

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年7月21日(21.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/153997 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/13 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/000661

(22) 国際出願日: 2022年1月12日(12.01.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-003805 2021年1月13日(13.01.2021) JP

(71) 出願人: アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 曾我 真司(SOGA, Shinji); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 重永 健詞(SHIGENAGA, Takeshi); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 堤 剛(TSUTSUMI, Takeshi); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 濱井 康丞, 外(HAMAI Kousuke et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号 アステラス製薬株式会社 イノベーション知財室内 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, 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.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: MULTISPECIFIC ANTIBODY BONDING TO ActRIIA, ActRIIB, AND Fn14

(54) 発明の名称: ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体

(57) Abstract: [Problem] Provided is a multispecific antibody that bonds to ActRIIA, ActRIIB, and Fn14 and inhibits amyotrophic action which occurs via ActRIIA, ActRIIB, and Fn14 to thereby prevent or treat an amyotrophic disease such as inclusion body myositis. [Solution] The present inventors, with consideration to multispecific antibodies, provided a multispecific antibody that contains: a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO. 2; and a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO. 4.

(57) 要約: 課題 ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合し、ActRIIA、ActRIIB及びFn14を介する筋萎縮作用を阻害することにより封入体筋炎等の筋萎縮性疾患を予防又は治療する多重特異性抗体を提供することにある。解決手段 本発明者らは、多重特異性抗体について検討し、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び配列番号4のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、多重特異性抗体を提供した。

WO 2022/153997 A1

明 細 書

発明の名称：

ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体
技術分野

[0001] 本発明は、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体に関する。

背景技術

[0002] アクチビン受容体タイプ2A (ActRIIA) 及びアクチビン受容体タイプ2B (ActRIIB) は、ミオスタチン及びアクチビンAの受容体として知られている。ActRIIA及びActRIIBへのリガンド刺激によりSmad2及びSmad3がリン酸化される。リン酸化Smad2/3はSmad4と複合体を形成し、各種転写因子と結合して遺伝子発現を制御することが知られている (Tsuchida K et al., Endocr J. 2008, Vol. 55, p. 11-21)。骨格筋においては、ActRIIA及びActRIIBはタンパク分解に関与していることが知られている (Morvan F et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2017, vol. 114, p. 12448-12453)。

[0003] 線維芽細胞増殖因子誘導性14 (Fn14: Fibroblast growth factor-inducible 14) (TNFRSF12Aとも称する) は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの一員である。また、Fn14は、TNF様アポトーシス弱誘導因子 (TWEAK: TNF-like weak inducer of apoptosis) の受容体としても知られている。Fn14にはTWEAKの結合によって惹起されるTWEAK依存的な活性化と、TWEAKの非存在下で惹起されるTWEAK非依存的な活性化がある。TWEAK依存的又は非依存的なFn14の活性化は、いずれもNF- κ Bシグナル伝達経路を活性化し、細胞の増殖

、移動、分化、及びアポトーシス、並びに、血管新生、組織損傷、再生に關与する炎症を制御することが知られている (Winkles JA, Nat Rev Drug Discov. 2008, Vol. 7, p. 411-425)。骨格筋においては、Fn14は病態時に発現が上昇し、骨格筋萎縮に關与していることが報告されている (非特許文献1)。これまでにいくつかのFn14に結合する抗体の開発が報告されている。これらの抗体の多くは、TWEAK刺激によるFn14の活性化に対するアンタゴニスト活性 (以降、単に「アンタゴニスト活性」とも称する) と同時に、TWEAK非存在下でFn14を活性化させるアゴニスト活性 (以降、単に「アゴニスト活性」とも称する) も持つことが知られている。例えば、マウスモノクローナル抗体CRCBT-06-002は、ヒト悪性黒色腫由来細胞株A375細胞でのTWEAK刺激によるIL-8産生を阻害するアンタゴニスト活性が報告されている。しかし、同時にTWEAK非存在下でA375細胞からのIL-8産生を誘導するアゴニスト活性を持つことも報告されている (特許文献1)。近年では、アンタゴニスト活性を持ち、アゴニスト活性を持たないFn14に結合する抗体も知られている (特許文献2)。

[0004] 骨格筋萎縮には、ActR1A、ActR1B及びFn14以外にもいくつかの因子が關与していることが報告されている (非特許文献2)。腫瘍壊死因子 (TNF) α はTNF受容体を介して骨格筋タンパクの分解に關わる。糖質コルチコイドも同様に、糖質コルチコイド受容体を介して骨格筋タンパク分解に關わる。また、骨格筋のタンパク同化に關与するインスリン様成長因子の抑制により、骨格筋が萎縮する。

[0005] 封入体筋炎 (sIBM: Sporadic inclusion body myositis) は慢性進行性の筋疾患である。大腿四頭筋や手指・手首屈筋を中心に筋萎縮と筋力低下が認められる。特徴的な所見として縁取空胞を伴う筋線維の発現、非壊死線維や筋内鞘への単核球侵入や包囲が見られる。進行とともに歩行機能の低下や嚥下障害が認められ、生活の質 (QOL: Quality of life) を著しく低下させる。しかしながら

、sIBMには現在確立された治療法がない（非特許文献3）。

[0006] これまでに、数多くのミオスタチン阻害剤又はActRIIA及びActRIIB阻害剤の筋疾患に対する臨床試験が実施されている。中でも、ActRIIA及びActRIIB阻害抗体であるBimagrumab（特許文献3）は最も高次まで開発がすすめられた薬剤であり、sIBMを対象として第二B相／第三相試験が実施された。Bimagrumabの第二B相／第三相試験において除脂肪体重の増加は認められたものの、主要評価項目である6分間歩行距離の改善は認められていない（非特許文献4）。

[0007] sIBM患者の骨格筋では、Smad2のリン酸化の上昇が認められていることから、筋萎縮へのActRIIA及びActRIIB刺激の関与が示唆されている（非特許文献5）。加えて、sIBM患者の骨格筋においてFn14の発現が上昇していることが報告されている（非特許文献6）。しかし、これまでにActRIIA及びActRIIBとFn14の両経路阻害を標的としたsIBMの治療薬は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2013/026099号

