を増加させる方法を提供する。

【0131】

本発明はまた、中性pH範囲の抗原結合活性と比較して血漿抗原を排除する能力が改善された上記抗体の酸性pH範囲の抗原結合活性を低下させることによって、抗体による血漿抗原を排除する能力を増加させる方法を提供する。本発明はまた、上記の抗体の抗原結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を、血漿抗原を除去する改善された能力で変化させることによって、抗体による血漿抗原を除去する能力を増加させる方法を提供する。本発明はまた、抗体を投与することによって、少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換することによって、又は血漿抗原を除去する能力を改善して少なくとも1つのヒスチジンを上記抗体の抗原結合ドメインに挿入することによって、血漿抗原を除去する能力を増加させる方法を提供する。

【0132】

本明細書において、「血漿抗原を排除する能力」とは、抗体をin vivoで投与又は分泌する場合に、血漿から抗原を除去する能力を意味する。したがって、本明細書における「血漿抗原を排除する抗体の能力の増加」は、中性pH範囲で抗体のヒトFcRn結合活性を増加させる前、又はヒトFcRn結合活性を増加させ、同時に酸性pH範囲でのその抗原結合活性を中性pH範囲のものよりも低下させる前と比較して、抗体の投与時に血漿からの抗原除去速度が加速されることを意味する。血漿から抗原を除去するための抗体の活性の増加は、例えば、可溶性抗原及び抗体をin vivoで投与し、投与後の血漿中の可溶性抗原の濃度を測定することによって評価することができる。可溶性抗原及び抗体の投与後の血漿中の可溶性抗原の濃度が、中性pH範囲での抗体のヒトFcRn結合活性を増加させることによって、又はそのヒトFcRn結合活性を増加させ、同時に酸性pH範囲でのその抗原結合活性を中性pH範囲よりも低下させることによって減少する場合、血漿抗原を除去する抗体の能力は増加したと判断することができる。可溶性抗原の形態は、その濃度がそれぞれ「血漿中の抗体結合抗原濃度」及び「血漿中の抗体非結合抗原濃度」として決定され得る抗体結合抗原又は抗体非結合抗原であり得る（後者は「血漿中の遊離抗原濃度」と同義である。「血漿中の総抗原濃度」は抗体結合抗原と非結合抗原濃度の和、すなわち抗体非結合抗原濃度である「血漿中の遊離抗原濃度」を意味するので、可溶性抗原の濃度は「血漿中の総抗原濃度」と決定できる。「血漿中の総抗原濃度」又は「血漿中の遊離抗原濃度」を測定するための様々な方法は、以下に記載されるように当技術分野で周知である。

【0133】

本発明はまた、抗体の薬物動態を改善するための方法を提供する。より具体的には、本発明は、中性pH範囲における抗体のヒトFcRn結合活性を増加させることによって、酸性pH範囲におけるヒトFcRn結合活性を有する抗体の薬物動態を改善するための方法を提供する。さらに、本発明は、抗体のヒトFcRn結合ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸を変化させることによって、酸性pH範囲においてヒトFcRn結合活性を有する抗体の薬物動態を改善するための方法を提供する。

【0134】

本発明はまた、IgGのFcドメインを含むヒトFcRn結合ドメインの親IgG Fcドメインにおいて、位置237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434及び436（EUN numbering）から選択される少なくとも1つのアミノ酸が異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を含むヒトFcRn結合ドメインを使用することにより、酸性pH範囲でヒトFcRn結合活性を有する抗体の薬物動態を改善する方法を提供する。

【0135】

抗体に結合していない遊離抗原の血漿濃度又は総濃度に対する遊離抗原濃度の比を、当業者に公知の方法、例えば、Pharm Res. 2006 Jan; 23(1): 95-103に記載される方法によって決定することができる。あるいは、抗原がin vivoで特定の機能を示す場合、抗原機能が中和されているかどうかを試験することによって、抗原が抗原機能を中和する抗体（アンタゴニスト分子）に結合しているかどうかを評価することができる。抗原機能が中和されるかどうかは、抗原機能を反映するin vivoマーカーをアッセイすることによって評価することができる。抗原が抗原機能を活性化する抗体（アゴニスト分子）に結合しているかどうかは、抗原機能を反映するin vivoマーカーをアッセイすることによって評価することができる。

【0136】

遊離抗原の血漿中濃度及び血漿中の遊離抗原の量と血漿中の総抗原の量との比の決定、in vivoマーカーアッセイ、及びそのような測定は、特に限定されないが、抗体投与後一定時間経過後にアッセイを行うことが好ましい。本発明において、抗体投与後の期間は特に限定されず、当業者であれば、投与する抗体の性質等に応じて適切な期間を決定することができる。そのような期間としては、例えば、抗体の投与の1日後、抗体の投与の3日後、抗体の投与の7日後、抗体の投与の14日後、及び抗体の投与の28日後が挙げられる。本明細書において、「血漿抗原濃度」とは、抗体結合抗原と非結合抗原濃度の和である「血漿中の総抗原濃度」、又は抗体非結合抗原濃度である「血漿中の遊離抗原濃度」のいずれかを意味する。

【0137】

血漿中の総抗原濃度は、本発明の抗体の投与によって、インタクトなヒトIgG FcドメインをヒトFcRn結合ドメインとして含む参照抗体の投与と比較して、又は本発明の抗原結合ドメイン分子が投与されない場合と比較して、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍、又は更にそれ以上低下させることができる。

【0138】

別の態様では、本発明は、pH依存性結合特徴を示す二重特異性抗CCl2抗体を提供する。本明細書で使用される場合、「pH依存性結合」という表現は、抗体が「中性pHでの結合と比較して、酸性pHでのCCl2への結合の減少」（本開示の目的のために、両方の表現が交換可能に使用されてもよい）を示すことを意味する。例えば、抗体「pH依存性結合特性を有する」には、酸性pHよりも中性pHでより高い親和性でCCl2に結合する抗体が含まれる。特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、酸性pHにおけるよりも中性pHにおける方が、少なくとも2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、2

0 倍、2 5 倍、3 0 倍、3 5 倍、4 0 倍、4 5 倍、5 0 倍、5 5 倍、6 0 倍、6 5 倍、7 0 倍、7 5 倍、8 0 倍、8 5 倍、9 0 倍、9 5 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、4 0 0 倍、1 0 0 0 倍、1 0 0 0 0 倍又はそれを超える親和性で C C L 2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、p H 5 . 8 よりも p H 7 . 4 で高い親和性で C C L 2 に結合する。更なる実施形態では、抗体は、p H 5 . 8 よりも p H 7 . 4 で、少なくとも 2 倍、3 倍、5 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、2 5 倍、3 0 倍、3 5 倍、4 0 倍、4 5 倍、5 0 倍、5 5 倍、6 0 倍、6 5 倍、7 0 倍、7 5 倍、8 0 倍、8 5 倍、9 0 倍、9 5 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、4 0 0 倍、1 0 0 0 倍、1 0 0 0 0 倍又はそれ以上高い親和性で C C L 2 に結合する。

【0139】

抗原が可溶性タンパク質である場合、抗体は抗原自体よりも長い血漿中半減期を有することができ、抗原の担体として機能し得るため、抗原への抗体の結合は、血漿中の抗原の半減期の延長をもたらし得る（すなわち、血漿からの抗原のクリアランスの減少）。これは、細胞内のエンドソーム経路を介した F c R n による抗原抗体複合体の再利用に起因する（Roopenian, Nat. Rev. Immunol. 7 (9) : 715-725 (2007)）。しかしながら、中性細胞外環境でその抗原に結合し、細胞への進入後に酸性エンドソーム区画に抗原を放出する pH 依存性結合特性を有する抗体は、p H 非依存的に結合するその対応物と比較して、抗原中和及びクリアランスに関して優れた特性を有すると予想される（Igawa et al., Nature Biotechnol. 28 (11) : 1203-1207 (2010) ; Devanaboyina et al., mAbs 5 (6) : 851-859 (2013) ; 国際公開第 2009 / 125825 号）。

【0140】

C C L 2 に対する抗体の「親和性」は、本開示の目的のために、抗体の K D に関して表される。抗体の K D は、抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指す。その抗原に結合する抗体の K D 値が大きいほど、その結合親和性はその特定の抗原に対して弱くなる。したがって、本明細書で使用される場合、表現「酸性 pH よりも中性 pH で高い親和性」「p H 依存性結合」は、酸性 pH で C C L 2 に結合する抗体の K D が中性 pH で C C L 2 に結合する抗体の K D よりも大きいことを意味する。例えば、本発明の文脈において、酸性 pH で C C L 2 に結合する抗体の K D が、中性 pH で C C L 2 に結合する抗体の K D より少なくとも 2 倍大きい場合、抗体は、酸性 pH よりも中性 pH でより高い親和性で C C L 2 に結合すると考えられる。したがって、本発明は、中性 pH で C C L 2 に結合する抗体の K D よりも少なくとも 2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000、又はそれ以上大きい K D で酸性 pH で C C L 2 に結合する抗体を含む。別の実施形態では、中性 pH での抗体の K D 値は、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M 以下であり得る。別の実施形態では、酸性 pH での抗体の K D 値は、 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M 又はそれ以上であり得る。

【0141】

更なる実施形態では、p H 5 . 8 で C C L 2 に結合する抗体の K D が p H 7 . 4 で C C L 2 に結合する抗体の K D よりも少なくとも 2 倍大きい場合、抗体は、酸性 pH よりも中性 pH でより高い親和性で結合すると考えられる。いくつかの実施形態では、提供される抗体は、p H 7 . 4 で C C L 2 に結合する抗体の K D よりも少なくとも 3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000 倍又はそれを超える K D で、p H 5 . 8 で C C L 2 に結合する。別の実施形態では、p H 7 . 4 での抗体の K D 値は、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M 以下であり得る。別の実施形態では、p H 5 . 8 での抗体の K D 値は、 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M 又はそれ以上であり得る。

【0142】

特定の抗原に対する抗体の結合特性はまた、抗体の k_d に関して表され得る。抗体の k_d は、特定の抗原に対する抗体の解離速度定数を指し、秒の逆数（すなわち、 sec^{-1} ）で表される。 k_d 値の増加は、その抗原に対する抗体の結合がより弱いことを意味する。したがって、本発明は、中性 pH よりも酸性 pH でより高い k_d 値で CCCL2 に結合する抗体を含む。本発明は、中性 pH で CCCL2 に結合する抗体の K_d よりも少なくとも2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000、又はそれ以上大きい K_d で酸性 pH で CCCL2 に結合する抗体を含む。別の実施形態では、中性 pH での抗体の k_d 値は、 10^{-2} 1/s 、 10^{-3} 1/s 、 10^{-4} 1/s 、 10^{-5} 1/s 、 10^{-6} 1/s 以下であり得る。別の実施形態では、酸性 pH での抗体の k_d 値は、 10^{-3} 1/s 、 10^{-2} 1/s 、 10^{-1} 1/s 又はそれ以上であり得る。本発明はまた、 $\text{pH} 7.4$ よりも $\text{pH} 5.8$ でより高い k_d 値で CCCL2 に結合する抗体を含む。本発明は、 $\text{pH} 7.4$ で CCCL2 に結合する抗体の K_d よりも少なくとも3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000、又はそれ以上大きい K_d で $\text{pH} 5.8$ で CCCL2 に結合する抗体を含む。別の実施形態では、 $\text{pH} 7.4$ での抗体の k_d 値は、 10^{-2} 1/s 、 10^{-3} 1/s 、 10^{-4} 1/s 、 10^{-5} 1/s 、 10^{-6} 1/s 以下であり得る。別の実施形態では、 $\text{pH} 5.8$ での抗体の k_d 値は、 10^{-3} 1/s 、 10^{-2} 1/s 、 10^{-1} 1/s 又はそれ以上であり得る。

10

20

【0143】

特定の場合において、「中性 pH での結合と比較して、酸性 pH での CCCL2 への結合の減少」は、中性 pH で CCCL2 に結合する抗体の K_D 値に対する酸性 pH で CCCL2 に結合する抗体の K_D 値の比（又はその逆）に関して表される。例えば、抗体が2以上の酸性／中性 K_D 比を示す場合、本発明の目的のために、抗体は「中性 pH での結合と比較して、酸性 pH での CCCL2 への結合の減少」を示すと見なされ得る。特定の実施形態では、本発明の抗 CCCL2 抗体についての $\text{pH} 5.8 / \text{pH} 7.4$ の K_D 比は、2以上である。特定の例示的な実施形態では、本発明の抗体についての酸性／中性 K_D 比は、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000又はそれ以上であり得る。別の実施形態では、中性 pH での抗体の K_D 値は、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、 10^{-10} M 、 10^{-11} M 、 10^{-12} M 以下であり得る。別の実施形態では、酸性 pH での抗体の K_D 値は、 10^{-9} M 、 10^{-8} M 、 10^{-7} M 、 10^{-6} M 又はそれ以上であり得る。更なる例では、抗体が2以上の $\text{pH} 5.8 / \text{pH} 7.4$ の K_D 比を示す場合、抗体は「中性 pH での結合と比較して、酸性 pH での CCCL2 への結合の減少」を示すと見なされ得る。特定の例示的な実施形態では、抗体の $\text{pH} 5.8 / \text{pH} 7.4$ の K_D 比は、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000又はそれ以上であり得る。別の実施形態では、 $\text{pH} 7.4$ での抗体の K_D 値は、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、 10^{-10} M 、 10^{-11} M 、 10^{-12} M 以下であり得る。別の実施形態では、 $\text{pH} 5.8$ での抗体の K_D 値は、 10^{-9} M 、 10^{-8} M 、 10^{-7} M 、 10^{-6} M 又はそれ以上であり得る。

30

40

【0144】

特定の場合において、「中性 pH での結合と比較して、酸性 pH での CCCL2 への結合の減少」は、中性 pH で CCCL2 に結合する抗体の K_d 値に対する酸性 pH で CCCL2 に結合する抗体の K_d 値の比（又はその逆）に関して表される。例えば、抗体が2以上の酸性／中性 K_d 比を示す場合、本発明の目的のために、抗体は「中性 pH での結合と比較して、酸性 pH での CCCL2 への結合の減少」を示すと見なされ得る。特定の例示的な実施形態では、本発明の抗体の $\text{pH} 5.8 / \text{pH} 7.4$ の k_d 比は2以上である。特定の例示

50

的な実施形態では、本発明の抗体についての酸性／中性K_d比は、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000又はそれ以上であり得る。別の実施形態では、中性pHでの抗体のk_d値は、10⁻² 1/s、10⁻³ 1/s、10⁻⁴ 1/s、10⁻⁵ 1/s、10⁻⁶ 1/s以下であり得る。別の実施形態では、酸性pHでの抗体のk_d値は、10⁻³ 1/s、10⁻² 1/s、10⁻¹ 1/s又はそれ以上であり得る。特定の例示的な実施形態では、本発明の抗体のpH5.8／pH7.4のk_d比は、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000、又はそれ以上であり得る。別の実施形態では、pH7.4での抗体のk_d値は、10⁻² 1/s、10⁻³ 1/s、10⁻⁴ 1/s、10⁻⁵ 1/s、10⁻⁶ 1/s以下であり得る。別の実施形態では、pH5.8での抗体のk_d値は、10⁻³ 1/s、10⁻² 1/s、10⁻¹ 1/s又はそれ以上であり得る。

【0145】

本明細書で使用される場合、「酸性pH」という表現は、4.0～6.5のpHを意味する。「酸性pH」という表現は、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4及び6.5のいずれか1つのpH値を含む。特定の態様では、「酸性pH」は5.8である。

【0146】

本明細書で使用される場合、「中性pH」という表現は、6.7～約10.0のpHを意味する。「中性pH」という表現は、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、及び10.0のいずれか1つのpH値を含む。特定の態様では、「中性pH」は7.4である。

【0147】

本明細書で表されるK_D値及びk_d値は、抗体－抗原相互作用を特徴付けるために表面プラズモン共鳴ベースのバイオセンサーを使用して決定することができる。K_D値及びk_d値は、25℃又は37℃で決定することができる。

【0148】

更なる態様では、本発明は、CC₂と免疫複合体（すなわち、抗原抗体複合体）を形成する二重特異性抗CC₂抗体を提供する。特定の実施形態では、2つ以上の二重特異性抗CC₂抗体が2つ以上のCC₂分子に結合して免疫複合体を形成する。これは、抗体が2つの抗原結合部位を有する一方で、CC₂は2つのCC₂分子を含むホモ二量体として存在するために可能である。

【0149】

一般的に言えば、2つ以上の抗体が2つ以上の抗原と免疫複合体を形成する場合、得られた免疫複合体は、複合体中の抗体のFc領域を介したアビディティ効果により、細胞表面に存在するFc受容体に強く結合することができ、次いで高効率で細胞内に取り込まれ得る。したがって、2つ以上の抗CC₂抗体及び2つ以上のCC₂分子を含む免疫複合体を形成することができる上記の抗CC₂抗体は、アビディティ効果によるFc受容体への強い結合を介して、生体内の血漿からのCC₂の迅速なクリアランスをもたらし得る。

【0150】

さらに、pH依存的結合特性を有する抗体は、pH非依存的に結合するその対応物と比較して、抗原の中和及びクリアランスに関して優れた特性を有すると考えられている（Igawa et al., Nature Biotech. 28 (11): 1203-1207 (2010); Devanaboyina et al. mAbs 5 (6): 8

10

20

30

40

50

51-859(2013)；国際公開第2009/125825号)。したがって、上記両特性を有する抗体、すなわちpH依存的な結合特性を有し、2つ以上の抗原と2つ以上の抗体を含む免疫複合体を形成する抗体は、血漿からの抗原の除去を高度に促進するという、より優れた特性を有することが期待される(国際公開第2013/081143号)。

【0151】

一態様では、本発明は、以下を含む少なくとも2つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強されたバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：(a)位置236における1つのアミノ酸の変化、及び(b)以下からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸の変化：231、232、233、234、235、237、238、239、264、266、267、268、271、295、298、325、326、327、328、330、331、332、334、及び396(EUナンバリングに従う)。

10

【0152】

一態様では、本発明は、EUナンバリングで236位のアミノ酸変化を含むFcガンマRIIb結合活性が増強されたバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する。

【0153】

一態様では、本発明は、以下を含む少なくとも2つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強されたバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：(a)位置236における1つのアミノ酸の変化、及び(b)以下からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸の変化：231、232、235、239、268、295、298、326、330、及び396(EUナンバリングに従う)。更なる実施形態では、バリエーションFc領域は、以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置のアミノ酸変化を含む：231、232、235、239、268、295、298、326、330、及び396(EUナンバリングに従う)。更なる実施形態では、バリエーションFc領域は、以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置のアミノ酸変化を含む：268、295、326、及び330(EUナンバリングに従う)。

20

【0154】

別の態様では、本発明は、以下の(1)～(37)のいずれか1つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強されたバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：(1)位置231、236、239、268及び330；(2)位置231、236、239、268、295及び330；(3)位置231、236、268及び330；(4)位置231、236、268、295及び330；(5)位置232、236、239、268、295及び330；(6)位置232、236、268、295及び330；(7)位置232、236、268及び330；(8)位置235、236、268、295、326及び330；(9)位置235、236、268、295及び330；(10)位置235、236、268及び330；(11)位置235、236、268、330及び396；(12)位置235、236、268及び396；(13)位置236、239、268、295、298及び330；(14)位置236、239、268、295、326及び330；(15)位置236、239、268、295及び330；(16)位置236、239、268、298及び330；(17)位置236、239、268、326及び330；(18)位置236、239、268及び330；(19)位置236、239、268、330及び396；(20)位置236、239、268及び396；(21)位置236及び268；(22)位置236、268及び295；(23)位置236、268、295、298及び330；(24)位置236、268、295、326及び330；(25)位置236、268、295、326、330及び396；(26)位置236、268、295及び330；(27)位置236、268、295、330及び396；(28)位置236、268、298及び330；(29)位置236、268、298及び396；(30)位置236、268、326及び330；(31)位置236、268、326、330及び396；(32

30

40

50

) 位置 236、268 及び 330；(33) 位置 236、268、330 及び 396；(34) 位置 236、268 及び 396；(35) 位置 236 及び 295；(36) 位置 236、330 及び 396；並びに (37) 位置 236 及び 396 (EU ナンバリングに従う)。

【0155】

更なる実施形態では、Fc ガンマ RIIb 結合活性が増強されたバリエーション Fc 領域は、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸を含む：(a) 位置 231 の Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr；(b) 位置 232 の Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr；(c) 位置 233 の Asp；(d) 位置 234 の Trp、Tyr；(e) 位置 235 の Trp；(f) 位置 236 の Ala、Asp、Glu、His、Ile、Leu、Met、Asn、Gln、Ser、Thr、Val；(g) 位置 237 の Asp、Tyr；(h) 位置 238 の Glu、Ile、Met、Gln、Tyr；(i) 位置 239 の Ile、Leu、Asn、Pro、Val；(j) 位置 264 の Ile；(k) 位置 266 の Phe；(l) 位置 267 の Ala、His、Leu；(m) 位置 268 の Asp、Glu；(n) 位置 271 の Asp、Glu、Gly；(o) 位置 295 の Leu；(p) 位置 298 の Leu；(q) 位置 325 の Glu、Phe、Ile、Leu；(r) 位置 326 の Thr；(s) 位置 327 の Ile、Asn；(t) 位置 328 の Thr；(u) 位置 330 の Lys、Arg；(v) 位置 331 の Glu；(w) 位置 332 の Asp；(x) 位置 334 の Asp、Ile、Met、Val、Tyr；及び (y) 位置 396 の Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr (EU ナンバリングに従う)。

【0156】

更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：(a) 位置 231 の Gly、Thr；(b) 位置 232 の Asp；(c) 位置 235 の Trp；(d) 位置 236 の Asn、Thr；(e) 位置 239 の Val；(f) 位置 268 の Asp、Glu；(g) 位置 295 の Leu；(h) 位置 298 の Leu；(i) 位置 326 の Thr；(j) 位置 330 の Lys、Arg；(k) 位置 396 の Lys、Met (EU ナンバリングによる)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 236 の Asn、位置 268 の Glu、位置 330 の Lys、及び位置 396 の Met (EU ナンバリングに従う)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 236 の Asn、位置 268 の Asp、及び位置 330 の Lys (EU ナンバリングに従う)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 236 の Asn、位置 268 の Asp、位置 295 の Leu、及び位置 330 の Lys (EU ナンバリングに従う)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 236 の Thr、位置 268 の Asp、及び位置 330 の Lys (EU ナンバリングに従う)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 236 の Asn、位置 268 の Asp、位置 295 の Leu、位置 326 の Thr、及び位置 330 の Lys (EU ナンバリングに従う)。更なる実施形態では、増強された Fc ガンマ RIIb 結合活性を有するバリエーション Fc 領域は、以下のアミノ酸変化 (例えば、置換) を含む：位置 235 の Trp、位置 236 の Asn、位置 268 の Asp、位置 295 の Leu、位置 326 の Thr、及び位置 330 の Lys (EU ナンバリングに従う)。

【0157】

別の態様では、本発明は、等電点（ pI ）が増加したバリエーションFc領域を含む単離されたポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、本明細書中に記載されるバリエーションFc領域は、親Fc領域に少なくとも2つのアミノ酸変化を含む。特定の実施形態では、アミノ酸変化のそれぞれは、親Fc領域の等電点（ pI ）と比較してバリエーションFc領域の等電点（ pI ）を増加させる。それらは、例えば抗体を *in vivo* で投与した場合、少なくとも2つのアミノ酸残基の修飾によって pI が増加した抗体で血漿からの抗原除去を促進できるという知見に基づいている。

【0158】

本発明において、 pI は、理論的に決定された pI 及び実験的に決定された pI のいずれかであり得る。 pI の値は、例えば、当業者に公知の等電点電気泳動によって決定することができる。理論 pI の値は、例えば、遺伝子・アミノ酸配列解析ソフト（Genetyx等）を用いて算出することができる。

【0159】

一実施形態では、 pI 値は、修飾前と比較して、例えば、少なくとも0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5若しくはそれ以上、少なくとも0.6、0.7、0.8、0.9若しくはそれ以上、少なくとも1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5若しくはそれ以上、及び少なくとも1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、3.0若しくはそれ以上増加し得る。

【0160】

特定の実施形態では、 pI 増加のためのアミノ酸をバリエーションFc領域の表面に露出させることができる。本発明において、表面に露出し得るアミノ酸とは、通常、バリエーションFc領域を構成するポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基をいう。ポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基とは、その側鎖が溶媒分子（一般にほとんどが水分子である）と接触することができるアミノ酸残基を指す。しかし、必ずしも全ての側鎖が溶媒分子と接触している必要はなく、一部でも溶媒分子と接触していれば、そのアミノ酸は、「表面に位置するアミノ酸残基」と定義される。ポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基は、表面の近くに位置するアミノ酸残基も含み、それによって、側鎖が、部分的であっても、溶媒分子と接触している別のアミノ酸残基からの電荷の影響を有し得る。当業者は、例えば、市販のソフトウェアを使用して、ポリペプチドの相同性モデルを調製することができる。あるいは、X線結晶学などの当業者に公知の方法を使用することが可能である。表面に露出し得るアミノ酸残基は、例えば、InsightIIプログラム（Accelrys）などのコンピュータプログラムを用いた3次元モデルからの座標を用いて決定される。表面露出可能部位は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、Lee and Richards（J. Mol. Biol. 55:379-400（1971））；Connolly（J. Appl. Cryst. 16:548-558（1983）））を使用して決定され得る。表面露出可能部位は、タンパク質モデリング及び三次元構造情報に適したソフトウェアを使用して決定することができる。そのような目的のために利用可能なソフトウェアとしては、例えば、SYBYL Biopolymer Moduleソフトウェア（Tripos Associates）が挙げられる。アルゴリズムがユーザー入力サイズパラメータを必要とする場合、計算に使用されるプローブの「サイズ」は、半径約1.4オングストローム以下に設定され得る。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用して表面露出可能領域を決定する方法は、Pacios（Comput. Chem. 18（4）：377-386（1994）；J. Mol. Model. 1：46-53（1995））によって記載されている。このような情報に基づいて、バリエーションFc領域を構成するポリペプチドの表面に位置する適切なアミノ酸残基を選択することができる。

【0161】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、バリエーションFc領域と抗原結合ドメインの両方

を含む。更なる実施形態では、抗原は可溶性抗原である。一実施形態では、抗原は対象の体液（例えば、血漿、間質液、リンパ液、腹水、及び胸水）中に存在する。抗原は、膜抗原であってもよい。

【0162】

更なる実施形態では、抗原結合ドメインの抗原結合活性はイオン濃度条件に従って変化する。一実施形態では、イオン濃度は、特に限定されず、水素イオン濃度（pH）及び金属イオン濃度を指す。本明細書において、金属イオンとは、アルカリ金属、及び銅族元素等の水素を除くⅠ族元素、アルカリ土類金属及び亜鉛族元素等のⅡ族元素、ホウ素を除くⅢ族元素、炭素及びケイ素を除くⅣ族元素、鉄族及び白金族元素等のⅤ族元素、Ⅵ族、Ⅶ族及びⅧ族のⅧ族Aに属する元素、並びにアンチモン、ビスマス、ポロニウム等の金属元素のイオンを指す。本発明において、金属イオンには、例えば、国際公開第2012/073992号及び国際公開第2013/125667号に記載されているように、カルシウムイオンが含まれる。一実施形態では、「イオン濃度条件」は、低イオン濃度と高イオン濃度との間の抗原結合ドメインの生物学的挙動の差に焦点を合わせた条件であり得る。さらに、「抗原結合ドメインの抗原結合活性はイオン濃度条件に応じて変化する」は、抗原結合ドメインの抗原結合活性が低イオン濃度と高イオン濃度との間で変化することを意味する（そのような抗原結合ドメインは、「イオン濃度依存性抗原結合ドメイン」として本明細書で言及される）。高イオン濃度条件下での抗原結合ドメインの抗原結合活性は、低イオン濃度条件下よりも高く（強く）及び低く（弱く）なり得る。一実施形態では、イオン濃度依存性抗原結合ドメイン（pH依存性抗原結合ドメイン又はカルシウムイオン濃度依存性抗原結合ドメインなど）は、公知の方法、例えば国際公開第2009/125825号、国際公開第2012/073992号及び国際公開第2013/046722号に記載されている方法によって得ることができる。

【0163】

本発明において、高カルシウムイオン濃度条件下での抗原結合ドメインの抗原結合活性は、低カルシウムイオン濃度条件下よりも高くてもよい。高カルシウムイオン濃度は、特に限定されないが、*in vivo*でのカルシウムイオンの血漿（血液）濃度に近いことが好ましく、100マイクロM～10mM、200マイクロM～5mM、400マイクロM～3mM、200マイクロM～2mM、400マイクロM～1mM、500マイクロM～2.5mMから選択される濃度であってもよい。一方、低カルシウムイオン濃度は、特に限定されないが、*in vivo*の初期エンドソーム中のカルシウムイオン濃度に近いことが好ましく、0.1マイクロM～30マイクロM、0.2マイクロM～20マイクロM、0.5マイクロM～10マイクロM、1マイクロM～5マイクロM、又は2マイクロM～4マイクロMから選択される濃度であってもよい。

【0164】

一実施形態では、低カルシウムイオン濃度条件下と高カルシウムイオン濃度条件下での抗原結合活性の比は限定されないが、高カルシウムイオン濃度条件下でのKDに対する低カルシウムイオン濃度条件下での解離定数（KD）の比、すなわちKD（低カルシウムイオン濃度条件）／KD（高カルシウムイオン濃度条件）は、2以上、10以上及び40以上である。この比の上限は、当業者に公知の技術によってそのような抗原結合ドメインを産生することができる限り、400、1000及び10000であり得る。また、KDの代わりに、例えば、解離速度定数（kd）を用いることもできる。この場合、高カルシウムイオン濃度条件のkdに対する低カルシウムイオン濃度条件のkdの比、すなわち、kd（低カルシウムイオン濃度条件）／kd（高カルシウムイオン濃度条件）は、2以上、5以上、10以上、又は30以上である。この比の上限は、当業者の技術常識に基づいて抗原結合ドメインを製造できる限り、50、100であってもよく、200であってもよい。

【0165】

本発明において、低水素イオン濃度（中性pH）下での抗原結合ドメインの抗原結合活性は、高水素イオン濃度（酸性pH）下よりも高くてもよい。酸性pHは、初期エンドソ

ームにおいて *in vivo* での pH に近いことが好ましく、例えば、pH 4.0～pH 6.5 から選択される pH、pH 4.5～pH 6.5 から選択される pH、pH 5.0～pH 6.5 から選択される pH、及び pH 5.5～pH 6.5 から選択される pH であり得る。酸性 pH は、例えば、pH 5.8 及び pH 6.0 であってもよい。特定の実施形態では、酸性 pH は pH 5.8 である。なお、中性の pH としては、例えば、pH 6.7～pH 10.0 から選択される pH、pH 6.7～pH 9.5 から選択される pH、pH 7.0～pH 9.0 から選択される pH、pH 7.0～pH 8.0 から選択される pH であってもよく、血漿（血液）中の *in vivo* での pH に近いことが好ましい。中性 pH は、例えば、pH 7.4 及び pH 7.0 であってもよい。特定の実施形態では、中性 pH は pH 7.4 である。

10

【0166】

一実施形態では、酸性 pH 条件下と中性 pH 条件下での抗原結合活性の比は限定されないが、中性 pH 条件下での KD に対する酸性 pH 条件下での解離定数 (KD) の比、すなわち KD (酸性 pH 条件) / KD (中性 pH 条件) は、2 以上、10 以上、及び 40 以上である。この比の上限は、当業者に公知の技術によってそのような抗原結合ドメインを生成することができる限り、400、1000 及び 10000 であり得る。また、KD の代わりに、例えば、解離速度定数 (kd) を用いることもできる。この場合、酸性 pH 条件の kd と中性 pH 条件の kd の比、すなわち、kd (酸性 pH 条件) / kd (中性 pH 条件) は、2 以上、5 以上、10 以上、又は 30 以上である。当該比の上限は、当業者の技術常識に基づいて抗原結合ドメインを製造できる限り、50、100 であってもよく、200 であってもよい。

20

【0167】

一実施形態では、例えば、国際公開第 2009/125825 号に記載されているように、少なくとも 1 つのアミノ酸残基が 4.0～8.0 の側鎖 pKa を有するアミノ酸残基で置換され、及び／又は 4.0～8.0 の側鎖 pKa を有する少なくとも 1 つのアミノ酸が抗原結合ドメインに挿入される。アミノ酸は、酸性 pH 条件下では中性 pH 条件下よりも抗原結合ドメインの抗原結合活性が置換又は挿入前に比べて弱くなる限り、任意の部位で置換及び／又は挿入され得る。抗原結合ドメインが可変領域及び CDR を有する場合、その部位は可変領域及び CDR 内にあり得る。置換又は挿入されるアミノ酸の数は、当業者が適宜決定することができ、この数は、1 以上であってもよい。4.0～8.0 の側鎖 pKa を有するアミノ酸を使用して、水素イオン濃度条件に従って抗原結合ドメインの抗原結合活性を変化させることができる。そのようなアミノ酸としては、例えば、His (H) 及び Glu (E) などの天然アミノ酸、並びにヒスチジン類縁体（米国特許出願公開第 2009/0035836 号）、m-NO₂-Tyr (pKa 7.45)、3,5-Br₂-Tyr (pKa 7.21)、及び 3,5-I₂-Tyr (pKa 7.38) (Heyl et al., Bioorg. Med. Chem. 11 (17): 3761-3768 (2003)) などの非天然アミノ酸が挙げられる。6.0～7.0 の側鎖 pKa を有するアミノ酸も使用することができ、例えば His (H) が挙げられる。

30

【0168】

別の実施形態では、pI が増加したバリエーション Fc 領域の好ましい抗原結合ドメインが記載されており、国際公開第 2016/125495 号及び国際公開第 2017/046994 号に記載されている方法によって得ることができる。

40

【0169】

特定の実施形態では、pI が増加したバリエーション Fc 領域は、以下からなる群から選択される少なくとも 2 つの位置の少なくとも 2 つのアミノ酸変化を含む：285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、431 (EU ナンバリングに従う)。

【0170】

更なる実施形態では、pI が増加したバリエーション Fc 領域は、以下からなる群から選択

50

される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸変化を含む：311、341、343、384、399、400、401、402、413（EUN numberingに従う）。

【0171】

別の態様では、本発明は、以下の（1）～（10）のいずれか1つのアミノ酸変化を含む、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：（1）位置311及び341；（2）位置311、343；（3）位置311、343、413；（4）位置311、384、413；（5）位置311、399；（6）位置311、401；（7）位置311、413；（8）位置400、413；（9）位置401、413；並びに（10）位置402及び413（EUN numberingに従う）。

10

【0172】

一態様では、本発明は、以下を含む少なくとも3つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強され、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：（a）以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸変化：231、232、233、234、235、236、237、238、239、264、266、267、268、271、295、298、325、326、327、328、330、331、332、334、及び396（EUN numberingに従う）；並びに（b）以下からなる群から選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸変化：285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、431（EUN numberingに従う）。

20

【0173】

一態様では、本発明は、以下を含む少なくとも3つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強され、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：（a）以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸変化：231、232、235、236、239、268、295、298、326、330及び396（EUN numberingに従う）、並びに（b）以下からなる群から選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸変化：311、341、343、384、399、400、401、402、413（EUN numberingに従う）。

30

【0174】

別の態様では、本発明は、以下の（1）～（9）のいずれか1つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強され、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：（1）位置235、236、268、295、311、326、330及び343；（2）位置236、268、295、311、326、330及び343；（3）位置236、268、295、311、330及び413；（4）位置236、268、311、330、396及び399；（5）位置236、268、311、330及び343；（6）位置236、268、311、330、343及び413；（7）位置236、268、311、330、384及び413；（8）位置236、268、311、330及び413；並びに（9）位置236、268、330、396、400及び413（EUN numberingに従う）。

40

【0175】

一態様では、本発明は、以下を含む少なくとも3つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強され、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：（a）以下からなる群から選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸変化：234、238、250、264、267、307、及び330；並びに（b）以下からなる群から選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸変化：285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、431（EUN numberingに従う）。更なる実施形態では、ポ

50

リペプチドは、以下からなる群から選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸変化を含む：311、341、343、384、399、400、401、402、413（EUN numberingに従う）。

【0176】

別の態様では、本発明は、以下の(1)～(16)のいずれか1つのアミノ酸変化を含む、FcガンマRIIb結合活性が増強され、pIが増加したバリエーションFc領域を含むポリペプチドを提供する：(1)位置234、238、250、264、307、311、330及び343；(2)位置234、238、250、264、307、311、330及び413；(3)位置234、238、250、264、267、307、311、330及び343；(4)位置234、238、250、264、267、307、311、330及び413；(5)位置234、238、250、267、307、311、330及び343；(6)位置234、238、250、267、307、311、330及び413；(7)位置234、238、250、307、311、330及び343；(8)位置234、238、250、307、311、330及び413；(9)位置238、250、264、267、307、311、330及び343；(10)位置238、250、264、267、307、311、330及び413；(11)位置238、250、264、307、311、330及び343；(12)位置238、250、264、307、311、330及び413；(13)位置238、250、267、307、311、330及び343；(14)位置238、250、267、307、311、330及び413；(15)位置238、250、307、311、330及び343；並びに(16)位置238、250、307、311、330及び413（EUN numberingに従う）。

10

20

【0177】

さらに、他の目的のために行われるアミノ酸変化を、本明細書中に記載されるバリエーションFc領域において組み合わせることができる。例えば、FcRn結合活性を改善するアミノ酸置換（Hinton et al., J. Immunol. 176 (1): 346-356 (2006)；Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281 (33): 23514-23524 (2006)；Petkova et al., Intl. Immunol. 18 (12): 1759-1769 (2006)；Zallevsky et al., Nat. Biotechnol. 28 (2): 157-159 (2010)；国際公開第2006/019447号；国際公開第2006/053301号；及び国際公開第2009/086320号）、及び抗体の不均一性又は安定性を改善するためのアミノ酸置換（国際公開第2009/041613号）を加えてもよい。あるいは、国際公開第2011/122011号、国際公開第2012/132067号、国際公開第2013/046704号及び国際公開第2013/180201号に記載されている抗原クリアランスを促進する特性を有するポリペプチド、国際公開第2013/180200号に記載されている標的組織への特異的結合特性を有するポリペプチド、国際公開第2009/125825号、国際公開第2012/073992号及び国際公開第2013/047752号に記載されている複数の抗原分子への反復結合特性を有するポリペプチドを、本明細書に記載のバリエーションFc領域と組み合わせることができる。あるいは、他の抗原への結合能を付与する目的で、欧州特許第1752471号及び欧州特許第1772465号に開示されているアミノ酸変化を、本明細書に記載のバリエーションFc領域のCH3において組み合わせることができる。あるいは、血漿保持を増加させる目的で、定常領域のpIを減少させるアミノ酸変化（国際公開第2012/016227号）を本明細書に記載のバリエーションFc領域に組み合わせてもよい。あるいは、細胞への取り込みを促進する目的で、定常領域のpIを増加させるアミノ酸変化（国際公開第2014/145159号）を本明細書に記載のバリエーションFc領域に組み合わせてもよい。あるいは、血漿からの標的分子の除去を促進する目的で、定常領域のpIを増加させるアミノ酸変化（国際公開第2016/125495号）を、本明細書中に記載されるバリエーションFc領域において組み合わせることができる。一実施形態では、そのような変化は

30

40

50

、例えば、EUナンバリングで311、343、384、399、400及び413からなる群から選択される少なくとも1つの位置の置換を含み得る。更なる実施形態では、そのような置換は、各位置のLys及びArgによるアミノ酸を置き換えることであり得る。

【0178】

酸性pH下でヒトFcRn結合活性を増強するアミノ酸変化も、本明細書に記載のバリエーションFc領域に組み合わせることができる。具体的には、このような変化としては、例えば、EUナンバリング(Zallevsky et al., Nat. Biotechnol. 28:157-159 (2010))に従って、位置428でのLeuのMetへの置換及び位置434でのSerのAsnへの置換；位置434でのAlaのAsnへの置換(Deng et al., Metab. Dispos. 38(4):600-605 (2010))；位置252でのTyrのMetへの置換、位置254でのThrのSerへの置換、及び位置256でのGluのThrへの置換(Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-23524 (2006))；位置250でのGlnのThrへの置換、及び位置428でのLeuのMetへの置換(Hinton et al., J. Immunol. 176(1):346-356 (2006))；位置434でのHisのAsnへの置換(Zheng et al., Clin. Pharmacol. Ther. 89(2):283-290 (2011)、並びに国際公開第2010/106180号、国際公開第2010/045193号、国際公開第2009/058492号、国際公開第2008/022152号、国際公開第2006/050166号、国際公開第2006/053301号、国際公開第2006/031370号、国際公開第2005/123780号、国際公開第2005/047327号、国際公開第2005/037867号、国際公開第2004/035752号又は国際公開第2002/060919号に記載される変化を含み得る。このような変化としては、例えば、位置428でのMetのLeuへの置換、位置434でのAsnのAlaへの置換、及び位置436でのTyrのThrへの置換からなる群より選択される少なくとも1つの変化が挙げられ得る。これらの変化には、位置438におけるGlnのためのArgの置換及び／又は位置440におけるSerのためのGluの置換が更に含まれ得る(国際公開第2016/125495号)。

【0179】

例示的な二重特異性抗CCl2抗体

本発明の一実施形態は、ヒトCCl2上の第1のエピトープに(特異的に)結合する第1の抗原結合部位と、ヒトCCl2上の第2の異なるエピトープに(特異的に)結合する第2の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、

二重特異性抗体が、

a) (N末端からC末端方向に) VH1-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL1-CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり(両方が第1の抗原結合部位を共に形成する(共に会合して形成する))、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ(一実施形態では5～10アミノ酸の長さ)を有するポリペプチドリッカーであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

L2は、5～15アミノ酸の長さ(一実施形態では10～15アミノ酸の長さ)を有するポリペプチドリッカーであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、

b) (N末端からC末端方向に) VH2-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL2-CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、

VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含み、

A) i) VH1ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

B) i) VH1ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号91のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

C) i) VH1ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号94のアミノ酸配列を含むか、

又は

D) i) VH1ドメインが、配列番号72のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号94のアミノ酸配列を含むか、

又は

E) i) VH1ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

F) i) VH1ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号94のアミノ酸配列を含むか、

又は

G) i) VH1ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号92のアミノ酸配列を含み、
VL2ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含むか、

又は

H) i) VH1ドメインが、配列番号73のアミノ酸配列を含み、
VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) VH2ドメインが、配列番号91のアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、
又は

I) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

J) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

10

又は

K) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

L) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

20

又は

M) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含むか、

又は

N) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

30

又は

O) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

P) i) V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ
i i) V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、二重特異性抗体である。

40

【0180】

本発明の一実施形態は、ヒト C C L 2 上の第 1 のエピトープに（特異的に）結合する第 1 の抗原結合部位と、ヒト C C L 2 上の第 2 の異なるエピトープに（特異的に）結合する第 2 の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、

二重特異性抗体が

a) (N 末端から C 末端方向に) V H 1 - C H 1 - L 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 - L 2 - V L 1 - C L を含む、第 1 のポリペプチド鎖であって、

V H 1 は、第 1 の重鎖可変ドメインであり、V L 1 は、第 1 の可変軽鎖ドメインであり（両方が第 1 の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

50

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、
 L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
 ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
 CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
 CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
 L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
 CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、
 b) (N末端からC末端方向に) VH2-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL2-CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、
 VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、
 CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、
 L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
 ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、
 CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、
 CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、
 L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、
 CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含み、
 i) 当該第1の抗原結合部位が、
 (a) 配列番号57のアミノ酸配列SHYGXS（式中、XはIである）を含むCDR-H1、(b) 配列番号58のアミノ酸配列GX¹IX²IFX³TANYAQKFQG（式中、X¹はVであり、X²はPであり、X³はHである）を含むCDR-H2、及び(c) 配列番号59のアミノ酸配列YDAHYGELEDFを含むCDR-H3を含む、VHドメインと、
 (d) 配列番号60のアミノ酸配列RASQHVSDAYLAを含むCDR-L1、(e) 配列番号61のアミノ酸配列DASDRAEを含むCDR-L2、及び(f) 配列番号62のアミノ酸配列HQYIHLHSFTを含むCDR-L3を含む、VLドメインとを含み、
 ii) 当該第2の抗原結合部位が、
 (a) 配列番号76のアミノ酸配列HTYMHを含むCDR-H1、(b) 配列番号77のアミノ酸配列RIDPXNHNTKFDPKFQG（式中、XはDである）を含むCDR-H2、及び(c) 配列番号78のアミノ酸配列GVFGFFXH（XはEである）を含むCDR-H3を含む、VHドメインと、
 (d) 配列番号79のアミノ酸配列KAX¹EDIYNRX²A（式中、X¹はFであり、X²はRである）を含むCDR-L1、(e) 配列番号80のアミノ酸配列GATSLLEHを含むCDR-L2、及び(f) 配列番号81のアミノ酸配列QQFXSAPYT（式中、XはRである）を含むCDR-L3を含むVLドメインとを含む、二重特異性抗体である。
 【0181】
 本発明の一実施形態は、ヒトCC2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、ヒトCC2上の第2の異なるエピトープに（特異的に）結合する第2の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、
 二重特異性抗体が
 a) (N末端からC末端方向に) VH1-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL1-CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

10

20

30

40

50

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり（両方が第1の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、

b) (N末端からC末端方向に) VH2-CH1-L1-ヒンジ-CH2-CH3-L2-VL2-CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、

VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリンカーであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含み、

i) VH1ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、

VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

ii) VH2ドメインが、配列番号91のアミノ酸配列を含み、

VL2ドメインが、配列番号93のアミノ酸配列を含む、二重特異性抗体である。

【0182】

一実施形態では、L1及びL2は、アミノ酸グリシン及びセリンを含むポリペプチドリンカーであり、反復グリシンは最大4個の連続グリシンに制限され、セリンは別のセリンに直接結合していない。

【0183】

一実施形態では、L1は、9～11アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーであり、L2は、9～11アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーである。

【0184】

一実施形態では、L1及びL2は、GSGGSGGSGG（配列番号183）、GSGGSGGSGG（配列番号184）、GSGGSGGSGG（配列番号185）、GSGGSGGSGG（配列番号186）、GSGGSGGSGG（配列番号187）、GSGGSGGSGG（配列番号188）、GSGGSGGSGG（配列番号189）、GSGGSGGSGG（配列番号190）、及びGSGGSGGSGG（配列番号191）の群から選択されるポリペプチドリンカーである。

【0185】

一実施形態では、L1は、GSGGSGGSGG（配列番号188）のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーであり、L2は、GSGGSGGSGG（配列番号188）のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーである。

【0186】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgGアイソタイプ、好ましくはヒトIgG1アイソタイプのものである。

10

20

30

40

50

【0187】

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体は、他のヒトCCCLホモログに対して交差反応性ではなく、特に、CCCL2に対する結合と比較して、他のCCCLホモログ（CCCL8、CCCL7及びCCCL13の群から選択される）に対して100倍低い結合を示す。

【0188】

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体は、イオン依存的にヒトCCCL2上の第1及び第2のエピトープに結合する。

【0189】

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体は、pH依存的様式でヒトCCCL2に結合し、第1の抗原結合部位及び第2の抗原結合部位はどちらも酸性pHよりも中性pHで、より高い親和性でCCCL2に結合する。

【0190】

一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗体は、pH7.4において、pH5.8よりも10倍高い親和性でヒトCCCL2に結合する。

【0191】

一実施形態では、ヒト野生型IgG1アイソタイプの定常重鎖ドメイン（又はそのFcドメイン）を含む二重特異性抗体を投与した後のヒトCCCL2のin vivoクリアランス速度（ml/日/kg）は、20mg/kgの各二重特異性抗体及び0.1mg/kgヒトCCCL2からなる予め形成された免疫複合体を10ml/kgの単回用量でFcRnトランスジェニックマウスに投与した場合、変異L234A、L235A、P329G（Kabata EUNanバリング）を含むヒトIgG1アイソタイプのFcガンマ受容体サイレンシング定常重鎖ドメイン（又はそのFcドメイン）を含む二重特異性抗体を投与した後のヒトCCCL2のin vivoクリアランス速度（ml/日/kg）と比較して、少なくとも15倍高く、特に少なくとも20倍高い。

【0192】

一実施形態では、ヒト野生型IgG1アイソタイプの定常重鎖ドメイン（又はそのFcドメイン）を含む二重特異性抗体を投与した後のヒトCCCL2のin vivoクリアランス速度（ml/日/kg）は、20mg/kgの各二重特異性抗体及び0.1mg/kgヒトCCCL2からなる予め形成された免疫複合体を10ml/kgの単回用量でFcRnトランスジェニックマウスに投与した場合、変異L234A、L235A、P329G（Kabata EUNanバリング）を含むヒトIgG1アイソタイプのFcガンマ受容体サイレンシング定常重鎖ドメイン（又はそのFcドメイン）を含む二重特異性抗体を投与した後のヒトCCCL2のin vivoクリアランス速度（ml/日/kg）と比較して少なくとも2倍高い（一実施形態では、少なくとも5倍高い、一実施形態では、少なくとも10倍高い、一実施形態では、少なくとも20倍高い）。

【0193】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabata EUNanバリング）：

i) Q311R及び／若しくはP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに／又は

ii) L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T及び／若しくはA330K（ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している）、並びに／又は

iii) M428L、N434A及び／若しくはY436T（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに／又は

iv) Q438R及び／若しくはS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）

の1つ以上を含む。

10

20

30

40

50

【0194】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabat EUナンバリング）：

i) Q311R及び／若しくはP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに／又は

ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T及び／若しくはA330K（ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している）、並びに／又は

iii) N434A（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに／又は

iv) Q438R及び／若しくはS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）

の1つ以上を含む。

【0195】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabat EUナンバリング）：

i) Q311R及びP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに

ii) L235W、G236N、H268D、Q295L、K326T及びA330K（ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している）、並びに

iii) N434A（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに

iv) Q438R及びS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）

の1つ以上を含む。

【0196】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabat EUナンバリング）：

i) Q311R及びP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに

ii) N434A（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに

iii) Q438R及びS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）の1つ以上を含む。

【0197】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabat EUナンバリング）：

Q311R及びP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）の1つ以上を含む。

【0198】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabat EUナンバリング）：

i) Q311R及び／若しくはP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに／又は

ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P及び／若しくはA330K（ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している）、並びに／又は

iii) M428L、N434A及び／若しくはY436T（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに／又は

iv) Q438R及び／若しくはS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適して

10

20

30

40

50

いる)

の1つ以上を含む。

【0199】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異(Kabat EUナンバリング)：

i) Q311R及びP343R(抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している)、並びに

ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P及びA330K(ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している)、並びに

iii) M428L、N434A及びY436T(より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

iv) Q438R及びS440E(リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の1つ以上を含む。

【0200】

一実施形態では、定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3は、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異(Kabat EUナンバリング)：

i) Q311R及びP343R(抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している)、並びに

ii) L234Y、P238D、T250V、V264I、T307P及びA330K(ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している)、並びに

iii) N434A及び(より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

iv) Q438R及びS440E(リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の1つ以上を含む。

【0201】

一実施形態では、そのような二重特異性抗体は、(独立して、及び上記の変異に加えて)以下の変異(Kabat EUナンバリング)

i) 重鎖定常CH3ドメインの1つにおけるS354C及びT366W

ii) 他方の重鎖定常CH3ドメインにおけるY349C、T366S、L368A、Y407V

を含む。

【0202】

一実施形態では、ヘテロ二量体化を促進するFcドメイン修飾のセクションで上述した他のヘテロ二量体化促進変異を、上記のホール修飾への例示的なノブの代わりに使用することができる。

【0203】

本発明の特定の実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに(特異的に)結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の(異なる)エピトープに(特異的に)結合する第2の(異なる)抗原結合部位とを含む(単離された)二重特異性抗体であって、配列番号配列番号175の配列と少なくとも98%又は99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号176の配列と少なくとも98%又は99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

【0204】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに(特異的に)結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の(異なる)エピトープに(特異的に)結合する第2の(異なる)抗原結合部位とを含む(単離された)二重特異性抗体であって、配列番号175の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号176のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

10

20

30

40

50

【0205】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含むan（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号177の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号178の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

【0206】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含む（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号177の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号178のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

10

【0207】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含むan（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号179の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号180の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

20

【0208】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含む（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号179の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号180のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

【0209】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含むan（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号181の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号182の配列と少なくとも98%又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

30

【0210】

本発明の具体的な一実施形態は、a) ヒトCC_L2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、b) ヒトCC_L2上の第2の（異なる）エピトープに（特異的に）結合する第2の（異なる）抗原結合部位とを含む（単離された）二重特異性抗体であって、配列番号181の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号182のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。

【0211】

40

組換え方法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載される組換え法及び組成物を使用して生成されてもよい。一実施形態では、本明細書に記載の抗CC_L2抗体（二重特異性及び単一特異性のいずれか）をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、単一特異性抗体又は二重特異性抗体の1つ又は全てのVLを含むアミノ酸配列及び／又は1つ又は全てのVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードし得る。更なる実施形態では、そのような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。更なる実施形態では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような一実施形態では、宿主細胞は、（例えば、形質転換された）以下を含む：（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列と、抗体のVHを含むアミノ酸配列とを

50

コードする核酸を含むベクター、又は（２）抗体のV Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第１のベクター、及び抗体のV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第２のベクター。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HEK 293細胞又はリンパ球細胞（例えば、Y 0、NS 0、Sp 20細胞）である。一実施形態では、抗CC L 2抗体を作製する方法が提供され、本方法は、のように、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養すること、及び任意に宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から抗体を回収することを含む。

【0212】

抗CC L 2細胞の組換え産生のために、そのような核酸は、従来の手順（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）を使用して容易に単離され、配列決定され得る。

【0213】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現のための適切な宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされていない場合には、細菌中で産生されてもよい。細菌中の抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号及び米国特許第5,840,523号を参照されたい。（大腸菌（*E. coli*）における抗体断片の発現を記載するCharlton, K. A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B. K. C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照）。発現後、本発明の抗体は、細菌細胞ペーストから可溶性画分として単離され、更に精製することができる。

【0214】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現宿主としては、原核生物に加えて、糸状菌や酵母などの真核微生物が適しており、その中にはグリコシル化経路が「ヒト化」されており、結果として部分的又は完全にヒトのグリコシル化パターンを有する抗体を産生する真菌株や酵母株も含まれる。Gerngross, T. U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414、及びLi, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215を参照されたい。

【0215】

また、グリコシル化抗体を発現させるのに適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株が同定されており、これを昆虫細胞と組み合わせて使用され得て、特にスポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションに使用され得る。

【0216】

植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照。

【0217】

脊椎動物細胞も、宿主として使用されてもよい。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV 40によって形質転換されたサル腎臓CV 1株（COS-7）；ヒト胚腎臓株（例えば、Graham, F. L. et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59-74に記載されるような、293又は293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J. P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252に記載されるようなTM 4細胞）；サル腎臓細胞（CV 1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌腫細胞（

10

20

30

40

50

HELA) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A) ; ヒト肺細胞 (W138) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2) ; マウス乳腺腫瘍 (MMT060562) ; TRI細胞 (例えば、Mather, J. P. et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載される) ; MRC5細胞 ; 及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR⁻CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220) ; 並びに骨髓腫細胞株、例えば、Y0、NS0及びSp2/0が含まれる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞の総説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A. M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B. K. C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

10

【0218】

別の態様では、本発明は、部分的には、本明細書中に記載される修飾された単一特異性抗体が改善されたpH依存性結合特性を示し、したがって、本発明の二重特異性抗体の作製に特に有用であるという発見に基づく。

【0219】

診断及び検出のための方法及び組成物

特定の実施形態では、本明細書に提供される二重特異性抗CCl2抗体はいずれも、生物学的試料中のCCl2の存在の検出に有用である。本明細書で使用される場合、「検出する」という用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。特定の実施形態では、生物学的試料は、免疫細胞、又はT細胞浸潤物及び又は腫瘍細胞等の細胞若しくは組織を含む。

20

【0220】

一実施形態では、診断及び検出の方法に使用するための二重特異性抗CCl2抗体が提供される。更なる態様では、生物学的試料中のCCl2の存在を検出する方法が提供される。特定の実施形態では、方法は、生物学的試料を、CCl2に対する二重特異性抗CCl2抗体の結合に許容される条件下で、本明細書に記載されるような二重特異性抗CCl2抗体と接触させることと、二重特異性抗CCl2抗体とCCl2との間で複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む。そのような方法は、in vitro又はin vivoの方法であり得る。一実施形態では、二重特異性抗CCl2抗体を使用して、二重特異性抗CCl2抗体による治療に適格な対象を選択する (例えば、CCl2は患者を選択するためのバイオマーカーである) 。

30

【0221】

特定の実施形態では、標識化二重特異性抗CCl2抗体が提供される。標識には、直接検出される標識又は部分 (蛍光、発色団、高電子密度、化学発光、及び放射性標識など) 、並びに間接的に検出される、例えば、酵素反応又は分子相互作用による酵素又はリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、放射性同位元素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ (米国特許第4, 737, 456号) 、ルシフェリン、2, 3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼやキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼを、HRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定したフリーラジカルなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合したものなどが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0222】

医薬製剤

50

本明細書に記載される二重特異性抗 C C L 2 抗体の医薬製剤は、所望の程度の純度を有するかかる抗体と、1つ以上の任意の薬学的に許容され得る担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)) とを混合することによって、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製される。薬学的に許容され得る担体は、一般的に、採用される用量及び濃度において受領者に無毒であり、以下を含むが、これらに限定されるものではない：リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリ（ビニルピロリドン）等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸。単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤。ここにおける例示的な薬学的に許容され得る担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の介在性薬物分散剤を更に含む。特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、rhuPH20を含め、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載される。一態様では、sHASEGPを、1つ以上の更なるグリコサミノグリカナーゼ（例えば、コンドロイチナーゼ）と組み合わせる。

10

20

【0223】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及び国際公開第2006/044908号に記載されるものが挙げられ、後者の製剤は、酢酸ヒスチジン緩衝液を含む。

30

【0224】

本明細書の製剤はまた、処置される特定の適応症に必要な応じて2以上の活性成分を含んでもよく、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含んでもよい。例えば、更に提供することが望ましい場合がある。そのような有効成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせると好適に存在する。

【0225】

有効成分は、例えば、コアセルベーション技法によって、又は界面重合、例えば、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおいて、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルによって調製されたマイクロカプセル内に封入することができる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980) に開示されている。

40

【0226】

徐放性調製物を調製してもよい。持続放出調製物の好適な例としては、本抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、又はマイクロカプセルの形態である。

【0227】

in vivo投与に使用される製剤は一般に、滅菌される。無菌は、例えば無菌濾過膜による濾過によって容易に達成され得る。

50

【0228】

治療方法及び組成物

本明細書に提供される二重特異性抗 C C L 2 抗体のいずれも、治療方法において使用することができる。

【0229】

一態様では、医薬品としての使用のための二重特異性抗 C C L 2 抗体が提供される。更なる態様では、二重特異性抗 C C L 2 抗体及びがんの処置における使用が提供される。特定の実施形態では、処置方法における使用のための二重特異性抗 C C L 2 抗体が提供される。特定の実施形態では、本発明は、がんを有する個体を処置する方法に使用するための二重特異性抗 C C L 2 抗体であって、有効量の二重特異性抗 C C L 2 抗体を個体に投与することを含む二重特異性抗 C C L 2 抗体を提供する。

10

【0230】

更なる実施形態では、本発明は、二重特異性抗 C C L 2 抗体が腫瘍における免疫抑制を阻害し、したがって、抗 P D 1、抗 P D L - 1 アンタゴニストなどのような免疫刺激遺伝子に対して腫瘍感受性を生じさせることを提供する。

【0231】

したがって、その一態様は、本明細書に記載の二重特異性抗 C C L 2 抗体と、抗 P D 1、抗 P D L - 1 アンタゴニストなどのがん免疫療法との組み合わせである。

【0232】

本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、例えば、肺がん、非小細胞肺 (N S C L) がん、肺細気管支肺胞がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部若しくは頭部のがん、皮膚若しくは眼内の黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん (s t o m a c h c a n c e r)、胃がん (g a s t r i c c a n c e r)、結腸がん、乳がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰の癌腫、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、前立腺がん、膀胱のがん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞癌腫、腎盂の癌腫、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系 (C N S) の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、多形膠芽細胞腫、星細胞腫、神経鞘腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌腫、下垂体腺腫、リンパ腫、リンパ球性白血病 (上述のがんのいずれかの難治性態様を含む)、又は上述のがんの 1 つ以上の組み合わせであってもよい。

20

30

【0233】

上記の実施形態のいずれかによる「個体」は、好ましくはヒトである。更なる態様では、本発明は、医薬品の製造及び調製における二重特異性抗 C C L 2 抗体の使用を提供する。一実施形態では、医薬品は、がんの処置のためのものである。更なる実施形態では、医薬品は、がんを処置する方法であって、がんを有する個体に有効量の医薬品を投与することを含む方法における使用のためのものである。更なる実施形態では、医薬品は、がん細胞の細胞媒介性溶解を誘導するためのものである。更なる実施形態では、医薬品は、がん罹患している個体においてがん細胞の細胞媒介性溶解を誘導する方法において使用するためのものであり、がん細胞におけるアポトーシスを誘導するために／又はがん細胞増殖を阻害するために有効な量の医薬品を個体に投与することを含む。上記の実施形態のいずれかに従った「個体」は、ヒトであってもよい。

40

【0234】

更なる態様では、本発明は、がんを処置するための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、がんを有する個体に有効量の二重特異性抗 C C L 2 抗体を投与することを含む。上記の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0235】

更なる態様では、本発明は、がん罹患している個体においてがん細胞の細胞媒介性溶解を誘導する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、がん罹患している個体においてがん細胞の細胞媒介性溶解を誘導するために有効量の二重特異性抗 C C L 2 抗体を個

50

体に投与することを含む。一実施形態では、「個体」は、ヒトである。

【0236】

本発明の別の態様では、炎症性疾患及び自己免疫疾患の処置に使用するための二重特異性抗CC₂抗体が提供される。特定の実施形態では、本発明は、炎症性疾患及び自己免疫疾患を有する個体を処置する方法に使用するための二重特異性抗CC₂抗体であって、有効量の二重特異性抗CC₂抗体を個体に投与することを含む二重特異性抗CC₂抗体を提供する。

【0237】

いくつかの実施形態では、炎症性疾患及び自己免疫疾患は、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、顆粒球性（好中球性及び好酸球性）障害、単球性障害、若しくはリンパ球性障害、及び正常若しくは異常な組織常在細胞（例えば、マスト細胞、マクロファージ、及びリンパ球など）若しくは間質細胞（例えば、線維芽細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞、上皮及び内皮）の数若しくは分布の増加に関連する障害である。いくつかの実施形態では、障害は、肺障害である。いくつかの実施形態では、肺障害は、顆粒球性（好酸球性及び／又は好中球性）肺炎症、感染誘発性肺症状（ウイルス（例えば、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルス）、細菌又は真菌（例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*））トリガーに関連するものを含む。いくつかの実施形態では、障害は、アレルゲン誘発性肺症状、毒性環境汚染物質誘発性肺症状（例えば、石綿肺、珪肺及びベリリウム症）、胃吸引誘発性肺症状、及び免疫調節不全若しくは嚢胞性線維症などの遺伝的素因を有する炎症性症状に関連する。いくつかの実施形態では、障害は、物理的外傷誘発性肺症状（例えば、人工呼吸器損傷）、気腫、タバコ誘発性（*cigarette-induced*）気腫、気管支炎、サルコイドーシス、組織球症、リンパ脈管筋腫症、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症候群、慢性肺疾患、気管支肺異形成、肺炎（例えば、市中肺炎、院内肺炎、人工呼吸器関連肺炎、ウイルス性肺炎、細菌性肺炎、及び重症肺炎）、気道増悪、及び急性呼吸窮迫症候群（ARDS）である。いくつかの実施形態では、炎症性肺障害は、COPDである。

【0238】

いくつかの実施形態では、炎症性肺障害は喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、生命を脅かし得る症状を悪化させる（増悪又は再燃）急性事象を伴う、持続性の慢性重度喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、アトピー性（アレルギー性としても知られる）喘息、非アレルギー性喘息（例えば、しばしば、呼吸器ウイルス（例えば、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、及び呼吸系発疹ウイルス）又は吸入した刺激物質（大気汚染物質、スモッグ、ディーゼル粒子、揮発性化学物質及びガス、屋内若しくは屋外又は更には冷たい乾燥した空気による）での感染によって引き起こされる。

【0239】

いくつかの実施形態では、喘息は、「煙」（典型的には、紙巻タバコ、葉巻、パイプ）、吸入、若しくは喫煙（タバコ、マリファナ、又は他のそのような物質）への急性又は慢性の一次又は二次曝露による間欠的又は運動誘発性の喘息、又はアスピリン若しくは関連NSAIDの新しい摂取によって引き起こされる喘息である。いくつかの実施形態では、喘息は、軽度の喘息若しくはコルチコステロイド未治療喘息、新たに診断された未処置喘息であるか、又は以前には、症状（咳、喘鳴、呼吸困難／息切れ、又は胸痛）を制御するための吸入局所若しくは全身ステロイドの慢性使用を必要としていない。いくつかの実施形態では、喘息は、慢性のコルチコステロイド抵抗性喘息、コルチコステロイド不応性喘息、コルチコステロイドで制御不能な喘息、又は他の慢性喘息制御薬で制御不能な喘息である。いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、好中球性障害及び好酸球性障害は、肺線維症である。いくつかの実施形態では、肺線維症は特発性肺線維症（IPF）である。いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、顆粒球性（好中球性又は好酸球性）障害、単球性障害又はリンパ球性障害は、食道炎、アレルギー性鼻炎、非アレルギー性鼻炎、ポリープを伴う鼻副鼻腔炎、鼻ポリープ、気

管支炎、慢性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、気道炎症、アレルギー性鼻炎、気管支拡張症及び／又は慢性気管支炎である。

【0240】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、顆粒球性（好中球性及び好酸球性）障害、単球性障害及びリンパ球性障害は、関節炎である。いくつかの実施形態では、関節炎は関節リウマチである。いくつかの実施形態では、関節炎は、変形性関節症、関節リウマチ、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、早期関節炎、多関節性関節リウマチ、全身型関節リウマチ、腸疾患性関節炎、反応性関節炎、乾癬性関節炎、及び／又は傷害の結果としての関節炎である。

【0241】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、顆粒球性（好中球性及び好酸球性）障害、単球性障害、及びリンパ球性障害は、胃腸炎症症状である。いくつかの実施形態では、胃腸炎症症状は、IBD（炎症性腸疾患）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、大腸炎（例えば、環境的傷害（例えば、化学療法、放射線療法などの治療レジメンによって引き起こされるか、又はそれに関連する）によって引き起こされる大腸炎）、感染性大腸炎、虚血性大腸炎、コラーゲン性又はリンパ球性大腸炎、壊死性腸炎、慢性肉芽腫性疾患又はセリアック病などの症状における大腸炎、食物アレルギー、胃炎、胃腸炎、感染性胃炎又は小腸結腸炎（例えば、ピロリ菌（*Helicobacter pylori*）感染慢性活動性胃炎）、及び感染因子によって引き起こされる他の形態の胃腸炎症、又は不確定大腸炎である。

【0242】

いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、線維性障害、顆粒球性（好中球性又は好酸球性）障害、単球性障害、若しくはリンパ球性障害、又は正常若しくは異常な組織常在細胞（例えば、マスト細胞、マクロファージ、又はリンパ球など）若しくは間質細胞（例えば、線維芽細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞、上皮又は内皮）の数若しくは分布の増加に関連する障害は、狼瘡若しくは全身性エリテマトーデス（SLE）、又は狼瘡の1つ以上の器官特異的症状発現（例えば、腎臓に影響を及ぼすループス腎炎（LN）、又は血液及び／若しくはリンパ系器官（リンパ節、脾臓、胸腺、及び関連するリンパ管）、及び／又は関節及び／又は他の器官に影響を及ぼすが必ずしも腎臓に影響を及ぼさない腎外ループス（ERL））である。いくつかの実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害又は線維性障害は、敗血症及び／又は外傷、HIV感染症、又は特発性（原因不明）、例えば、ANCA関連白斑症（AAV）、多発血管炎性肉芽腫症（以前はウェゲナー肉芽腫症として知られていた）、ベーチェット病、心血管疾患、好酸球性気管支炎、ライター症候群、SEA症候群（血清反応陰性、腱附着部症、関節症症候群）、強直性脊椎炎、皮膚筋炎、強皮症、例えば、全身性硬化症とも呼ばれる全身性強皮症、血管炎（例えば、側頭動脈炎、頭蓋動脈炎又はホートン病とも呼ばれる巨細胞性動脈炎（GCA））、筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、サルコイドーシス、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、例えば、尋常性天疱瘡、アテローム性動脈硬化症、狼瘡、スチル病、重症筋無力症、セリアック病、再発寛解型（RRMS）又は原発性進行型（PPMS）又は続発性進行型（SPMS）の多発性硬化症（MS）、ギラン・バレー病、I型糖尿病（T1DM）又はインスリン依存性（IDDM）若しくは若年発症DM型、甲状腺炎（例えば、グレーブス病）、セリアック病、チャグ・シュトラウス症候群、筋痛症候群、好酸球増加症候群、反復性血管性浮腫を含む浮腫性反応、蠕虫感染症、オンコセルカ皮膚炎（*onchocercal dermatitis*）、好酸球性食道炎、好酸球性腸炎、好酸球性大腸炎、閉塞性睡眠時無呼吸、心内膜線維症、アジソン病、レイノー病又は現象、自己免疫性肝炎、移植片対宿主病（GVHD）又は臓器移植拒絶に関する。

【0243】

更なる態様では、本発明は、例えば、上記治療方法のいずれかにおける使用のための、

10

20

30

40

50

本明細書で提供される二重特異性抗 C C L 2 抗体のいずれかを含む医薬製剤を提供する。一実施形態では、医薬製剤は、本明細書に提供される二重特異性抗 C C L 2 抗体のうちのいずれか及び薬学的に許容され得る担体を含む。

【0244】

本発明の抗体（及び任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、並びに局所的な処置に望まれる場合、病変内投与を含む、任意の適切な手段によって投与することができる。非経口輸液には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、又は皮下投与が含まれる。投薬は、任意の適切な経路によるもの、例えば、一部には、投与が一時的であるか慢性的であるかに依存して、注射によって、例えば、静脈又は皮下への注射によるものであってもよい。単回又は様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルス輸注を含むが、これらに限定されない様々な投薬スケジュールが、本明細書では企図される。

10

【0245】

本発明の抗体は、良好な医療行為と一致した方法で製剤化され、投与され、投与されるであろう。これに関連して考慮すべき要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に既知である他の要因が挙げられる。抗体は、必ずしもそうである必要はないが、任意に、問題の障害を予防又は処置するために現在使用されている1つ以上の薬剤と共に製剤化される。有効量のそのような他の作用物質は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類、及び上述の他の要因に依存する。これらは、一般に、ここに記載されている投与量と同じ投与量で、又はここに記載されている投与量の約1～99%、又は経験的／臨床的に適切であると判断される任意の投与量で、及び任意の投与経路で使用される。

20

【0246】

疾患の予防又は処置について、本発明の抗体の適切な投薬量は（単独で、又は1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）、処置される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的又は治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴及び抗体への応答、並びに主治医の裁量に依存するだろう。本発明の抗体は、好適には、患者に一度に又は一連の処置にわたって投与される。疾患の種類及び重篤度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば $0.5 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ）の抗体を、例えば、1回以上の別個の投与によるか、又は連続的な注入によるかにかかわらず、患者に投与するための初期の候補投薬量とすることができる。典型的な1日投薬量は、上述の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であってもよい。数日以上にわたる反復投与に関しては、病状に応じて、処置は一般に疾患症状の望まれる抑制が起こるまで継続されるものとする。抗体の1つの例示的な投薬量は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲である。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、又は $10 \text{mg} / \text{kg}$ （又はこれらの任意の組み合わせ）のうちの1つ以上の用量が、患者に投与され得る。そのような用量は、間欠的に、例えば、毎週又は3週間に1回（例えば、患者が約2～約20回、又は例えば、約6回用量の抗体を受けるように）投与され得る。最初の多めのローディング用量、それに続く1回以上の量の少ない用量を投与してよい。例示的な投薬レジメンは、約 $4 \text{mg} / \text{kg}$ の初期ローディング用量、続いて約 $2 \text{mg} / \text{kg}$ の抗体の毎週の維持用量を投与することを含む。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であってもよい。この治療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

30

40

【0247】

II. 製造品

本発明の別の態様では、上述の障害の処置、予防及び／又は診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上の又は容器に関連付けられたラベル又は添付文書を含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、静注溶液袋等が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は

50

、症状を処置、予防、及び／又は診断するのに有効な別の組成物と単独で又は組み合わせて使用される組成物を保持し、無菌アクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有するバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択される症状を処置するために使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）組成物を含む第1の容器を含み、この組成物は本発明の抗体を含み、（b）組成物を含む第2の容器を含み、この組成物は細胞疾患性又は他の治療剤を更に含む。製造品は、本発明のこの実施形態では、その組成物を特定の症状を処置するために使用可能であることを示すパッケージ添付文書を更に備えていてもよい。これに代えて、又はこれに加えて、製造品は、薬学的に許容され得る緩衝液、例えば、注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝化生理食塩水、R i n g e r 溶液及びデキストロース溶液を含む第2の（又は第3の）容器を更に備えていてもよい。製造品は、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針及びシリンジを含む、商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

10

【0248】

以下に、本発明の特定の実施形態を列挙する。

1. ヒトCCL2上の第1のエピトープに（特異的に）結合する第1の抗原結合部位と、ヒトCCL2上の第2の異なるエピトープに（特異的に）結合する第2の異なる抗原結合部位とを含む、二重特異性抗体であって、

20

前記二重特異性抗体が、

a）（N末端からC末端方向に）VH1－CH1－L1－ヒンジ－CH2－CH3－L2－VL1－CLを含む、第1のポリペプチド鎖であって、

VH1は、第1の重鎖可変ドメインであり、VL1は、第1の可変軽鎖ドメインであり（両方が第1の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

30

L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第1のポリペプチド鎖と、

b）（N末端からC末端方向に）VH2－CH1－L1－ヒンジ－CH2－CH3－L2－VL2－CLを含む、第2のポリペプチド鎖であって、

VH2は、第2の重鎖可変ドメインであり、VL2は、第2の可変軽鎖ドメインであり（両方が第2の抗原結合部位を共に形成する（共に会合して形成する））、

CH1は、定常重鎖ドメイン1であり、

L1は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では5～10アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

40

ヒンジは、重鎖ヒンジ領域であり、

CH2は、定常重鎖ドメイン2であり、

CH3は、定常重鎖ドメイン3であり、

L2は、5～15アミノ酸の長さ（一実施形態では10～15アミノ酸の長さ）を有するポリペプチドリinkerであり、

CLは、定常軽鎖ドメインである、第2のポリペプチド鎖とを含み、

A) i) 前記VH1ドメインが、配列番号71のアミノ酸配列を含み、

前記VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記VH2ドメインが、配列番号90のアミノ酸配列を含み、

50

K) i) 前記VH1ドメインが、配列番号72のアミノ酸配列を含み、
前記VL1ドメインが、配列番号75のアミノ酸配列を含み、かつ
ii) 前記VH2ドメインが、配列番号91のアミノ酸配列を含み、

50

前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、
又は

L) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

M) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含むか、

又は

N) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

O) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含むか、

又は

P) i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、

二重特異性抗体。

【0249】

2. i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 に記載の二重

特異性抗体。

【0250】

3. i) 前記 V H 1 ドメインが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 1 ドメインが、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、かつ

i i) 前記 V H 2 ドメインが、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含み、
前記 V L 2 ドメインが、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 に記載の二重

特異性抗体。

【0251】

4. L 1 が、9 ~ 11 アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーであり、

L 2 が、9 ~ 11 アミノ酸の長さを有するポリペプチドリンカーである、実施形態 1 ~
3 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0252】

5. L 1 及び L 2 が、G S G G S G G S G G (配列番号 183)、G S G G G S G G G
G (配列番号 184)、G S G G G G S G G G (配列番号 185)、G G S G G S G G G
G (配列番号 186)、G G S G G G S G G G (配列番号 187)、G G S G G G G S G
G (配列番号 188)、G G G S G G S G G G (配列番号 189)、G G G S G G G S G
G (配列番号 190)、及び G G G G S G G S G G (配列番号 191) の群から選択され
るポリペプチドリンカーである、実施形態 4 に記載の二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

【0253】

6. L1が、GGSGGGSGG（配列番号188）のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーであり、

L2が、GGSGGGSGG（配列番号188）のアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーである、実施形態4に記載の二重特異性抗体。

【0254】

7. 前記定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3が、ヒトIgGアイソタイプ、好ましくはヒトIgG1アイソタイプのものである、実施形態1～6のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0255】

8. 前記二重特異性抗体が、

i) *in vitro* でCCL2のその受容体CCR2への結合を遮断し（レポーターアッセイ、 $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$ ）、かつ／又は

ii) 骨髄系細胞のCCL2媒介走化性を*in vitro*で阻害し（ $IC_{50} = 1.5 \text{ nM}$ ）、かつ／又は

iii) カニクイザル（*cyno*）及びヒトCCL2に対して交差反応性である、実施形態1～7のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0256】

9. 前記二重特異性抗体が、CCL2への結合と比較して、他のCCLホモログに対して交差反応性でない（他のCCLホモログ（CCL8、CCL7及びCCL13の群から選択される）に対して100倍低い結合を示す）、実施形態1～8のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0257】

10. イオン依存的様式でヒトCCL2上の第1及び第2のエピトープに結合する、実施形態1～9のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0258】

11. 前記二重特異性抗体が、pH依存的様式でヒトCCL2に結合し、前記第1の抗原結合部位及び前記第2の抗原結合部位の両方が、酸性pHよりも中性pHでより高い親和性でCCL2に結合する、実施形態1～9のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0259】

12. 前記二重特異性抗体が、pH7.4において、pH5.8よりも10倍高い親和性でヒトCCL2に結合する、実施形態1～10のいずれか1つに記載の二重特異性抗体。

【0260】

13. 前記定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3が、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabata EUNanバリング）：

i) Q311R及び／若しくはP343R（抗原の取り込みを増強するためにpIを増加させるのに適している）、並びに／又は

ii) L234Y、L235W、G236N、P238D、T250V、V264I、H268D、Q295L、T307P、K326T及び／若しくはA330K（ヒトFcγRIIbに対する親和性の増加及び他のヒトFcγRに対する親和性の減少に適している）、並びに／又は

iii) M428L、N434A及び／若しくはY436T（より長い血漿半減期のためにFcRnに対する親和性を増加させるのに適している）、並びに／又は

iv) Q438R及び／若しくはS440E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）

の1つ以上を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0261】

14. 前記定常重鎖ドメインCH1、ヒンジ、CH2及びCH3が、ヒトIgG1アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異（Kabata EUNanバリング）：

10

20

30

40

50

i) Q 3 1 1 R 及び／若しくは P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに／又は

ii) L 2 3 5 W、G 2 3 6 N、H 2 6 8 D、Q 2 9 5 L、K 3 2 6 T 及び／若しくは A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに／又は

iii) N 4 3 4 A (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに／又は

iv) Q 4 3 8 R 及び／若しくは S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【0262】