特許文献2：国際公開第2020/090892号

特許文献3：国際公開第2017/081624号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Sato S et al., Front Immunol. (瑞) 2014, Vol. 5, Article 18

非特許文献2：Bonald P et al., Dis Model Mech. (英) 2013, Vol. 6, p. 25-39

非特許文献3：Naddaf E et al., Neurotherapeutics. (米) 2018, Vol. 15, p. 995-1005

非特許文献4：Hanna MG et al., Lancet Neurology. (英) 2019, Vol. 18, p. 834-844

非特許文献5: Amato AA et al., *Neurology*. (米) 2014、Vol. 83、p. 2239-2246

非特許文献6: Morosetti R et al., *Am J Pathol*. (米) 2012、Vol. 180、p. 1603-1613

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の課題は、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合し、ActRIIA、ActRIIB及びFn14を介する筋萎縮作用を阻害することにより封入体筋炎等の筋萎縮性疾患を予防又は治療することが期待される多重特異性抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、多重特異性抗体の作製において相当の創意工夫を持って検討を重ねた結果、配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から105までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、第一のVHH、並びに、配列番号2のアミノ酸番号172から176までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号195から210までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号243から251までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、第二のVHHを含むActRIIA及びActRIIBに結合するポリペプチドを作製した(実施例2)。さらに、当該ポリペプチドのC末端がヒトFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている多重特異性抗体を作製した(実施例3~4)。当該多重特異性抗体が、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合し(実施例5)、ミオスタチン刺激によるSmadのリン酸化を阻害すること(実施例6)、TWEAK刺激によるNF- κ Bの活性化を阻害すること(実施例7)、並びに、TWEAK非存在下においてNF- κ Bの活性化を誘導しないこと(実施例7)を見出した。これらの結果

、前記 ActR11A、ActR11B 及び Fn14 に結合する多重特異性抗体を提供し、本発明を完成した。

[0012] 本発明によれば、例えば、以下の発明が提供される。

[1]

ActR11A、ActR11B 及び Fn14 に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A 及び ActR11B に結合する第一の VHH 及び第二の VHH を含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、

第一の VHH が配列番号 2 のアミノ酸番号 31 から 35 までのアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 2 のアミノ酸番号 50 から 65 までのアミノ酸配列からなる CDR2、配列番号 2 のアミノ酸番号 98 から 105 までのアミノ酸配列からなる CDR3 を含み、

第二の VHH が配列番号 2 のアミノ酸番号 172 から 176 までのアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 2 のアミノ酸番号 195 から 210 までのアミノ酸配列からなる CDR2、配列番号 2 のアミノ酸番号 243 から 251 までのアミノ酸配列からなる CDR3 を含み、

(a) のポリペプチドの C 末端が Fn14 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域の N 末端にペプチドリッカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[2]

第一の VHH が配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 116 までのアミノ酸配列からなり、第二の VHH が配列番号 2 のアミノ酸番号 142 から 262 までのアミノ酸配列からなる、[1] に記載の多重特異性抗体。

[3]

第一の VHH の C 末端が第二の VHH の N 末端にペプチドリッカーを介し

て連結されている、[1]又は[2]に記載の多重特異性抗体。

[4]

(a)のポリペプチドが配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなる、[1]に記載の多重特異性抗体。

[5]

F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号303から307までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号322から338までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号371から379までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、及び、配列番号4のアミノ酸番号24から34までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号50から56までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号4のアミノ酸番号89から97までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[6]

F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[7]

F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及びT 2 5 6 Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む、[1]～[6]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[8]

F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及びT 2 5 6 E

のアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[9]

F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720までのアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[10]

配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[1]に記載の多重特異性抗体。

[11]

翻訳後修飾を受けた、[1]～[10]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[12]

[1]～[4]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[13]

[5]～[9]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のF n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[14]

[5]～[9]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のF n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[15]

[1]～[9]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペ

プチドと F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[1 6]

[1 0] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[1 7]

[1 0] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[1 8]

[1 2] ~ [1 5] のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[1 9]

[1 4] 及び／又は [1 5] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[2 0]

[1 6] 及び／又は [1 7] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[2 1]

[1 8] ~ [2 0] のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[2 2]

以下の (i) 及び (i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の (i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び／又は以下の (i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞 :

(i) [1] ~ [9] のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド ;

(i i) [1] ~ [9] のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[23]

以下の(A) ~ (D) からなる群より選択される、宿主細胞：

(A) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び[10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び[10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(C) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；
並びに

(D) [10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[24]

以下の(i) 及び(i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の(i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターと以下の(i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体を生産する方法：

(i) [1] ~ [9] のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(i i) [1] ~ [9] のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体の (a) のポリペプチドと F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[25]

以下の (E) ~ (G) からなる群より選択される宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、A c t R I I A、A c t R I I B 及び F n 1 4 に結合する多重特異性抗体を生産する方法：

(E) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び [10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(F) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び [10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(G) [10] に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、[10] に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[26]

[24] に記載の方法で生産された多重特異性抗体。

[27]

[25] に記載の方法で生産された多重特異性抗体。

[28]

[1] ~ [11]、[26] 及び [27] のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体、並びに、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[29]

封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物である、[28]に記載の医薬組成物。

[30]

[1]～[11]、[26]及び[27]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の治療有効量を投与する工程を包含する、封入体筋炎を予防又は治療する方法。

[31]

封入体筋炎の予防又は治療に使用するための、[1]～[11]、[26]及び[27]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[32]

封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物の製造における、[1]～[11]、[26]及び[27]のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の使用。