15. 前記定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 が、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング) :

i) Q 3 1 1 R 及び P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに

ii) L 2 3 5 W、G 2 3 6 N、H 2 6 8 D、Q 2 9 5 L、K 3 2 6 T 及び A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに

iii) N 4 3 4 A (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

20

iv) Q 4 3 8 R 及び S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0263】

16. 前記定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 が、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング) :

i) Q 3 1 1 R 及び／若しくは P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに／又は

ii) L 2 3 4 Y、P 2 3 8 D、T 2 5 0 V、V 2 6 4 I、T 3 0 7 V 及び／若しくは A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに／又は

30

iii) M 4 2 8 L、N 4 3 4 A 及び／若しくは Y 4 3 6 T (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに／又は

iv) Q 4 3 8 R 及び／若しくは S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0264】

17. 前記定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 が、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング) :

i) Q 3 1 1 R 及び P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに

ii) L 2 3 4 Y、P 2 3 8 D、T 2 5 0 V、V 2 6 4 I、T 3 0 7 V 及び A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに

40

iii) M 4 2 8 L、N 4 3 4 A 及び Y 4 3 6 T (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

iv) Q 4 3 8 R 及び S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している)

の 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0265】

18. 前記定常重鎖ドメイン C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 が、ヒト I g G 1 アイソタイプのものであり、かつ、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング) :

50

i) Q 3 1 1 R 及び P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)、並びに

i i) L 2 3 4 Y、P 2 3 8 D、T 2 5 0 V、V 2 6 4 I、T 3 0 7 V 及び A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)、並びに

i i i) N 4 3 4 A (より長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)、並びに

i v) Q 4 3 8 R 及び S 4 4 0 E (リウマチ因子結合を抑制するのに適している) の 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0266】

19. 前記定常重鎖ドメイン C H 3 が、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング)

i) 重鎖定常ドメイン C H 3 の 1 つにおける S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W ; 並びに

i i) 他方の重鎖定常ドメイン C H 3 における Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V

を含む、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0267】

20. 前記定常重鎖ドメイン C H 3 が、以下の変異 (K a b a t E U ナンバリング)

K 4 4 7 G

を含む、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0268】

21. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 5 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 7 6 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0269】

22. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 5 の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 7 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0270】

23. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 7 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 7 8 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 7、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0271】

24. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 7 の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0272】

25. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 9 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 8 0 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0273】

26. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 9 の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【0274】

27. 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 7 9 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 8 0 の配列と少なくとも 9 8 % 又は 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ~ 2 及び 4

10

20

30

40

50

～ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【 0 2 7 5 】

2 8 . 前記二重特異性抗体が、配列番号 1 8 1 の配列のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、配列番号 1 8 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む、実施形態 1 ～ 2 及び 4 ～ 7 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【 0 2 7 6 】

2 9 . 実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードする、単離された核酸。

【 0 2 7 7 】

3 0 . 実施形態 2 9 の核酸を含む、宿主細胞。

【 0 2 7 8 】

3 1 . 抗体を産生する方法であって、前記抗体が産生されるように、実施形態 3 0 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。

【 0 2 7 9 】

3 2 . 抗体を宿主細胞から回収することを更に含む、実施形態 3 2 に記載の方法。

【 0 2 8 0 】

3 3 . 実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬製剤。

【 0 2 8 1 】

3 4 . 医薬品としての使用のための、実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【 0 2 8 2 】

3 5 . がんの処置における使用のための、実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【 0 2 8 3 】

3 6 . 炎症性疾患及び自己免疫疾患の処置における使用のための、実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体。

【 0 2 8 4 】

3 7 . 前記医薬品の製造における実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体の使用。

【 0 2 8 5 】

3 8 . 前記医薬品ががんの処置用である、実施形態 3 7 に記載の使用。

【 0 2 8 6 】

3 9 . 前記医薬品が、炎症性疾患又は自己免疫疾患の処置のためのものである、実施形態 3 7 に記載の使用。

【 0 2 8 7 】

4 0 . がんを有する個体を処置する方法であって、前記個体に有効量の実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体を投与することを含む、がんを有する個体を処置する方法。

【 0 2 8 8 】

4 1 . 炎症性疾患又は自己免疫疾患を有する個体を処置する方法であって、前記個体に有効量の実施形態 1 ～ 2 8 のいずれか 1 つに記載の二重特異性抗体を投与することを含む、炎症性疾患又は自己免疫疾患を有する個体を処置する方法。

【 0 2 8 9 】

以下の実施例及び図は、本発明の理解を助けるために提供されており、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示されている。本発明の思想から逸脱することなく、定められた手順に変更を加えることができると理解される。

【 0 2 9 0 】

アミノ酸配列の説明

異なるエピトープに結合する抗 C C L 2 抗原結合部分（可変領域及び超可変領域（C D R））：

10

20

30

40

50

【表 1】

配列 番号	33	重鎖 CDR-H1	CNT O888	SYGIS
配列 番号	34	重鎖 CDR-H2	CNT O888	GIPIFGTANYAQKFQG
配列 番号	35	重鎖 CDR-H3	CNT O888	YDGIYGELDF
配列 番号	36	軽鎖 CDR-L1	CNT O888	RASQSVSDAYLA
配列 番号	37	軽鎖 CDR-L2	CNT O888	DASSRAT
配列 番号	38	軽鎖 CDR-L3	CNT O888	HQYIQLHSFT
配列 番号	39	重鎖可変 ドメインVH	CNT O888	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG GTFSSYGISWVRQAPGGGLEWMGGIPI FGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM

				ELSSLRSED TAVYYCARYDGIYGELDF WGQGT LVT VSS
配列 番号	40	軽鎖可変 ドメイン V L	CNT O888	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSDAYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASS RATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCHQYIQLHSFTFGQGTKVEIK
配列 番号	41	重鎖 C D R - H 1	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	DTYMH
配列 番号	42	重鎖 C D R - H 2	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	RIDPANGNTKFDPKFQG
配列 番号	43	重鎖 C D R - H 3	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	GVFGFFDY
配列 番号	44	軽鎖 C D R - L 1	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	KATEDIYNRLA
配列 番号	45	軽鎖 C D R - L 2	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	GATSLET
配列 番号	46	軽鎖 C D R - L 3	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	QQFWSAPYT
配列 番号	47	重鎖可変 ドメイン V H	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG LTISDTYMHVVRQAPGQGLEWMGRID PANGNTKFDPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARGVFGFFDY WGQGT T V T V S S
配列 番号	48	軽鎖可変 ドメイン V L	ヒト化 1 1 K 2 (= 1 1 K 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKATED IYNRLAWYQQKPGKAPKLLISGATSLE TGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDF ATYYCQQFWSAPYTFGGGTKVEIK

C D R 改変抗 C C L 2 抗原結合部分（可変領域及び超可変領域（C D R））：
改変 C N T O 8 8 8

10

20

30

40

50

【表 2】

配列 番号	57	重鎖 CDR-H1	変異型 バリエーション CNT0888	XがI及びTであるSHYGXS
配列 番号	58	重鎖 CDR-H2	変異型 バリエーション CNT0888	GX ¹ IX ² IFX ³ TANYAQKFQG (式中、X ¹ はV、I及びHであり、X ² はP及びHであり、X ³ はH及びGである)
配列 番号	59	重鎖 CDR-H3	変異型 バリエーション CNT0888	YDAHYGELDF
配列 番号	60	軽鎖 CDR-L1	変異型 バリエーション CNT0888	RASQHVSDAYLA
配列 番号	61	軽鎖 CDR-L2	変異型 バリエーション CNT0888	DASDRAE
配列 番号	62	軽鎖 CDR-L3	変異型 バリエーション CNT0888	HQYIHLHSFT
配列 番号	63	重鎖 FR-H1	変異型 バリエーション CNT0888	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTF
配列 番号	64	重鎖 FR-H2	変異型 バリエーション CNT0888	WVRQAPGQGLEWMG
配列 番号	65	重鎖 FR-H3	変異型 バリエーション CNT0888	RVTITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCAR
配列 番号	66	重鎖 FR-H4	変異型 バリエーション CNT0888	WGQGTLVTVSS
配列 番号	67	軽鎖 FR-L1	変異型 バリエーション CNT0888	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
配列 番号	68	軽鎖 FR-L2	変異型 バリエーション CNT0888	WYQQKPGQAPRLLIY
配列 番号	69	軽鎖 FR-L3	変異型 バリエーション CNT0888	GVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPED FAVYYC
配列 番号	70	軽鎖 FR-L4	変異型 バリエーション CNT0888	GQGTVKVEIK

10

20

30

40

50

配列 番号	71	重鎖可変 ドメインVH	変異型 バリエント CNT0888 H0695	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSHYGISWVRQAPGQGLEW MGGVIPIFHTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDAHYGELDFWGGQGLTLVTVSS
配列 番号	72	重鎖可変 ドメインVH	変異型 バリエント CNT0888 H0625	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSHYGISWVRQAPGQGLEW MGGIIHIFHTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDAHYGELDFWGGQGLTLVTVSS
配列 番号	73	重鎖可変 ドメインVH	変異型 バリエント CNT0888 H0634	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSHYGTSWVRQAPGQGLEW MGGIIHIFGTANYAQKFQGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDAHYGELDFWGGQGLTLVTVSS
配列 番号	74	重鎖可変 ドメインVH	変異型 バリエント CNT0888 H0635	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSHYGISWVRQAPGQGLEW MGGHIIHIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARYDAHYGELDFWGGQGLTLVTVS S
配列 番号	75	軽鎖可変 ドメインVL	変異型 バリエント CNT0888 L0616	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QHVSDAYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASDRAEGVPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCHQYIHLHSFT FGQGTKVEIK

改 変 ヒ ト 化 1 1 K 2

10

20

30

40

50

【表 3】

配列 番号	76	重鎖 CDR-H1	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	HTYMH
配列 番号	77	重鎖 CDR-H2	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	RIDPXNHNTKFDPKFQG (式中、X は、D又はEである)
配列 番号	78	重鎖 CDR-H3	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	GVFGFFXH (式中、Xは、D及びEであ る)
配列 番号	79	軽鎖 CDR-L1	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	KAX ¹ EDIYNRX ² A (式中、X ¹ は、F及 びTであり、X ² は、R及びLである)

10

20

30

40

50

配列 番号	80	軽鎖 CDR-L 2	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	GATSLEH
配列 番号	81	軽鎖 CDR-L 3	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	QQFXSAPYT (式中、Xは、W及びRであ る)
配列 番号	82	重鎖 FR-H 1	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGLTIS
配列 番号	83	重鎖 FR-H 2	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	WVRQAPGQGLEWMG
配列 番号	84	重鎖 FR-H 3	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
配列 番号	85	重鎖 FR-H 4	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	WGQGTTVTVSS
配列 番号	86	軽鎖 FR-L 1	変異型バリア ント11 K 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
配列 番号	87	軽鎖 FR-L 2	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	WYQQKPKGKAPKLLIH
配列 番号	88	軽鎖 FR-L 3	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYYC
配列 番号	89	軽鎖 FR-L 4	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2	FGGGTKVEIK
配列 番号	90	重鎖可変 ドメインVH	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2 H1503	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGLTISHTYMHWRQAPGQGLEW MGRIDPDNHNTKFDPKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGVFGFFDHWGQGTTVTVSS
配列 番号	91	重鎖可変 ドメインVH	変異型バリア ントヒト化11 K 2 H1510	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGLTISHTYMHWRQAPGQGLEW MGRIDPDNHNTKFDPKFQGRVTIT

10

20

30

40

50

				ADTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYY CARGVFGFFEHWGQGTTVTVSS
配列 番号	92	重鎖可変 ドメインVH	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2 H 1 5 1 4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGLTISHTYMHVVRQAPGGLEW MGRIDPENHNTKFDPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGVFGFFEHWGQGTTVTVSS
配列 番号	93	軽鎖可変 ドメインVL	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2 L 1 3 3 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA FEDIYNRRAWYQQKPGKAPKLLIH GATSLEHGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLPEDFATYYCQQFWSAPYTFG GGTKVEIK
配列 番号	94	軽鎖可変 ドメインVL	変異型バリア ントヒト化1 1 K 2 L 1 2 0 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA TEDIYNRLAWYQQKPGKAPKLLIH GATSLEHGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLPEDFATYYCQQFRSAPYTFG GGTKVEIK

10

20

【0291】

例示的な定常軽鎖領域：

配列番号95 例示的なヒトカッパ軽鎖定常領域

配列番号96 例示的なヒトラムダ軽鎖定常領域

【0292】

例示的な定常重鎖領域：

配列番号97 I g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域

配列番号98 突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A及びP 3 2 9 Gを有するI g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域（F c ガンマ受容体サイレンシング）

30

配列番号99 I g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域（S G 1－I g G 1アロタイプ）

配列番号100 変異を有するI g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域（S G 1 0 5－I g G 1アロタイプ－F c ガンマ受容体サイレンシング）

配列番号101 変異を含むI g G 1由来のS G 1 0 9 5例示的ヒト重鎖定常領域（K a b a t E Uナンバリング）：

- － L 2 3 5 W／G 2 3 6 N／H 2 6 8 D／Q 2 9 5 L／A 3 3 0 K／K 3 2 6 T（ヒトF c g R I I bに対する親和性の増加及び他のヒトF c g Rに対する親和性の減少に適している）；

- － Q 3 1 1 R／P 3 4 3 R（抗原の取り込みを増強するための等電点（p I）を増加させるのに適している）；

40

- － N 4 3 4 A（抗体のより長い血漿半減期のためにF c R nに対する親和性を増加させるのに適している）；及び

- － Q 4 3 8 R／S 4 4 0 E（リウマチ因子結合を抑制するのに適している）

配列番号102 S G 1 0 9 9－変異を含むI g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域（K a b a t E Uナンバリング）：

Q 3 1 1 R／P 3 4 3 R（抗原の取り込みを増強するためにp Iを増加させるのに適している）

配列番号103 S G 1 1 0 0－変異を含むI g G 1由来の例示的なヒト重鎖定常領域（K a b a t E Uナンバリング）：

50

－ Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している) ;

－ N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

－ Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1 (例示的二重特異性 C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1 C r o s s m a b)

配列番号 1 0 4 重鎖 1 - C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1

配列番号 1 0 5 重鎖 2 - C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1

配列番号 1 0 6 軽鎖 1 - C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1

配列番号 1 0 7 軽鎖 2 - C N T O 8 8 8 // 1 1 K 2 - W T I g G 1

C K L O 2 - I g G 1 (例示的二重特異性 C K L O 2 I g G 1 C r o s s m a b)

配列番号 1 0 8 重鎖 1 - C K L O 2 I g G 1

配列番号 1 0 9 重鎖 2 - C K L O 2 I g G 1

配列番号 1 1 0 軽鎖 1 - C K L O 2 I g G 1

配列番号 1 1 1 軽鎖 2 - C K L O 2 I g G 1

C K L O 2 - S G 1 0 9 5 (= P 1 A D 8 3 2 5) (S G 1 0 9 5 F c 変異を含む例示的二重特異性 C L O K 2 C r o s s m a b)

配列番号 1 1 2 重鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 1 3 重鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 1 4 軽鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 1 5 軽鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 0 9 5

C K L O 2 - S G 1 0 9 9 (S G 1 0 9 9 F c 変異を含む例示的二重特異性 C K L O 2 C r o s s m a b)

配列番号 1 1 6 重鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 1 7 重鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 1 8 軽鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 1 9 軽鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 0 9 9

C K L O 2 - S G 1 1 0 0 (S G 1 1 0 0 F c 変異を含む例示的二重特異性 C K L O 2 C r o s s m a b)

配列番号 1 2 0 重鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 1 0 0

配列番号 1 2 1 重鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 1 0 0

配列番号 1 2 2 軽鎖 1 - C K L O 2 - S G 1 1 0 0

配列番号 1 2 3 軽鎖 2 - C K L O 2 - S G 1 1 0 0

C K L O 3 - S G 1 0 9 5 (S G 1 0 9 5 F c 変異を含む例示的二重特異性 C L O K 3 C r o s s m a b)

配列番号 1 2 4 重鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 2 5 重鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 2 6 軽鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 0 9 5

配列番号 1 2 7 軽鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 0 9 5

C K L O 3 - S G 1 0 9 9 (S G 1 0 9 9 F c 変異を含む例示的二重特異性 C K L O 3 C r o s s m a b)

配列番号 1 2 8 重鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 2 9 重鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 3 0 軽鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 0 9 9

配列番号 1 3 1 軽鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 0 9 9

C K L O 3 - S G 1 1 0 0 (S G 1 1 0 0 F c 変異を含む例示的二重特異性 C K L O 3 C r o s s m a b)

配列番号 1 3 2 重鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 1 0 0

配列番号 1 3 3 重鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 1 0 0

10

20

30

40

50

配列番号 134 軽鎖 1 - C K L O 3 - S G 1 1 0 0

配列番号 135 軽鎖 2 - C K L O 3 - S G 1 1 0 0

【0293】

更なる抗 C C L 2 抗原結合部分：

配列番号 136 重鎖可変ドメイン V H 2 F 2

配列番号 137 軽鎖可変ドメイン V L 2 F 2

配列番号 138 重鎖可変ドメイン V H マウス 1 1 K 2 (= 1 1 K 2 m)

配列番号 139 軽鎖可変ドメイン V L マウス 1 1 K 2 (= 1 1 K 2 m)

配列番号 140 重鎖可変ドメイン V H 1 H 1 1

配列番号 141 軽鎖可変ドメイン V L 1 H 1 1

10

【0294】

例示的な C C L 2 及びホモログ（シグナルペプチドなし）：

配列番号 142 例示的なヒト C C L 2 (M C P 1) - 野生型 (w t)

配列番号 143 例示的なヒト C C L 2 (M C P 1) - P 8 A バリエーション

配列番号 144 例示的なヒト C C L 2 (M C P 1) - T 1 0 C バリエーション

配列番号 145 例示的なヒト C C L 8 (M C P 2) - 野生型 (w t)

配列番号 146 例示的なヒト C C L 8 (M C P 2) - P 8 A バリエーション

配列番号 147 例示的なヒト C C L 7 (M C P 3) - 野生型 (w t)

配列番号 148 例示的なヒト C C L 1 3 (M C P 4) - 野生型 (w t)

配列番号 149 例示的なカニクイザル C C L 2 - 野生型 (w t)

20

配列番号 150 例示的なマウス C C L 2 - 野生型 (w t)

【0295】

更なる例示的な定常重鎖領域：

配列番号 151 G G 0 1 - 変異を含む I g G 1 由来の例示的なヒト重鎖定常領域 (K a b a t E U ナンバリング)：

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)；

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している)；

- N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)；及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

30

配列番号 152 G G 0 2 - 変異を含む I g G 1 由来の例示的なヒト重鎖定常領域 (K a b a t E U ナンバリング)：

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)；

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している)；

- M 4 2 8 L / N 4 3 4 A / Y 4 3 6 T (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している)；及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

40

配列番号 153 G G 0 3 - 変異を含む I g G 1 (I g G 1 アロタイプ配列を含む) 由来の例示的なヒト重鎖定常領域 (K a b a t E U ナンバリング)：

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している)；

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している)；

50

－ N 4 3 4 A（抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している）；及び

－ Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E（リウマチ因子結合の抑制に適している）

配列番号 1 5 4 G G 0 4－変異を含む I g G 1（I g G 1 アロタイプ配列を含む）由来の例示的ヒト重鎖定常領域（K a b a t E U ナンバリング）：

－ L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K（ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している）；

－ Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R（抗原の取り込みを増強するための等電点（p I）を増加させるのに適している）；

－ M 4 2 8 L / N 4 3 4 A / Y 4 3 6 T（抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している）；及び

－ Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E（リウマチ因子結合の抑制に適している）

C K L O 2－G G 0 1（＝P 1 A F 8 1 3 7）例示的な二重特異性 C L O K 2 C r o s s m a b（G G 0 1 F c 変異を含む））

配列番号 1 5 5 重鎖 1－C K L O 2－G G 0 1

配列番号 1 5 6 重鎖 2－C K L O 2－G G 0 1

配列番号 1 5 7 軽鎖 1－C K L O 2－G G 0 1

配列番号 1 5 8 軽鎖 2－C K L O 2－G G 0 1

C K L O 2－G G 0 2（＝P 1 A F 8 1 3 9）（例示的な二重特異性 C L O K 2 C r o s s m a b（G G 0 2 F c 変異を含む））

配列番号 1 5 9 重鎖 1－C K L O 2 G G 0 2

配列番号 1 6 0 重鎖 2－C K L O 2 G G 0 2

配列番号 1 6 1 軽鎖 1－C K L O 2 G G 0 2

配列番号 1 6 2 軽鎖 2－C K L O 2 G G 0 2

C K L O 2－G G 0 3（例示的な二重特異性 C L O K 2 C r o s s m a b（G G 0 3 F c 変異を含む））

配列番号 1 6 3 重鎖 1－C K L O 2－G G 0 3

配列番号 1 6 4 重鎖 2－C K L O 2－G G 0 3

配列番号 1 6 5 軽鎖 1－C K L O 2－G G 0 3

配列番号 1 6 6 軽鎖 2－C K L O 2－G G 0 3

C K L O 2－G G 0 4（G G 0 4 F c 変異を含む例示的な二重特異性 C K L O 2 C r o s s m a b）

配列番号 1 6 7 重鎖 1－C K L O 2－G G 0 4

配列番号 1 6 8 重鎖 2－C K L O 2－G G 0 4

配列番号 1 6 9 軽鎖 1－C K L O 2－G G 0 4

配列番号 1 7 0 軽鎖 2－C K L O 2－G G 0 4

C K L O 2－G G 0 3 / G G 0 4（＝P 1 A F 8 1 4 0）（ノブ鎖に G G 0 3 F c 変異を含み、ホール鎖に G G 0 4 F c 変異を含む例示的な二重特異性 C K L O 2 C r o s s m a b）

配列番号 1 7 1 重鎖 1－C K L O 2－G G 0 3 / G G 0 4

配列番号 1 7 2 重鎖 2－C K L O 2－G G 0 3 / G G 0 4

配列番号 1 7 3 軽鎖 1－C K L O 2－G G 0 3 / G G 0 4

配列番号 1 7 4 軽鎖 2－C K L O 2－G G 0 3 / G G 0 4

P 1 A F 8 1 4 2（C K L O 2－C B－S G 1 0 9 5）－（S G 1 0 9 5 F c 変異を含む 2 本のポリペプチド鎖のみを含む例示的な二重特異性 C K L O 2 コントースボディ（C B））

配列番号 1 7 5 ポリペプチド鎖 1－C K L O 2－C B－S G 1 0 9 5

配列番号 1 7 6 ポリペプチド鎖 2－C K L O 2－C B－S G 1 0 9 5

P 1 A F 8 1 4 3（C K L O 2－C B－G G 0 2）－（例示的な二重特異性 C K L O 2

10

20

30

40

50

コントースボディ（CB）は、GG02 Fc変異を含む2本のポリペプチド鎖のみを含む）

配列番号177 ポリペプチド鎖1－CKLO2－CB－GG02

配列番号178 ポリペプチド鎖2－CKLO2－CB－GG02

P1AG5853（CKLO2－CB－GG02－K447G）－（例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB）は、GG02 Fc変異及び変異K447Gを含む2本のポリペプチド鎖のみを含む）

配列番号179 ポリペプチド鎖1－CKLO2－CB－GG02－KG

配列番号180 ポリペプチド鎖2－CKLO2－CB－GG02－KG

P1AG8317（CKLO2－CB－SG1095－K447G）－（SG1095 Fc変異及び変異K447Gを含む2本のポリペプチド鎖のみを含む例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB））

配列番号181 ポリペプチド鎖1－CKLO2－CB－SG1095－KG

配列番号182 ポリペプチド鎖2－CKLO2－CB－SG1095－KG

10アミノ酸長を有する例示的なグリシン－セリンポリペプチドリンカー：

配列番号183 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号184 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号185 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号186 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号187 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号188 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号189 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号190 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

配列番号191 ポリペプチドリンカー－GSGGSGGSGG

本明細書に記載される抗CCL2二重特異性抗体のために使用された単一特異性未修飾抗CCL2抗体／抗原結合部分の命名

【表4】

抗体／抗原結合部位	エイリアス	VH／VL
1A4	CCL2-0008	配列番号8／配列番号9
1A5	CCL2-0009	配列番号15／配列番号16
1G9	CCL2-0010	配列番号23／配列番号24
2F6	CCL2-0014	配列番号31／配列番号32
CNT0888	CCL2-0004	配列番号39／配列番号40
ヒト化11K2（＝11K2）	CCL2-0002	配列番号47／配列番号48
ABN912	CCL2-0003	配列番号55／配列番号56

【0296】

変異L234A、L235A及びP329G（PGLALA）を含むIgG1及びIgG1のいずれかを有するCrossmab（国際公開第2016／016299号参照）としての未改変VH／VLを有する二重特異性抗CCL2の命名

【表 5】

二重特異性抗CCL2抗体	エイリアス
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055

10

20

30

40

50

【0297】

改変VH/VLを有する二重特異性抗体のCrossma bの命名（国際公開第2016/016299号を参照）。使用される重鎖定常ドメイン（例えば、IgG1野生型、PGLALA、SG1095、SG1099、SG1100、GG01、GG02、GG03、GG04、GG02-KG）に応じて、IgG1野生型、PGLALA、SG1095、SG1099、1100、GG01、GG02、GG03、GG04、GG02-KG）という接尾辞を付加する。

【表 6】

二重特異性CCL2抗体 (及び親単一特異性)	可変領域の名称 (VH/VL)	VH (配列 番号)	VL (配列 番号)	VH (配列 番号)	VL (配列 番号)
ヒト化11K2親	11K2 VH/11K2 VL	47	48	—	—
CNT0888親	CNT0888 VH /CNT0888VL			39	40
CKLO01	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888L 0616	90	93	71	75
CKLO02	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888L 0616	91	93	71	75
CKLO03	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0695/CNT0888L 0616	90	94	71	75
CKLO04	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0625/CNT0888L 0616	90	94	72	75
CKLO05	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888L 0616	90	93	73	75
CKLO06	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0634/CNT0888L 0616	90	94	73	75
CKLO07	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888L 0616	92	93	73	75
CKLO08	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0634/CNT0888L 0616	91	93	73	75
CKLO09	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888L 0616	90	93	72	75
CKLO10	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888L 0616	92	93	72	75
CKLO11	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0625/CNT0888L 0616	91	93	72	75
CKLO12	11K2H1503/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888L 0616	90	93	74	75
CKLO13	11K2H1503/11K2L1201// CNT0888H0635/CNT0888L 0616	90	94	74	75
CKLO14	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888L 0616	92	93	74	75
CKLO15	11K2H1510/11K2L1338// CNT0888H0635/CNT0888L 0616	91	93	74	75

二重特異性CCL2抗体 (及び親単一特異性)	可変領域の名称 (VH/VL)	VH (配列 番号)	VL (配列 番号)	VH (配列 番号)	VL (配列 番号)
CKLO16	11K2H1514/11K2L1338// CNT0888H0695/CNT0888L 0616	92	93	71	75

【実施例】

【0298】

実施例

実施例 A-1 単一特異性抗 CCL2 抗体

単一特異性抗 CCL2 抗体及び CCL2 抗原の作製

【0299】

組換え DNA 技術

標準的な方法を使用して、Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, New York, 1989において説明されるように、DNAを操作した。分子生物学的試薬は、製造元の説明書によって使用した。 10

【0300】

遺伝子及びオリゴヌクレオチド合成

所望の遺伝子セグメントを、Geneart GmbH (レーゲンスブルク、ドイツ)での化学合成によって調製した。合成した遺伝子断片を増殖／増幅のために大腸菌プラスミドにクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。あるいは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって、又はPCRによって短い合成DNA断片を組み立てた。それぞれのオリゴヌクレオチドを、Metabion GmbH (プラネグーマルティンスリート、ドイツ)によって調製した。 20

【0301】

基本的／標準的な哺乳動物発現プラスミドの説明

所望の遺伝子／タンパク質（例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖及びCCL-2分子）の発現のために、以下の機能的要素を含む転写単位が使用される：

- ー イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス（P-CMV）の即初期エンハンサー及びプロモーター、
- ー ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域（5'UTR）、
- ー マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- ー 発現される遺伝子／タンパク質（例えば完全長抗体重鎖及び抗体軽鎖及びCCL-2分子）、及び
- ー ウシ成長ホルモンのポリアデニル化配列（BGH pA）。 30

【0302】

発現される所望の遺伝子を含む発現ユニット／カセットの他に、基本的／標準的な哺乳動物発現プラスミドは、

大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製起点、及び

大腸菌にアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含む。

【0303】

組換えモノクローナル抗体及びCCL-2分子のための発現プラスミドの作製 40

モノクローナル抗体及びCCL-2抗原の一過性発現のための発現プラスミドは、それぞれの発現カセットの他に、大腸菌（E. coli）におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製起点と、大腸菌（E. coli）におけるアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子とを含んでいた。

【0304】

それぞれの免疫グロブリンHC及びLC及びCCL-2分子の転写単位は、以下の機能要素を含んでいた：

- ー イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス（P-CMV）の即初期エンハンサー及びプロモーター、
- ー ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域（5'UTR）、 50

- ー マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、及び
- ー ウシ成長ホルモンのポリアデニル化配列（BGH pA）。

【0305】

VH及びVLに基づいて、それぞれの抗体1A4、1A5、1G9、2F6、CNTO888、マウス及びヒト化11K2、ABN912をIgG1野生型として、及びカップ軽鎖を有するIgG1 PGLALA／エフェクターサイレントFcとして生成した。

ー過性発現及び精製

組換え産生を、F17培地（Invitrogen Corp.）中で培養したHEK293細胞（ヒト胎児腎臓細胞株293由来）の一過性トランスフェクションによって行った。モノクローナル抗体の産生のため、細胞を、それぞれの免疫グロブリン重鎖及び軽鎖を含有するプラスミドで同時トランスフェクトした。トランスフェクション「293－フェクチン」には、トランスフェクション試薬（Invitrogen）を使用した。トランスフェクションは、製造業者の説明書に明記されているように実施した。細胞培養上清をトランスフェクションの3～7日後に回収した。上清を低温（例えば－80℃）で保存した。

【0306】

例えばHEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報を以下に示す：Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197－203。

【0307】

抗体を、MabSelectSure－Sepharose（GE Healthcare、スウェーデン）及びSuperdex 200サイズ排除（GE Healthcare、スウェーデン）クロマトグラフィーを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。簡潔には、滅菌濾過細胞培養上清をPBS緩衝液（10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH7.4）で平衡化したMabSelect SuRe樹脂上に捕捉し、平衡化緩衝液で洗浄し、pH3.0の25mMクエン酸ナトリウムで溶出した。溶出したタンパク質画分をプールし、2M Tris、pH9.0で中和し、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0で平衡化したSuperdex 200 26／60 GL（GE Healthcare、スウェーデン）カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーによって更に精製した。サイズ排除クロマトグラフィー画分をCE－SDS（Caliper Life Science、米国）によって分析し、抗体含有画分をプールし、－80℃で保存した。

【0308】

組換えCCL2の作製

野生型CCL2はモノマーとして存在することができるが、実際には生理学的濃度で二量体を形成することもできる。この単量体－二量体平衡は異なる可能性があり、異なる濃度で使用され得る記載された全ての *in vitro* 実験について慎重に考慮する必要がある。不確実性を回避するために、本発明者らは点突然変異CCL2バリエーションを作製した：CCL2のP8Aバリエーションは、二量体化界面に突然変異を保有し、その結果、定義された純粋なCCL2単量体をもたらす二量体を形成することができない。対照的に、CCL2のT10Cバリエーションは、CCL2の固定二量体をもたらす（J Am Chem Soc. 2013 Mar 20; 135 (11): 4325－32）。

【0309】

それぞれの可溶性CCL2タンパク質（野生型、P8A及びT10Cバリエーション）を、SP－Sepharose HP（GE Healthcare、スウェーデン）及びSuperdex 200サイズ排除（GE Healthcare、スウェーデン）クロマトグラフィーを使用する陽イオン交換クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。簡潔には、滅菌濾過した細胞培養上清を10mM KH₂PO₄、pH5.0で希釈して、伝導率<4mS／cmを調整した。希釈した上清を、10mM KH₂PO₄

、pH 5.0で平衡化したSP-Sepharose樹脂にロードし、平衡化緩衝液で洗浄し、10mM KH₂PO₄、1M NaCl、pH 5.0への勾配を用いて溶出した。溶出したタンパク質画分をプールし、20mMのヒスチジン、140mMのNaCl、pH 6.0を用いて平衡化されたSuperdex 200 16/60 GL (GE Healthcare、Sweden) カラムを使用してサイズ排除クロマトグラフィーにより更に精製した。サイズ排除クロマトグラフィー画分をSDS-PAGE及び分析高速サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。CCL2含有画分をプールし、-80℃で保存した。

【0310】

機能的特性評価 (結合)

T200機器にBiacore Series S Sensor Chip CM5を取り付けた。系緩衝液は、HBS-ET (10mM HEPES (pH 7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA、0.05% (w/v) P20) であった。系を37℃に設定した。各測定について、試料緩衝液は、1mg/ml CMD (カルボキシメチルデキストラン、Fluka) を更に補充した系緩衝液であった。

【0311】

抗体捕捉系を確立した。14000 GARFcγ (ヤギ抗ウサギFcγ)、111-005-046、Jackson ImmunoResearch) を、製造業者によって記載されるようにEDC/NHSカップリングによって、10mM酢酸ナトリウム緩衝液pH 5.0中、25μg/mlで25℃で固定化した。HBS緩衝液 (100mM HEPES pH 7.4、1.5M NaCl、0.05% (w/v) Tween 20) を用いた15秒間の注入、10mMグリシン緩衝液pH 2.0を用いた1分間の注入、続いて10mMグリシン緩衝液pH 2.25を用いた1分間の2回の注入によって、捕捉系を20μl/分で再生した。別の実施形態では、マウスモノクローナル抗体は、12700 RUポリクローナルウサギ抗マウス (RAMIgG、GE Healthcare) 抗体を上記のようなBiacoreシリーズCM5センサーに固定化することによってバイオセンサー上に捕捉された。10mMグリシン緩衝液pH 1.7の3分間の注入によってセンサーを再生した。

【0312】

抗体クローン上清を系緩衝液で1:2に希釈し、5μl/分で1分間捕捉した。抗体捕捉後、系を2.5倍濃縮系緩衝液によって80μl/分で30秒間洗浄し、引き続いて2分間のベースライン安定化を行った。分析物の速度論を30μl/分で行った。溶液wt中の分析物として、ヒトCCL2及びモノマーCCL2 P8AバリエーションCCL2を使用した。分析物を90nMの最高濃度で注入した。分析物接触時間は3分であり、解離時間は10分であった。BiaevaluationソフトウェアV. 3.0を製造者GEHCの指示に従って使用した。RMAX局所を有する1:1結合モデルを適用して、速度論的速度を見かけ上推定した。

野生型 (wt) ヒトCCL2及びヒトCCL2 P8Aバリエーション (モノマー) に対する抗体の結合

10

20

30

40

50

【表 7】

抗体	エイリアス	KD [nM] w t ヒト CCL2	T1/2 [分]	KD [nM] 単量体ヒト CCL2	T1/2 [分]
1A4	CCL2-0008	0.073	100	0.059	174
1A5	CCL2-0009	0.024	160	0.046	137
1G9	CCL2-0010	0.062	177	0.051	218
2F6	CCL2-0014	0.059	52	0.091	47
マウス 11K2	X-0048	0.35	19	0.011	518
ヒト化 11K2 (=11K2)	CCL2-0002	0.028	118	0.035	116
AB912	CCL2-0003	0.036	33	0.046	25
CNT0888	CCL2-0004	0.026	94	0.054	44

10

【0313】

SPR 分析 I から得られた pH 依存性 CCL2 結合動態のまとめ

【0314】

T200 機器に Biacore Series S Sensor Chip CM5 を取り付けた。系緩衝液は、HBS-ET (10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA、0.05% (w/v) P20) であった。他の実施形態では、系緩衝液の pH を pH8.3、pH7.9、pH7.4、pH7.1、pH6.7、pH6.3、pH5.9、pH5.5 に設定した。系を 25℃ に設定した。各測定について、試料緩衝液は、1mg/ml CMD (カルボキシメチルデキストラン、Fluka) を更に補充した系緩衝液であった。

20

【0315】

抗体捕捉系を確立した。13000MAb<h-Fc-pan>M-R10Z8E9-IgG (Roche) を、製造業者によって記載されるように EDC/NHS カップリングによって、10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 中 18μg/ml で 25℃ で固定化した。HBS 緩衝液 (100mM HEPES pH7.4、1.5M NaCl、0.05% (w/v) Tween20) を 20μl/分 で注入し、続いて 10mM NaOH を 1 分間 15 秒間注入し、10mM グリシン緩衝液 pH2.5 を 1 分間 2 回注入することによって、捕捉系を再生した。捕捉した抗体を、それぞれの系緩衝液で希釈した 80nM 濃度で 10μl/分 で 30 秒間注入した。抗体捕捉後、系を 2.5 倍濃縮系緩衝液によって 50μl/分 で 30 秒間洗浄し、引き続いて 2 分間のベースライン安定化を行った。濃度依存性分析物系列を、0nM (緩衝液対照)、0.4nM、1.1nM からの 1:3 希釈段階、3.3nM、30nM での 2 回の注入で注入した。分析物接触時間は 3 分であり、解離時間は 10 分であった。分析物の速度論を 50μl/分で行った。

30

【0316】

ヒト抗体をセンサー表面上のリガンドとして捕捉した：

40

- 陽性対照としてのヒト正常 IgG (H-N-IgG、Id. : 11717570、Roche)、
- 抗ヒト CCL2 mAb (ヒト化 11k2 : CCL2-0002)、
- 抗ヒト CCL2 mAb (AB912、CCL2-0003)、及び
- 抗ヒト CCL2 mAb (CNT0888、CCL2-0004)；
- 陰性対照としての系緩衝液。

【0317】

Biaevaluation ソフトウェア V. 3.0 を製造者 GEHC の指示に従って使用した。R_{MAX} 局所を有する 1:1 結合モデルを適用して速度論的速度を決定した。

50

【表 8】

	ヒト化11K2 CCL2-0002		ABN912 CCL2-0003		CNT0888 CCL2-0004	
pH	KD [nM]	$t_{1/2}$ -dis s. [分]	KD [nM]	$t_{1/2}$ -dis s. [分]	KD [nM]	$t_{1/2}$ -dis s. [分]
8.3	0.003	1155	0.004	35	0.01	135
7.9	0.02	165	0.004	25	0.01	138
7.4	0.02	163	0.01	33	0.02	130
7.1	0.01	215	0.02	20	0.02	124
6.7	0.01	292	0.2	8	0.03	103
6.3	0.003	1155	1	3	0.02	128
5.9	0.01	287	13	1	0.04	61
5.5	0.01	118	2000	0.03	0.06	31

10

20

【0318】

交差反応性CCLホモログ

CCL2 (MCP-1) は、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (MCP-2)、CCL13 (MCP-4) に対して高い相同性を有し、これらのCCLケモカインはCCR2に結合することができるので、これらのホモログに対する抗CCL2抗体の結合を評価した。結果を図1に示す。CCL2に対する選択性を有すると記載されたCNT0888 (Mol Immunol. 2012 Jun; 51 (2) : 227-33) を除いて、試験された他の抗体は、CCL7及びCCL8のいずれかに結合した (CCL7及びCCL8のいずれかにに対して交差反応性を示した)。

30

【0319】

Biacoreアッセイ法：CCLホモログ、例えばCCL2 (MCP-1)、CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3) 及びCCL13 (MCP-4) に対する抗CCL2抗体の結合を、Biacore T200機器 (GE Healthcare) を使用して25℃で評価した。アミンカップリングキット (GE Healthcare) を製造者の推奨設定に従って使用して、マウス抗ヒトIgG (Fc) (GE Healthcare) をCM4センサーチップの各フローセルに固定化した。抗体及び検体をACES pH7.4緩衝液 (20mM ACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween20、0.005% NaN3) に希釈した。抗体を抗Fcセンサ表面上に捕捉し、次いで組換えヒトCCLホモログタンパク質をフローセル上に5nM及び20nMで注入した。野生型CCL2 (MCP-1)、CCL8 (MCP-2)、CCL7 (MCP-3) 及びCCL13 (MCP-4) はR&D Systemsから市販されていたが、モノマーCCL2 (P8Aバリエーション) は社内で生成した抗原であった。センサ表面を3M MgCl2を用いて各サイクルで再生した。結合センサーグラムを、Biacore T200 Evaluationソフトウェア、バージョン2.0 (GE Healthcare) を使用して処理した。