発明の効果

[0013] 本発明の多重特異性抗体は、ミオスタチン刺激によるSmadのリン酸化を阻害し、さらにアゴニスト活性を示さずにTWEAK刺激によるFn14の活性化を阻害することによって、筋萎縮抑制作用を有すると期待されるものであり、封入体筋炎等の筋萎縮性疾患の予防又は治療剤として使用できる可能性がある。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] (A) ActRIIA/HEK293細胞におけるミオスタチン誘発Smad3リン酸化に対する阻害作用 (ActRIIA阻害作用)、及び (B) ActRIIB/HEK293細胞におけるミオスタチン誘発Smad3リン酸化に対する阻害作用 (ActRIIB阻害作用) を示す。縦軸はミオスタチン100ng/mLによるSmad3リン酸化に対する阻害率 (ミオスタチン100ng/mL刺激条件下の測定値を0%阻害、ミオスタチン非存在下の測定値を100%阻害とする) を示す。横軸は抗体濃度 (nmol/L) の対数を示す。なお、データは2試行 (各試行はデュプリケートで実施) の平均値を表す。

[0015] [図2]NF- κ B/HEK293細胞における(A)TWEAK誘発NF- κ B活性化に対するアンタゴニスト活性、及び(B)Fn14に対するアゴニスト活性を示す。縦軸は(A)TWEAK100ng/mLによるNF- κ B活性化に対する阻害率(TWEAK100ng/mL刺激条件下の測定値を0%阻害、TWEAK非存在下の測定値を100%阻害とする)、及び(B)TWEAK100ng/mL刺激条件下の測定値を100%、TWEAK非存在下の測定値を0%としたときの、TWEAK非存在下における評価抗体による相対的活性化率を示す。横軸は抗体濃度(nmol/L)の対数を示す。なお、データは2試行(各試行はデュプリケートで実施)の平均値を表す。

[0016] [図3]ステロイド誘発ミオパチーモデルマウスにおける、ステロイド及び被験物質投与開始後14日の(A)大腿四頭筋重量、及び(B)握力を示す。縦軸は(A)摘出大腿四頭筋の実測重量(g)、及び(B)四肢握力(kg)を示す。なお、データは各群10例の平均値 \pm SEMを表す。* $P < 0.05$ 対正常群、# $P < 0.05$ 対溶媒投与群、+ $P < 0.05$ 対75E9(mFc)群、++ $P < 0.05$ 対STF8-1(mFc)群、& $P < 0.05$ 対75E9(mFc)+STF8-1(mFc)群、全てスチューデントt検定。

[0017] [図4]ステロイド誘発ミオパチーモデルサルにおける、ステロイド及び被験物質投与開始後4週の大腿部除脂肪重量を示す。縦軸は二重エネルギーX線吸収測定法による骨密度測定装置で計測した大腿部の除脂肪重量(g)を示す。なお、正常群のデータは2例の実測値及び平均値、ステロイド誘発ミオパチーモデル各群のデータは各群3例の実測値及び平均値 \pm SEMを表す。* $P < 0.05$ 対溶媒投与群、スチューデントt検定。

発明を実施するための形態

[0018] 以下に、本発明について詳述する。

[0019] 抗体にはIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEの5つのクラスが存在する。抗体分子の基本構造は、各クラス共通で、分子量5万~7万の重鎖

と2万～3万の軽鎖から構成される。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEに対応してIg γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ とよばれる。さらにIgGには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のサブクラスが存在し、それぞれに対応する重鎖はIg γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、Ig γ 4とよばれている。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、 λ 型と κ 型の2種が知られており、それぞれIg λ 、Ig κ とよばれる。抗体分子の基本構造のペプチド構成は、それぞれ相同な2本の重鎖及び2本の軽鎖が、ジスルフィド結合(S-S結合)及び非共有結合によって結合され、分子量15万～19万である。2種の軽鎖は、どの重鎖とも対をなすことができる。個々の抗体分子は、常に同一の軽鎖2本と同一の重鎖2本からできている。

[0020] 鎖内S-S結合は、重鎖に四つ(Ig μ 、Ig ϵ には五つ)、軽鎖には二つあって、アミノ酸100～110残基ごとに一つのループを成し、この立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位又はドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにN末端に位置するドメインは、同種動物の同一クラス(サブクラス)からの標品であっても、そのアミノ酸配列が一定せず、可変領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)とよばれている。可変領域よりC末端側のアミノ酸配列は、各クラス又はサブクラスごとにほぼ一定で定常領域とよばれている(定常領域の各ドメインは、それぞれ、重鎖定常領域のN末端側からCH1、CH2、CH3と表され、軽鎖定常領域はCLと表される)。

[0021] 抗体の抗原結合部位はVH及びVLによって構成され、結合の特異性はそれぞれこの部位のアミノ酸配列によっている。一方、補体や各種Fc受容体発現細胞との結合といった生物学的活性は各クラスIgの定常領域の構造の差を反映している。軽鎖、重鎖の可変領域の可変性は、どちらの鎖にも存在する3つの小さな超可変領域にほぼ限られることがわかっており、これらの領域は相補性決定領域(CDR:それぞれN末端側からCDR1、CDR2

、CDR3)とよばれている。可変領域の残りの部分はフレームワーク領域(FR)とよばれ、比較的一定である。

[0022] 抗体のVH及びVLを含む各種抗原結合フラグメントも抗原結合活性を有し、このような代表的な抗原結合フラグメントとして、一本鎖可変領域フラグメント(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂が挙げられる。scFvは、リンカーで連結されたVHとVLから構成される、一価の抗体フラグメントであり、Fabは、軽鎖と、VH、CH1ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される、一価の抗体フラグメントである。Fab'は、軽鎖と、VH、CH1ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される、一価の抗体フラグメントであり、このヒンジ領域の部分には重鎖間S-S結合を構成していたシステイン残基が含まれる。F(ab')₂フラグメントは、2つのFab'フラグメントがヒンジ領域中の重鎖間S-S結合で結合した二価の抗体フラグメントである。

[0023] ラクダ科動物(フタコブラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ)由来の抗体として、軽鎖とCH1ドメインが欠損した重鎖のみで構成された抗体(重鎖抗体)が知られている。重鎖抗体の可変領域はvariable domain of heavy chain of heavy chain antibody(VHH)とよばれ、重鎖抗体の抗原結合部位はVHHのみで構成される。VHHは3つのCDRを含み、抗原への結合の特異性はCDRのアミノ酸配列によっている。

[0024] 本明細書における「VHH」には、FRのアミノ酸配列の一部、大部分、又は全部がヒト免疫グロブリン分子に由来するアミノ酸配列に置換されたそのヒト化型(ヒト化VHH)も含まれる。ヒト化の方法としては、特に制限されないが、例えば、国際公開第2006/122825号、米国特許第5225539号、米国特許第6180370号等を参照してヒト化抗体を製作することができる。

[0025] 本明細書において「多重特異性抗体」は2種以上の異なる抗原に結合する

抗体を意味する。

[0026] 本明細書において「ペプチドリンカー」とは、可変領域間を連結するための、遺伝子工学的手法により導入し得る1以上の任意のアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。

[0027] <本発明の多重特異性抗体>

本発明は、以下の多重特異性抗体（以下、「本発明の多重特異性抗体」とも称する）を提供する：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、

第一のVHHが配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号98から105までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

第二のVHHが配列番号2のアミノ酸番号172から176までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号195から210までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号243から251までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0028] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHである。本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116まで

のアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる。

[0029] 本発明の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドにおいて、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端に連結されていてもよく、第二のVHHのC末端が第一のVHHのN末端に連結されていてもよい。本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端に連結されている。

[0030] 本発明の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドにおいて、第一のVHHと第二のVHHは直接連結されていてもよく又はペプチドリンカーを介して連結されていてもよい。本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHはペプチドリンカーを介して連結されている。

[0031] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHであり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。

[0032] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。

[0033] 第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHは、5アミノ酸以上のペプチドリンカーで連結され、1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHは、5アミノ酸以上35アミノ酸以下、5アミノ酸以上30アミノ酸以下、5アミノ酸以上25アミノ酸以下、10アミノ酸以上25アミノ酸以下

、又は15アミノ酸以上25アミノ酸以下のペプチドリンカーで連結される。
。

[0034] ペプチドリンカーとして、例えば、

S e r

G l y · S e r

G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号5)

S e r · G l y · G l y · G l y (配列番号6)

G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号8)

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号9)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号10)

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号11)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号12)

(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7))_n

(S e r · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号8))_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7))_n [nは1~5の整数である]であり、1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r)₅ (配列番号2のアミノ酸番号117から141)である。

[0035] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHであり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されており、該第一のVHHと第二

のVHHを連結するペプチドリンカーが(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser)₅(配列番号2のアミノ酸番号117から141)である。

[0036] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、(a)のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなる。

[0037] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号2のアミノ酸番号303から307までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号322から338までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号371から379までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、及び、配列番号4のアミノ酸番号24から34までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号50から56までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号4のアミノ酸番号89から97までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

[0038] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

[0039] 本発明の多重特異性抗体の1つの実施形態において、Fn14に結合する抗体の抗原結合フラグメントは、scFv、Fab、Fab'、又はF(ab')₂である抗原結合フラグメントである。

[0040] Fn14に結合する抗体における定常領域としては、どのようなサブクラスの定常領域(例えば、重鎖としてIgγ1、Igγ2、Igγ3又はIgγ4、軽鎖としてIgλ又はIgκの定常領域)も選択可能であり得る。1つの実施形態において、Fn14に結合する抗体は、重鎖定常領域としてヒトIgγ1定常領域、軽鎖定常領域としてヒトIgκ定常領域を含む。

[0041] 本明細書中で使用される抗体の定常領域におけるアミノ酸変異導入に関する残基番号については、EUインデックス(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immun

ological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda) に従う。L234Aとは、ヒトIg γ 1定常領域におけるKabataらのEUインデックスに従うアミノ酸234位のロイシンのアラニンでの置換である。L235Aとは、ヒトIg γ 1定常領域におけるKabataらのEUインデックスに従うアミノ酸235位のロイシンのアラニンでの置換である。M252Yとは、ヒトIg γ 1定常領域におけるKabataらのEUインデックスに従うアミノ酸252位のメチオニンのチロシンでの置換である。S254Tとは、ヒトIg γ 1定常領域におけるKabataらのEUインデックスに従うアミノ酸254位のセリンのスレオニンでの置換である。T256Eとは、ヒトIg γ 1定常領域におけるKabataらのEUインデックスに従うアミノ酸256位のスレオニンのグルタミン酸での置換である。

[0042] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、Fn14に結合する抗体を含み、該Fn14に結合する抗体が、L234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む。L234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する定常領域としては、例えば、配列番号2のアミノ酸番号391から720までのアミノ酸配列からなるヒトIg γ 1定常領域が挙げられる。

[0043] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、Fn14に結合する抗体を含み、該Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む。

[0044] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、Fn14に結合す

る抗体を含み、該Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む。

[0045] 本発明の多重特異性抗体において、(a)のポリペプチドのC末端は、Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリinkerを介して連結されている。使用されるペプチドリinkerの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。1つの実施形態において、(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントは、5アミノ酸以上のペプチドリinkerで連結され、1つの実施形態において、(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントは、5アミノ酸以上35アミノ酸以下、5アミノ酸以上30アミノ酸以下、5アミノ酸以上25アミノ酸以下、5アミノ酸以上20アミノ酸以下、又は10アミノ酸以上20アミノ酸以下のペプチドリinkerで連結される。

[0046] ペプチドリinkerとして、例えば、

S e r

G l y · S e r

G l y · G l y · S e r

S e r · G l y · G l y

G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号5)

S e r · G l y · G l y · G l y (配列番号6)

G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号8)

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号9)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号10)

G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号11)

S e r · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号12)

2)

(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7))_n

(S e r · G l y · G l y · G l y · G l y (配列番号8))_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。1つの実施形態において、(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7))_n [nは1~5の整数である]であり、1つの実施形態において、(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r)₂ (配列番号2のアミノ酸番号263から272)である。