40

【0320】

機能的特性評価 (生物学的)

50

CCR2シグナル伝達I-カルシウムフラックスアッセイ

THP-1（ヒト急性単球性白血病細胞株；ATCC TIB-202）細胞を、RPMI 1640、10% FBS、1mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES、50 μ M β -メルカプトエタノール（供給元Thermo Fisher Scientific）中で培養した。アッセイ日に、細胞密度を25.8mlアッセイ培地（FBSを含まないRPMI 1640）中 8.33×10^5 細胞/mlに調整した。FLIPR（登録商標）カルシウムAssay Kits（FLIPR カルシウム4アッセイキット、カタログ番号R8142、

【0321】

色素ローディング溶液は、製造業者Molecular Devicesの指示に従って、成分Aのバイアル2つと成分B（HBSS緩衝液と20mM HEPES、pH7.4）20mlとを混合することによって調製した。516 μ lの1M Hepes（最終アッセイ濃度：10mM）を加えた後、516 μ lの250mMプロベネシド（最終アッセイ濃度：2.5mM）を加える。ストック溶液の場合、プロベネシド（Sigma P8761）65.4mgを1N NaOH 465 μ lに溶解し、1 $\times$ HBSS（Thermo Fisher Scientific）465 μ lを添加する。25.8 mlのローディング緩衝液を、例えば4つのマイクロタイタープレート（52.6ml容量が必要である； 10^6 THP-1/ml）に十分な細胞を含む25.8mlのアッセイ培地と混合した。ローディング緩衝液中の120 μ lの細胞懸濁液を黒色F底96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに移した。プレートを室温で3～4時間インキュベートした。

【0322】

その間に、抗体及びリガンド溶液を調製した。30 μ g/ml～0.025 μ g/ml（段階希釈なし、ウェル中の最終濃度）の各抗体の8つの濃度を試験した。各濃度を2つのプレートで試験した。全ての希釈液をアッセイ培地中で10倍濃縮溶液として調製した。参照抗体として、ヒトCCL2/JE/MCP-1抗体（R&D Systemsカタログ番号MAB279）を使用した。リガンドCCL2（R&D Systemsカタログ番号279-MC-10）を、50 μ gのCCL2凍結乾燥物を500 μ lのRPMI 1640（100 μ g/ml）に溶解し、400 μ lを10mlのアッセイ培地（4 μ g/mlストック溶液）に移すことによって調製した。刺激対照として、イオノマイシン（Sigmaカタログ番号I-0634）を使用した（1340 μ lのDMSO（Sigmaカタログ番号D-8779）に溶解した1mgのイオノマイシン、1mM）。10 μ lの1mMストック溶液を1990 μ lアッセイ培地（5 μ M、最終アッセイ濃度500nM）で希釈した。100 μ lをポリプロピレンMTPの対応する対照ウェルにピペットで入れた。

【0323】

抗体希釈物及びCCL2を2つのV字形ポリプロピレン96ウェルプレート中でプレインキュベートした。50 μ lの4 μ g/mlストック溶液CCL2（最終400ng/ml CCL2）及び50 μ lの10倍濃縮抗体希釈物をウェルにピペットで入れた。プレートを室温で30～60分間インキュベートした。

【0324】

インキュベーション後、細胞プレート及び化合物プレートをFlexStation（登録商標）3（Molecular Devices）の読み取り位置に直接移し、システムマニュアル（励起485nm、発光525nm）に記載されているようにカルシウムアッセイを実施した。読み出しは数秒間隔で行った。

【0325】

結果：

10

20

30

40

50

【表 9】

表 1 : 40 ng/ml の PMA 及び 4 μ M の イオノマイシンを陽性対照として使用した。表は、n = 2 の EC₅₀ の平均を含む。

抗 CCL2 抗体		CCR2 シグナル伝達の阻害	
抗体	エイリアス	EC ₅₀ [μ g/ml]	EC ₅₀ [nM]
1A4	CCL2-0008	4.2	28.0
1A5	CCL2-0009	2.2	14.6
1G9	CCL2-0010	2.4	16
2F6	CCL2-0014	8.7	3.9
Ma b 279 (R&D)	商業的基準	2.6	17.4
マウス 11K2 (11K2m)	X-0048	4.5	30.0
ヒト化 11K2 (11K2)	CCL2-0002	2.1	14.0
AB912	CCL2-0003	1.9	12.7
CNT0888	CCL2-0004	2.7	18

【0326】

単球上に発現される CCR2 受容体の CCL2 誘導内在化を阻害する抗 CCL2 抗体の効力

骨髓細胞上のリガンド誘導性 CCR2 内在化を防ぐために、本発明者らは *in vitro* アッセイを設定し、抗 CCL2 抗体を特徴付けた。健常ドナーの末梢血から市販のキット (Stemcell、カタログ番号 15068) を用いて磁気分離により単球を単離した。Fc γ R のブロッキングのために、単球を、FACS 緩衝液 (PBS + 0.2% BSA) 中、氷上で 50 分間、500 μ g/ml の最終濃度で正常ヒト IgG (Privigen、CSL ベーリング) とプレインキュベートした。次いで、細胞を 10 分間遠心分離し (300 x g、4°C)、FACS 緩衝液でもう一度洗浄し、氷上で保存した。抗 CCL2 抗体希釈液 (それぞれ 50 μ l) を 96 U 底ウェル (BD) 中で調製した (4°C 及び 37°C で並行してアプローチ)。単球を分割し、培地 (RPMI 1640; 10% FCS; 2 mM β -グルタミン) に再懸濁し、更なる使用までそれぞれ 4°C 及び 37°C でインキュベートした。組換え CCL2 (50 μ l; 100 ng/ml の最終濃度) を調製した抗体希釈物に 4°C 及び 37°C の両方で添加した。100 μ l の単球懸濁液 (2 $\times$ 10⁵ 細胞/ウェル) を CCL2/抗 CCL2 混合物に総体積 200 μ l で添加し、細胞を 4°C 及び 37°C で 1 時間 30 分間インキュベートした後、300 x g、4°C で遠心分離した。これ以降、全ての工程を予備冷却緩衝液で実施した：細胞を 250 μ l の FACS 緩衝液で洗浄し、更に細胞を CCR2 受容体に対して染色した (市販の CCR2-APC コンジュゲート及び適切なアイソタイプ ctrl-APC を標準的な FACS プロトコルに従って使用する：アリコート、CD192 (CCR2) APC (BioLegend、#357208、クローン K036C2/ml IgG2a k) 並びに適切なアイソタイプ ctrl 抗体：20 μ l/10⁶ 細胞 ml IgG2a k APC BD Biosciences、#400222、クローン MOPC-173 を用いて 5 μ l/10⁶ 細胞で染色した)。

【0327】

次いで、受容体発現をFACS Canto IIで分析し、CCR2内在化を以下のように計算した：

● 内在化なし：リガンド（rec. CCL2）の非存在下でのインキュベーションで細胞を分析した。

● 100%内在化：rec. CCL2と以前にインキュベートした細胞上のCCR2発現レベルを最大に低下させた。

【表10】

抗CCL2抗体		CCR2内在化の阻害	
抗体	エイリアス	EC50 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	EC50 [nM]
1A4	CCL2-0008	2.52	16.81
1A5	CCL2-0009	2.37	15.77
1G9	CCL2-0010	2.16	14.42
2F6	CCL2-0014	2.41	1.09
11K2 (マウス)	X-0048	1.98	13.19
AB912	CCL2-0003	1.99	13.25
CNT0888	CCL2-0004	2.00	13.36
Ma b 279 (R&D)	商業的基準	1.98	13.22

10

20

【0328】

ヒトTHP-1細胞に対するCCL2媒介性走化性の阻害

CCL2勾配に向かうCCR2⁺THP1細胞の遊走を以下のように試験した。単球性THP1細胞（ATCC（登録商標）TIB-202（商標））を、FCS及びL-グルタミンを補充したRPMI 1640培地（PAN、カタログ番号P04-17500）中で培養した。細胞を通常、遊走アッセイで使用する前に2〜3回継代し、次いで、FSC含有量が減少した培地（10% FCSの代わりに1.5%）中で一晚飢餓状態にした。細胞を計数し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の正常ヒトIgG（Invitrogen、カタログ番号12000；FcγRをブロックする）と室温で15分間インキュベートした。

30

【0329】

その間に、抗CCL2抗体（及び／又は対照）を、25 ng/mlのrhCCL-2（R&D Systems、カタログ番号#279-MC）を含む無血清培地を含有するHTS Transwell 96ウェルプレートシステム（Corning、カタログ番号3386；3 μm 細孔径）の下側チャンバーに加えた。次いで、インサートプレートを下部チャンバープレートに貼り付け、75 μl （ 1.5×10^5 細胞）の上記細胞懸濁液（IgGブロックを含む）を、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体／アイソタイプあり及びなしで各インサートに添加した。プレートを覆い、CO₂インキュベーター（5% CO₂）中、37℃で一晩インキュベートした。

40

【0330】

インサートプレートを除去し、Cell-titer-glo基質（Promega、カタログ番号G758）を下部チャンバープレートの各ウェルに添加して、遊走細胞の生存率を測定した。300 rpmの振盪機上で1時間インキュベートした後（カバープレートを密封した）、各ウェル200 μl をMicrofluor black 96ウェ

50

ルプレート（VWR、カタログ番号#735-0527）に移し、発光を測定した（発光リーダー、例えばBio-Tek、Tecan）。倍率変化を、IgG対照抗体及び抗CCL2抗体による遊走細胞（細胞力価Glo、RLU）の数の間の比として計算した。以下の表2には、条件ごとに5～10回の反復の結果が示されている。

【表11】

表 2

抗体	エイリアス	THP1 走化性 [IgG対照と比較した倍率変化]
1A4	CCL2-0008	4.5
1A5	CCL2-0009	3.6
1G9	CCL2-0010	0.9
2F6	CCL2-0014	6.7
Ma b 279 (R&D)	—	3.7
マウス11K2 (11K2m)	X-0048	6.9
ヒト化11K2 (11K2)	CCL2-0002	7.2
ABN912	CCL2-0003	6.5
CNT0888	CCL2-0004	4.9

【0331】

マウスにおける単一特異性（モノパラトピック）抗CCL2抗体によるヒトCCL2免疫複合体掃攻の評価

野生型ヒトCCL2と免疫複合体を形成するモノパラトピック抗体の能力を評価するために、抗CCL2モノパラトピック抗体（20mg/kg）及び野生型ヒトCCL2（0.1mg/kg）からなる予め形成された免疫複合体を、10ml/kgの単回用量でヒトFcRnトランスジェニックマウス（B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr}Tg（FCGRT）32Dcr/DcrJ、Jackson Laboratory）の尾静脈に投与した。投与の5分後、7時間後、1日後、2日後、3日後及び7日後に血液を採取した。血液を直ちに14,000rpmで10分間、4℃で遠心分離することによって血清を調製した。血清を測定まで-80℃以下で保存した。試験したモノパラトピック抗体を以下の表3に列挙する。SG1 Fcを有する抗体は野生型と同様のFcガンマ受容体結合を有するが、SG105 Fcを有する抗体はFcガンマ受容体結合サイレントである。

【0332】

図2に示すように、in vivoでのhCCL2クリアランスに対する各抗CCL2モノパラトピック抗体の免疫複合体掃攻の効果を、抗CCL2抗体とFcガンマ受容体結合（SG1、=インタクトFcガンマ受容体結合を有するIgG1野生型；実線）及び抗CCL2抗体とFcガンマ受容体結合サイレント（SG105、=Fcガンマ受容体結合なしのIgG1；点線）とを比較することによって評価した。それぞれの図2a～図2gは、FcRnトランスジェニックマウスにおける、hCCL2及びそれぞれの抗CCL2抗体（2つの異なるFc部分：SG1=インタクトFcガンマ受容体結合を有するIgG1野生型、及びSG105=Fcガンマ受容体結合を有しないIgG1）からなる予め形成された免疫複体の注射後の経時的なhCCL2の血清濃度を示す。抗体プロファイル

は、Phoenix 64 (Pharsight / Certara) を使用したノンコンパートメント分析によって分析した。AUCinfは、無限大に外挿した線形対数台形則によって推定した。クリアランス値を用量 / AUCinfと定義する。このクリアランスの差は、Fcガンマ受容体結合を有する抗体のhCCL2クリアランス (SG1) を、Fcガンマ受容体結合サイレントを有する抗体のhCCL2クリアランス (SG105) で割ることによって計算される倍率変化としても表された (以下の表3)。以下の表3中のデータは、Fcガンマ受容体結合抗体 (SG1=インタクトなFcガンマ受容体結合を有するIgG1野生型) によるヒトCCL2のクリアランスが、試験した全てのモノパルトピック抗体について、Fcガンマ受容体結合サイレント抗体 (Fcガンマ受容体結合なしのSG105) によるクリアランスと類似していたことを示す。これは、試験されたモノパルトピック抗体によるCCL2の免疫複合体媒介掃攻が効率的でなかったことを示唆する。

【表 1 2】

表3：抗CCL2単一特異性抗体 (20mg / kg) 及び野生型ヒトCCL2 (0.1mg / kg) の予め形成された免疫複合体 (IgG1野生型 (SG1) 及びIgG1 Fc受容体サイレンシング (SG105) のいずれか) の投与後の野生型CCL2のクリアランス値

	クリアランス (ml / 日 / kg)	倍率変化 (野生型IgG1 (SG1) 対Fc受容体サイレンシングIgG1 (SG105))
CNT0888-SG1	14.05	1.60
CNT0888-SG105	8.80	
11K2-SG1	80.60	1.69
11K2-SG105	47.83	
ABN912-SG1	67.06	0.99
ABN912-SG105	67.84	
1A4-SG1	38.93	1.66
1A4-SG105	23.39	
1A5-SG1	20.08	0.95
1A5-SG105	21.14	
1G9-SG1	14.02	0.87
1G9-SG105	16.07	
2F6-SG1	21.49	1.03
2F6-SG105	20.94	

【0333】

電気化学発光 (ECL) による血清中の総ヒトCCL2濃度の測定

マウス血清中の総ヒトCCL2の濃度をECLによって測定した。3ug / mLの抗CCL2抗体 (F7 (Biolegend) 及びクローンMAB679 (R&D Systems)) をMULTI-ARRAY 96ウェルプレート (Meso Scale Discovery) 上に一晚固定化した後、ブロッキング緩衝液中で30℃にて2時間インキュベートした。抗CCL2 MAB679を、ヒト化11K2、1A4及び1A5抗体を含有する試料の捕捉抗体として使用した。抗CCL2クローン5D3-F7を、ABN912、CNT0888、1G9、2F6H抗体を含有する試料に使用した。ヒトCCL2検量線試料、品質管理試料及びマウス血清試料を、希釈緩衝液で希釈し、過剰の薬物と共に37℃で30分間インキュベートすることによって調製した。その後、試料を抗CCL2固定化プレートに添加し、30℃で1時間結合させた後、洗浄した。次に、SUL

FO TAG NHS-エステル (Meso Scale Discovery) 標識抗ヒトFc (クローン: JDC-10、Southern Biotech) を添加し、プレートを30℃で1時間インキュベートした後、洗浄した。読み出し緩衝液T (×4) (Meso Scale Discovery) を直ちにプレートに加え、SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) によってシグナルを検出した。分析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を使用して、検量線の応答に基づいてヒトCCL2濃度を計算した。

【0334】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) による血清中の抗CCL2抗体濃度の測定

マウス血清中の抗CCL2抗体の濃度をELISAによって測定した。抗ヒトIgGκ鎖 (Antibody Solutions) をNunc MaxiSorpプレート (Thermo Fisher) に分注し、4℃で一晩静置して抗ヒトIgG固定化プレートを調製した。検量線及び試料を1%ブールマウス血清で調製した。その後、試料を、抗ヒトIgG固定化プレートに分注し、30℃で1時間静置した。その後、HRPコンジュゲート (Southern Biotech) を有するヤギ抗ヒトIgG (ガンマ鎖特異的) を添加して、30℃で1時間反応させた。発色反応は、TMB基質 (Life Technologies) を基質として用いて行った。1N硫酸 (Wako) で反応停止後、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。マウス血漿中の濃度は、検量線の吸光度から、解析ソフトSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて計算した。

【0335】

マウスにおけるモノパラトピック抗体による内因性マウスCCL2免疫複合体掃攻の評価

上記の結果 (試験したモノパラトピック抗体によるCCL2の免疫複合体媒介掃攻が効率的でなかったことを示唆する) に加えて、更なる評価を行った。

【0336】

内在性マウスCCL2との免疫複合体を形成し、それを除去するためのモノパラトピック抗体の能力を評価するために、マウス交差反応性11K2抗CCL2モノパラトピック抗体をマウスに投与した。ヒト化11K2H2-SG1 (IgG1野生型=Fcガンマ受容体結合) 及びヒト化11K2-SG105 (Fcガンマ受容体結合サイレント) 抗体を、20mg/kgの単回用量で、10ml/kgの単回用量で、Balb/cマウスの尾静脈に静脈内投与した。投与前、投与の5分後、7時間後、1日後、2日後、3日後及び7日後に血液を採取した。血液を直ちに14,000rpmで10分間、4℃で遠心分離することによって血清を調製した。血清を測定まで-80℃以下で保存した。

【0337】

図3は、マウスにおけるヒト化11K2-SG1及び11K2-SG105の血清総マウスCCL2濃度及び抗体-時間プロファイルの時間経過を示す。

【0338】

図3に見られるように、蓄積されたマウスCCL2のレベルは、11K2-SG105 (Fcガンマ受容体結合サイレントFc) と11K2-SG1 (IgG1野生型=Fcガンマ受容体結合Fc) との間で差はなかった。これは、注入された抗体による内因性マウスCCL2のFcガンマ受容体媒介クリアランスがなかったか及びほとんどなかったことを示している。免疫複合体中の抗原は、Fcガンマ受容体の多量体結合を介して複合体化していない抗原よりも迅速に除去されるので、これは、11K2抗体が内因性マウスCCL2と免疫複合体を形成することができなかったことを示唆している。

【0339】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によるマウス血清中のマウスCCL2濃度の測定

市販のマウスCCL2 ELISAキット (R&D Systems) からの試薬を適合させることによって、マウス血清中のマウスCCL2の濃度を測定した。検量線試料の

調製を除いて、製造業者のプロトコルに従った。精製された組換えマウスCCL2を、製造業者のタンパク質の代わりに標準として置換した。抗体を注射した後に採取した試料について、検量線試料及び試料を、40マイクログラム／mLの濃度でスパイクした2.5%マウス血清注射抗体を用いて調製し、37℃で30分間インキュベートした。その後、試料を抗ヒトCCL2固定化プレートに分注し、30℃で2時間インキュベートした。マウスMCP-1コンジュゲートを添加し、30℃で2時間インキュベートし、続いて基質及び停止溶液を添加することによる検出。

【0340】

抗体を注射する前に採取した試料については、マウスMCP-1 Ultra-Sensitive Kit (Meso Scale Discovery) を製造者の指示に従って使用した。プレートに添加する前に、抗体を試料に添加しなかった。

10

【0341】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) による血清中の抗CCL2抗体濃度の測定
マウス血清中の抗CCL2抗体の濃度をELISAによって測定した。抗ヒトIgG鎖 (Antibody Solutions) をNunc MaxiSorpプレート (ThermoFisher) に分注し、4℃で一晩静置して抗ヒトIgG固定化プレートを調製した。検量線及び試料を1%プールマウス血清で調製した。その後、試料を、抗ヒトIgG固定化プレートに分注し、室温で1時間静置した。その後、マウス抗ヒトIgG HRP (クローンJDC-10、Southern Biotech) を加え、室温で30分間反応させた。ABTS基質 (KPL) を基質として発色反応を行い、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。マウス血漿中の濃度は、検量線の吸光度から、解析ソフトSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて計算した。

20

【0342】

単一特異性 (モノパラトピック) 抗CCL2抗体を用いた異なるマウスPK試験の結論
マウスPK研究の結果を要約すると、試験されたモノパラトピック抗体のいずれも、循環からのCCL2の効率的なクリアランスを示さなかった。これらのデータは、モノパラトピック抗体がCCL2と免疫複合体を形成してCCL2を循環から効率的に除去することができないことを示唆している。

30

【0343】

対照的に、以下に記載するように、2つの異なる抗原結合部分／部位を有する二重特異性抗CCL2抗体 (バイパラトピック抗CCL2抗体) は、CCL2と免疫複合体を効率的に形成し、それを循環から除去することができた。

【0344】

実施例B-1

二重特異性 (バイパラトピック) 抗CCL2抗体

ヒトCCL2上の2つの異なる特異的エピトープに結合する2つの異なる抗原結合部分 (パレート) を有するいくつかの二重特異性抗CCL2抗体を作製した。

【0345】

序論

40

抗原の単一結合及び架橋がin vivo CCL2クリアランスに有意な影響を及ぼすかどうかを試験するために、本発明者らは、二重特異性CrossMab Technology (例えば、国際公開第2009/080252号、国際公開第2015/150447号を参照)、国際公開第2009/080253号、国際公開第2009/080251号、国際公開第2016/016299号、Schaefer et al., PNAS, 108 (2011) 1187-1191、及びKlein et al., Mabs 8 (2016) 1010-20) (二重特異性 (=バイパラトピック) CrossMab) を使用して、CCL2上の2つの異なるエピトープに結合する2つの異なる抗原結合部分／部位を有する二重特異性抗CCL2抗体を作製した。これらの分子は、最初にこれらの生化学的及び機能的特性についてin vitroで特性評価されたが、マウス共

50

注射研究における *in vivo* CCL2 クリアランス評価のためのツールとしても機能した。Fc ガンマ受容体 (FcγR) 結合媒介掃攻 (例えば、Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151、国際公開第2012/122011号、及び国際公開第2016/098357号、及び国際公開第2013/081143号) に基づいてクリアランス能を評価するために、本発明者らは、FcγR に結合する野生型 huIgG1 として、及び FcγR エフェクターサイレント分子 (例えば、突然変異 L234A、L235A、P329G を有する IgG1 (Kabat EU ナンバリング)) への結合を低減/消失させた改変ヒト IgG1 定常鎖を有する全ての Crossmab を作製した。

【0346】

適切な抗 CCL2 抗体対の同定
ー サンドイッチ ELISA によるバイパロットピック抗体アームの選択。
サンドイッチ ELISA を実施して、ヒト CCL2 への結合について競合しない抗体対を同定した。384 ウェルの MAXISORP (NUNC) プレートに 1 μg/mL の 7 つの示された捕捉抗体 (アーム1) でコーティングし、2% BSA でブロックした。ビオチン化 (NHS-PEO₄-ビオチン、Pierce) WT ヒト CCL2 (20 ng/mL) を、過剰量の同じ 7 つの抗体 (アーム2) と共に 1 μg/mL 及びブロック緩衝液で、摂氏 37 度で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、混合物をブロッキング ELISA プレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートに結合した CCL2 の検出は、ストレプトアビジン HRP、続いて TMB One Component 基質 (Life tech) を用いて行った。シグナルの発生を 1N HCL 酸 (Wako) によって停止させた。競合する抗体を有しないウェルの O.D. を各捕捉抗体について 100% シグナルとして設定した。CCL2 を添加していないブランクウェルの O.D. を 0% シグナルとした。両方向で CCL2 結合に対して強い競合を示さなかった 9 つの抗体対を、二重特異性 Crossmab 抗体の作製のための候補として選択した。

【表 13】

		抗体アーム2						
		ABN912	CNTO888	11K2	1A4	1A5	1G9	2F6
抗体アーム1	ABN912			選択		選択		
	CNTO888			選択			選択	
	11K2						選択	選択
	1A4							選択
	1A5						選択	選択
	1G9							
	2F6							

【0347】

バイパロットピック抗 CCL2 抗体及び免疫複合体の作製及び特性評価
二重特異性 CrossMab フォーマット組換え DNA 技術におけるバイパロットピック抗 CCL2 抗体の作製
標準的な方法を使用して、Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harb

or, New York, 1989)において説明されるように、DNAを操作した。分子生物学的試薬は、製造元の説明書によって使用した。

【0348】

遺伝子及びオリゴヌクレオチド合成

所望の遺伝子セグメントを、Geneart GmbH (レーゲンスブルク、ドイツ)での化学合成によって調製した。合成した遺伝子断片を増殖／増幅のために大腸菌プラスミドにクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。あるいは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって、又はPCRによって短い合成DNA断片を組立てた。それぞれのオリゴヌクレオチドを、Metabion GmbH (プラネグーマルティンスリート、ドイツ)によって調製した。

10

【0349】

基本的／標準的な哺乳動物発現プラスミドの説明

所望の遺伝子／タンパク質 (例えば、抗体重鎖又は抗体軽鎖) の発現のため、以下の機能的要素を含む転写単位を使用する。

● イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス (P-CMV) 由来の前初期エンハンサー及びプロモーター、

● ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域 (5'UTR)、

● マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、

● 発現される遺伝子／タンパク質 (例えば完全長抗体重鎖又はMHCクラスI分子)、及び

20

● ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列 (BGH pA)。

● 発現される所望の遺伝子を含む発現ユニット／カセットに加えて、塩基性／標準的な哺乳動物発現プラスミドは、

● 大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製起点、及び

● 大腸菌にアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含む。

【0350】

組換えモノクローナル抗体のための発現プラスミドの作製

組換えモノクローナル抗体遺伝子は、それぞれの免疫グロブリン重鎖及び免疫グロブリン軽鎖をコードする。

30

【0351】

一過性発現モノクローナル抗体分子のための発現プラスミドは、免疫グロブリン重鎖又は軽鎖発現カセットの他に、大腸菌 (E. coli) におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製起点と、大腸菌 (E. coli) におけるアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子とを含んでいた。

【0352】

それぞれの抗体重鎖又は抗体軽鎖の転写単位は、以下の機能要素を含んでいた：

● イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス (P-CMV) 由来の前初期エンハンサー及びプロモーター、

40

● ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域 (5'UTR)、

● マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、

● それぞれの抗体重鎖及び軽鎖cDNA配列、及び

● ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列 (BGH pA)。

【0353】

一過性発現及び分析特性評価

組換え産生を、F17培地 (Invitrogen Corp.) 中で培養したHEK293細胞 (ヒト胎児腎臓細胞株293由来) の一過性トランスフェクションによって行った。モノクローナル抗体の産生のため、細胞を、それぞれの免疫グロブリン重鎖及び軽鎖を含有するプラスミドで同時トランスフェクトした。トランスフェクション「293-

50

フェクチン」には、トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を使用した。トランスフェクションは、製造業者の説明書に明記されているように実施した。細胞培養上清をトランスフェクションの3～7日後に回収した。上清を低温 (例えば-80℃) で保存した。

【0354】

例えばHEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報を以下に示す: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203。下記の二重特異性抗体を作製するために、国際公開第2016/016299号に記載されるCrossMab技術を使用し、この技術では、VH/VLが一方の抗体アームにおいて交換されており、他方の抗体アームのCH1/CL界面が電荷修飾によって修飾されており、CH3/CH3界面におけるノブ・イントゥ・ホール (knobs-into-holes) 技術と組み合わせてヘテロ二量体化を促進した。この技術を適用した4つ全ての抗体鎖の例示的な配列を、CNT0888/11K2-WT IgG1 (配列番号104～配列番号107を参照の) について示す。

【0355】

野生型IgG1 (WT IgG1) を用いて生成された二重特異性 (バイパラトピック) 抗CCL2 Crossmab抗体のリスト (野生型IgG1は、Fc受容体結合に影響を及ぼす修飾/突然変異を伴わないことを意味するが、ノブ・イントゥ・ホールのようなヘテロ二量体化技術が含まれる)。

【表14】

二重特異性抗体 IgG1	エイリアス 1	エイリアス2	第1抗原結合 部位 VH/VL交差	第2抗原結合 部位 VH/VL 通常構造 (非交差)
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	P1AA3447	ヒト化11K2	ABN912
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	P1AA3429	ヒト化11K2	CNT0888
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	P1AA3461	ヒト化11K2	1G9
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	P1AA3392	ヒト化11K2	2F6
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	P1AA3419	CNT0888	1A5
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	P1AA3439	CNT0888	1G9
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	P1AA3400	1A4	2F6
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	P1AA3427	1A5	2F6
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	P1AA3446	1A5	1G9

【0356】

Fcガンマ受容体サイレンシング変異L234A、L235A、P329G (Kaba

t EUナンバリング) (IgG1-PGLALA) を含むIgG1との二重特異性 (バイパトリック) 抗CCL2 Crossma b抗体のリスト

【表15】

二重特異性抗体 IgG1-PGLALA	エイリアス 1	エイリアス2	第1抗原結合 部位 VH/VL交差	第2抗原結合 部位 VH/VL 通常構造 (非交差)
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2- 0041	P1AA3411	ヒト化11K2	ABN912
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2- 0042	P1AA3452	ヒト化11K2	CNT0888
11K2//1G9-PGLALA	CCL2- 0043	P1AA3463	ヒト化11K2	1G9
11K2//2F6-PGLALA	CCL2- 0053	P1AA3450	ヒト化11K2	2F6
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2- 0044	P1AA3448	CNT0888	1A5
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2- 0045	P1AA3455	CNT0888	1G9
1A4//2F6-PGLALA	CCL2- 0054	P1AA3459	1A4	2F6
1A5//2F6-PGLALA	CCL2- 0055	P1AA3402	1A5	2F6
1A5//1G9-PGLALA	CCL2- 0046	P1AA3444	1A5	1G9

10

20

30

【0357】

バイパトリック抗CCL2抗体の精製

【0358】

細胞培養上清を含むバイパトリック抗CCL2抗体をフィルタにかけ、最大3つのクロマトグラフィー工程によって精製した。捕捉工程溶出液の純度に応じて、捕捉工程と最終精製工程との間にイオン交換クロマトグラフィー工程を実施してもよい。

【0359】

バイパトリック抗CCL2抗体を、MabSelectSure-Sepharose (商標) (GE Healthcare、スウェーデン)、POROS 50 HS (ThermoFisher Scientific) 及びSuperdex 200サイズ排除 (GE Healthcare、スウェーデン) クロマトグラフィーを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。簡潔には、滅菌濾過細胞培養上清をPBS緩衝液 (10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH7.4) で平衡化したMabSelect Sure樹脂上に捕捉し、平衡化緩衝液で洗浄し、pH3.0の25mMクエン酸ナトリウムで溶出した。溶出した前駆体画分をプールし、2MのTris、pH9.0を用いて中和した。

40

【0360】

POROS 50 HS (ThermoFisher Scientific) を用い

50

て任意の第2の精製工程としてイオン交換クロマトグラフィーを行い、平衡化し、20 mMヒスチジンpH5.6で洗浄し、希釈捕捉工程溶出液のローディングを行い、pH5.6で20 mMヒスチジン、0.5 M NaClを用いて勾配クロマトグラフィーを行った。CE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer) によってイオン交換クロマトグラフィー画分を分析し、Crossmab含有画分をプールした。

【0361】

Superdex 200 (GE Healthcare)でのサイズ排除クロマトグラフィーを第2及び第3の精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーは、20 mMヒスチジン緩衝液、0.14 M NaCl、pH6.0で行った。サイズ排除クロマトグラフィー画分をCE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer) によって分析し、Crossmab含有画分をプールし、-80℃で保存した。

10

【0362】

製品品質を満たす場合、POROS 50HS (ThermoFisher Scientific)の後、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200 (GE Healthcare)) を、20 mMヒスチジン緩衝液、0.14 M NaCl、pH6.0中のHiPrep 26/10脱塩 (GE Healthcare)での脱塩クロマトグラフィーに置き換えた。

【0363】

抗体製剤のタンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を用いて、280 nmにおける光学密度 (OD) を測定することにより決定した。

20

【0364】

抗体の純度及び完全性を、LabChip GX II (PerkinElmer) を Protein Express Chip及びHT Protein Express Reagents Kitと共に使用してCE-SDSによって分析した。200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250 mM KCl、pH7.0をランニング緩衝液として使用して、Biosuite High Resolution SEC、250 Å、5 µm分析サイズ排除カラム (Waters GmbH) を使用する高性能SECによって、抗体調製物の凝集体含有量を決定した。平均純度は、CE-SDSによって分析して94~100%の間であり、モノマー含量>95% (SEC) であった。

【0365】

30

二重特異性 (バイパラトピック) 抗CCL2抗体の機能的特性評価
親和性測定 (結合)

捕捉システム (20 µg/mlヤギ抗ヒトIgG Fc; 注文コード: 109-005-098; Jackson Immuno Research) の約1200個の共鳴単位 (RU) を、GE Healthcareによって供給されるアミンカップリングキットを使用してpH5.0でC1チップ (GE Healthcare BR-1005-35) 上にカップリングさせた。試料及び系緩衝液は、PBS-T (0.05% Tween 20を含む10 mMのリン酸緩衝生理食塩水) pH7.4だった。フローセルを25℃に設定し、試料ブロックを12℃に設定し、ランニング緩衝液で2回プライミングした。この二重特異性抗体を、2 µg/ml溶液を10 µl/分の流速で60秒間注入することによって捕捉した。会合は、30 nMの1:10希釈で開始して30 µl/分の流速で150秒間、溶液中の様々な濃度のヒトCCL2 (wt) の注射によって測定した。解離段階は、最大1200秒間モニタリングされ、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることで誘発された。流速10 µl/分の0.85% H₃PO₄ 溶液で60秒間洗浄することによって表面を再生した。ヤギ抗ヒトIgG Fc表面から得られた応答を差し引くことにより、バルク屈折率の差を補正した。ブランク注入も差し引いた (二重参照)。動力学的パラメータの計算には、ラングミュア1:1モデルを使用した。

40

50

【表 16】

単一特異性及び二重特異性抗CCL2抗体	エイリアス	t _{1/2} * (分)	リガンドレベル (RU)	Rmax (RU)
ヒト化11K2 (=11K2)	CCL2-0002	解離なし	293.5	39.3
ABN912	CCL2-0003	27	307.0	33.6
CNT0888	CCL2-0004	解離なし	272.8	31.9
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041	解離なし	212.2	21.1
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042	解離なし	211.8	22.0
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043	解離なし	204.9	21.2
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044	解離なし	207.3	20.0
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045	解離なし	213.0	19.0
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046	解離なし	203.1	20.0
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	解離なし	209.3	20.2
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	解離なし	226.1	22.9
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	解離なし	206.1	21.1
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	解離なし	214.4	20.3
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	解離なし	215.8	20.7
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	解離なし	211.7	21.0
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053	解離なし	201.9	19.8
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054	解離なし	194.7	18.8
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055	解離なし	203.5	20.1
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	解離なし	205.3	20.2
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	解離なし	199.0	19.5
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	解離なし	202.8	19.8

【0366】

野生型抗原の存在下での自然免疫複合体の形成。

透析及び遠心式限外濾過デバイスを使用して、全てのタンパク質試料（二重特異性抗CCL2 Cross Mab抗体及び抗原）を1×PBS、pH7.4に再緩衝化した。

【0367】

2.0~0.1mg/mLのCross Mab試料の希釈系列を調製した。同様に、PBS中の抗原溶液を0.012~0.23mg/mLの範囲の濃度で調製した。等体積の混合を可能にして1:1の一定のモル比（抗体：CCL2複合体）を達成するように濃度を選択した。以下の抗原をこの試験で使用した：野生型CCL2。

【0368】

等量の予備希釈したCross Mab調製物及びCCL2調製物を混合し、37℃で1時間インキュベートした後、試料をSuperose 6（GE Healthcare #2039）カラムに適用し、PBSで予備平衡化し、0.5 mL/分の流速で溶出した。合計100 µg及び250 µLの最大可能体積を適用し、抗体及び抗原のみを対照として使用した。

【0369】

SEC-MALLSデータは、OptiLab rEX屈折率検出器及びminiDAWN Treos MALLS検出器（両方ともWyatt inc. 製）を用いて記録した。SEC-MALLSシグナルを、Astra V5ソフトウェア（Wyatt）を

使用して処理した。

【表 17】

二重特異性抗CCL2抗体	エイリアス	CCL2wtとの相互作用 (低濃度)
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	+
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	+++
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	++
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	+
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051	+
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	++
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	++
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057	+
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	+

凡例

+++多量のマルチ／オリゴマー

++中量のマルチ／オリゴマー

+少量の多／オリゴマー

0 二量体のみ又はそれ以下

10

20

【0370】

抗CCL2抗体の中和特性を研究するためのCCR2レポーターアッセイ

Tango (商標) CCR2-bla U2OS細胞をInvitrogen (ドイツ) から購入して、CCL2中和抗体コンストラクトの影響を試験した。これらのレポーター細胞は、TEVプロテアーゼ部位に連結されたヒトケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体2 (CCR2) と、Tango (商標) GPCR-bla U2OS親細胞株に安定に組み込まれたGal4-VP16転写因子とを含有する。この親細胞株は、UAS応答エレメントの制御下でβ-アレスチン/TEVプロテアーゼ融合タンパク質及びβ-ラクタマーゼ (bla) レポーター遺伝子を安定に発現する。天然リガンドMCP1=CCL2を添加すると、レポーター遺伝子の活性の指標が得られ、これはFRET対応基質の切断によって測定することができる。

30

【0371】

基本的に、アッセイ及び細胞取り扱い手順は、提供者のマニュアルに従った。簡単に記載すると、CCR2-U2OS細胞を、50μlのアッセイ培地 (Freestyle 293発現培地、カタログ番号12338-018、Invitrogen) 中に2×10⁴細胞/ウェル (96er黒色透明底板、カタログ番号#655090、Greiner Bio-one) の密度で播種した。並行して、異なる試験抗体の段階希釈液並びにCCL2抗原溶液をc=4×最終濃度で調製した。次いで、CCL2抗原/抗体混合物を調製し、室温で2～3時間 (時間) プレインキュベートした。50μlの示されたCCL2/抗体溶液をCCR2発現U2OS細胞に移し、加湿インキュベータ内で37℃及び5%CO₂で18時間インキュベートした。対照として、アッセイ培地のみを使用した。

40

【0372】

翌日、β-ラクタマーゼローディング溶液 (カタログ番号K1085、Invitrogen) を用いてCCF4基質 (カタログ番号K1089、Invitrogen) を調製し、その20μl/ウェルを細胞に添加した。基質溶液を暗所においてRTで2時間インキュベートした。

【0373】

最後に、Spectra Max (M4) リーダー (Molecular devic

50

es)を用いて、以下の波長 ($E_x/E_m = 409\text{ nm}/460\text{ nm} = \text{青色}^*$; $E_x/E_m = 409\text{ nm}/530\text{ nm} = \text{緑色}^{**}$)で蛍光波長を決定し、アッセイ培地対照を差し引いた後の青色/緑色蛍光の比を以下の式に従って計算した: 比 = (試料 - 青色* - 対照 - 青色*) / (試料 - 緑色** - 対照 - 緑色**).