[0047] 本発明の多重特異性抗体において、第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーと(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを連結するペプチドリンカーは、同じペプチドリンカーでも、異なるペプチドリンカーでもよい。

[0048] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及

び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0049] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体を含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0050] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体

であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体
を含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含み、

(a)のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、
多重特異性抗体。

[0051] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体
であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント
を含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されており、

Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及

び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0052] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体を含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されており、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0053] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体を含み、

第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されており、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、
多重特異性抗体。

[0054] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActR11A、ActR11B及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActR11A及びActR11Bに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、

(a) のポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及

び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、

多重特異性抗体。

[0055] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActRIIA及びActRIIBに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体を含み、

(a) のポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、
多重特異性抗体。

[0056] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、以下の多重特異性抗体である：

ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActRIIA及びActRIIBに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体
を含み、

(a) のポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなり、

Fn14に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体の重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、
多重特異性抗体。

[0057] 1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、多重特異性抗体である。

[0058] 抗体を細胞で発現させる場合、抗体が翻訳後に修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾の例としては、カルボキシペプチダーゼによる重鎖C末端のリジンの欠失、重鎖及び軽鎖N末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾、グリコシル化、酸化、脱アミド化、糖化等が挙げられ、種々の抗体において、このような翻訳後修飾が生じることが知られている (Liu H et al., J Pharm Sci, 2008, Vol. 97, p. 2426-2447)。

[0059] 本発明の多重特異性抗体には、翻訳後修飾を受けた多重特異性抗体も含まれる。1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、前述の本発明の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び/又はFn14に結合する抗体の重鎖C末端のリジン欠失を受けた多重特異性抗体である。このようなN末端のピログルタミル化又はC末端リジン欠失による翻訳後修飾が抗体の活性に影響を及ぼすものではないことは当該分野

で知られている (Lyubarskaya Y et al., Anal Biochem, 2006, Vol. 348, p. 24-39)。

[0060] 当業者であれば、本発明に基づいて、本発明の多重特異性抗体と他のペプチドや蛋白質との融合体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾体を作製することも可能であり、これらの形態の多重特異性抗体も本発明の多重特異性抗体に含まれる。融合に用いられる他のペプチドや蛋白質は、融合体が ActRIIA、ActRIIB 及び Fn14 に結合する限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種タグペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合蛋白質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチド又は蛋白質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、修飾体が ActRIIA、ActRIIB 及び Fn14 に結合する限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リポソーム、低分子化合物等が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体の修飾に用いられる修飾剤はポリエチレングリコールである。

[0061] 本発明の多重特異性抗体は、ActRIIA 及び ActRIIB に結合する第一の VHH 及び第二の VHH、並びに、Fn14 に結合する抗体又は抗原結合フラグメントを含む。本発明の多重特異性抗体は、ActRIIA、ActRIIB 及び Fn14 に結合する。ActRIIA、ActRIIB 又は Fn14 に結合するか否かは、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 等の方法が挙げられる。ELISA を用いる場合は、例えば、ActRIIA、ActRIIB 又は Fn14 蛋白質を ELISA プレートに固相化し、これに対して被験抗体を添加して反応させた後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 等の酵素で標識した抗 IgG 抗体等の二次抗体を反応させる。反応後、洗浄した後、その活性を検出する試薬 (例えば、HRP 標識の場合、TMB Microwell Peroxidase Subs

t r a t e (K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s 社、50-76-03)) 等を用いた活性測定により、二次抗体の結合を同定することで、被験抗体が A c t R 1 1 A、A c t R 1 1 B 又は F n 1 4 に結合するか否かを確認することができる。具体的な評価方法としては、後記実施例5に記載されるような方法を用いることができる。

[0062] 本発明の多重特異性抗体は、ヒト A c t R 1 1 A、ヒト A c t R 1 1 B 及びヒト F n 1 4 のみならず、他の動物（マウス、サル等）由来の A c t R 1 1 A、A c t R 1 1 B 及び F n 1 4 にも結合する多重特異性抗体も含まれる。1つの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、ヒト A c t R 1 1 A、ヒト A c t R 1 1 B 及びヒト F n 1 4 に結合する。

[0063] 本発明の多重特異性抗体は、本明細書に開示される、本発明の多重特異性抗体の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の多重特異性抗体は、特に限定されるものではないが、例えば、後述の〈本発明の多重特異性抗体を生産する方法〉に記載の方法に従い製造することができる。

[0064] 本発明の多重特異性抗体は、必要によりさらに精製された後、定法に従って製剤化され、封入体筋炎等の筋萎縮性疾患の予防又は治療に用いることができる。

[0065] 〈本発明のポリヌクレオチド〉

本発明はまた、以下の(1)～(4)のポリヌクレオチド（「本発明のポリヌクレオチド」とも称する）を提供する：

(1) 本発明の多重特異性抗体の第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド（(a)のポリペプチド）をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(2) 本発明の多重特異性抗体のF n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(3) 本発明の多重特異性抗体のF n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合

フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(4) 本発明の多重特異性抗体の第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド((a)のポリペプチド)とFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0066] 1つの実施形態において、(1)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(1)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含み、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、ポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(1)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0067] 1つの実施形態において、(2)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(2)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(2)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0068] 1つの実施形態において、(3)のポリヌクレオチドは、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(3)のポリヌクレオチドは、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(3)のポリヌクレオチドは、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0069] 1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含み、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド及びFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0070] 1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から

390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含み、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0071] 1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含み、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖を含むポリペプチド

ドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0072] 1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含み、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリッカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0073] 1つの実施形態において、(4)のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0074] 本発明のポリヌクレオチドは、その塩基配列に基づき、当該分野で公知の

方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、国際公開第90/07861号に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。

[0075] <本発明の発現ベクター>

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクター（「本発明の発現ベクター」とも称する）を提供する。1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の（1）～（4）のポリヌクレオチドのいずれかを含む。本発明の発現ベクターに含まれるポリヌクレオチドの具体的な実施形態の例としては、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の（1）～（4）のポリヌクレオチドについて記載されたものが挙げられる。

[0076] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、（i）本発明の多重特異性抗体のF_n14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び／又は（ii）本発明の多重特異性抗体の第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド（（a）のポリペプチド）とF_n14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む。

[0077] 本発明の発現ベクターに含まれる前記（i）及び（ii）のポリヌクレオチドの具体的な実施形態の例としては、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の（3）及び（4）のポリヌクレオチドについて記載されたものが挙げられる。

[0078] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターとしては、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、又は、配列番

号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドと配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとを含む発現ベクターである。

[0079] 本発明のポリヌクレオチドを発現させるために用いる発現ベクターとしては、真核細胞（例えば、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母）及び／又は原核細胞（例えば、大腸菌）の各種の宿主細胞中で本発明の多重特異性抗体の第一のVHHをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び該多重特異性抗体の第二のVHHをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現し、これらによりコードされるポリペプチドを産生できるものである限り、特に制限されるものではない。このような発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等が挙げられ、例えば、pEE6.4やpEE12.4等のプラスミドベクターを使用することができる。また、AG- γ 1やAG- κ （例えば、国際公開94/20632号を参照）等の予めヒトIg定常領域遺伝子を有する発現ベクターに可変領域遺伝子断片を導入して抗体遺伝子を発現することもできる。

[0080] 本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。動物細胞で本発明のポリヌクレオチドを発現させるためのプロモーターとしては、例えば、CMV、RSV、SV40などのウイルス由来プロモーター、アクチンプロモーター、EF (elongation factor) 1 α プロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。細菌（例えば、エシェリキア属菌）で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、 λ PLプロモーター、tacプロモーターなどが挙げられる。また、酵母で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられる。

[0081] 宿主細胞として動物細胞、昆虫細胞、又は酵母を用いる場合、本発明の発

現ベクターは、開始コドン及び終止コドンを含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、エンハンサー配列、本発明の多重特異性抗体又はその重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域をコードする遺伝子の5'側及び3'側の非翻訳領域、分泌シグナル配列、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、あるいは複製可能単位などを含んでもよい。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域、及び複製可能単位を含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでもよい。

[0082] <本発明の形質転換された宿主細胞>

本発明はまた、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞（「本発明の形質転換された宿主細胞」とも称する）を提供する。1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の(1)～(4)のポリヌクレオチドのいずれかを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。当該発現ベクターに含まれるポリヌクレオチドの具体的な実施形態の例としては、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の(1)～(4)のポリヌクレオチドについて記載されたものが挙げられる。

[0083] 1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、以下の(i)及び/若しくは(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の(i)のポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び/若しくは以下の(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である：

(i) 本発明の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(i i) 本発明の多重特異性抗体の第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド((a)のポリペプチド)とFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0084] 本発明の宿主細胞における前記(i)及び(ii)のポリヌクレオチドの具体的な実施形態の例としては、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の(3)及び(4)のポリヌクレオチドについて記載されたものが挙げられる。

[0085] 1つの実施形態において、本発明の形質転換された宿主細胞には、以下の(A)～(D)からなる群より選択される、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる。

(A) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(C) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；
並びに

(D) 配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0086] 形質転換する宿主細胞としては、使用する発現ベクターに適合し、該発現ベクターで形質転換されて、多重特異性抗体を発現することができるものである限り、特に限定されるものではない。形質転換する宿主細胞としては、例えば、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞又は人工的に樹

立された細胞など種々の細胞（例えば、動物細胞（例えば、CHO-K1SV細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf9）、細菌（エシェリキア属菌など）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）など）が挙げられ、例えば、CHO細胞（CHO-K1SV細胞、CHO-DG44細胞等）、293細胞、NS0細胞等の培養細胞を使用することができる。

[0087] 宿主細胞を形質転換する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる。

[0088] <本発明の多重特異性抗体を生産する方法>

本発明はまた、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体を生産する方法（（「本発明の生産方法」とも称する））を提供する。

[0089] 1つの実施形態において、本発明の生産方法は、以下の(i)及び(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の(i)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターと以下の(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する：

(i) 本発明の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(ii) 本発明の多重特異性抗体の第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド（(a)のポリペプチド）とFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0090] 本発明の生産方法における前記(i)及び(ii)のポリヌクレオチドの具体的な実施形態の例としては、<本発明のポリヌクレオチド>の項に記載の(3)及び(4)のポリヌクレオチドについて記載されたものが挙げられ

る。

[0091] 1つの実施形態において、本発明の生産方法には、以下の(A)～(C)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体を生産する方法が含まれる。

(A) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(C) 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、

配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0092] 形質転換された宿主細胞の培養は公知の方法により行うことができる。培養条件、例えば、温度、培地のpH、及び培養時間は、適宜選択される。宿主細胞が動物細胞の場合、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地(Eagle H、Science、1959、Vol. 130、p. 432-437)、DMEM培地(Dulbecco R and Freeman G、Virology、1959、Vol. 8、p. 396-397)、RPMI1640培地(Moore GE et al.、JAMA、1967、Vol. 199、p. 519-524)、199培地(Morgan JF et al.、Proc Soc Exp Biol Med、1950、Vol. 73、p. 1-8)等を用いることが

できる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約30～40℃で約15～336時間行われる。宿主細胞が昆虫細胞の場合、培地としては、例えば、胎児牛血清を含むGrace's培地(Smith GE et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1985, Vol. 82, p. 8404-8408)等を用いることができる。培地のpHは約5～8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20～40℃で約15～100時間行われる。宿主細胞が大腸菌又は酵母である場合、培地としては、例えば、栄養源を含有する液体培地が適当である。栄養培地は、形質転換された宿主細胞の生育に必要な炭素源、無機窒素源又は有機窒素源を含んでいくことが好ましい。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源又は有機窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが挙げられる。所望により他の栄養素(例えば、無機塩(例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類など)、抗生物質(例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)を含んでいてもよい。培地のpHは約5～8であるのが好ましい。宿主細胞が大腸菌の場合、好ましい培地としては、例えば、LB培地、M9培地(Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Vol. 3, A2. 2)等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約14～39℃で約3～24時間行われる。宿主細胞が酵母の場合、培地としては、例えば、Burkholder最小培地(Bostian KA et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1980, Vol. 77, p. 4504-4508)等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20～35℃で約14～144時間行われる。上述のような培養により、本発明の多重特異性抗体を発現させることができる。