【0374】

pH操作後、本発明者らは、CCL2誘導性CCR2シグナル伝達を阻害する能力について最終LO候補 (CKLO1-4) を特徴付けた。この場合、中和特性は、約15 ng/mlの最終濃度で使用するrec. CCL2タンパク質の単量体バリエーションのみによって評価した。

【表18】

二重特異性抗体	エイリアス	IC50 [ng/ml]		
		実施例1	実施例2	実施例3
ABN912//11K2-PGLALA	CCL2-0041		80.2	
CNT0888//11K2-PGLALA	CCL2-0042		84	
11K2//1G9-PGLALA	CCL2-0043		57	
CNT0888//1A5-PGLALA	CCL2-0044		77.7	88
CNT0888//1G9-PGLALA	CCL2-0045		86.4	81.3
1A5//1G9-PGLALA	CCL2-0046		75.8	
ABN912//11K2-WT IgG1	CCL2-0047	84.4		
CNT0888//11K2-WT IgG1	CCL2-0048	92.9		
11K2//1G9-WT IgG1	CCL2-0049	82.2		
CNT0888//1A5-WT IgG1	CCL2-0050	89.2		
CNT0888//1G9-WT IgG1	CCL2-0051		89.6	52.7/67.9
1A5//1G9-WT IgG1	CCL2-0052	86.2		
11K2//2F6-PGLALA	CCL2-0053		26.3	49.6/70
1A4//2F6-PGLALA	CCL2-0054		78.2	
1A5//2F6-PGLALA	CCL2-0055		48.7	
11K2//2F6-WT IgG1	CCL2-0056	93.9		
1A4//2F6-WT IgG1	CCL2-0057		58.2	
1A5//2F6-WT IgG1	CCL2-0058	93		
単一特異性対照	CCL2-0002	76.1	79.1	56.9/58

【0375】

マウスにおけるバイパロトピック抗体によるヒトCCL2免疫複合体掃攻の評価

バイパロトピック抗体が野生型ヒトCCL2と免疫複合体を形成する能力を評価するために、抗CCL2バイパロトピック抗体（20mg/kg）及び野生型ヒトCCL2（0.1mg/kg）からなる予め形成された免疫複合体を10ml/kgの単回用量でBalb/cマウスの尾静脈に投与した。投与の5分後、7時間後、1日後、3日後及び7日後に血液を採取した。血液を直ちに14,000rpmで10分間、4℃で遠心分離することによって血清を調製した。血清を測定まで-80℃以下で保存した。試験したバイパロトピック抗体を以下の表4に列挙する。WT IgG1 Fcを有する抗体は野生型と同様のFcガンマ受容体結合を有するが、PGLALA Fcを有する抗体はFcガンマ受容体結合サイレントである。結果を図4a～図4iに示す。

10

【0376】

図4a～図4iに示すように、in vivoでのhCCL2クリアランスに対する各抗CCL2バイパロトピック抗体の免疫複合体掃攻の効果を、抗CCL2抗体とFcガンマ受容体結合（実線）及び抗CCL2抗体とFcガンマ受容体結合サイレント（PGLALA、点線）とを比較することによって評価した。抗体プロファイルは、Phoenix 64（Pharsight/Certara）を使用したノンコンパートメント分析によって分析した。AUCinfは、無限大に外挿した線形対数台形則によって推定した。クリアランス値を用量/AUCinfと定義する。このクリアランスの差は、Fcガンマ受容体結合を有する抗体のhCCL2クリアランス（SG1）を、Fcガンマ受容体結合サイレントを有する抗体のhCCL2クリアランス（PGLALA）で割ることによって計算される倍率変化としても表された（以下の表4）。以下の表4中のデータは、Fcガンマ受容体（FcγR）結合抗体（WT IgG1）によるヒトCCL2のクリアランスが、試験した全てのバイパロトピック抗体について、Fcガンマ受容体結合サイレント抗体（突然変異L234A、L235A、P329G突然変異を含むIgG1 Fcドメインを有するPGLALA（Kabata EUNANバリング））によるクリアランスよりも優れていたことを示す。これは、試験したバイパロトピック抗体によって達成されたCCL2の免疫複合体媒介掃攻がより効率的であったことを示唆する。さらに、いくつかのバイパロトピック抗体は、クリアランス値の大きな倍率変化、例えば、CNTO//ヒト化11K2（CNTO//11K2）を示した。

20

30

【0377】

倍率変化は、WT型FcガンマR（FcγR）結合を有する抗体のhCCL2クリアランスを、PGLALAを有する抗体のhCCL2クリアランスで割ることによって計算される。図4a～図4i及び下記の表4に示されるように、CNTO//11K2は、FcγR結合を有するIgG1野生型（WT）を有する抗体と、FcγR結合サイレント（PGLALA）である抗体との間で21.5の最大倍率変化を示す。これは、CNTO//11K2-WT IgG1による免疫複合体媒介掃攻が全てのバリエーションの中で最も効率的であることを示唆する。

40

50

【表 19】

表 4：抗 CCL2 バイパルトピック抗体（20 mg / kg）及び野生型ヒト CCL2（0.1 mg / kg）の予め形成された免疫複合体の投与後の野生型 CCL2 のクリアランス値

抗体	エイリアス	クリアランス (ml / 日 / kg g)	倍率変化
11K2 // 1G9-WT IgG1	CCL2-0049	101.761	6.1
11K2 // 1G9-PGLALA	CCL2-0043	16.713	
CNT0888 // 11K2-WT IgG1	CCL2-0048	244.705	21.5
CNT0888 // 11K2-PGLALA	CCL2-0042	11.374	
CNT0888 // 1G9-WT IgG1	CCL2-0051	31.085	7.8
CNT0888 // 1G9-PGLALA	CCL2-0045	3.999	
CNT0888 // 1A5-WT IgG1	CCL2-0050	7.098	3.8
CNT0888 // 1A5-PGLALA	CCL2-0044	1.892	
1A5 // 1G9-WT IgG1	CCL2-0052	194.481	11.4
1A5 // 1G9-PGLALA	CCL2-0046	17.073	
11K2 // 2F6-WT IgG1	CCL2-0056	14.442	4.9
11K2 // 2F6-PGLALA	CCL2-0053	2.964	
ABN912 // 11K2-WT IgG1	CCL2-0047	20.935	4.2
ABN912 // 11K2-PGLALA	CCL2-0041	4.988	
1A4 // 2F6-WT IgG1	CCL2-0057	19.606	3.3
1A4 // 2F6-PGLALA	CCL2-0054	5.933	
1A5 // 2F6-WT IgG1	CCL2-0058	10.254	2.7
1A5 // 2F6-PGLALA	CCL2-0055	3.825	

【0378】

電気化学発光（ECL）による血清中の総ヒト CCL2 濃度の測定

マウス血清中の総ヒト CCL2 の濃度を ECL によって測定した。3 ug / mL の抗 CCL2 抗体 2F2-SG1 を MULTI-ARRAY 96 ウェルプレート（Meso Scale Discovery）に一晩固定化した後、ブロッキング緩衝液中で 30℃ にて 2 時間インキュベートした。ヒト CCL2 検量線試料、品質管理試料及び希釈マウス血清試料を、9% SDS からなる変性緩衝液と共に 37℃ で 30 分間、及び pH 2.0 ~ 2.5 グリシン HCl 緩衝液と共に 37℃ で 10 分間インキュベートした。変性緩衝液の目的は、バイパルトピック抗体からヒト CCL2 を解離させることである。その後、試料を 10 倍希釈し、抗 CCL2 固定化プレートに添加し、30℃ で 1 時間結合させた後、洗

【0379】

酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）による血清中の抗 CCL2 抗体濃度の測定

マウス血清中の抗 CCL2 抗体の濃度を ELISA によって測定した。抗ヒト IgG κ 鎖（Antibody Solutions）を Nunc MaxiSorp プレート

(ThermoFisher) に分注し、4℃で一晩静置して抗ヒトIgG固定化プレートを調製した。検量線及び試料を1%ブールマウス血清で調製した。その後、試料を、抗ヒトIgG固定化プレートに分注し、30℃で1時間静置した。その後、HRPコンジュゲート(Southern Biotech)を有するヤギ抗ヒトIgG(ガンマ鎖特異的)を添加して、30℃で1時間反応させた。ABTS基質(KPL)を基質として用いて発色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。マウス血漿中の濃度は、検量線の吸光度から、解析ソフトSOFTmax PRO(Molecular Devices)を用いて計算した。

【0380】

研究の概要

マウスPK研究データを要約すると、試験されたバイパルトピック抗体によるヒトCCL2の掃攻は、同じ用量のモノパルトピック抗体と比較してより効率的であった。モノパルトピック抗体では、WT FcγR結合及びFcγR結合サイレントの抗体間で抗原クリアランスの差は最小限であった(表3)。対照的に、WT FcγR結合及びFcγR結合を有しないバイパルトピック抗体間の抗原クリアランスの大きな差が得られ(表4)、試験したバイパルトピック抗体がヒトCCL2を効率的に掃攻のことが示唆された。CNT0888//11K2の組み合わせを、クリアランスにおける最大の可能性を示したので、更なる抗体工学のために選択した。

【0381】

実施例B-2 改変された可変ドメイン及びCDRを有する抗CCL2抗体(イオン依存性/pH依存性結合)

イオン依存性/pH依存性結合をもたらす修飾

pH依存性抗CCL2抗体を作製するために、mAb CNT0888及びヒト化11K2の全てのCDRについてヒスチジンスキャン突然変異誘発を行った。CDR中の各アミノ酸を、In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech Inc.又はTakara Bio company)を製造者の説明書に従って使用してヒスチジンに個々に変異させた。シーケンシングによって各バリエーションが正しく変異していることを確認した後、以下の方法によってバリエーションを一過性に発現させ、精製した：組換え抗体を、Freestyle FS293-F細胞及び293Fectin(Life technologies)を製造者の説明書に従って使用して一過性に発現させた。組換え抗体をプロテインA(GE Healthcare)で精製し、D-PBS及びHis緩衝液(20mMヒスチジン、150mM NaCl、pH6.0)で溶出した。プロテインAで精製するのが困難な抗体には、例えば、kappaSelect及びLambdaFABselect(GE Healthcare)及びCaptureSelect IgG-CH1 Affinity Matrix(ThermoFisher Scientific)を使用することができる。サイズ排除クロマトグラフィーを更に実施して、必要に応じて高分子量及び/又は低分子量成分を除去した。全てのヒスチジン置換バリエーションを、上記のものと比較して改変BIACORE(登録商標)アッセイによって評価した。簡潔には、pH5.8での更なる解離相を、pH7.4での解離相の直後にBIACORE(登録商標)アッセイに組み込んだ。これは、pH5.8での対応する解離とは対照的に、pH7.4で形成された複合体からの抗体(Ab)と抗原(Ag)との間のpH依存性解離を評価するためである。pH5.8緩衝液での解離速度は、Scrubber 2.0(BioLogic Software)カーブフィッティングソフトウェアを使用してデータを処理及びフィッティングすることによって決定した。

【0382】

pH7.4の解離相と比較してpH5.8での結合応答の減少をもたらした単一のヒスチジン置換を選択し、組み合わせた。pH7.4での親和性を改善する変異を同定するために、ヒスチジン置換工程中に生成された少なくとも1つのバリエーションを使用して、重鎖及び軽鎖に対してそれぞれ500を超えるバリエーションを生成した。これらのバリエーションは、CDR中の各アミノ酸を、元のアミノ酸及びシステインを除く他の18個のアミノ酸で

10

20

30

40

50

置換した。ヒトCCL2に対するバリエーションの結合能を、BIA CORE（登録商標）4000装置（GE Healthcare）を使用してpH7.4下、37℃で評価した。以前と同様に、pH5.8での更なる解離相を、pH7.4での解離相の直後にBIA CORE（登録商標）アッセイに組み込んだ。pH5.8緩衝液での解離速度は、Scrubber 2.0（BioLogic Software）カーブフィッティングソフトウェアを使用してデータを処理及びフィッティングすることによって決定した。

【0383】

pH7.4での親和性及びpH依存性が改善されたバリエーションを選択し、これらの変異を組み合わせた。これは、以下の表の4つの11K2バリエーション及び4つのCNT0888バリエーションで例示される。

【表20】

表：pH依存性結合のために操作された4つの改変11K2バリエーション及び4つのCNT0888バリエーション

改変11K2バリエーション (VH/VL)	改変CNT0888バリエーション (VH/VL)
11K2H1503/11K2L1338	CNT0888H0625/CNT0888L0616
11K2H1510/11K2L1338	CNT0888H0634/CNT0888L0616
11K2H1503/11K2L1201	CNT0888H0635/CNT0888L0616
11K2H1514/11K2L1338	CNT0888H0695/CNT0888L0616

【0384】

改変11K2及びCNT0888バリエーションの組み合わせ効果を評価するために、各11K2バリエーションを4つの改変CNT0888バリエーションと組み合わせ、CrossMabフォーマットでバイパトリックCCL2抗体として発現させた。これは、以下の表に例示されており、4×4の組み合わせは、CKL001～CKL016と呼ばれる16個のバイパトリック抗体の生成をもたらす。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表：16種の二重特異性（バイパトリック）抗体を作製するための4つの改変11K2バリエーション及び4つの改変CNTO888バリエーションの組み合わせ。

二重特異性抗 CCL2抗体	以下の可変ドメインに基づく
CKLO01	11K2H1503/11K2L1338//CNTO888H0695/CNTO888L0616
CKLO02	11K2H1510/11K2L1338//CNTO888H0695/CNTO888L0616
CKLO03	11K2H1503/11K2L1201//CNTO888H0695/CNTO888L0616
CKLO04	11K2H1503/11K2L1201//CNTO888H0625/CNTO888L0616
CKLO05	11K2H1503/11K2L1338//CNTO888H0634/CNTO888L0616
CKLO06	11K2H1503/11K2L1201//CNTO888H0634/CNTO888L0616
CKLO07	11K2H1514/11K2L1338//CNTO888H0634/CNTO888L0616
CKLO08	11K2H1510/11K2L1338//CNTO888H0634/CNTO888L0616
CKLO09	11K2H1503/11K2L1338//CNTO888H0625/CNTO888L0616
CKLO10	11K2H1514/11K2L1338//CNTO888H0625/CNTO888L0616
CKLO11	11K2H1510/11K2L1338//CNTO888H0625/CNTO888L0616
CKLO12	11K2H1503/11K2L1338//CNTO888H0635/CNTO888L0616
CKLO13	11K2H1503/11K2L1201//CNTO888H0635/CNTO888L0616
CKLO14	11K2H1514/11K2L1338//CNTO888H0635/CNTO888L0616
CKLO15	11K2H1510/11K2L1338//CNTO888H0635/CNTO888L0616
CKLO16	11K2H1514/11K2L1338//CNTO888H0695/CNTO888L0616

10

20

30

【0385】

二重特異性抗体を作製するために、国際公開第2016/016299号に記載されるCrossMab技術を使用し、この技術では、VH/VLが一方の抗体アームにおいて交換されており、他方の抗体アームのCH1/CL界面が電荷修飾によって修飾されており、CH3/CH3界面におけるノブ・イントゥ・ホール（knobs-into-holes）技術と組み合わせてヘテロ二量体化を促進した。この技術を適用した4つ全ての抗体鎖の例示的な配列を、CKLO2IgG1（配列番号108～配列番号111を参照）について示す。使用される重鎖定常ドメイン（例えば、IgG1野生型（Fc受容体結合サイレンシング変異なし）、PGLALA、SG1095、SG1099、1100-SG1095、SG1099、1100については以下の説明及び配列説明を参照）に応じて、接尾辞IgG1、PGLALA、SG1095、SG1099、1100が付加さ

40

50

れる

【0386】

改変された可変ドメイン及びCDR（イオン依存性／pH依存性結合）を有するバイパ
ラトピック抗CCL2抗体の機能的特性評価

親和性測定（上記の方法を参照）

IgG1野生型として生成された16個全ての二重特異性抗CCL2抗体について、そ
れらのpH依存的結合ヒトCCL2を決定した。

【0387】

図5aは、組み合わせ後の4つの改変11K2及び4つのCNT0888バリエーションの
pH7.4（黒線）及びpH5.8（灰色線）並びに16個のCrossmabでの単量
体CCL2に対する結合プロファイルを示すBiacore（登録商標）センサーグラム
を示す。

10

【0388】

図5bは、4つの改変11K2及び4つのCNT0888バリエーション、並びに単量体C
CL2との組み合わせ後の16個のCrossmabの結合プロファイルを示すBiac
ore（登録商標）センサーグラムを示し、pH5.8での更なる解離相をpH7.4で
の解離相の直後にBIACORE（登録商標）アッセイに組み込んだ。

【0389】

CCL8への交差反応性結合

組換え単量体ヒトCCL2及び組換え単量体ヒトCCL8へのpH依存性結合を、Bi
acore T200装置（GE Healthcare）を使用して37℃で評価した。
アミンカップリングキット（GE Healthcare）を製造者の推奨設定に従っ
て使用して、CM4センサーチップの各フローセルに抗ヒトFc（GE Healthcare）
を固定化した。抗体及び検体をACES pH7.4又はpH5.8の緩衝液（
20mM ACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween 20、0.005% NaN3）
に希釈した。抗体を抗Fcセンサ表面上に捕捉し、次
いで組換え単量体ヒトCCL2を8nM濃度でフローセル上に注射した。抗体に対
する分析物の会合相を120秒間モニターし、続いて解離相を180秒間モニター
した。センサ表面を3M MgCl₂を用いて各サイクルで再生した。結合センサー
グラムを、捕捉レベルに対する結合応答の正規化によってTIBCO Spofireによ
って処理した。

20

30

【0390】

pH7.4で形成された抗体／抗原複合体のpH依存性解離の評価を、修正されたBi
acoreアッセイによって確認した。簡潔には、pH5.8での更なる解離相を、pH
7.4での解離相の直後にBiacoreアッセイに組み込んだ。結合センサーグラム
を、捕捉レベルに対する結合応答の正規化によってTIBCO Spofireによ
って処理した。

【0391】

組換えヒトCCL8 P8Aモノマーの発現及び精製：野生型ヒトCCL8の配列は
、Genbank（NCBI：NP_005614.2）から入手した。単量体CCL8
を作製するために、成熟CCL8タンパク質の位置8のプロリンをアラニンに変異させた
。Expi 293細胞（Life tech）を製造者の説明書に従ってトランスフェク
トした。CCL8野生型及びP8A単量体タンパク質を、SP-Sepharose H
P（GE Healthcare）及びSuperose 200サイズ排除（GE H
ealthcare）クロマトグラフィーを使用する陽イオン交換クロマトグラフィー
によって細胞培養上清から同じ方法を使用して精製した。簡潔には、細胞培養上清をMil
liQ水（Millipore）で2.5倍希釈し、PBSで平衡化したHi-Trap
SP-HPカラムにロードし、平衡化緩衝液で洗浄し、0～2M NaClの勾配を用い
て溶出した。溶出したタンパク質画分をプールし、20mMヒスチジン、150mM Na
Cl、pH6.0で平衡化したHiLoad 16/600 Superose 20
0（GE Healthcare）カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィーによ

40

50

って更に精製した。画分をサイズ排除クロマトグラフィー及びSDS-PAGEによって分析した。CCL8タンパク質を含有する画分をプールし、濃縮し、 -80°C で保存した。

【0392】

ヒトCCL8は、CCL2と高度の相同性を共有し、CCR2にも結合することができる。11K2アームはCCL8に結合することができるので（図1参照）、CCL8を中和する可能性のあるオフターゲット効果を回避するために、この結合を減少させる変異を同定することが必要であった。さらに、11K2アーム上のCCL8結合の除去は、CCL2との免疫複合体の効率的な形成に重要である。CNTOアームはCCL8に結合しないので、11K2アームへのCCL8の結合は、CCL2との免疫複合体形成を妨害し、血漿からのCCL2のクリアランス速度を低下させ得る。

10

【0393】

11K2のヒトCCL8への結合を低下させ、ヒトCCL2に対する選択性を付与する変異を同定するために、いくつかのCDR位置を、例えば、CKLO02の11K2 VHにおけるD101E及びCKLO03の11K2 VLにおけるW92Rのように置換して、huCCL8に対する交差反応性を除去した。図6に示されるように、バイパロットピックCrossmabにおけるCCL8結合は、11K2を操作することによって著しく減少させることができた。CKLO01バリエーションは、CCL8結合を減少させるように最適化されなかったが、CKLO04、CKLO03、及びCKLO02は、CCL8結合を減少させる変異を含む。4つ全てのCrossmabは、CCL8に対するpH依存性結合を有する。

20

【0394】

pH7.4及びpH5.8での組換えCCL2及びCCL8に対する抗CCL2抗体の結合親和性

親CNTO888H/11K2H2、CKLO1、CKLO2及びCKLO3のヒトCCL2及びCCL8への親和性及びpH依存性結合を決定するために、Biacore T200装置（GE Healthcare）を使用して 37°C で評価した。アミンカップリングキット（GE Healthcare）を製造者の推奨設定に従って使用して、CM4センサーチップの各フローセルに抗ヒトFc（GE Healthcare）を固定化した。抗体及び検体をACES pH7.4又はpH5.8の緩衝液（20mM ACES、150mM NaCl、1mg/ml BSA、0.05% Tween20、0.005% NaN3）に希釈した。抗体を抗Fcセンサ表面上に捕捉し、次いで組換えヒトCCL2 P8Aバリエーション（モノマー）及びCCL8 P8Aバリエーション（モノマー）を、二倍段階希釈によって調製した1.25nM~20nMでフローセル上に注入した。センサ表面を3M MgCl2を用いて各サイクルで再生した。Biacore T200 Evaluationソフトウェア、バージョン2.0（GE Healthcare）を使用してデータを処理し、1:1結合モデルに当てはめることによって結合親和性を決定した。pH7.4及びpH5.8での組換えCCL2及びCCL8に対する抗CCL2抗体の結合親和性を以下の表5に示す。

30

40

50

【表 2 2】

表 5：pH 7.4 及び pH 5.8 での組換え CCL2 及び CCL8 に対する抗 CCL2 抗体の結合親和性

二重特異性抗 CCL2 抗体	ヒト CCL2 に対する KD		ヒト CCL8 に対する KD	
	pH 7.4	pH 5.8	pH 7.4	pH 5.8
CNT08888/11k2	1.28E-11	2.35E-13	1.47E-09	1.75E-09
CKLO1	7.39E-12	9.32E-09	2.33E-08	n. d.
CKLO2	4.32E-12	n. d.	n. d.	n. d.
CKLO3	6.85E-12	2.17E-08	n. d.	n. d.

注：n. d. KD は、低い結合応答のために決定することができない。

【0395】

表 5 のデータは、pH 7.4 での CCL8 への結合が CKLO2 及び CKLO3 については無効にされたが、CCL2 については pH 7.4 での強い親和性及び pH 依存性結合を維持したことを示す。結果は、CNT0888 及び 11K2 に基づく親二重特異性抗体の可変領域及び CDR に導入された異なる修飾が、pH 7.4 で親 Ab と比較して CCL2 に対する結合親和性が増強された親和性成熟バリエーション、CKLO1、CKLO2、CKLO3 の生成に成功したことを示す。同時に、CKLO1、CKLO2、CKLO3 は、CCL2 への強い pH 依存性結合を示した。pH 5.8 での KD 値と比較して、CCL2 に対する結合親和性の 1000 倍を超える弱い KD が pH 7.4 で観察された。

【0396】

野生型ヒト CCL2 のクリアランス

pH 依存性二重特異性抗体が野生型ヒト CCL2 のクリアランスを増強する能力を評価するために、抗 CCL2 モノパラトピック抗体 (20 mg/kg) 及び野生型ヒト CCL2 (0.1 mg/kg) からなる予め形成された免疫複合体を 10 ml/kg の単回用量で SCID マウスの尾静脈に投与した。投与の 5 分後、1 時間後、4 時間後、7 時間後、1 日後及び 7 日後に血液を採取した。血清を測定まで -80℃ 以下で保存した。試験した Crossma b 抗体は、親 CNT0888/11K2、及び 4 つの pH 操作バリエーション、CKLO01、CKLO02、CKLO03、及び CKLO04 であった。全ての抗体は IgG1 野生型 Fc 部分を有していた (変異なしで Fc (ガンマ) 受容体結合をサイレンシング/消失させた)。マウス血清中の総ヒト CCL2 及び抗 CCL2 抗体濃度の測定を上記のように行った (表 4 の「マウスにおけるバイパラトピック抗体を用いたヒト CCL2 免疫複合体掃攻の評価」の下で)。

【0397】

結果を図 7a に示す：hCCL2 及び二重特異性抗 CCL2 抗体 (親 CNT0888/11K2 及び pH 依存性バリエーション CKLO01、CKLO02、CKLO03 及び CKLO04) からなる予め形成された免疫複合体を SCID マウスに注射した後の経時的な hCCL2 の血清濃度。4 つ全ての pH 操作バリエーションは、ヒト CCL2 の迅速なクリアランスを示した。CKLO02、CKLO03 では、ヒト CCL2 は 1 日目までに検出限界未満であった。親 CNT0888/11K2 では、ヒト CCL2 の急速なクリアランスが最初に 1 日目まで観察されたが、その後、ヒト CCL2 のクリアランスは遅かった。

【0398】

実施例 B-3 改変された可変ドメイン及び CDR (イオン依存性/pH 依存性結合) 及び Fc 媒介掃攻を有する抗 CCL2 抗体

掃攻技術による二重特異性抗 CCL2 抗体の修飾

二重特異性抗 CCL2 抗体を、掃攻技術を使用して改変して、二重特異性抗 CCL2 抗体が遊離 CCL2 を長期間にわたって消失させて、in vivo での抗がん有効性及び抗炎症有効性のような生物学的効果を持続させることを可能にした。

【0399】

掃攻の概念は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる Igawa et al, Immunological Reviews 270 (2016) 132-151、国際公開第2012/122011号、国際公開第2016/098357及び国際公開第2013/081143号に記載されている。

【0400】

pI Fc媒介掃攻

pH操作されたバイパルトピック抗体が *in vivo* で CCL2 クリアランスを加速することができることを実証したので、本発明者らは次に、pI増加置換を有する抗体が野生型ヒト CCL2 のクリアランスを増強する能力を評価した。抗 CCL2 モノパルトピック抗体 (20 mg/kg) 及び野生型ヒト CCL2 (0.1 mg/kg) からなる予め形成された免疫複合体を、10 ml/kg の単回用量で SCID マウスの尾静脈に投与した。投与5分後、30分後、1時間後、2時間後、4時間後、7日後に採血した。血清を測定まで -80 °C 以下で保存した。試験した Crossmab 抗体は、IgG1 を含む親 CKLO03、及び pI 増強 Fc を含む CKLO03、CKLO03-SG1099 であった。マウス血清中の総ヒト CCL2 及び抗 CCL2 抗体濃度の測定を上記のように行った (表4の「マウスにおけるバイパルトピック抗体を用いたヒト CCL2 免疫複合体掃攻の評価」の下で)。

【0401】

結果を図7bに示す：hCCL2 及び CKLO03 (IgG1 野生型 Fc を含む) 及び CKLO03-SG1099 (pI Fc が増強された CKLO03) からなる予め形成された免疫複合体を SCID マウスに注射した後の経時的な hCCL2 の血清濃度。Fc 置換 Q311R/P343R (EU カバットナンバリング) を含む CKLO03-SG1099 は、IgG1 を含む CKLO03 と比較して、ヒト CCL2 のより速いクリアランス/減少を示した。これは、pI 増加変異を有する pH 依存性バイパルトピック抗体が CCL2 のクリアランスを加速し得ることを実証する。

【0402】

Fc ガンマRIIb 増強 Fc バリエーション及び更なる Fc 修飾を有するバイパルトピック抗 CCL2 抗体の作製

この例では、CCL2 クリアランスを増強するための Fc 工学が示されている。

【0403】

国際公開第2013/125667号では、可溶性抗原のクリアランスが、Fc ガンマRIIb に対する親和性の増加を示す Fc ドメインを含む抗原結合分子 (例えば、抗体) の投与によって増強され得ることが実証されている。さらに、ヒト Fc ガンマRIIb に対する結合の増強を示すことができる Fc バリエーションは、国際公開第2012/115241号及び国際公開第2014/030728号に示されている。これらの Fc バリエーションは、ヒト Fc ガンマRIIb に対する選択的に増強された結合及び他の活性 Fc ガンマ受容体 (Fc ガンマR) に対する減少した結合を示すことができることも示されている。Fc ガンマRIIb 結合のこの選択的増強は、可溶性抗原のクリアランスだけでなく、望ましくないエフェクター機能及び免疫応答のリスクの低減にも有利であり得る。

【0404】

抗体薬物の開発のために、薬物が薬理的に活性である非ヒト動物において有効性、薬物動態及び安全性を評価すべきである。それがヒトにおいてのみ活性である場合、代理抗体の使用などの代替アプローチを考慮しなければならない (Int. J. Tox. 28: 230-253 (2009))。しかしながら、非ヒト動物における Fc ガンマR の発現パターン及び/又は機能は必ずしもヒトと同じではないので、代理抗体を使用してヒトにおける Fc 領域と Fc ガンマR との間の相互作用の影響を正確に予測することは容易ではない。抗体薬物の Fc 領域は、非ヒト動物、特にヒトに近い Fc ガンマR の発現パターン及び機能を有するカニクイザルに対して交差反応性を有するべきであり、その結果、非ヒト動物で得られた結果をヒトに外挿することができる。

【0405】

二重特異性抗 C C L 2 抗体の以下の I g G 1 定常ドメイン / F c バリエーションを、F c 部分 (E U K a b a t ナンバリング) の位置に突然変異を有するように作製した (C r o s s m a b として)。

S G 1 0 9 5 - 突然変異を含む I g G 1 由来 (K a b a t E U ナンバリング) :

- L 2 3 5 W / G 2 3 6 N / H 2 6 8 D / Q 2 9 5 L / A 3 3 0 K / K 3 2 6 T (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している) ;

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している) ;

- N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

S G 1 0 9 9 - 変異を含む I g G 1 由来 (K a b a t E U ナンバリング) :

Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している)

S G 1 1 0 0 - 突然変異を含む I g G 1 由来 (K a b a t E U ナンバリング) :

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するために p I を増加させるのに適している) ;

- N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

G G 0 1 - 突然変異を含む I g G 1 由来 (K a b a t E U ナンバリング) :

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している) ;

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している) ;

- N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

G G 0 2 - 変異を含む I g G 1 由来 (K a b a t E U ナンバリング) :

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している) ;

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している) ;

- M 4 2 8 L / N 4 3 4 A / Y 4 3 6 T (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

G G 0 3 - 突然変異 (K a b a t E U ナンバリング) を含む I g G 1 由来 (S G 1 - I g G 1 アロタイプ) :

- L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している) ;

- Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している) ;

- N 4 3 4 A (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

- Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

G G 0 4 - 突然変異 (K a b a t E U ナンバリング) を含む I g G 1 由来 (S G 1 -

10

20

30

40

50

I g G 1 アロタイプ) :

— L 2 3 4 Y / P 2 3 8 D / T 2 5 0 V / V 2 6 4 I / T 3 0 7 P / A 3 3 0 K (ヒト F c g R I I b に対する親和性の増加及び他のヒト F c g R に対する親和性の減少に適している) ;

— Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R (抗原の取り込みを増強するための等電点 (p I) を増加させるのに適している) ;

— M 4 2 8 L / N 4 3 4 A / Y 4 3 6 T (抗体のより長い血漿半減期のために F c R n に対する親和性を増加させるのに適している) ; 及び

— Q 4 3 8 R / S 4 4 0 E (リウマチ因子結合の抑制に適している)

【 0 4 0 6 】

改変された可変ドメイン及び C D R (イオン依存性 / p H 依存性結合) を有する二重特異性抗 C C L 2 抗体の機能的特性評価、及び F c 媒介掃攻の有無

C r o s s m a b フォーマットにおける C K L O 2 の F c バリエーション S G 1 0 9 5 、 G G 0 1 、 G G 0 2 、 G G 0 3 / 0 4 の S P R 結合

B i a c o r e 8 K 機器での S P R アッセイにおいて、p H 7 . 4 及び 5 . 8 での 4 つの異なる抗体 P 1 A D 8 3 2 5 (C K L O 2 - S G 1 0 9 5) 、 P 1 A F 8 1 3 7 (C K L O 2 - G G 0 1) 、 P 1 A F 8 1 3 9 (C K L O 2 - G G 0 2) 及び P 1 A F 8 1 4 0 (C K L O 2 - G G 0 3 / 0 4) への単量体ヒト及びカニクイザル C C L 2 の結合を調べた。

【 0 4 0 7 】

この設定では、C a p t u r e S e l e c t (商標) H u m a n F a b - k a p p a (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を、アミンカップリング法を使用して C M 3 センサーチップ上に固定化し、多様な抗体をリガンドとして捕捉し、測定を、0 n M 、1 0 n M 、1 0 0 n M 及び 1 0 0 0 n M の単量体ヒト及びカニクイザル C C L 2 をアナライトとして 2 つの異なる p H 値で行った。

【 0 4 0 8 】

C K L O 2 - S G 1 0 9 5 、 C K L O 2 - G G 0 1 、 C K L O 2 - G G 0 2 、 C K L O 2 - G G 0 3 / 0 4 は、1 0 、1 0 0 及び 1 0 0 0 n M で結合し、p H 7 . 4 で等しく速く解離する単量体ヒト及びカニクイザル C C L 2 とほぼ同一の結合プロファイルを示すが、p H 5 . 8 では安定した結合は観察されなかった。結果を下表に示す。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表：CKLO2-SG1095、CKLO2-GG01、CKLO2-GG02、CKLO2-GG03/04のモノマーヒトCCL2及びカニクイザルCCL2への結合は、モノマーヒトCCL2及びカニクイザルCCL2へのほぼ同一の結合プロファイルを示す。

抗体	抗原	pH7.4でのR _{max} (RU)	pH7.4における t _{1/2} (s)	pH5.8における R _{max} (RU)	pH5.8における t _{1/2} (s)
CKLO2-GG01	単量体ヒトCCL2	15.9	6.18	29.8	3.29
CKLO2-GG02	単量体ヒトCCL2	16.8	4.04	28.8	3.29
CKLO2-GG03/04	単量体ヒトCCL2	17.6	5.90	29.6	3.24
CKLO2-SG1095	単量体ヒトCCL2	19.0	5.49	35.3	3.51
CKLO2-GG01,	単量体カニクイザルCCL2	16.5	7.10	30.7	3.22
CKLO2-GG02,	単量体カニクイザルCCL2	17.2	5.97	29.5	3.14
CKLO2-GG03/04	単量体カニクイザルCCL2	17.9	6.48	30.4	3.12
CKLO2-SG1095	単量体カニクイザルCCL2	19.5	6.07	36.0	3.41

【0409】

走化性アッセイ

方法の説明

THP-1細胞を 8×10^5 細胞/mlまで3日間培養した。5000細胞/ウェルの総細胞数をマイクロタイタープレートの上部チャンバーに播種し、37℃で静置させた。抗CCL2抗体（代理抗体を試験するためにアッセイを実施したとき、組換えmuCCL2を代わりに100ng/mlで使用した）の存在下及び非存在下で、組換えhuCCL2を最終濃度50ng/mlで底部チャンバーにピペットで入れた。気泡の形成を回避して上部及び底部チャンバーを合わせ、次いで、プレートを37℃で24時間インキュベートした。遊走細胞を、製造業者の推奨に従ってCell Titer Glo法によって定量化し、Tecan Infinite 200リーダーを用いて発光を測定した。

【0410】

結果を図8に示す：走化性アッセイ：同一のCDR及び可変領域VH/VL、すなわちCKLO2-IgG1野生型及びCKLO2-SG1095を有するが異なるFc部分を有する二重特異性抗CCL2抗体は、同一の効力でTHP-1細胞の遊走を阻害することができる（IC₅₀=0.2μg/ml；図8、左パネル）。

【0411】

同様に、pH非依存性である、CKLO2の親VH/VL非修飾二重特異性抗体CNT0888/11k2であるCCL2-0048もまた、pH依存性が抗原掃攻に重要であるため、0.2μg/mlのIC₅₀を示し、このアッセイでは起こらない現象である。

【0412】

対応するモノパルトピック抗体CNT0888 IgG1及びヒト化11k2 IgG1は、それぞれ0.3及び0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のIC₅₀値を示すが、huIgG1アイソタイプコントロールは阻害を示さない（図8、右パネル）。

【0413】

更なる類似の実験では、CKLO2-GG01（0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、CKLO2-GG02（0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、及びGG03/GG04（0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のIC₅₀値を決定した。

【0414】

遺伝子改変マウスモデルにおけるIn vivo生物学的活性

10

材料及び方法

B16-huCCCL2/CCCL2ヌルモデル

本モデルは、免疫適格腫瘍担持マウスにおいてマウスCCCL2の干渉なしに抗ヒトCCCL2抗体を試験することを目的として生成された。このために、マウス腫瘍細胞株B16-F10は、mCCCL2を分泌せず、CCCL2ノックアウトマウスの遺伝的背景であるC57/B16株のマウスにおいてin vivoで増殖することが知られているので選択した。

【0415】

huCCCL2を発現するB16F10腫瘍細胞の安定なプールを作製するために、それらをhuCCCL2をコードするプラスミドDNA及びハイグロマイシン-B選択カセットでトランスフェクトした。したがって、細胞を増殖培地（DMEM+10% FCS+2mM L-グルタミン）中 2.0×10^5 細胞/ウェルの6ウェルプレートに播種した。24時間後、Opti-MEM培地中のウェルあたり1 μg のDNA及びリポフェクタミン2000で構成されるトランスフェクションミックスを細胞に添加した。続いて、ハイグロマイシン-B（0.5mg/ml）を含む培地で細胞を選択した。20日間の培養後、生存単一細胞を、BD FACS Aria IIIを使用してFSC/SSC散乱に基づいて選別した。12日後、単一細胞クローン由来の細胞培養上清を、野生型B16F10細胞（データ示さず）と比較して、ebioscience製ELISA Ready-SET-Go（カタログ番号88-7399-86）を使用してヒトCCCL2の発現についてスクリーニングした。

20

30

【0416】

選択されたB16-F10_HOMSA_CCL2腫瘍細胞クローン1A5、2A3及び2B2を、10% FCS及び2mM L-グルタミン（PAN Biotech GmbH、ドイツ）を含有するDMEM中、37℃、水飽和雰囲気、5% CO₂でルーチンに培養した。培養継代は、トリプシン/EDTA 1×（PAN Biotech GmbH、ドイツ）を週に2回分割して行った。

【0417】

到着時7～10週齢の雌B6.129S4-Ccl2tm1Rol/Jマウス（Jackson Laboratories）にB16-F10_HOMSA_CCL2腫瘍細胞クローンを接種した：その日（試験0日目）に、腫瘍細胞を培養フラスコから採取し、培養培地に移し、1回洗浄し、PBSに再懸濁した。細胞数は、細胞計数装置及び分析装置システム（Vi-CELL、Beckman Coulter）を使用して決定した。皮下用注射細胞力価を 1×10^7 細胞/mlに調整し、100 μl をマウスの右側腹部に、冷却した

40

【0418】

1.0ml ツベルクリンシリンジ（Dispomed、ドイツ）及び小型針（0.45×1.2mm）。小動物用吸入ユニットにてイソフルラン（CP Pharma、ドイツ）による全身麻酔下で細胞接種を行った。

【0419】

腫瘍成長を毎日モニタリングし、腫瘍がB16-F10_HOMSA_CCL2腫瘍細胞

50

胞クローン1 A 5 及び2 A 3 について約1 0 0 0 mm³に達した（この時点で、2 B 2 腫瘍は成長速度が遅いため約6 0 0 mm³であった）研究1 5 日目にマウスを 殺した。エンドポイントで、上記のように、C C L 2 測定のために血液試料を採取し、腫瘍を外植し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0 4 2 0】

マウス免疫細胞は全ての腫瘍に浸潤することが見出され、ヒトC C L 2 がマウスC C R 2 + 細胞を引き寄せることができるという考えが確認された。B 1 6 - F 1 0 _ H O M S A _ C C L 2 腫瘍細胞クローン1 A 5 は、最も高いC D 4 5 + 総浸潤を示し、最も高い相対m M D S C（単球性骨髄由来サプレッサー細胞）組成を有していた（図2）。2 A 3 細胞は1 A 5 細胞と同様のレベルの血清総C C L 2 をもたらしたが、クローン2 A 3 及び2 B 2 は腫瘍中の免疫細胞の頻度がより低かったが、2 B 2 クローンは有意に低いC C L 2 血清濃度を示した（データは示さず）。

10

【0 4 2 1】

雌性B 6 . 1 2 9 S 4 - C c l 2 t m 1 R o l / J マウスに、上記のように、B 1 6 - F 1 0 _ H O M S A _ C C L 2 腫瘍細胞クローン1 A 5 を接種した。