[0093] 本発明の多重特異性抗体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程に加えて、さらには、該形質転換された宿主細胞及び／又は培養上清から多重特異性抗体を回収、例えば単離又は精製する工程を含むことができる。単離又は精製方法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。例えば、培養上清中に蓄積された抗体は、各種クロマトグラフィー、例えば、プロテインAカラム又はプロテインGカラムを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製することができる。

[0094] 本発明の多重特異性抗体には、本発明の多重特異性抗体を生産する方法で生産された多重特異性抗体も含まれる。

[0095] <本発明の医薬組成物>

本発明はまた、本発明の多重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物（「本発明の医薬組成物」とも称する）を提供する。本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴剤等の非経口剤が挙げられ、静脈内投与、皮下投与、及び筋肉内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。

[0096] 本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、複数種の本発明の多重特異性抗体を含み得る。1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体、及び、該多重特異性抗体の翻訳後修飾によ

り生じた多重特異性抗体を含有する。1つの実施形態において、翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14に結合する抗体（単に「Fn14抗体」とも称する）の重鎖C末端リジンの欠失を含む。

[0097] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0098] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含むFn14に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0099] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むFn14に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0100] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチドであって、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリinkerを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末

端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0101] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチドであって、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリッカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含むFn14に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0102] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなる第一のVHH及び配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる第二のVHHを含むポリペプチドであって、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリッカーを介して連結されている、ポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むF

n 1 4 に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a) のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はF n 1 4 抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0103] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むF n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含むF n 1 4 に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a) のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はF n 1 4 抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0104] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及びT 2 5 6 Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含むF n 1 4 に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a) のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はF n 1 4 抗体の重鎖C末端リジンの欠失で

ある。

[0105] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体は、以下を含む：

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなるポリペプチド、並びに、

(b) 配列番号2のアミノ酸番号273から720に示されるアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むFn14に結合する抗体。

1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0106] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明の多重特異性抗体及び／又は該多重特異性抗体の翻訳後修飾により生じた多重特異性抗体を含有し、本発明の多重特異性抗体が、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、医薬組成物である。1つの実施形態において、当該翻訳後修飾は、(a)のポリペプチドのN末端のピログルタミル化及び／又はFn14抗体の重鎖C末端リジンの欠失である。

[0107] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、下記(c)～(f)のうち1種又は2種以上の多重特異性抗体を含有する：

(c) 配列番号2のアミノ酸番号1から719までのアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、多重特異性抗体。

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾されたポリペプチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、多重特異性抗体。

(e) 配列番号2のアミノ酸番号1から719までのアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸番号1のグルタミン酸がピログルタミン酸に修飾されたポリペプチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、多重特異性抗体。

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、多重特異性抗体。

[0108] 上記製剤化に当たっての本発明の多重特異性抗体の添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいは抗体の結合力価等により異なるが、例えば、投与時に0.001mg/kg~100mg/kg程度となるように用いることができる。

[0109] 本発明の医薬組成物は、ActRIIA、ActRIIB、Fn14が病態形成に関与する疾患、例えば、封入体筋炎の予防又は治療剤として用いることができる。

[0110] 本発明には、本発明の多重特異性抗体を含む、封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物が含まれる。また、本発明には、本発明の多重特異性抗体の治療有効量を投与する工程を包含する、封入体筋炎を予防又は治療する方法が含まれる。また、本発明には、封入体筋炎の予防又は治療に使用するための、本発明の多重特異性抗体が含まれる。さらに、本発明には、封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物の製造における、本発明の多重特異性抗体の使用が含まれる。

[0111] <ActRIIA及びActRIIBに結合するポリペプチド>

本発明はまた、以下のActRIIA及びActRIIBに結合するポリペプチド（以下、「本発明のActRIIA/B結合ペプチド」とも称する）を提供する：

ActRIIA及びActRIIBに結合するポリペプチドであって、ActRIIA及びActRIIBに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含み、

第一のVHHが配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号98から105までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

第二のVHHが配列番号2のアミノ酸番号172から176までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号195から210までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号2のアミノ酸番号243から251までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、ポリペプチド。

[0112] 1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHである。1つの実施形態において、第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる。

[0113] 本発明のActRIIA/B結合ペプチドにおいて、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端に連結されていてもよく、第二のVHHのC末端が第一のVHHのN末端に連結されていてもよい。1つの実施形態において、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端に連結されている。

[0114] 本発明のActRIIA/B結合ペプチドにおいて、第一のVHHと第二のVHHは直接連結されていてもよく又はペプチドリンカーを介して連結されていてもよい。1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHはペプチドリンカーを介して連結されている。

[0115] 1つの実施形態において、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHであり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。

[0116] 1つの実施形態において、第一のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが、配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなり、第一のVHHの

C末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている。

[0117] 第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーは特に限定されず、例えば、＜本発明の多重特異性抗体＞の項において第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーとして例示されたペプチドリンカーが使用できる。1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r (配列番号7))_n [nは1～5の整数である]であり、1つの実施形態において、第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーは、(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r)₅ (配列番号2のアミノ酸番号117から141)である。

[0118] 1つの実施形態において、第一のVHH及び第二のVHHはヒト化VHHであり、第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されており、該第一のVHHと第二のVHHを連結するペプチドリンカーが(G l y · G l y · G l y · G l y · S e r)₅ (配列番号2のアミノ酸番号117から141)である。1つの実施形態において、本発明のA c t R I I A / B結合ペプチドは、配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなる。