【0 4 2 2】

試験群の処置は細胞接種の5 日後に開始した。群1 はヒトI g G ビヒクル対照処置を受けたが、群2 及び群3 は、M a b C K L O 2 - I g G 1（F c 野生型I g G 1）及びC K L O 2 - S G 1 0 9 9（（変異Q 3 1 1 R / P 3 4 3 R（K a b a t E U ナンバリング）を有するI g G 1に基づくC K L O 2 p I 増強F c）をそれぞれ3 m g / k g、7 m g / k g で9 日間、毎日、i . p . 処置された。試験1 4 日目に、マウスを 殺し、腫瘍を外植した。酵素消化及び細胞ストレーナーを使用して、フローサイトメトリーによって非プールで分析される各腫瘍塊から単一細胞懸濁液を生成した。目的の免疫細胞集団の検出のために、以下のマーカー及び蛍光色素を使用した：C D 4 5 - B U V 3 9 5、C D 1 1 b - B U V 7 3 7、F 4 / 8 0 - B V 4 2 1、C D 1 1 c - B V 6 0 5、L y 6 C - A F 4 8 8、L y 6 G - P e r C P - C y 5 . 5、C D 2 0 6 - B V 7 1 1、C D 4 - B V 5 1 0、C D 8 a - A P C - H 7、N K 1 . 1 - P E - C y 7、C D 2 7 9 - A P C 及びC D 2 7 4 - P E。試料をB D L S R - F o r t e s s a フローサイトメーターで取得し、B D D i v a S o f t w a r e を使用して分析した。

20

【0 4 2 3】

総h u C C L 2 及び遊離h u C C L 2 を測定するために、試験6、8、1 1 及び1 4 日目に血清試料を採取した。

30

【0 4 2 4】

遊離C C L 2 を検出する方法は、以下の「カニクイザルにおけるC C L 2 掃攻効率の概念実証研究」に詳細に記載されている。この研究における遊離ヒトC C L 2 の分析のために、組換えカニクイザルC C L 2 を組換えヒトC C L 2 に置き換えてキャリブプレート及びQ C を調製した。

【0 4 2 5】

総C C L 2 血清試料を、検証されていないが適格な特異的サンドイッチE L I S A で分析した。簡単に説明すると、ビオチン化抗C C L 2 捕捉抗体（C N T O 8 8 8 C C L 2 - 0 0 0 4）、ブロッキング緩衝液、前処理した試験試料及び検出試薬（ジゴキシゲニン化抗C C L 2 抗体（M - 1 H 1 1 - I g G））を3 8 4 ウェルストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートに段階的に添加し、各工程で非激しいシェーカー上で1 時間インキュベートした。前処置工程試料中でC C L 2 - 薬物複合体を解離させるために、キャリブプレート及びQ C をp H 5 . 5 で3 7 °C にて1 0 分間酸性化した。酸性化試料をS A - M T P に添加した。固定された免疫複合体の検出のために、ポリクローナル抗ジゴキシゲニン- P O D コンジュゲートを加え、プレートを6 0 分間インキュベートした。各工程後にプレートを3 回洗浄して未結合物質を除去した。

40

【0 4 2 6】

A B T S をプレートに添加し、振盪しながら室温でインキュベートした。吸収を4 0 5

50

／490nmの波長で測定した。分析ソフトウェアX L F i t (I D B S) を使用して、検量線の応答に基づいてヒトCCL2濃度を計算した。

【0427】

統計学的に分析されるデータセットに応じて、多重比較のためのテューキー検定を用いたt検定及び一元配置ANOVAを適用した。

【0428】

結果

試験終了時に、CKLO2-SG1099 (CKLO2 pI増強Fc) を投与したマウスでは、腫瘍体積及び腫瘍重量が有意に減少した (図9)。腫瘍浸潤物をより詳細に見ると、CCL2遮断時に予想されるように、単球性骨髓由来マクロファージ細胞 (MDSC) の腫瘍浸潤物の減少が明らかになった (図9)。

【0429】

さらに、血清分析により、治療の有効性が確認された：pI最適化は実際にIgG1野生型FcCKLO2分子と比較して総CCL2の蓄積の減少をもたらすが、遊離CCL2 (抗体に結合していない) は検出限界以下で完全に抑制される (図10)。したがって、本モデルは、抗huCCL2バイパトリック掃攻抗体CKLO2-SG1099 (CKLO2 pI増強Fc) を使用して、腫瘍状況におけるCCL2遮断の効果を調べるのに適している。その後の研究では、CKLO2-SG1099 (CKLO2 pI増強Fc) を低用量で週に1回及び2回与え、遊離CCL2抑制の延長を数週間にわたってモニターする最適用量レジメンを調査する。さらに、このモデルでは、T細胞活性化療法 (すなわち、T細胞の二重特異性、PD-L1遮断) との組み合わせも検討されている。

【0430】

更なる類似の実験では、CKLO2-SG1095、CKLO2-GG01、GG02及びGG03／GG04のような他のバリエーションを分析する。

【0431】

カニクイザルにおけるCCL2掃攻効率の概念実証 (POC) 研究

方法. この研究の主な目的は、カニクイザルにおける4つの抗CCL2 (MCP-1) 抗体のCCL2抑制及び掃攻効率の延長を評価することであった。二次目的は、これらの抗体の薬物動態 (PK) 特性を評価することであった。全ての抗体を25mg/kgの単回IV注入として30分間にわたって3～4歳の雄動物に投与し、総CCL2及び抗体濃度を70日間にわたって血清中で測定した。調査した抗CCL2抗体は、対照抗体 (群1及び2) 並びにCCL2-薬物複合体の除去を増強するように特異的に操作された抗体を含んでいた (以下、抗原掃攻及び単に掃攻と呼ぶ)。群1：CNT0888-SG1 (= IgG1野生型) 抗CCL2抗体 (n=3動物) (最大総CCL2蓄積の対照として) ; 群2：pH依存性標的結合を有するがFc改変を有さないバイパトリック抗CCL2抗体CKLO2-SG1 (IgG1野生型) (n=3) ; 群3：pH依存性標的結合及びFc-pI並びに更なる改変を有するバイパトリック抗CCL2抗体CKLO2-SG1100 (n=4) 、及び、群4：pH依存性標的結合、Fc-pI及びFcγRII並びに更なる改変を有するバイパトリック抗CCL2抗体CKLO2-SG1095 (n=4) 。

【0432】

この試験では、抗体の総血清濃度、全標的 (遊離及び抗体結合CCL2) 及び遊離標的を定量した。さらに、抗薬物抗体 (ADA) の存在を評価した。抗体、総CCL2及び遊離CCL2プロファイルを、Phoenix 64 (Pharsight/Certara) を使用したノンコンパートメント分析によって分析し、GraphPad Prism v. 6.07 (GraphPad Software) を用いてデータを示した。

【0433】

抗体については、一般的なヒトサンドイッチELISA法を用いて血清試料を分析した。サル血清中の総抗体濃度をELISAで測定した。2µg/mLの抗ヒトκ鎖抗体をmaxisorp 96ウェルプレートに一晩固定した後、ブロッキング緩衝液中で30℃

で2時間インキュベートした。抗体検量線試料、品質管理試料及びサル血清試料をプレート上で30℃で1時間インキュベートした後、洗浄した。次に、抗ヒトIgG-HRPを添加し、30℃で1時間インキュベートした後、洗浄した。ABTS基質を10、20及び30分間インキュベートした後、405nmのマイクロプレートリーダーで検出した。分析ソフトウェアSOF Tmax PRO (Molecular Devices) を使用して、検量線の応答に基づいて抗体濃度を計算した。

【0434】

総CCL2血清試料を、検証されていないが適格な特異的サンドイッチECL法アッセイで分析した。3µg/mLの抗CCL2抗体(r2F2-SG1)をMULTI-ARRAY 96ウェルプレート(Meso Scale Discovery)に一晩固定化した後、ブロッキング緩衝液中で30℃にて2時間インキュベートした。カニクイザルCCL2検量線試料、品質管理試料及び希釈したカニクイザル血清試料をpH5.5の酸緩衝液と共に37℃で10分間インキュベートした。その後、試料を抗CCL2固定化プレート上で30℃で1時間インキュベートした後、洗浄した。次に、SULFO TAG 標識MCP-1抗体を添加し、30℃で1時間インキュベートした後、洗浄した。読み出し緩衝液T(x4)(Meso Scale Discovery)を直ちにプレートに加え、SECTOR Imager 2400(Meso Scale Discovery)によってシグナルを検出した。分析ソフトウェアSOF Tmax PRO (Molecular Devices) を使用して、検量線の応答に基づいてカニクイザルCCL2濃度を計算した。

【0435】

Gyrolab Xploreで実行される、検証されていないが適格なGyrolab(商標)イムノアッセイを用いて、遊離CCL2血清試料を分析した。ビオチン化抗CCL2抗体(M-2F6-IgG)を捕捉試薬として使用し、検出のためにAlexa 647標識抗CCL2抗体(M-1H11-IgG)を選択した。両方の試薬をPBS、0.1%Tween、1%BSA中、1µg/mLに希釈し、96ウェルPCRプレート(Fisher Scientific)に移した。カニクイザルCCL2検量線試料、QC及び未希釈血清試料も96ウェルPCRプレートに移した。両方のプレートを、Gyrolab Bioaffy 200nLディスク(Gyros Protein Technologies AB)と共に機器にローディングした。3段階アッセイプロトコル(200-3W-001)を選択した。簡潔には、プロトコルは、Gyrolab Bioaffy 200ディスクの指定されたストレプトアビジンカラムへの捕捉試薬、試料及び検出試薬の連続的な添加を記載する。各試薬は、短いスピニング工程がディスクに適用された後、同時にカラムに到達する。各工程後にカラムをPBS 0.05%Tweenで洗浄し、最後にレーザー誘起蛍光値を装置内で記録した。XL Fitソフトウェア(IDBS)を使用して、検量線の応答に基づいて遊離カニクイザルCCL2濃度を計算した。

【0436】

ADAを、他の箇所に記載される方法(Stubenrauch et al., 2010)を使用して分析した。要約すると、ビオチン化mAb抗ヒトFcγR1 0Z8E9を0.5µg/mLの濃度でストレプトアビジン被覆高結合プレートに結合させ、1時間インキュベートした。試料及び標準をアッセイ緩衝液で5%カニクイザル血清に希釈し、洗浄後にコーティングプレートの各ウェルに添加し、振盪しながら1時間インキュベートした。洗浄後、0.1µg/mLのジゴキシゲニン化抗カニクイザル(カニクイザル)IgGを添加し、振盪しながら1時間インキュベートした。洗浄後、25mU/mLのポリクロナル抗ジゴキシゲニン-HRPコンジュゲートを添加し、振盪しながら1時間インキュベートした。ABTSをプレートに添加し、振盪しながら室温で10分間インキュベートした。吸収を405/490nmの波長でマイクロプレートリーダーによって測定した。分析ソフトウェアSOF Tmax PRO (Molecular Devices) を使用して、検量線の応答に基づいてADA濃度を計算した。

【0437】

結果、動物が ADA を含まない期間（すなわち、14日目より前に）中に PK 挙動を評価した。この期間中、全ての抗 CCL2 抗体の血清濃度－時間プロファイルは類似しており（図11の左パネルを参照）、部分平均 AUC 値（ AUC_{0-7d} ）は、群1、群2、群3及び4についてそれぞれ、異なる群間 1490、1810、1210及び1320日 $\mu g/mL$ で同等であった。。同様に、平均 C_{max} 値は、群1、2、4及び4についてそれぞれ 620 $\mu g/mL$ 、764 $\mu g/mL$ 、616 $\mu g/mL$ 及び 664 $\mu g/mL$ の値と同等であった。ADA 発達の程度は、動物と群との間で非常に可変的であり、7日目を超えて非常に可変的な PK プロファイルをもたらした（データ示さず）。群2の1匹の動物は、70日間の観察期間全体を通して ADA 陰性であった（図11の右パネルを参照）。この動物では、抗 CCL2 抗体のクリアランス、分布容積及び最終半減期を、それぞれ 7.34 mL / (日・kg)、76.2 mL / kg 及び 10.9 日間の非コンパートメント分析によって推定した。

10

【0438】

血清中の CCL2 のベースラインレベルを、抗体処置を開始する前に各動物について評価した。基礎 CCL2 レベルは 0.126～0.357 ng/mL の範囲であった（幾何平均（%CV）：0.199 ng/mL（32.2%、N=14））。遊離形態の CCL2 は、抗体結合形態の CCL2 よりも除去率が高いため、抗体処置後の総 CCL2 血清濃度の増加が予想された。これは実際に全ての群で観察され（図12左パネル）、全ての抗体による標的の関与を実証した。処置下で、総 CCL2 の C_{max} 値は、群1、2、3及び4についてそれぞれ 824、575、106、32.7 ng/mL に増加した。 AUC_{0-7d} 値は、群1、2、3及び4についてそれぞれ 3060、2970、522及び181日 ng/mL であった。動物が ADA 陰性であった期間中、モル薬物濃度は総 CCL2 濃度を越えたままであった。2つの掃攻抗 CCL2 抗体（群3及び4）は、従来の抗体（群1）と比較して、それぞれ血清 C_{max} 値に基づいて約8倍及び25倍、総 CCL2 の AUC_{0-7d} 値に基づいて約6倍～17倍の総 CCL2 血清濃度のかなりの減少を示した。第2群の ADA 陰性動物は、総 CCL2 濃度の持続的な標的関与（プラトーによって明らか）を示した（図12右パネル）。

20

【0439】

全ての抗体での処置は、血清中の遊離 CCL2 レベルの実質的な低下をもたらした（図13左パネル）が、低下は部分的には最初のものに過ぎなかった。群1では、全ての個体が1日後に再び遊離 CCL2 の定量可能なレベルを有していた。群2では、全ての個体が2日後に再び遊離 CCL2 の定量可能なレベルを有していた。群3及び4では、各群の2名が7日間遊離 CCL2 の抑制を示した。群3では、十分な抗体濃度を維持した中程度の ADA 応答を有する2匹の動物が、21日間検出限界未満の遊離 CCL2 抑制を示した。ADA 陽性動物では、抗体除去が有意に増加し、標的結合の喪失の結果として、CCL2 レベルは元のベースラインに急速に戻った（ここには示さず）。

30

【0440】

更なる類似の実験では、CKLO2-SG1099、CKLO2-GG01、GG02及びGG03/GG04のような他のバリエーションを分析する。

40

【0441】

カニクイザルにおける CCL2 掃攻効率の PK/PD 研究

研究の概要及び目的 PK/PD 研究を、抗 CCL2 抗体 CKLO2-SG1095を使用した POC 研究の結果に基づいて設計した。POC 研究は、高度の抗薬物抗体（ADA）形成を実証したので、ADA 応答を低下させることを意図して、Gazyva（登録商標）（オビニツズマブ）処置を PK/PD 研究に含めた。この目的のために、30 mg/kg 用量の Gazyva を、試験全体を通して4回：－14日目、－7日目、8日目及び36日目に静脈内注入によって投与した。CKLO2-SG1095を、2.5、10及び25 mg/kg の用量レベルで、1日目に30分間にわたって IV 注入として用量群あたり4匹の動物（雄及び雌2/2）に投与した（群1～3）。比較のために、従来の抗 C

50

C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8 - I g G 1) を、1 日目に 3 0 分間にわたって I V 注入として 2 5 m g / k g で投与した (群 4 ; 上記の P O C 研究の群 1 と同じ対照)。総 P K (C K L 0 2 - S G 1 0 9 5)、総 C C L 2 及び遊離 C C L 2 濃度を 9 9 日目まで評価した (すなわち、投与後 1 4 週間)。

【0442】

P K / P D 研究の目的は、非ヒト霊長類における従来の抗 C C L 2 抗体 (野生型 I g G 1 F c 部分を有する C N T O 8 8 8) と比較して、長期間にわたる C K L 0 2 - S G 1 0 9 5 の遊離 C C L 2 抑制を実証することであった。

【0443】

方法. この試験では、総 P K 並びに総 C C L 2 及び遊離 C C L 2 を定量した。しかしながら、血清試料中の G a z y v a の存在に起因して、本明細書中に記載される P O C 研究と比較して、総 P K アッセイ、総 C C L 2 アッセイ及び A D A アッセイに対していくつかの修正が行われた。C N T O 8 8 8 I g G 1 については、P K アッセイは開発されなかった。

【0444】

サル血清中の総抗体 C K L 0 2 - S G 1 0 9 5 濃度を E L I S A で測定した。E L I S A のために、ビオチン化組換えヒト C C L 2 (抗原) について、前処置した試験試料、陽性対照標準 (キャリブレタ) 及び Q C (品質管理) 及びジゴキシゲニン化抗ヒト I g G (M - 1 . 1 9 . 3 1 - I g G) を 3 8 4 ウェルストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート (S A - M T P) に連続的に添加した。C C L 2 - 薬物複合体を解離させるために、試験試料の前処置を p H 5 . 5 で 2 0 分間行った。S A - M T P に添加する前に、酸性化した試料を中和した。固定された免疫複合体を、ポリクロール抗ジゴキシゲニン - P O D コンジュゲートを用いて検出した。各工程後にプレートを 3 回洗浄して未結合物質を除去した。A B T S を基質としてプレートに添加し、室温でインキュベートした。吸収を 4 0 5 / 4 9 0 n m の波長で測定した。分析ソフトウェア X L F i t (I D B S) を使用して、検量線の応答に基づいて抗体濃度を計算した。

【0445】

総 C C L 2 血清試料を、検証されていないが適格な特異的サンドイッチ E L I S A で分析した。簡単に説明すると、ビオチン化抗 C C L 2 捕捉抗体*、前処理した試験試料及び検出試薬 (ジゴキシゲニン化抗 C C L 2 抗体 (1 H 1 1 - I g G 1)) を 3 8 4 ウェルのストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートに段階的に添加し、捕捉及び試料工程のために 1 時間、検出試薬のために 5 0 分間、激しく振盪がしていない (n o n - v i g o r o u s) シェーカー上でそれぞれインキュベートした。前処置工程試料中で C C L 2 - 薬物複合体を解離させるために、キャリブレタ及び Q C を p H 5 . 5 で 2 0 分間酸性化した。酸性化試料を S A - M T P に添加した。固定された免疫複合体の検出のために、ポリクロール抗ジゴキシゲニン - P O D コンジュゲートを加え、プレートを 5 0 分間インキュベートした。各工程後にプレートを 3 回洗浄して未結合物質を除去した。

【0446】

A B T S をプレートに添加し、振盪しながら室温でインキュベートした。吸収を 4 0 5 / 4 9 0 n m の波長で測定した。分析ソフトウェア X L F i t (I D B S) を使用して、検量線の応答に基づいてカニクイザル C C L 2 濃度を計算した。* 群 1 ~ 群 3 の分析のための捕捉抗体: 抗 C C L 2 C N T O 8 8 8 I g G 1、群 4 の分析のための捕捉抗体: 抗 C C L 2 2 F 2 I g G 1。

【0447】

A D A を 3 8 4 ウェルプレートにおいて架橋サンドイッチ E L I S A でスクリーニングした。群 1、群 2 及び群 3 の動物の試験試料、品質管理試料及び陽性対照を、ビオチン化捕捉抗体 C K L 0 2 - S G 1 0 9 5 及びジゴキシゲニン化検出抗体 C K L 0 2 - S G 1 0 9 5 と共に、2 つの更なる抗 C C L 2 抗体 (2 F 6 - I g G 1 及び 1 H 1 1 - I g G 1) と共に、室温、5 0 0 r p m で、M T P シェーカー上で一晚インキュベートし、これらの抗体を添加して C C L 2 を中和した。群 4 の動物の試料には、ビオチン標識 C N T O 8 8

8-SG1及びジゴキシゲニル化CNTO888-SG1をそれぞれ使用した。形成された免疫複合体をストレプトアビジン(SA)被覆MTPに移し、ビオチン標識(Bi)捕捉抗体を介して免疫複合体を固定化した。上清を吸引した後、未結合物質を繰り返し洗浄することによって除去した。検出を、抗ジゴキシゲニンPOD(p)コンジュゲート化抗体及びABTS基質溶液の添加によって達成した。反応物の着色強度を測光的に決定した(405nm~490nm基準波長での吸収)。シグナルがプレート特異的切断点を上回ることが判明した場合、試料をADA陽性と定義した。このカットポイントは、アッセイ適格化中に定義した。

【0448】

結果、Gazyva(登録商標)(オビニツズマブ)前処置にもかかわらず、CKL02-SG1095処置動物12匹中10匹及びCNTO888処置動物4匹中1匹がADAを発症し、薬物及びバイオマーカー濃度に影響を及ぼした。しかし、CKL02-SG1095の2匹のADA陰性動物は25mg/kg用量群であり、CNTO888群のADA陰性動物と直接比較することができた。動物がADAを含まない期間(すなわち、10日目より前に)中にPK挙動を評価した。CKL02-SG1095についての3つの異なる用量群のPKプロファイルを図14の左パネルに示す。部分平均AUC値(AUC_{0-7d})は、それぞれ用量レベル2.5、10及び25 mg/kgに対して、229/191(雄/雌)、696/813及び1492/1346日μg/mLであった。C_{max}値は、用量レベル2.5、10及び25mg/kgに対して、それぞれ115/122(雄/雌)、369/491及び869/941μg/mLであった。最高用量レベルでは、これらの所見はPOC研究と一致する。2匹のADA陰性動物について、CKL02-SG1095のクリアランス、分布量及び最終半減期を、それぞれ10.5~17.4mL/(日・kg)、116~118mL/kg及び5.8~11.6日の非コンパートメント分析によって推定した(図14の右パネルを参照)。

【0449】

上記のPOC研究に関して、抗CCL2抗体で処置すると、総CCL2蓄積が観察された(図15左パネルを参照)。CCL2のベースラインレベルを薬物投与前に5回(Gazyva(登録商標)(オビニツズマブ)処置前の1回を含む)評価した。平均CCL2ベースライン値は0.742ng/mLであり、(登録商標)(オビニツズマブ)処理は基礎CCL2レベルに影響を及ぼさなかった。総CCL2蓄積の程度(括弧内の値は、個々のベースラインからの中央倍数変化を示す)は、用量及びコンストラクト依存性であった。CKL02-SG1095の場合、総CCL2レベルは、2.5、10及び25mg/kg用量レベルで22.4(22)、67.2(105)及び54.9(76)ng/mL(4匹の動物の中央値)に増加した。CNTO888 IgG1の場合、総CCL2レベルは1490(3160)ng/mLに増加した(4動物の中央値)。群3と群4のADA陰性動物の比較は、CNTO888と比較して、CKL02-SG1095の蓄積レベルがかなり低いことを示した(図15右パネル)。

【0450】

全ての研究群の処置は、血清中の遊離CCL2レベルの実質的な一過性低下をもたらす(図16左パネルを参照)。典型的には、検出限界(0.01ng/mL)未満である。全てのADA陽性動物について、遊離CCL2レベルは、ADA発症後に急速にベースライン値に戻った(薬物曝露の喪失及び迅速な標的代謝回転と一致する)。ADA陰性動物(群3では2/4)及び(群4では3/4)については、研究期間を通して遊離CCL2抑制の期間を評価することができた。従来の抗体CNTO888(群4)では、CCL2抑制の持続時間は短く、これはおそらく総標的の広範な蓄積によるものであった(図15)。薬物濃度は定量化されなかったが(CNTO888について利用可能な特異的アッセイはない)、POC研究は、CNTO888とCKL02-SG1095との間で同様のPK特性を示唆している。一方、群3の2匹のADA陰性動物では、長期持続性の遊離CCL2抑制が観察された。1匹の動物について、遊離CCL2レベルは29日間検出限界未満のままであった(図16右パネル)。

【0451】

更なる類似の実験では、CKLO2-SG1099、CKLO2-GG01、GG02及びGG03/GG04のような他のバリエーションを分析する。

【0452】

異なる腫瘍タイプにおけるCCL2の有病率研究

CD163/CD68及びCD14を使用するマクロファージ分析を含む、CCL2及びその受容体CCR2の以下のIHC有病率研究を、6つの異なる適応症の121のヒト適合腫瘍及び血清試料で実施した：

膵臓がん (PaC)

結腸直腸がん (CRC)

乳がん (BC)

前立腺がん (PrC)

卵巣がん (OvC)

胃がん (GC)

以下の質問に対処した：

- これらの腫瘍は（過剰に）CCL2を発現するか？
- これらの腫瘍患者において血中CCL2レベルは上昇しているか？
- 血液と腫瘍CCL2レベルとの間に相関があるか？
- 腫瘍CCL2と浸潤CCR2⁺免疫細胞との間に相関があるか？
- 腫瘍CCL2と浸潤骨髄細胞との間に相関があるか？

【0453】

材料及び方法

組織病理学的スコアリングを半定量的に行った。さらに、自動多重画像解析をCD163/CD68 IHCのために使用し、免疫細胞定量化のためのCD14及びCCR2、並びにCCL2定量化のために試験した。

【0454】

6つの異なる適応症の121個のヒト腫瘍の切除標本のセットに対して免疫組織学的調査を実施した：Indivumed（ハンブルク）及びAsterand（Royston/Herts、英国）によって提供される31の膵臓がん (PaC)、30の結腸直腸がん (CRC)、30の乳がん (BC)、29の前立腺がん (PrC)、20の卵巣がん (OvC)、及び10の胃がん (GC)。腫瘍を4%緩衝ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、2.5 µmの厚さに切断し、Superfrost Plusスライドにマウントした。CCL2に対するマウスモノクローナル抗体（クローン2D8、Novusbio NBP2-22115）を、標準的な染色プロトコル（32' についてのCC1、VBX中の濃度1 µg/mL、Optiview DAB検出システム）に従って、Ventana BXTで使用した。CCR2に対するウサギモノクローナル抗体（E68、Abcam ab32144）を、標準的な染色プロトコル（32' についてのCC1、DS2中の濃度0.8 µg/mL、Omni-Ultra Map HRP DAB検出システム）に従って、Ventana Discovery XTで使用した。単球マーカーCD14（Cell Marque EPR 3653、RTU）に対するマウスモノクローナル抗体を、標準的な染色プロトコル（64' 用CC1、Omni-Ultra Map HRP DAB検出システム）に従って、Ventana Discovery Ultraで使用した。マクロファージ及びM2様TAM（腫瘍関連マクロファージ）CD163/CD68（DAB CD163 Mouse MRQ-26 Cell Marque RTU // red CD68 Mouse PG-M1 Dako）に対する二重染色を、標準的な染色プロトコル（32' についてのCC1、DS2におけるCD163 RTU//CD68濃度0.6 µg/mL、DAB及びRed検出系による検出）に従って、Ventana BXTで使用した。全ての画像は、Ventana iScan HT（登録商標）を使用してスキャンした。組織切片を半定量的に分析した。

10

20

30

40

50

【0455】

1. 結果

CCL2及びCCR2の有病率

分析された全ての腫瘍適応症は、可変レベルのCCL2の上方制御及び可変量のTAM上のCCR2の存在を伴ういくつかの腫瘍を示した（以下の表6）。CCL2及びCCR2の両方について、卵巣がんで最も高い発現が観察され、続いてPDAC及びGCが観察された。

【0456】

腫瘍型特異的特徴

高いMDSC引力及びM2分極の腫瘍増殖増強免疫学的状態に関連する、CCL2－CCR2の高い活性を有する腫瘍は、CCL2遮断療法に対する好ましい腫瘍となる。CCR2 IHCは、MDSC及びM2様マクロファージとの良好な相関を示し、その生物学的役割を確認し、この経路のバイオマーカーとしてCCL2 IHC測定よりも高い関連性を実証した。本研究から結論として、CCL2療法についての以下の推奨事項を要約することができる。

・CCL2及びCCR2の有病率及びM2分極が最も高いため、OvCをCCL2標的療法に推奨することができる。

・PDACは、他の分析された腫瘍型と比較してMDSCの量が最も多いため、並びにCCR2及びM2がかなり高いレベル及び量で存在したため、CCL2標的療法に推奨され得る。CCL2はPDACにおいても高く、他の腫瘍型とは対照的に、腫瘍細胞よりも免疫細胞において並外れて高い存在を示した。PaCは、CCL2／CCR2とMDSC引力／M2分極との間の非常に良好な相関を示した。これらの結果は、分析されたPDACにおいて、CCL2－CCR2の役割が免疫細胞誘引に非常に集中していることを裏付けている。

・BC、特にTNBCは、CCL2標的療法に推奨され得る。BCは、かなり高いレベル及び量のCCL2、CCR2、MDSC及びM2を示した。特に、TNBC症例は、非TNBCよりも多量のM2及びMDSCを特徴としたが、非TNBCは、他の腫瘍適応症と比較して腫瘍細胞において最も高いCCL2産生を示した。

【0457】

以下の腫瘍適応症は、CCL2－CCR2軸からの依存性が低いようであり、したがって、CCL2標的療法にあまり推奨されない可能性がある。

【0458】

・CRC：CCL2は、特にPaCと比較した場合、他の腫瘍型と比較して低かった。ここでも、他の腫瘍型と比較して、M2様マクロファージの最小量を測定した。CCR2及びMDSCは可変量で存在した。興味深いことに、この指標のみでは、CCL2とCCR2との間の正の相関の傾向が検出可能であった。しかしながら、全体的な所見は、CRCでは、CCL2－CCR2の役割が腫瘍細胞の生存に焦点を当てており、免疫細胞の誘引に焦点を当てていないことを裏付けている。

・CCL2については高いが、GCはCCR2については低いことが観察され、MDSCの量が最も少ないことを示した。M2様マクロファージは、様々な量で存在した。

10

20

30

40

【表 2 4】

表 6：本研究で分析した異なる腫瘍型の腫瘍細胞（TC）及び免疫細胞（IC）における CCL2 及び CCR2 の陽性発現。

腫瘍 タイプ	CCL2					CCR2		
	腫瘍細胞（TC）において （マニュアルスコア）			免疫細胞（IC）において （マニュアルスコア）		免疫細胞において （マニュアルスコア）		
	陽性症例 の％	中程度～ 高程度の 陽性症例 の％	平均 スコア	陽性症例 の％	平均 スコア	陽性症例 の％	中程度～高 程度の陽性 症例の％	平均 スコア
OvC	100%	42%	1.3	100%	0.9	100%	63	1.7
PaC	90%	9%	0.8 (PDAC 0.8及び PNET 0.9)	97%	2.0 (PDAC2.2及 びPNET0.6)	90%	55	1.5 (PDAC 1.7及び PNET 0.3)
GC	91%	45%	1.3	91%	1.9	91%	18	0.8
BC	78%	46%	1.1 (TNBC 0.9、非 TNBC 1.6)	61%	0.6 (TNBC0.5、 非TNBC0.9)	96%	38	1.3 (TNBC 1.2、非 TNBC 1.5)
CRC	76%	24%	0.8	72%	0.7	96%	39	1.2
PrC	72%	10%	0.7	79%	0.5	72%	10	0.6

10

20

・PrCにおいて、CCR2は様々なレベルで存在した。（M2及びMDSCは測定せず）

【0459】

相関分析

研究結果を以下のように要約することができる。

- ・腫瘍CCL2とCCR2（IHC）との間で、唯一の正の相関がCRCに存在した。
- ・血清CCL2（ELISA）は、CCL2、CCR2、マクロファージ、及びMDSCを含む腫瘍において測定されたパラメータのいずれとも相関しなかった。腫瘍CCL2に対する正の相関の傾向はPrCでのみ見られ、両方の方法が非常に低い値を示す。
- ・CCR2発現は、M2様マクロファージ及びCD14⁺細胞の存在と正に相関し、M1/M2比と負に相関し、CCR2の生物学的役割を確認する。CCR2のレベルは、MDSC引力よりもM2分極と良好に相関する。
- ・CCL2は、MDSC引力及びM2分極と正の相関の傾向を示した。したがって、CCL2レベルのみが、MDSC及びM2様分極の存在の主要な要因ではないようであった。

30

【0460】

実施例C-1 改変された可変ドメイン及びCDR（イオン依存性／pH依存性結合）及びFc媒介掃攻を有する二重特異性コントースボディ

40

Fcガンマリイb増強Fcバリエーション及び更なるFc修飾を有するコントースボディフォーマット（二重特異性抗CCL2抗体）のバイパトリック抗CCL2抗体の作製
二重特異性抗CCL2抗体の以下のIgG1定常ドメイン／Fcバリエーションを、コントースボディ（CB）フォーマットのFc部分（EU Kabatナンバリング）の位置に突然変異を有するように作製した。「コントースボディ（contorsbody）」（CB）というフォーマットを含むこの抗体Fcドメインは、例えば、Guy J. Georges et al, Computational and Structural Biotechnology Journal Volume 18, 2020, Pages 1210-1220.に記載されている。

50

【0461】

したがって、例えば実施例B-1に記載される方法を使用するが、配列番号175～配列番号182の配列を使用して、以下の二重特異性抗体（コントースボディ）を作製した：

P1AF8142（CKLO2-CB-SG1095）-（SG1095 Fc変異を含む2本のポリペプチド鎖のみを含む例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB））

配列番号175 重鎖1-CKLO2-CB-SG1095

配列番号176 重鎖2-CKLO2-CB-SG1095

P1AF8143（CKLO2-CB-GG02）-（例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB）は、GG02 Fc変異を含む2本のポリペプチド鎖のみを含む）

配列番号177 重鎖1-CKLO2-CB-GG02

配列番号178 重鎖2-CKLO2-CB-GG02

P1AG5853（CKLO2-CB-GG02-K447G）-（例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB）は、GG02 Fc変異及び変異K447Gを含む2本のポリペプチド鎖のみを含む）

配列番号179 重鎖1-CKLO2-CB-GG02-KG

配列番号180 重鎖2-CKLO2-CB-GG02-KG

P1AG8317（CKLO2-CB-SG1095-K447G）-（SG1095 Fc変異及び変異K447Gを含む2本のポリペプチド鎖のみを含む例示的な二重特異性CKLO2コントースボディ（CB））

配列番号181 重鎖1-CKLO2-CB-SG1095

配列番号182 重鎖2-CKLO2-CB-SG1095

【0462】

同様に、バリエーションCKLO1及びCKLO3～CKLO16のコントースボディは、野生型（wt）Fc（例えば、ノブがホールに入るような突然変異を助長するヘテロ二量体化を含む）及び本明細書に記載の他のFcバリエーションのいずれかで生成される。

【0463】

バイパトリック抗CCL2抗体の精製

細胞培養上清を含むバイパトリック抗CCL2抗体をフィルタにかけ、最大3つのクロマトグラフィー工程によって精製した。捕捉工程溶出液の純度に応じて、捕捉工程と最終精製工程との間にイオン交換クロマトグラフィー工程を実施してもよい。

【0464】

バイパトリック抗CCL2抗体を、Capture Select IgG-CH1 Affinity Matrix（ThermoFisher Scientific）及びPOROS XS（ThermoFisher Scientific）及びSuperdex 200サイズ排除（GE Healthcare、スウェーデン）クロマトグラフィーを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。簡潔には、滅菌でフィルタにかけた細胞培養上清を、PBS緩衝液（10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH 7.4）で平衡化したIgG-CH1樹脂上に捕捉し、平衡化緩衝液で洗浄し、pH 3.0の25mMクエン酸ナトリウムで溶出した。溶出した前駆体画分をプールし、2MのTris、pH 9.0を用いて中和した。

【0465】

POROS XS（ThermoFisher Scientific）を用いて任意の第2の精製工程としてイオン交換クロマトグラフィーを行い、平衡化し、40mM酢酸ナトリウムpH 5.5で洗浄し、希釈捕捉工程溶出液をローディングし、勾配クロマトグラフィーを1M酢酸ナトリウムpH 5.5で行った。イオン交換クロマトグラフィー画分をCE-SDS LabChip GX II（PerkinElmer）によって分析

し、Crossmab含有画分をプールした。

【0466】

Superdex 200 (GE Healthcare)でのサイズ排除クロマトグラフィーを第2及び第3の精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーは、20mMヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl、pH6.0で行った。サイズ排除クロマトグラフィー画分をCE-SDS LabChip GX II (PerkinElmer)によって分析し、Crossmab含有画分をプールし、-80℃で保存した。

【0467】

製品品質を満たす場合、POROS XS (ThermoFisher Scientific)の後、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200 (GE Healthcare))を、20mMヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl、pH6.0中のHiPrep 26/10脱塩 (GE Healthcare)での脱塩クロマトグラフィーに置き換えた。

【0468】

抗体製剤のタンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を用いて、280nmにおける光学密度 (OD) を測定することにより決定した。

【0469】

抗体の純度及び完全性を、LabChip GX II (PerkinElmer)をProtein Express Chip及びHT Protein Express Reagents Kitと共に使用してCE-SDSによって分析した。200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250mM KCl、pH7.0をランニング緩衝液として使用して、Biosuite High Resolution SEC、250Å、5µm分析サイズ排除カラム (Waters GmbH)を使用する高性能SECによって、抗体調製物の凝集体含有量を決定した。平均純度は、CE-SDSによって分析して94~100%の間であり、モノマー含量>95% (SEC)であった。

【0470】

改変された可変ドメイン及びCDR (イオン依存性/pH依存性結合)及び改変されたFcドメインを有する二重特異性抗CCL2コントースボディの機能的特性評価

表面プラズモン共鳴 (SPR) -コントースボディ (ontorbodies) P1AF8142 (CKLO2-CB-SG1095)、P1AF8143 (CKLO2-CB-GG02)、P1AG5853 (CKLO2-CB-GG02-K447G)のCCL2結合 (crossmabとの比較)

表面プラズモン共鳴 (SPR) によって評価したCCL2抗原への結合

二重特異性抗体の全体的な構造は、Fab部分の結合に有意な影響を及ぼさない。

【0471】

材料及び方法 (Mat&Meth) - SPR

SPR測定を、Biacore 8K機器 (GE Healthcare/Cytiva)で行った。第1の工程では、CM3チップ (シリーズSセンサチップCM3、GE Healthcare/Cytiva)を調製し、捕捉分子としての抗カッパ抗体 (anti kappa select、Thermo Fischer)を固定化した (10µg/ml、280秒、流量10µl/分、pH4.5)。

【0472】

続いて、抗体コンストラクトを固定化抗カッパ抗体に5nMの濃度及び5µl/分 (固定化緩衝液HBS-N: 0.01M HEPES、0.15M NaCl、pH7.4; GE Healthcare/シチバBR-1006-70)の流量で120秒の会合時間で結合させた。次の工程では、CCL2抗原を50µl/分の流速で濃度系列 (0~100nM)で分析物として注入した。会合時間は120秒であり、解離時間は600秒であった。再生液として、10mMグリシンpH1.5を流速30µl/分で60秒間注入した。

【0473】

10

20

30

40

50

主な実行は2回行った：一方はpH7.4のランニング緩衝液PBS-P+(0.02Mリン酸緩衝液、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05%(v/v)界面活性剤P20;GE Healthcare/Cytiva 28995084)を用い、もう一方はpH5.8のPBS-P+を用いた。全ての測定を25℃で行った。

【0474】

評価のために、 $t_{1/2}$ (=抗体に結合した抗原の解離の半分の時間)及び R_{max} を計算した。

【0475】

モノマー型ヒトCCL2及びカニクイザルCCL2に対する異なるコンストラクト(Crossma b及びコントースボディ)の結合を測定した。結果を下表に示す。

【0476】

同様に、更なる実験において、P1AG5853及びP1AG8317を分析し、結果を示す。

【表25】

表：結合性単量体ヒトCCL2及びカニクイザルCCL2

抗体	抗原	pH7.4における R_{max} (RU)	pH7.4における $t_{1/2}$ (s)	pH5.8における R_{max} (RU)	pH5.8における $t_{1/2}$ (s)
P1AD8325	単量体ヒトCCL2	6.0	106.8	9.1	4.6
CNT0888-IgG1	単量体ヒトCCL2	4.4	2125.8	5.1	366.5
P1AF8137	単量体ヒトCCL2	5.9	96.7	8.5	4.8
P1AF8139	単量体ヒトCCL2	5.1	271.9	7.4	5.2
P1AF8140	単量体ヒトCCL2	5.4	84.1	8.6	4.9
P1AF8142	単量体ヒトCCL2	4.3	130.1	4.2	5.7
P1AF8143	単量体ヒトCCL2	3.7	257.5	4.6	4.6
P1AD8325	単量体カニクイザルCCL2	5.5	289.6	6.9	2.8
CNT0888-IgG1	単量体カニクイザルCCL2	4.8	2627.9	5.7	421.8
P1AF8137	単量体カニクイザルCCL2	5.4	296.0	5.8	3.1
P1AF8139	単量体カニクイザルCCL2	4.9	345.1	7.2	2.6
P1AF8140	単量体カニクイザルCCL2	4.9	294.3	5.1	3.4
P1AF8142	単量体カニクイザルCCL2	3.9	284.1	1.9	0.0
P1AF8143	単量体カニクイザルCCL2	3.5	276.3	2.5	3.1

【0477】

pH 5.8での結合の評価は、全ての二重特異性抗体の結合の喪失をもたらす。

【0478】

表面プラズモン共鳴（SPR）によるFcRnへの結合

全ての二重特異性分子は、低pHでFcRn受容体に対する良好な結合親和性を示し、生理学的pH 7.4でははるかに低下した結合親和性を示している。次いで、全ての二重特異性抗体がエンドソーム中の酸性pHでFcRnに結合し、次いで細胞から再シャッフルされる。

【0479】

SPR測定を、Biacore 8K機器（GE Healthcare/Cytiva）で行った。最初の工程では、SAチップ（GE Healthcare/Cytiva）を調製し、ビオチン化リガンドヒト一本鎖FcRn（sc huFcRn）を、ストレプトアビジン（90秒、流量10μl/分、HBS-EP+緩衝液：0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.003M EDTA、0.05%（v/v）界面活性剤P20）への非共有結合性捕捉結合によって固定化して、500RUのsc huFcRnレベルに達した。続いて、抗体コンストラクトを固定化sc huFcRn-Biに、3つの異なるpH値5、6、及び7.4（PBS-P+：0.02Mリン酸緩衝液、2.7mM KCl、137mM NaCl、0.05%（v/v）界面活性剤P20）で、1×PBS中、30μl/分のフローで50nMの濃度、90秒の会合時間、及び240秒の解離時間で結合させた。全ての測定を25℃で行った。

【0480】

会合相の終わりに位置する報告点「結合」を、読み出す。チップ上の1RU sc huFcRn当たりの結合抗体コンストラクト [RU] の量を評価した。同様に、更なる実験において、P1AG5853及びP1AG8317を分析し、結果を示す。

【表26】

表 SPR-FcRn 結合

抗体（捕捉レベル：500RU）	FcRn表面の1RUあたりのAb（RU）の結合量		
	pH5において	pH6において	pH7.4において
P1AD8325	1.16	0.90	0.13
P1AF8137	1.18	0.85	0.09
P1AF8139	1.27	1.07	0.34
P1AF8140	1.20	0.92	0.15
P1AF8142	1.16	0.82	0.08
P1AF8143	1.18	0.89	0.18
CNT0888-IgG1	0.90	0.35	0.00
CKLO2-SG1	1.02	0.56	0.00
CKLO2-SG1100	1.18	0.97	0.15

【0481】

SPRによるFcガンマ受容体への結合

全ての二重特異性抗体は、他の全てのFcガンマ受容体とは対照的に阻害性シグナルを生成している受容体であるFcガンマRIIbへの結合を増強するように操作されている。したがって、両特異性は、活性化シグナルを生成することなく、細胞内への良好な取り

込みを受けることを意図している。

【0482】

SPR測定を、Biacore T200 (GE Healthcare/Cytiva)で行った。EDC/NHSカップリング化学(アミンカップリングキット、GE Healthcare/Cytiva)を用いて、CM5バイオセンサーチップ(GE Healthcare/Cytiva)にプロテインL(Pierce#21189)を固定化した。この目的のために、これを10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)で希釈し、10μl/分の流量で600秒間両方のフローセルに注入した。固定化及び以下の捕捉結合アッセイを25℃の温度で測定した。ランニング及び希釈緩衝液として、PBS-P(0.02Mリン酸緩衝液、2.7mM KCl、137mM NaCl pH7.4、0.05%v/v界面活性剤P20)を使用した。

10

【0483】

最初の工程では、1000RU捕捉レベルを達成する目的で、抗体試料を10μl/分の流量で120秒間注入する。第2の工程では、モノマー型Fcγ受容体(FcγRIIa、FcγRIIb又はFcγRIIIa)を5μg/mlの濃度で90秒間、10μl/分の流速で注入した。

【0484】

会合相の終わりに位置する報告点「結合」を、読み出す。1RU抗体あたりのFcγ受容体の結合量(RU)を算出した。

20

30

40

50

【表 27】

表 SPR-FcガンマR

抗体 (捕捉レベル: 1000RU)	Fcγ受容体	結合量1RU Ab当たりのhFcγR (RU)
P1AD8325	FcγRIIa	0.042
	FcγRIIb	0.049
	FcγRIIIa	-0.001
P1AF8137	FcγRIIa	0.002
	FcγRIIb	0.051
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8139	FcγRIIa	0.002
	FcγRIIb	0.056
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8140	FcγRIIa	0.003
	FcγRIIb	0.059
	FcγRIIIa	0.000
P1AF8142	FcγRIIa	0.070
	FcγRIIb	0.074
	FcγRIIIa	0.002
P1AF8143	FcγRIIa	0.003
	FcγRIIb	0.033
	FcγRIIIa	0.001
CKLO2-SG1	FcγRIIa	0.028
	FcγRIIb	0.007
	FcγRIIIa	0.017
CKLO2-SG1100	FcγRIIa	0.038
	FcγRIIb	0.010
	FcγRIIIa	0.020
CNT0888-IgG1	FcγRIIa	0.003
	FcγRIIb	0.000
	FcγRIIIa	0.001

10

20

30

40

【0485】

<CCL2>抗体は、FcRIIaのような活性化受容体を認識していないが、FcRIIbに対する親和性が増強されている。さらに、分子P1AF8137、P1AF8139、P1AF8140、及びP1AF8143は、FcRIIb対FcRIIaに対する選択性を示すが、分子P1AD8325及びP1AF8142は示さない。2つの分子群は、Fc部分の2つの異なるタイプの操作に属する。

【0486】

Y字形二重特異性抗体とコントースボディの間では、ヒンジ領域の周りの幾何学的形状が異なる場合がある。FcRへの結合は、この立体配座修飾によって劇的に影響される

50

ようには見えない。

【0487】

同様に、更なる実験において、P1AG5853及びP1AG8317を分析し、異なるFcRsについて結果を示す。

【0488】

走化性アッセイ

B-3に記載の更なる類似の実験では、P1AF8142 (CKLO2-CB-SG1095)、P1AF8143 (CKLO2-CB-GG02)、P1AG5853 (CKLO2-CB-GG02-K447G)のIC₅₀値を以下のように決定した(及び決定する)：

P1AF8142 (0.2 µg/ml)、P1AF8143 (0.6 µg/ml)、P1AG5853 (測定対象)。

【0489】

また、遺伝子改変マウスモデルにおける*in vivo*生物学的活性及び／又はカニクイザルにおけるCC₂掃攻効率も、実施例B-3に記載されているのと同様に決定される。

【0490】

濃縮性及び粘度

薬物が皮下に適用されることが意図される場合、及び／又はその標的を中和するために高濃度を必要とする場合、分子の粘度及び濃縮性は重要な因子である。二重特異性抗体について高濃度が研究されている。200 mg/Lを超える濃度では、タンパク質は凝集体を形成し、最終的に沈殿する傾向がより高くなり得る。注射剤として使用するために、粘度の測定は、より関連性の高いパラメータである。粘度は、粘度が許容可能なままである最大濃度(<15 cP)を導き出すことができるように、濃度範囲に対してプロットされ、以下の表は、値を示す。コントースボディP1AF8142は、crossmab P1AD8325と比較して最大濃度の38%の増加を示し、両方の化合物は同一のFab部分及びFc部分を有するが、コントースボディフォーマットはよりコンパクトであり、同じ粘度に対してより高い濃度をもたらす。

【表28】

表：粘度15 cP (20℃)における最大濃度

化合物	最大濃度15 cP (20°C)
P1AD8325	81 mg/ml
P1AF8142	112 mg/ml
P1AF8139	115 mg/ml
P1AF8143	183 mg/ml

【0491】

化合物P1AF8143は、対応するcrossmabである分子P1AF8139と比較して、約60%の15 cPでの最大濃度の増加を示す。したがって、コントースボディ構造は、生体物理特性を著しく向上させている。

【0492】

材料及び方法粘度測定

試料をAmicon遠心フィルタデバイス(10K)中で20 mMヒスチジン緩衝液(pH 6.0)に緩衝液交換し、14000×gで濃縮した。高濃度のストック溶液を、UV測定(NanoDrop 8000 UV-Vis分光光度計で三連)によって濃度を

決定するために、分析天秤を使用して希釈した。

【0493】

DLS測定 (Wyatt DLS DynaPro Plate Reader) 用に、15 μ Lの体積中に0.02%の最終Tween 20濃度及び0.03%の最終ビーズ濃度を含有する緩衝液中で試料を調製した。1%ビーズストック溶液 (Nanosphere Size Standards、Thermo Scientific、通常径：300 nm、平均径 (NIST Traceable)：296 $\pm$ 6 nm、サイズ分布：5.3 nm－標準偏差：1.8% CV、内容物：水中のポリマーミクロスフェア、(1%固形分、6.77 $\times$ 10⁸ ビーズ/ μ L) を希釈に使用した。

【0494】

試料を逆ピペット操作 (Greiner bio-one Microplate / Sensoplate、384ウェル、ブラック、ガラスボトム、小容量、蓋、gen 2) によって光学384ウェルプレートに移し、シリコーン油 (Alfa Aesar) で覆った。ラテックスビーズの見かけの直径を、20℃での動的光散乱によって決定した。溶液の粘度は、 $\eta = \eta_0 (r_h / r_{h,0})$ (η ：粘度； η_0 ：水の粘度； r_h ：ラテックスビーズの見かけの流体力学的半径； $r_{h,0}$ ：水中のラテックスビーズの流体力学的半径) として計算することができる。

【0495】

同じ濃度の様々な試料の比較を可能にするために、以下の式を用いて指数関数フィットモデル501を使用してデータをXLfit内にフィットさせた：

$$\eta = C + (A * \exp(B * c))$$

(η ：粘度； c ：濃度； A 、 B 、 C ：指数適合変数)。

【0496】

これらの当てはめから、15 cPの粘度閾値に対する20℃での最大実現可能濃度を外挿することができる。

【0497】

同様に、更なる実験において、P1AG5853及びP1AG8317を分析し、結果を示す。

【0498】

CCL2複合体形成

SEC方法

【0499】

複合体形成のために、1 $\times$ PBS (sigma-Aldrich 116667890) に、それぞれの等モル濃度のwt CCL2と共に100 μ g/mLのP1AD8325、P1AF8139及びP1AF8143をスパイクした。溶液を混合し、周囲温度で一晩インキュベートした。

【0500】

SEC-MALLS測定：

SEC-MALLS測定のため、1 mg/mLの濃度の100 μ gの試料を、UV280検出器及びWyatt MALS検出器 (RI Optilab rEX、LS miniDAWN Treos) を備えたThermoUltimate 3000機器のGE Superose 6カラム (Increase 10/300 GL) に適用した。1 $\times$ PBS (pH 7.4) を0.5 mL/分の流速で溶離剤として使用した。

【0501】

crossmabのようなY字形IgG様形式と比較して、コンパクトなコントースボディフォーマットは、バイパトリック分子によって引き起こされる多量体アセンブリの形成に関して異なる挙動をする。SEC複合体は、SEC-MALLSクロマトグラフィー実験におけるCCL2を含む及び含まないバイパトリック分子の挙動を示す図である。全てのバイパトリック分子は、145～148 kDaの範囲の同等の分子量を有するが、フォーマットがよりコンパクトであるため、コントースボディの挙動はCrossm

10

20

30

40

50

a bの挙動とは異なる。このコンパクトさはまた、C C L 2に結合する際に長いデージーチェーン接続を可能にしない。実際には、コントースボディ P 1 A F 8 1 4 3（図 1 8では4 3と略す）は、w t C C L 2とのインキュベーション後に大部分が約 8 5 %の四量体を形成し、対応する C r o s s m a b P 1 A F 8 1 3 9（図 1 8では3 9と略す）は、非常に大きな程度まではるかに大きな多量体を形成している。

【 0 5 0 2 】

P 1 A F 8 1 3 9（3 9と略す）の S E C - M A L L S測定は、複合体の大部分（> 8 0 %）が最大 1 0 M D aの多量体であるのに対して、P 1 A F 8 1 4 3（4 3と略す）は、w t C C L 2との複合体において、大部分（> 8 5 %）が約 6 0 0 k D aの四量体を形成することを示す。

10

【 0 5 0 3 】

同様に、更なる実験において、P 1 A G 5 8 5 3及びP 1 A G 8 3 1 7を分析し、結果を示す。

【 0 5 0 4 】

細胞取り込みを介した C C L 2の枯渇

F c R I I b受容体との相互作用を介して細胞に浸透する二重特異性抗体の能力を測定するために、C H O - K 1細胞株をヒト F c R I I b受容体でトランスフェクトした（クローン 2 2 3）。活性化 F c Rとの望ましくない相互作用の対照として、C H O - K 1細胞株にもヒト F c R I I aをトランスフェクトした（クローン 1 3 8）。本明細書の二重特異性は、F c R I I aとの相互作用を可能な限り低く保ちながら、F c R I I bへの結合を増強するように操作されている。

20

【 0 5 0 5 】

i n v i t r oで、異なる濃度の< C C L 2 >抗体を混合して C C L 2と複合体を形成し、合体を播種細胞に添加する。2 4時間後、上清を分析して、残存する C C L 2（内在化及び分解されなかった部分）を検出する。

【 0 5 0 6 】

材料及び方法 C H O取り込みアッセイ

細胞株及び培養条件：

C H O細胞、C H O - K 1 - W - T D Z 5 _ H O M S A _ F C G R 2 B _ C l o n e _ 2 2 3（R o c h e）及びC H O - K 1 - W - T D Z 5 _ H O M S A _ F C G R 2 A _ C l o n e _ 1 3 8 _ H R（R o c h e）を自社で産生した。C H O細胞を、1 0 % F C S及び4 0 0 μ g / m l ジェネテシン（T h e r m o F i s h e r）を補充した2 0 0 m M L - グルタミン、4 . 5 g / L グルコース、1 0 m M H E P E S、1 m M ピルビン酸 N aを含むR P M I 1 6 0 M e d i u m A T C C M o d i f i c a t i o nで培養した。

30

【 0 5 0 7 】

全ての細胞を、組織培養皿（G r e i n e r）において単層で成長させ、5 % C O ₂を含む加湿インキュベーターにおいて3 7 °Cでインキュベートした。細胞をA c c u t a s e（T h e r m o F i s h e r）で剥離し、2 0 0 m M L - グルタミン、4 . 5 g / L グルコース、1 0 m M H E P E S、1 0 % F C S及び5 0 μ g / m l ゲンタマイシン（T h e r m o F i s h e r）を補充した1 m M ピルビン酸 N aを含むR P M I 1 6 0 M e d i u m A T C C M o d i f i c a t i o nで更に処理した。

40

【 0 5 0 8 】

細胞取り込み研究では、2 n g / m l のビオチン化 C C L 2（R o c h e）を様々な希釈の< C C L 2 > M a bと共に1時間プレインキュベートして、9 6ウェル組織培養プレート中で C C L 2 / < C C L 2 > M a b免疫複合体を3 7 °C及び5 % C O ₂で形成した。

【 0 5 0 9 】

次いで、それぞれの細胞株のウェルあたり2、5 $\times$ 1 0 ⁴ 個の細胞を免疫複合体に添加し、プレートを3 7 °C及び5 % C O ₂で2 3 ~ 2 4時間インキュベートした。

【 0 5 1 0 】

50

以下のELISAでは、細胞培養上清（10 μL）を、周囲温度で1時間インキュベートした160mMグリシン-HCl（Sigma Aldrich）と共にpH2.5に調整したPBST（Thermo Fisher）中のアッセイ希釈剤（90 μL）1% BSA（Sigma Aldrich）を含有する96ウェルストレプトアビジンコーティングプレート（Microcoat）に移して、免疫複合体を分解し、変性ビオチン化CCL2を捕捉した。

【0511】

変性したビオチン化CCL2を、アッセイ希釈液中の0.3 μg/mLのDIG-抗CCL2検出抗体及び40mU/mLのPOD標識抗DIG Fab（両方ともRoche製、Penzberg）と室温で連続して1時間インキュベートすることによって検出した。各工程の間にPBSTでウェルを3回洗浄した。読み出しには、ABTS溶液（Roche、ペンズベルグ）及びABTS停止溶液（KPL）を使用した。OD405/490をi3x（Molecular Devices）で定量した。

10

40 μg/mLから0.512 ng/mLまでの精製された<CCL2> Mabの段階希釈物をアッセイにおいて試験した。以下の4パラメータ方程式を使用して非線形回帰によって、<CCL2> Mab濃度の関数のOD405/490シグナルをフィッティングして、有効濃度を決定した：

【数1】

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

A = より高い漸近線

B = ヒルスロープ

C = EC₅₀値

D = より低い漸近線

X = <CCL2> Mab濃度（ng/mL）

Y = OD値

20

【0512】

結果を図19A-1及び図20A-C、並びに以下の表に示す。

【0513】

図19A～図19C及び図20A～図20CのFcガンマーIIaは、上清中のCCL2の濃度が試験した化合物のほとんどについて安定なままであることを示す。しかしながら、化合物P1AF8142では、上清中のCCL2の濃度依存的喪失が観察される。同一のFc配列を共有するcrossmab P1AD8325と比較して、コントースボディP1AF8142についてフォーマット依存性取り込みが観察される。FcRIIa及びFcRIIbへの結合は、2つの化合物についてそれぞれ同じレベルで観察されたが、コントースボディP1AF8142の結合レベルは、crossmab P1AD8325と比較して有意に高かった。したがって、接触体フォーマットは、FcRIIaへの結合に影響を及ぼし、より小さいサイズのフォーマットと共に、コントースボディP1AF8142の場合にFcRIIaを介したいくらかの取り込みが観察される。

30

40

50

【表 29】

表 FcガンマーIIb：CHO細胞クローン223におけるFcγRIIbを介した枯渇

化合物	枯渇レベル最大 (%)	EC50 [nM]	EC90 [nM]
P1AF8143	82	0.14	0.4
P1AF8142	80	0.13	0.5
P1AD8325	85	0.50	13
P1AF8139	45	0.60	約30

10

【0514】

表 FcガンマIIbは、異なるレベルのCCl2枯渇／分解を示す。コントースボディフォーマットの2つの二重特異性、P1AF8142及びP1AF8143は、約0.13 nMのEC50を有する最も効率的なCCl2枯渇剤である。2つの対応するcrossmab、P1AD8325及びP1AF8139は、約0.55 nMのEC50を有する。EC90及び最大枯渇レベルを表 γ-IIbに要約する。

【0515】

この化合物は、他の全ての二重特異性抗体P1AD8325、P1AF8139、P1AF8142、P1AF8143、CKLO2-SG1が通常のFc、すなわちwt IgG1を有するので、抗原結合部位を有するため、上清中のCCl2濃度の非常にわずかな減少も参照CKLO2-SG1（図20CガンマIIb）で観察され、したがって、より良好な取り込みのための操作されたFcを有さないが、細胞内への受動的取り込みの場合、抗原CCl2は低pHで放出され、分解に選別することができる。同様に、更なる実験において、P1AG5853及びP1AG8317を分析し、結果を示す。

20

【0516】

DC-T細胞活性化アッセイ：DC：CD4再刺激アッセイ

材料

健常ドナー由来のPBMCを、採血から6時間以内に全血から調製した。細胞を、アッセイで使用するまで気相窒素中で凍結保存した。ナイーブT細胞応答を評価するために、各PBMC調製物の品質及び機能性を、KLHなどの陽性対照による7日間の活性化によって分析した。

30

【0517】

キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を技術的対照として使用し、滅菌条件下で製造業者の推奨に従って単回使用アリコートで再構成し、-80℃で保存した。さらに、ベバシズマブ（アバステン（登録商標））を陽性ベンチマークタンパク質として含めた。DC刺激段階及びAPC再刺激段階については、全ての試料を0.3 μMの最終濃度で試験した。

【0518】

方法

単球を、磁気ビーズ選択によって凍結PBMC試料から単離し、GM-CSF及びIL-4を使用して未成熟DC（iDC）に分化させた。次いで、iDCを回収し、洗浄し、最終濃度300 nMで37℃で4時間、各個々の試験タンパク質（mAb（データは示さず）又は免疫複合体）をロードした。免疫複合体を以下のように新たに調製した：600 nMのmAbを600 nMのCCl2と共に室温で24時間インキュベートし、300 nMの最終濃度でiDCに添加した。次いで、TNFα及びIL-1βを含有するDC成熟カクテルを更に40～42時間添加して、DC（mDC）を活性化／成熟させた。DCがT細胞相互作用の前に確実に活性化されていることを確認するため、未成熟段階及び成熟段階の両方における重要なDC表面マーカー（CD11c、CD14、CD40、CD8

40

50

0、CD83、CD86、CD209及びHLA-DR)の発現をフローサイトメトリーによって評価した。次いで、加湿雰囲気中、37℃、5%CO₂で6日間、 1.0×10^5 mDCを 1.2×10^6 個の自己CD4+T細胞(磁気ビーズ選択によって単離した)と共培養した。6日目に、磁気ビーズ選択を使用してPBMCから自己単球を単離し、DCをロードするために最初に使用した選択されたタンパク質／ペプチドをロードした。加湿雰囲気中、37℃、5%CO₂で4時間インキュベートした後、 5×10^4 個／ウェルの単球を、対応するDC:T共培養物と共に抗IFN- γ ／抗IL-5プレコートFluoroSpotプレート(Mabtech)に4連(2.5×10^5 個のCD4+T細胞／ウェル)で添加した。FluoroSpotプレートを、加湿雰囲気中、37℃、5%CO₂で40～42時間、インキュベートした。インキュベーション後、社内の手順を使用してFluoroSpotプレートを開発し、各試験条件で各サイトカインについてウェルあたりのスポット形成細胞(SFC)を評価した。

10

【0519】

未成熟段階及び成熟段階の両方で単球由来DCに対して表面マーカーQCチェックを行い、DC分化に対する試験生成物の任意の可能な影響を決定し、CD4+T細胞とのその後の共培養の前にDCの品質の評価が可能になった。表面マーカーを、蛍光標識抗体及びGuava(登録商標)easyCyte(商標)8HTフローサイトメーターを使用するフローサイトメトリーによって評価する。

【0520】

データ分析

データ管理及び統計分析は、Rプログラミング言語(<https://www.R-project.org/>、v.3.6.1)で実行されている。データをlog₂スケールに変換し、一般化線形モデル(GLM)を適用してSI(倍率変化及び95%CI)を定量化する。調整をデータセットに適用し(調整された指数型の不均一分散性、SFUSケールの下端でのガウスノイズ注入、各SIの0のブランク値への線形回帰及び外挿)、QCプロットを生成する(DC分化マーカー、化合物及びドナーレベルでの再現性、ドナーの相対刺激)。

20

【0521】

免疫原性リスク評価を助けるために、刺激指数(SI)を各ドナーの各試験条件について計算する(SFU／ウェルと適合ブランクとの比)。

30

【0522】

少なくとも2倍のSI変化が $p < 0.05$ で確立される場合(GLMからの調整されていないp値)、陽性ドナー応答がカウントされる。30人の健康なドナーコホート内の処置に対する陽性ドナー応答の数が、この処置に対する応答率を与える。

【表30】

表 応答率の概要($S_t > 2$ 、 $p > 0.05$)—SFU_{corr}に基づく観察されたパーセンテージ

抗体	免疫複合体(抗体+CCL2)に対する応答率(%)
P1AD8325	3, 33
P1AF8137-048	23, 33
P1AF8139	33, 33
P1AF8140	6, 67
P1AF8142	3, 33
P1AF8143	10

40

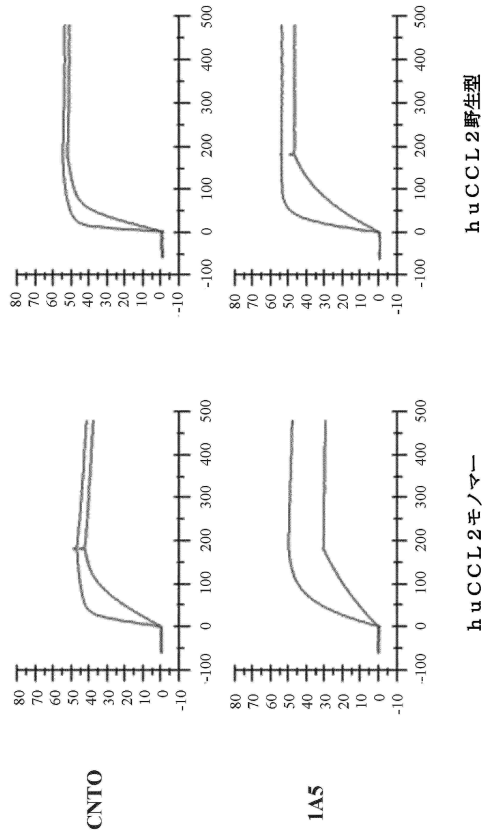
50

【 0 5 2 3 】

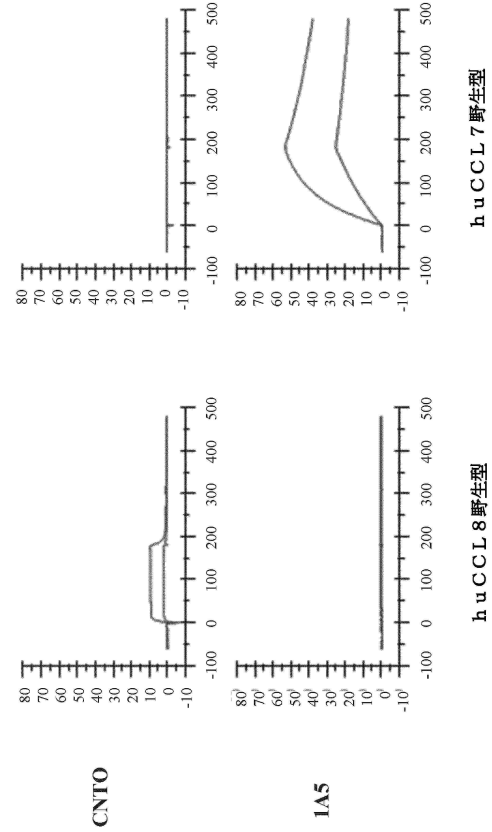
F c R I I bを介した取り込みを増加させるように操作された F c 部分を有する化合物 P 1 A F 8 1 3 9 は、化合物が免疫複合体として適用された場合、応答体の数の増加（約 3 3 %）を示すが、Y 字形抗体 P 1 A F 8 1 3 9 の対応するコントースボディである化合物 P 1 A F 8 1 4 3 は、1 0 %の参照レベルでレスポnderの割合を示す。

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】



10

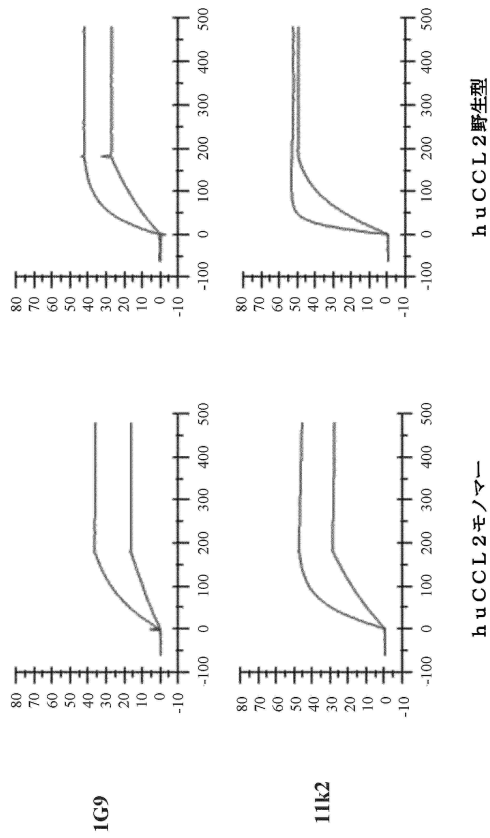
20

30

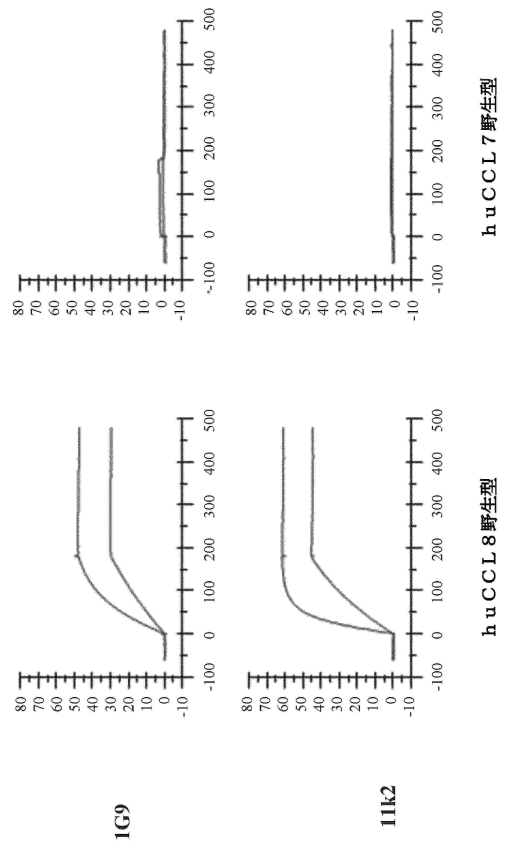
40

50

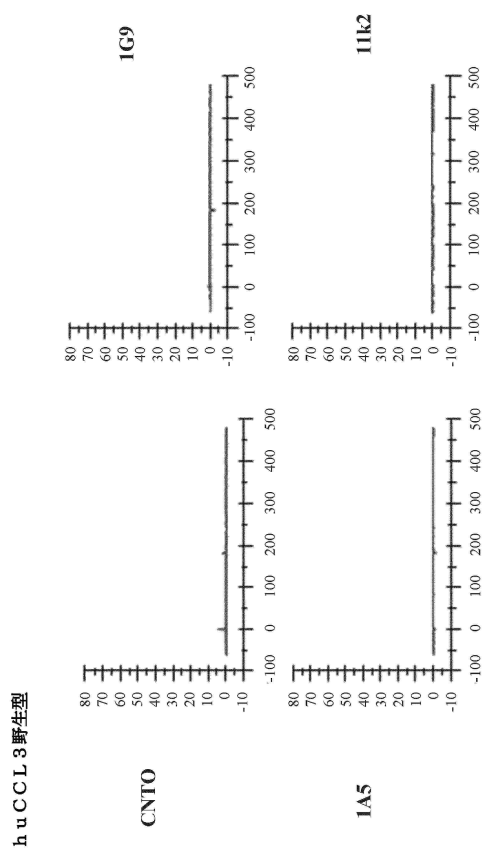
【図 1 - 3】



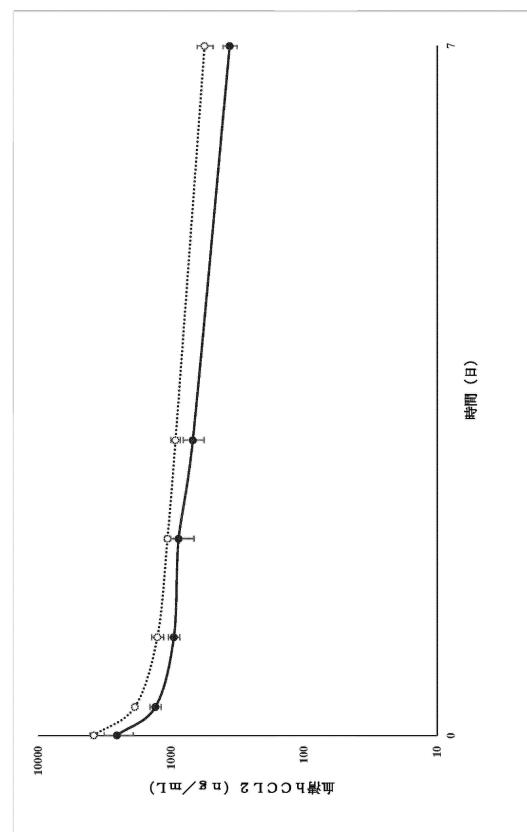
【図 1 - 4】



【図 1 - 5】



【図 2 a】



10

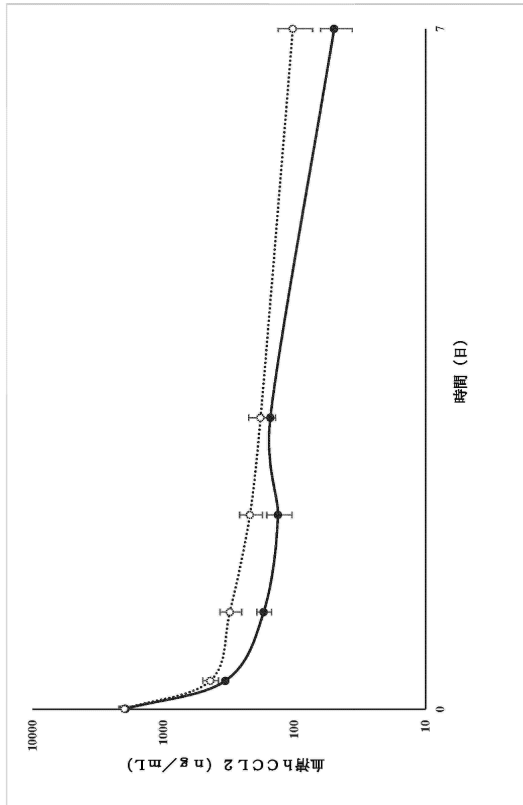
20

30

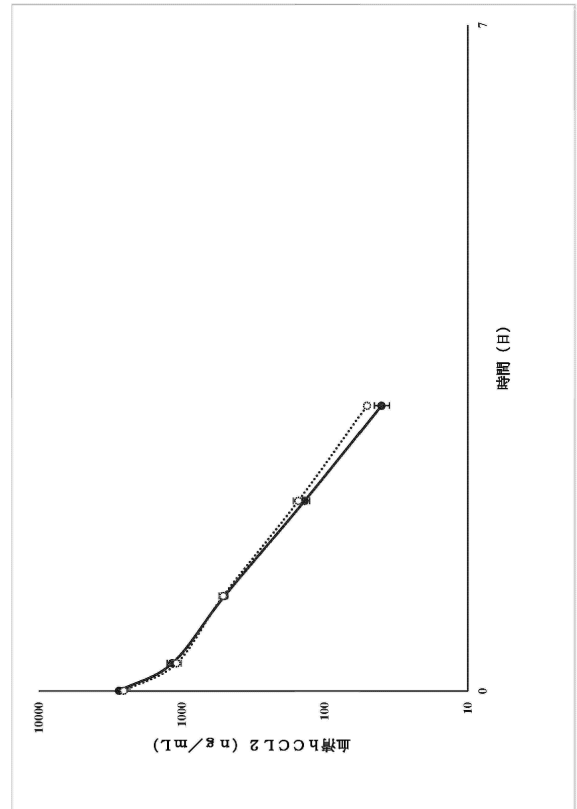
40

50

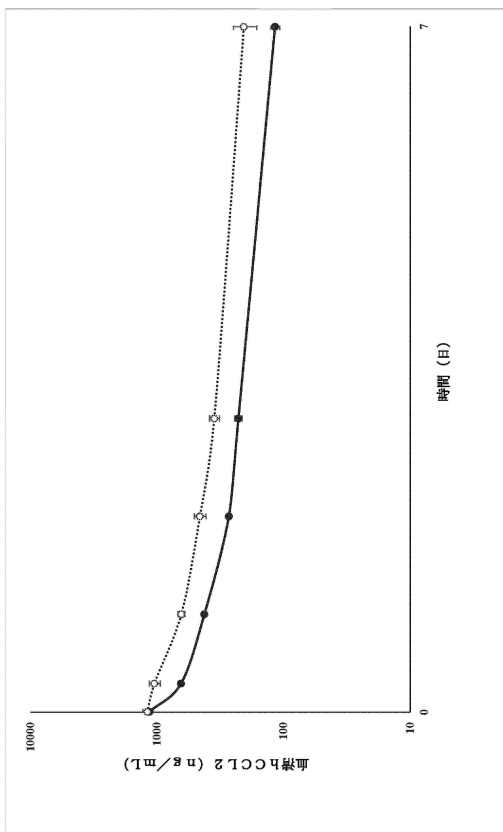
【図 2 b】



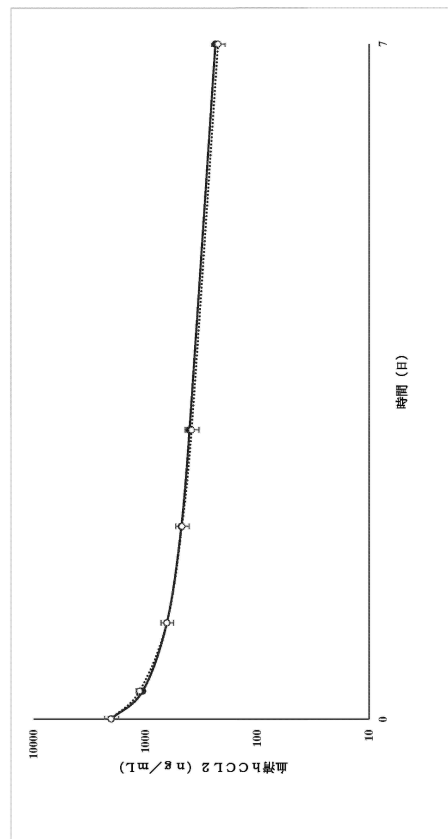
【図 2 c】



【図 2 d】



【図 2 e】



10

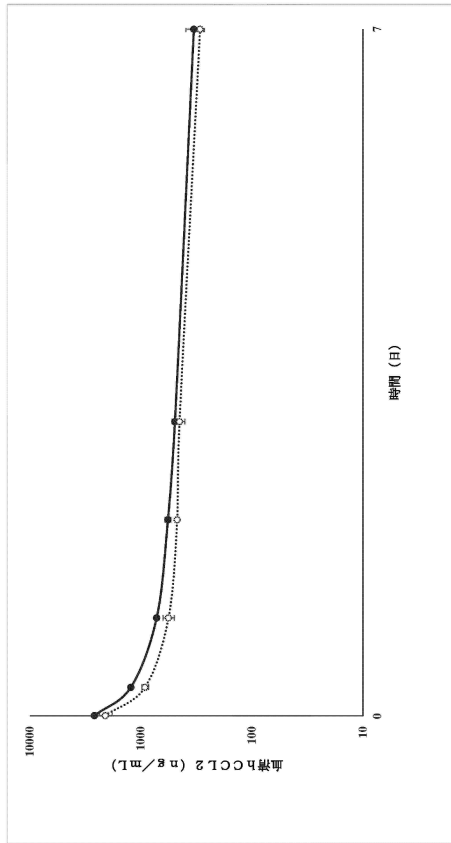
20

30

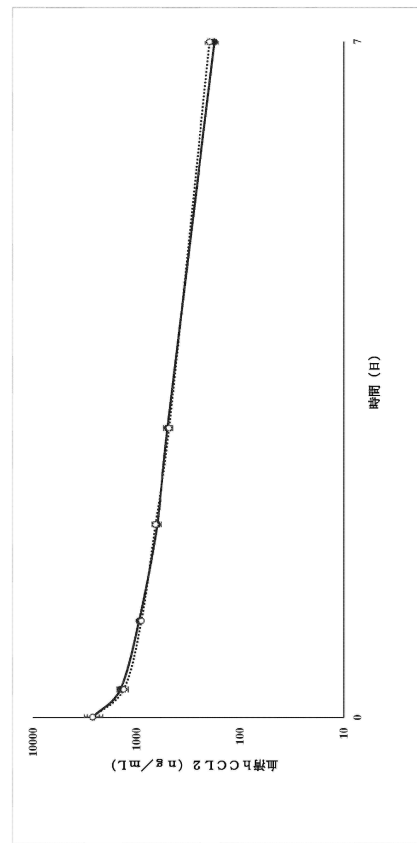
40

50

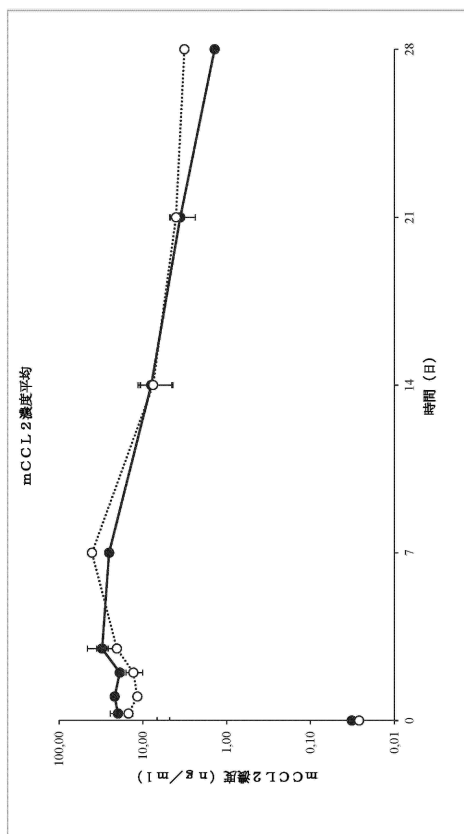
【図 2 f】



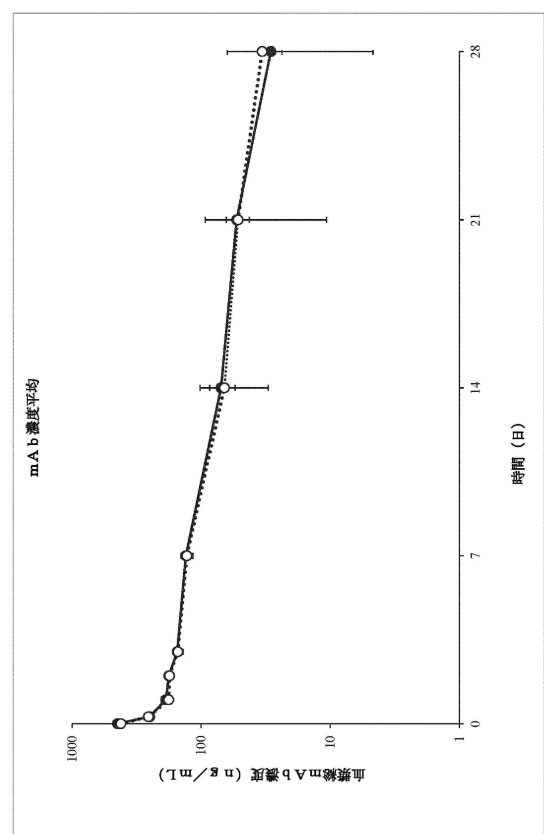
【図 2 g】



【図 3 a】



【図 3 b】



10

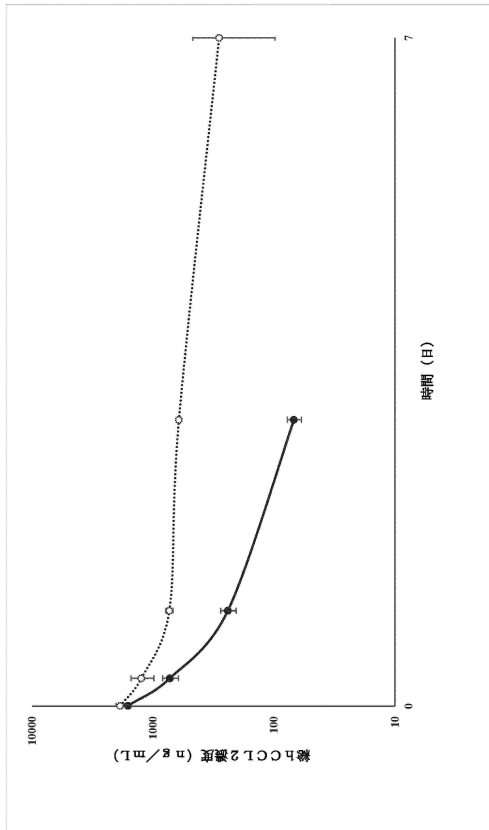
20

30

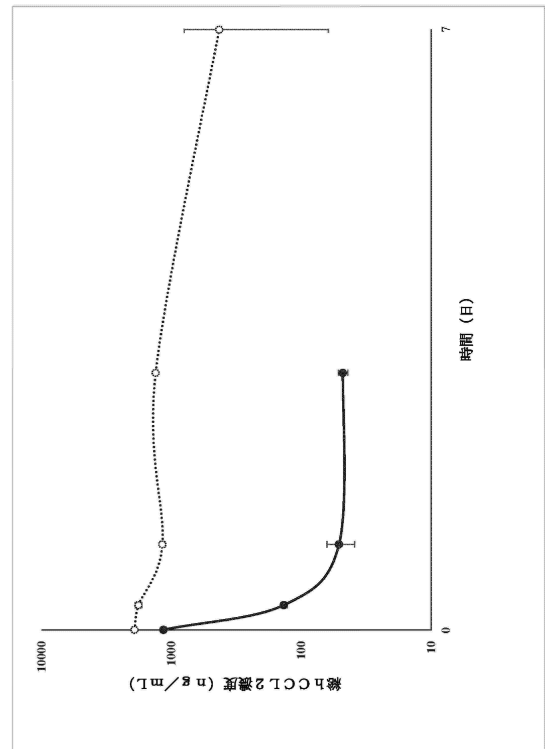
40

50

【図 4 a】



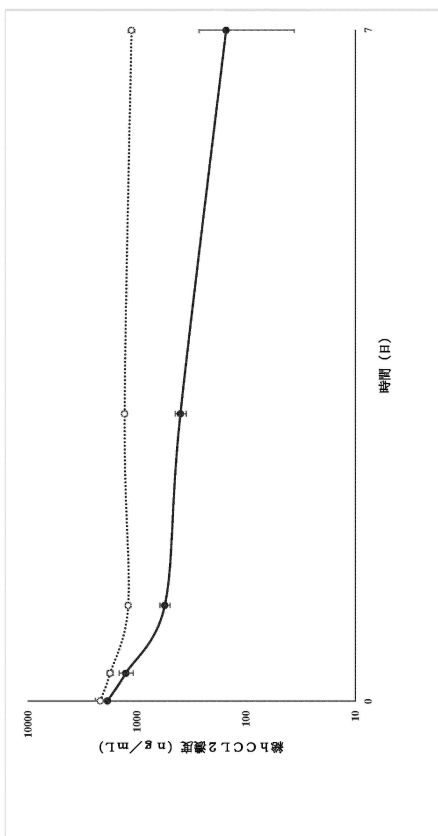
【図 4 b】



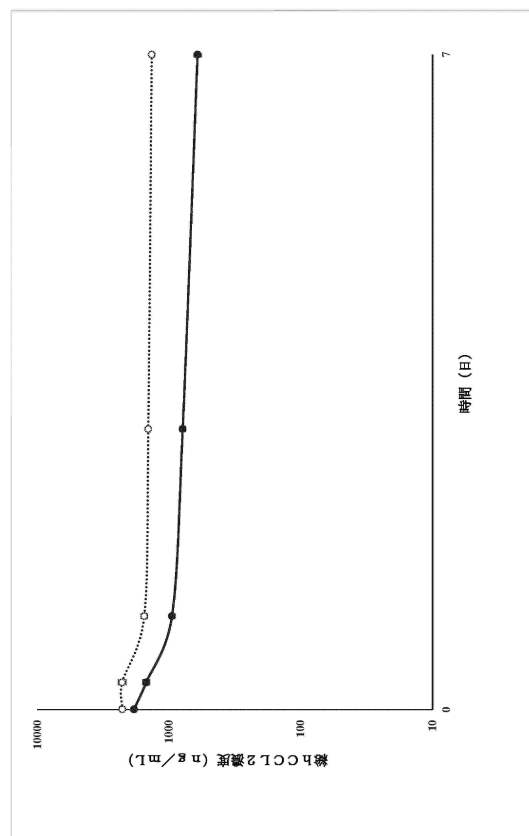
10

20

【図 4 c】



【図 4 d】

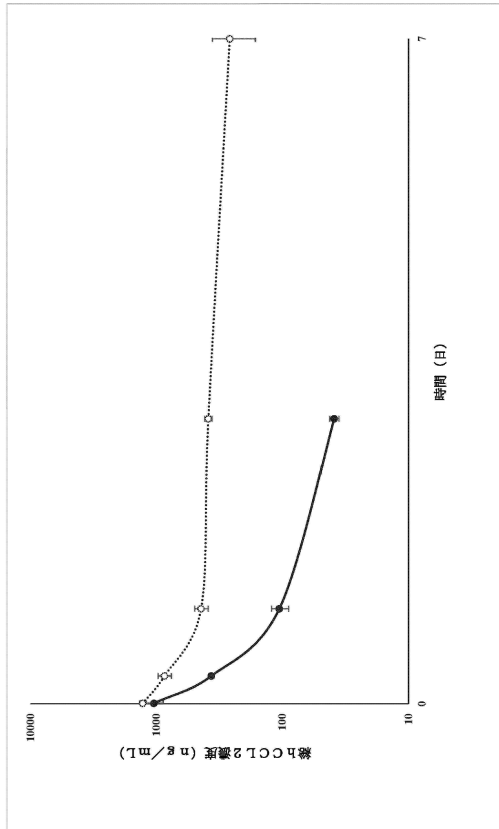


30

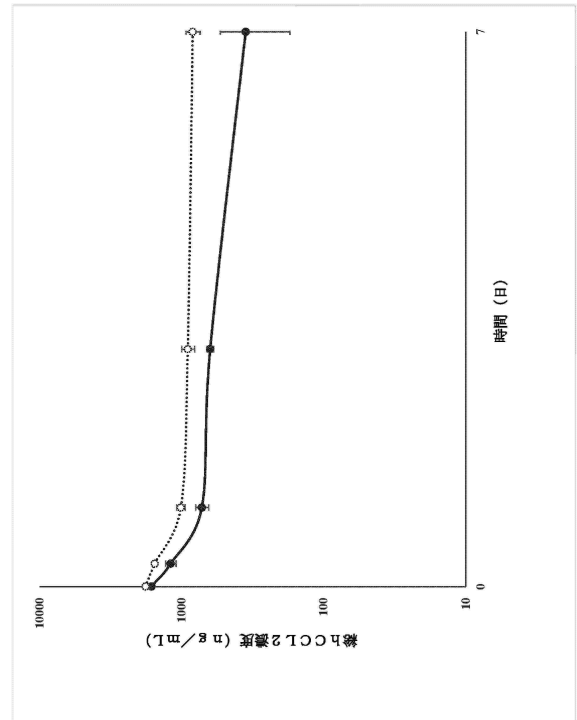
40

50

【図 4 e】



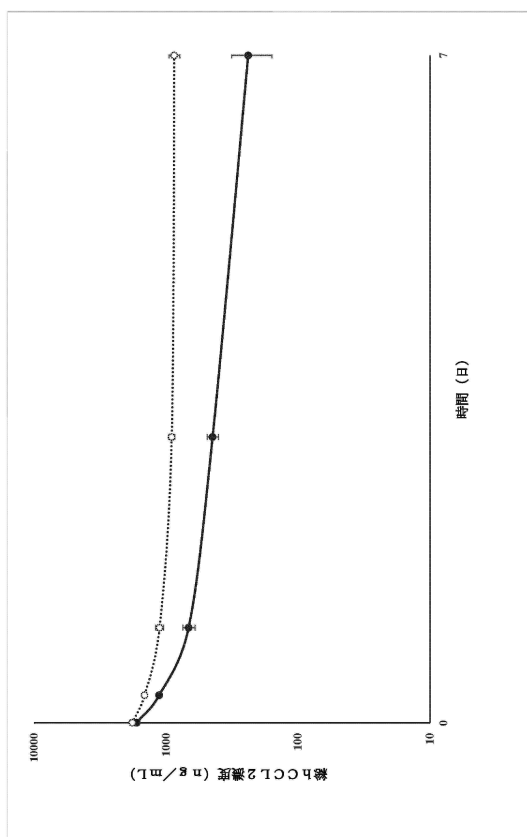
【図 4 f】



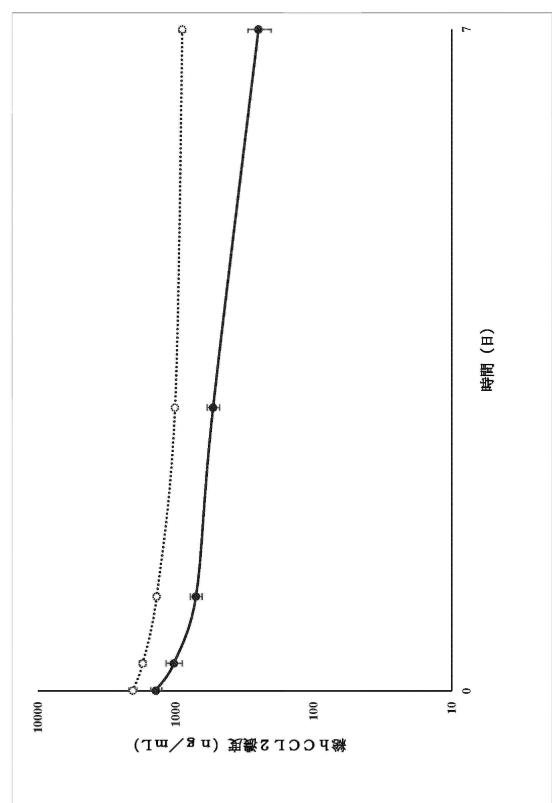
10

20

【図 4 g】



【図 4 h】

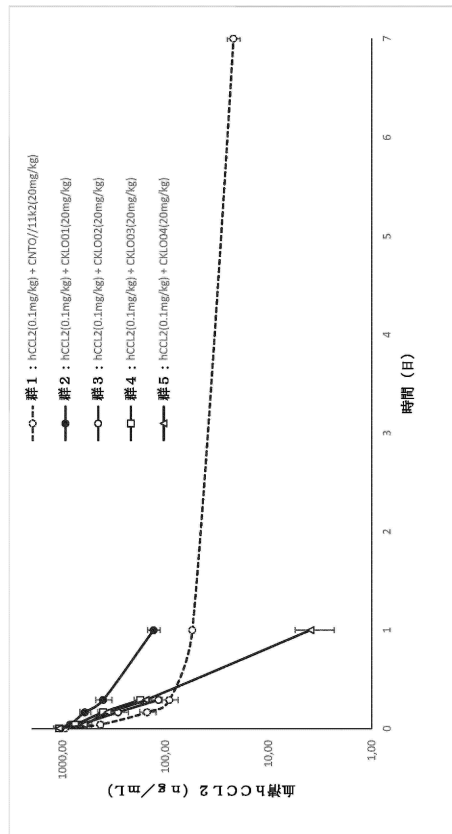


30

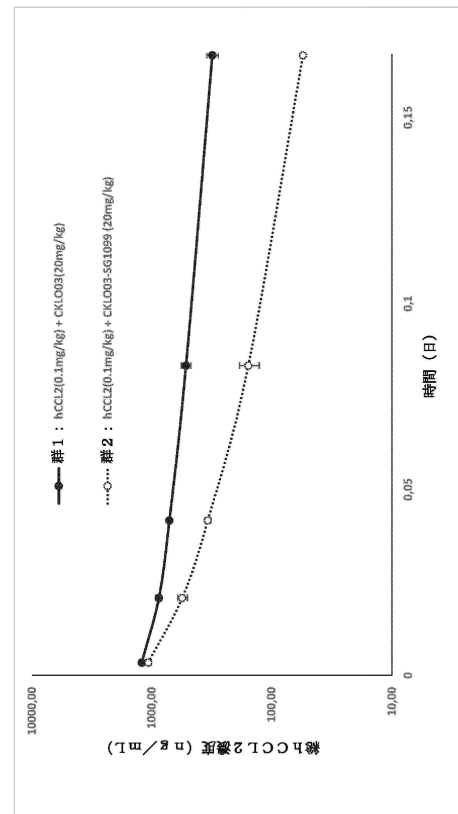
40

50

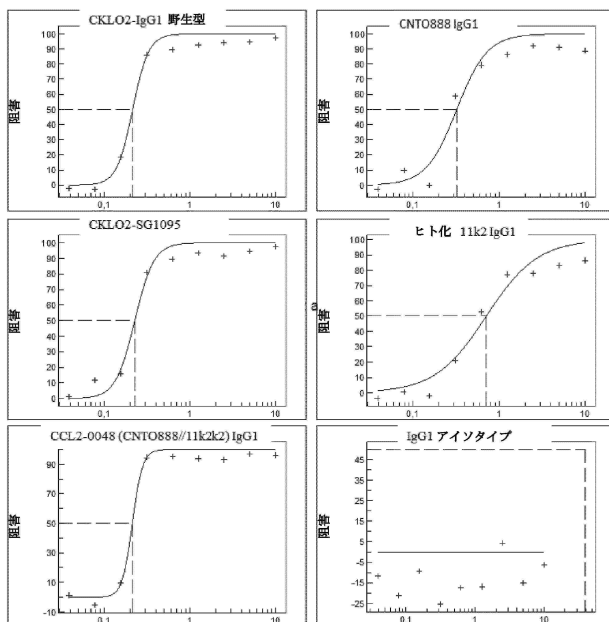
【図 7 a】



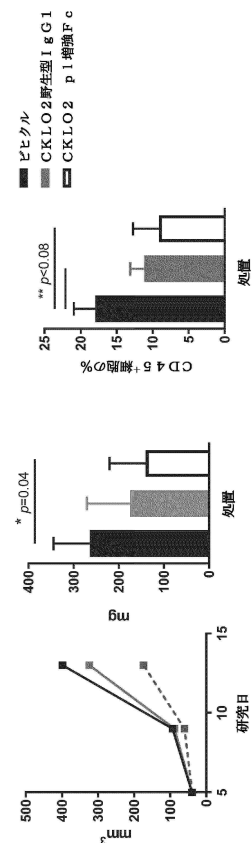
【図 7 b】



【図 8】



【図 9】



10

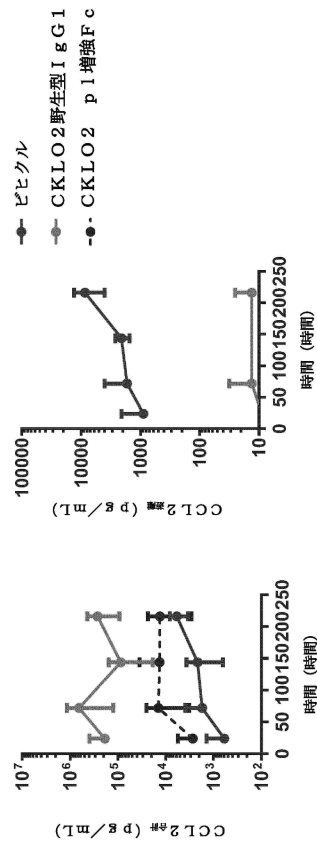
20

30

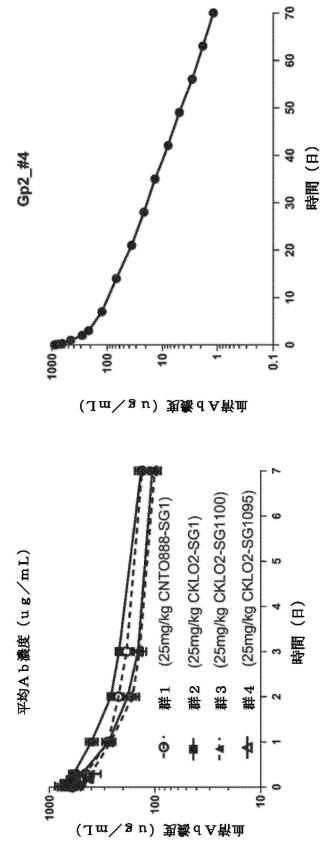
40

50

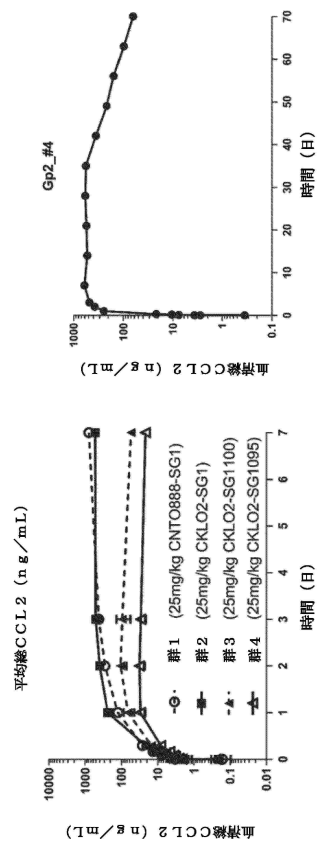
【図 1 0】



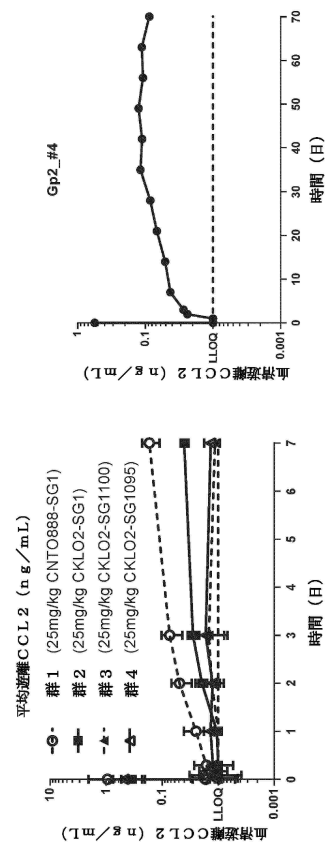
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



10

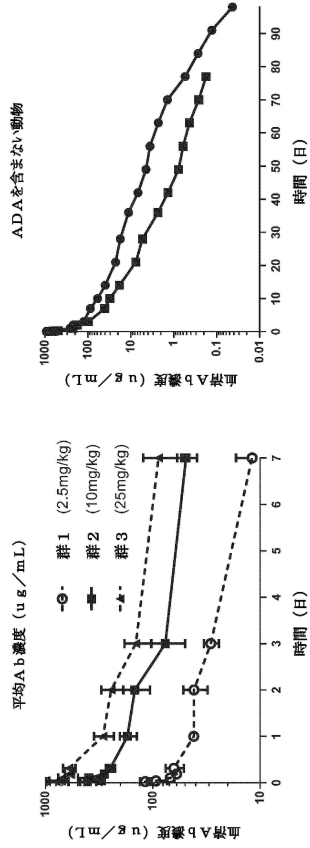
20

30

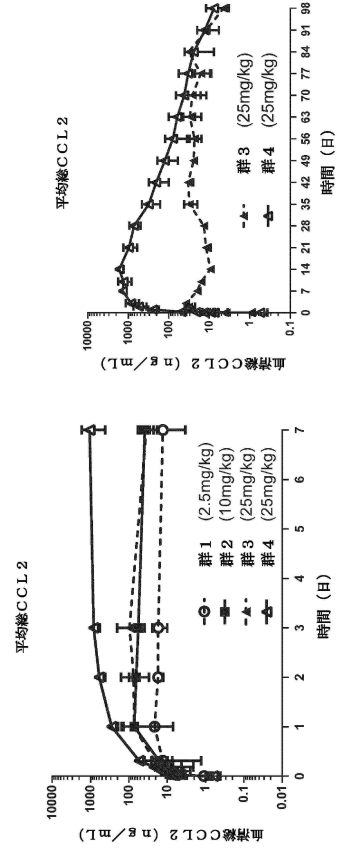
40

50

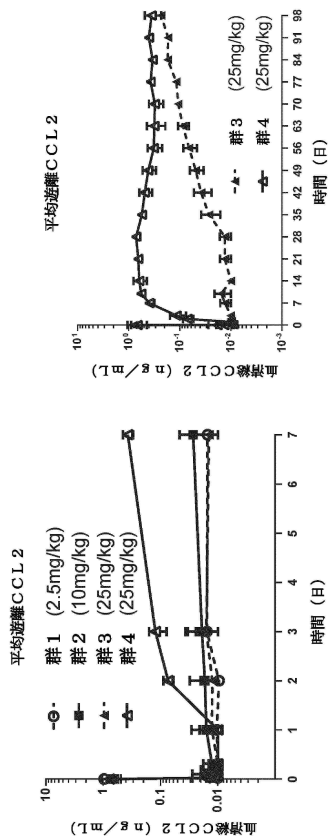
【図 1 4】



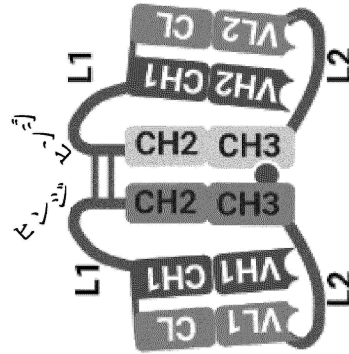
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

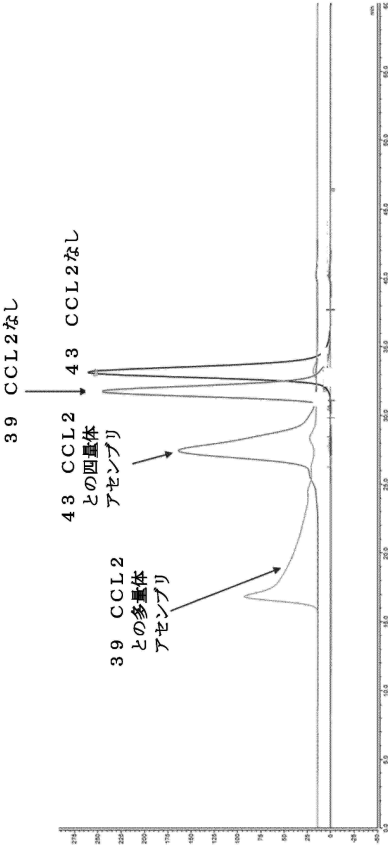
20

30

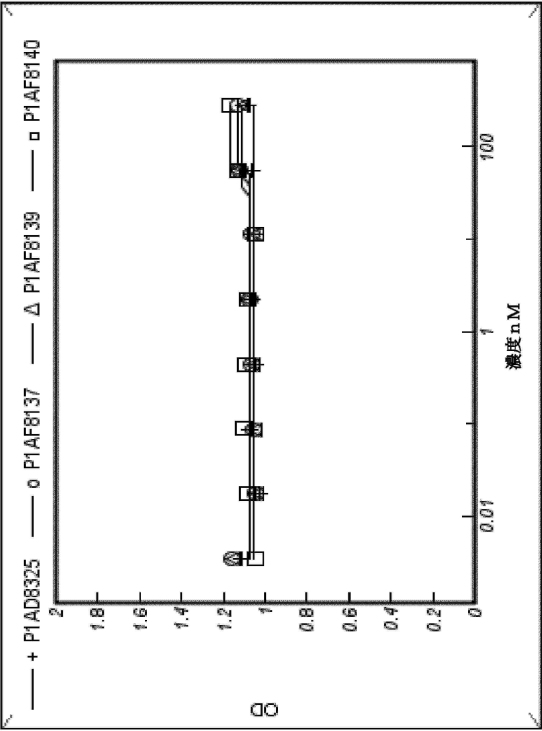
40

50

【図 18】



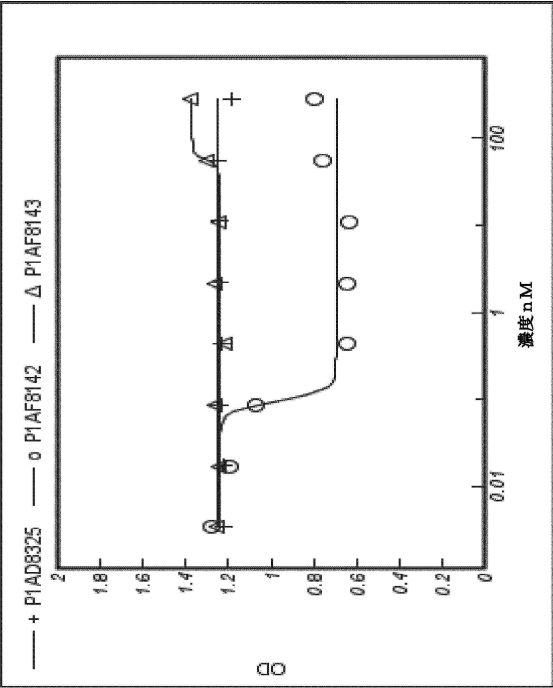
【図 19 a】



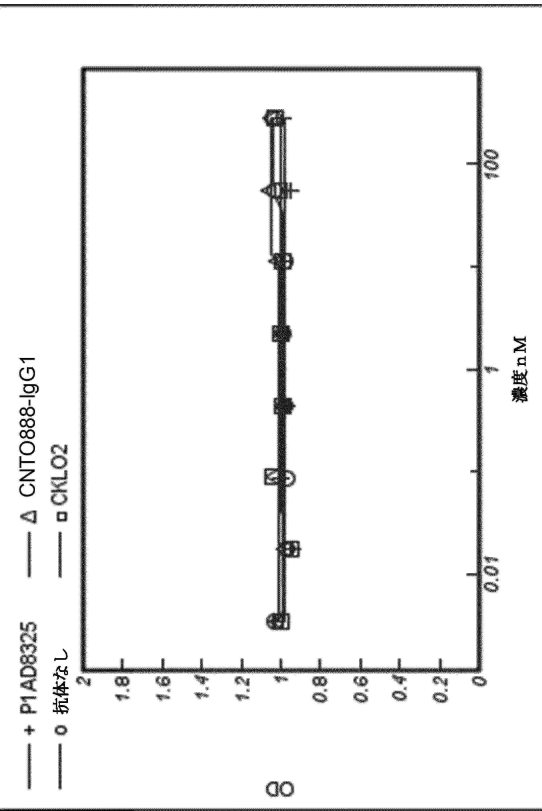
10

20

【図 19 b】



【図 19 c】

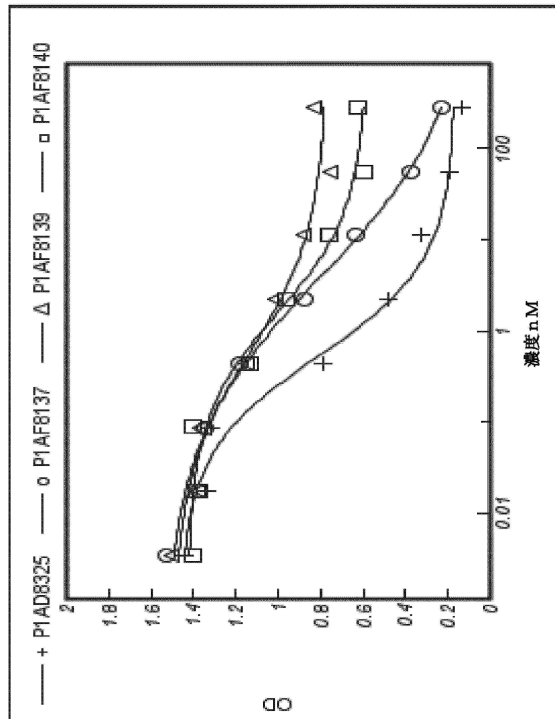


30

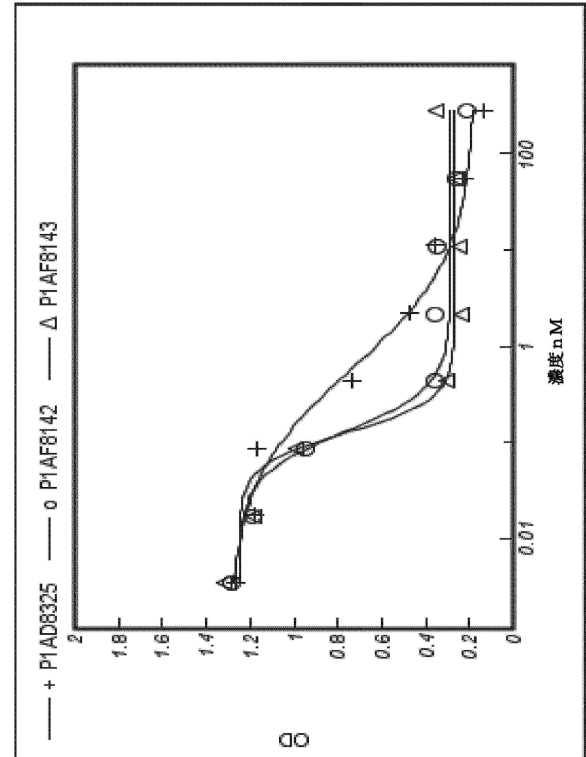
40

50

【図 20 a】



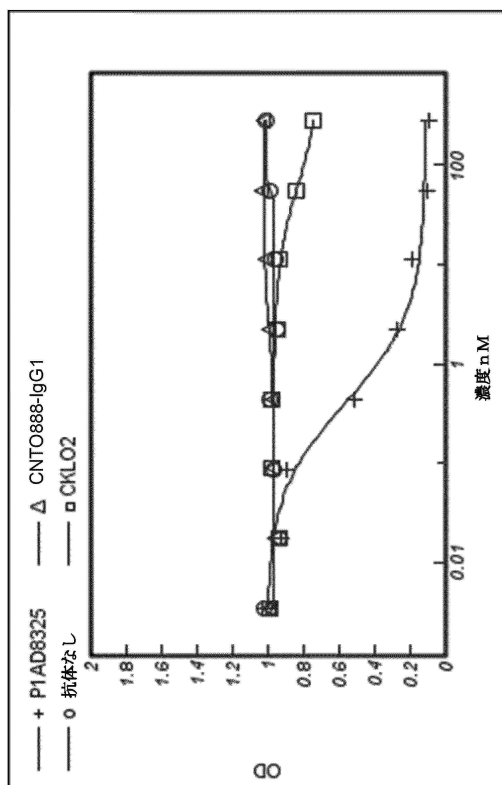
【図 20 b】



10

20

【図 20 c】



30

40

【配列表】

2024523034000001.app

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/066289
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/066289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 A61P35/00 A61P37/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/006359 A2 (CENTOCOR INC [US]; DAS ANUK [US] ET AL.) 8 January 2009 (2009-01-08) the whole document, in particular examples 4-7 -----	1-27
A	WO 2008/077945 A2 (ABLYNX NV [BE]; BLANCHETOT CHRISTOPHE [NL] ET AL.) 3 July 2008 (2008-07-03) page 15, line 17 - line 32; figures 15-17, 24; examples 1-4, 10, 11 ----- -/--	1-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 August 2022		31/08/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stein, Annette

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2022/066289

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUY J. GEORGES ET AL: "The Contorsbody, an antibody format for agonism: Design, structure, and function", COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 18, 1 January 2020 (2020-01-01), pages 1210-1220, XP055709267, Sweden ISSN: 2001-0370, DOI: 10.1016/j.csbj.2020.05.007 the whole document, in particular figure 1 and items 2.2, 2.4 -----	1-27
A	US 2016/200807 A1 (RUIKE YOSHINAO [SG] ET AL) 14 July 2016 (2016-07-14) the whole document, in particular tables 26-30; sequences 247, 352 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/066289

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009006359	A2	08-01-2009	AU 2008269954 A1 CA 2692392 A1 CN 101827610 A EP 2170387 A2 JP 2011517548 A US 2010254992 A1 WO 2009006359 A2	08-01-2009 08-01-2009 08-09-2010 07-04-2010 16-06-2011 07-10-2010 08-01-2009
WO 2008077945	A2	03-07-2008	AU 2007337983 A1 CA 2672944 A1 EP 2097451 A2 US 2010092460 A1 WO 2008077945 A2	03-07-2008 03-07-2008 09-09-2009 15-04-2010 03-07-2008
US 2016200807	A1	14-07-2016	AR 103161 A1 AU 2015365168 A1 BR 112017006736 A2 CA 2963760 A1 CL 2017001584 A1 CL 2019000259 A1 CN 107108726 A CO 2017005639 A2 CR 20170326 A EA 201791253 A1 EP 3240804 A1 IL 278014 A JP 6227191 B1 JP 7011438 B2 JP 7049392 B2 JP 2017535244 A JP 2018023398 A JP 2020127434 A KR 20170090403 A KR 20180054923 A KR 20220034918 A MA 41294 A MY 181199 A NZ 730607 A PE 201711111 A1 PH 12017501115 A1 RU 2017123731 A SG 11201700841Q A TW 201638107 A TW 201819409 A TW 202039553 A US 2016200807 A1 US 2018319876 A1 US 2018319877 A1 US 2020317768 A1 WO 2016098357 A1	19-04-2017 13-04-2017 19-12-2017 23-06-2016 26-01-2018 17-05-2019 29-08-2017 31-08-2017 22-08-2017 30-04-2018 08-11-2017 30-11-2020 08-11-2017 26-01-2022 06-04-2022 30-11-2017 15-02-2018 27-08-2020 07-08-2017 24-05-2018 18-03-2022 07-11-2017 21-12-2020 01-07-2022 07-08-2017 27-11-2017 09-01-2019 30-03-2017 01-11-2016 01-06-2018 01-11-2020 14-07-2016 08-11-2018 08-11-2018 08-10-2020 23-06-2016

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

2. TWEEN

- (72)発明者 フェン, シュウ
シンガポール国、シンガポール 1 3 8 6 2 3、バイオポリス・ドライブ 3、シナプス・ナンバー 0
7-11 トウ 1 6、シー／オー・チュウガイ・ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミ
テッド
- (72)発明者 フィッシャー, イェンス
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ノンネンヴァルト 2、ツェー／オー・ロシュ・ダイアグノ
スティックス・ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ガン, シオク・ワン
シンガポール国、シンガポール 1 3 8 6 2 3、バイオポリス・ドライブ 3、シナプス・ナンバー 0
7-11 トウ 1 6、シー／オー・チュウガイ・ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミ
テッド
- (72)発明者 ジョルジュ, ギー
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ノンネンヴァルト 2、ツェー／オー・ロシュ・ダイアグノ
スティックス・ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ゲルツ, ミヒャエル
スイス国、4 0 7 0 バーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4、ツェー／オー・エフ・ホ
フマン・ラ・ロシュ・アーゲー
- (72)発明者 ホ, ウェイ・シオン・エイドリアン
シンガポール国、シンガポール 1 3 8 6 2 3、バイオポリス・ドライブ 3、シナプス・ナンバー 0
7-11 トウ 1 6、シー／オー・チュウガイ・ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミ
テッド
- (72)発明者 カスプシク, ウカシュ
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ノンネンヴァルト 2、ツェー／オー・ロシュ・ダイアグノ
スティックス・ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ラム, ルンイ・アデリーン
シンガポール国、シンガポール 1 3 8 6 2 3、バイオポリス・ドライブ 3、シナプス・ナンバー 0
7-11 トウ 1 6、シー／オー・チュウガイ・ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミ
テッド
- (72)発明者 ランザ, ヴアレリア
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ノンネンヴァルト 2、ツェー／オー・ロシュ・ダイアグノ
スティックス・ゲーエムベーハー
- (72)発明者 シドニー・アンデルセン, ジャスミン

ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ノンネンヴァルト 2、ツェー／オー・ロシュ・ダイアグノ
スティックス・ゲーエムベーハー

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE10 CE11 CE12 DA01
 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB11 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA72 FA74
 GA22 GA23 GA26