[0119] 当業者であれば、本発明に基づいて、本発明のA c t R I I A / B結合ペプチドと他のペプチドや蛋白質との融合体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾体を作製することも可能であり、これらの融合体及び修飾体も本発明のA c t R I I A / B結合ペプチドに含まれる。融合に用いられる他のペプチドや蛋白質は、融合体がA c t R I I A及びA c t R I I Bに結合する限り特に限定されず、例えば、抗体又はその抗原結合フラグメント、ヒト血清アルブミン、各種タグペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合蛋白質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチド又は蛋白質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、修飾体がA c t R I I A及びA c t R I I Bに結合する限り

特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リポソーム、低分子化合物等が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の A c t R I I A / B 結合ペプチドの修飾に用いられる修飾剤はポリエチレングリコールである。

[0120] 本発明の A c t R I I A / B 結合ペプチド、その融合体及び修飾体は、V H H の配列情報、融合体に使用される他のペプチド又はタンパク質（例、抗体）、修飾体に用いられる修飾剤の情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の A c t R I I A / B 結合ペプチドは、特に限定されるものではないが、例えば、＜本発明の多重特異性抗体を生産する方法＞の項に記載の方法に従って生産することができる。

[0121] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0122] 市販のキット又は試薬等を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。

[0123] 実施例 1 : シングル V H H の取得

本発明者らは、A c t R I I B の細胞外ドメインを標的とする V H H を取得するために、A c t R I I B の細胞外ドメインを含むタンパク質をアルパカに複数回免疫した。免疫終了後にアルパカから採血を行い、その採血サンプルからアルパカ末梢血リンパ球を分離し、公知の方法（M i y a z a k i N e t a l . , J B i o c h e m . 2 0 1 5 , V o l . 1 5 8 , p . 2 0 5 - 2 1 5 ）に従いファージディスプレイ用免疫ライブラリを構築した。ファージディスプレイを使った A c t R I I B の細胞外ドメインに対するバイオパニングは、A c t R I I B の細胞外ドメインを含むタンパク質、CHO細胞にヒト A c t R I I B 遺伝子（NCBIアクセッション番号：N M _ 0 0 1 1 0 6 . 4 ）を導入した安定発現細胞株（以下、A c t R I I B

／CHO細胞と称する)、及び、HEK293細胞にヒトActRIIB遺伝子(NCBIアクセッション番号:NM_001106.4)を導入した安定発現細胞株(以下、ActRIIB／HEK293細胞と称する)を対象に実施した。ActRIIBの細胞外ドメインを含むタンパク質を対象としたバイオパニングは公知の方法(Miyazaki Net al.、J Biochem. 2015、Vol. 158、p. 205-215)に従って行った。ActRIIB／CHO細胞又はActRIIB／HEK293細胞を対象としたバイオパニングでは、ファージライブラリと各細胞を混合し洗浄操作を数回繰り返した後に、ファージ・細胞複合体から細胞に結合したファージを酸で溶出する、という方法で各細胞に結合したファージの取得を行った。上記バイオパニングによって、ActRIIBの細胞外ドメインに結合するファージを複数取得した。取得したファージからVHHをコードする遺伝子をクローニングし、配列決定した。

[0124] 実施例2：タンデムVHHの取得

実施例1で得たVHHのうち、任意の2つのVHHをコードする遺伝子をGly及びSerから構成される様々な長さのペプチドリンカー(GSリンカーとも称する)をコードする遺伝子で連結したファージディスプレイ用のライブラリを複数構築し、実施例1と同様にバイオパニングを実施した。ファージディスプレイを使ったActRIIAの細胞外ドメイン及びActRIIBの細胞外ドメインに対するバイオパニングは、ActRIIAの細胞外ドメインを含むタンパク質、ActRIIBの細胞外ドメインを含むタンパク質、CHO細胞にヒトActRIIA遺伝子(NCBIアクセッション番号:AB529011.1)を導入した安定発現細胞株(以下、ActRIIA／CHO細胞と称する)、及び、ActRIIB／CHO細胞を対象に実施した。複数のタンデムVHHを評価した結果、ActRIIAの細胞外ドメイン及びActRIIBの細胞外ドメインに結合するタンデムVHHを取得した。このタンデムVHHを75E9と称する。そして、国際公開第2006/122825号などの例に倣ってタンデムVHH75E9をヒト

化した。これをヒト化タンデムVHH75E9と称する。

[0125] ヒト化タンデムVHH75E9のアミノ酸配列を配列番号2のアミノ酸番号1から262に示す。配列番号2のアミノ酸番号1から262に示されるヒト化タンデムVHH75E9中の第一のVHHは配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる。

[0126] ヒト化タンデムVHH75E9の第一のVHHのCDR1、CDR2、CDR3はそれぞれ配列番号2のアミノ酸番号31から35まで、50から65まで、98から105までのアミノ酸配列からなる。ヒト化タンデムVHH75E9の第二のVHHのCDR1、CDR2、CDR3はそれぞれ配列番号2のアミノ酸番号172から176まで、195から210まで、243から251までのアミノ酸配列からなる。

[0127] 実施例3：抗Fn14抗体の取得

本発明者らは、細胞表面上に発現するヒトFn14に結合する抗体を取得する為に、国際公開第2020/090892号の実施例1に従ってヒトFn14の細胞外ドメインを含むヒトFc融合タンパク質の調製、及びJurkat細胞にヒトFn14遺伝子（NCBIアクセッション番号：NM_016639）を導入した安定発現細胞株（以下、Fn14/Jurkat細胞と称する）の構築を行い、免疫及びスクリーニングに用いた。そして、ヒトモノクローナル抗体開発技術「ベロシミュン」（VelocImmune antibody technology：Regeneron社（米国特許6596541号））マウスを用いて抗体を作製した。ベロシミュン技術により得られた抗体は、ヒト抗体の可変領域とマウス抗体の定常領域を有する抗体である。ベロシミュンマウスに、免疫反応を惹起するアジュバントと共に、上記で作製したヒトFn14の細胞外ドメインを含むヒトFc融合タンパク質からFabRICATOR（Sigma社、77661）を用いてヒトFc領域を切断・除去したヒトFn14タンパク質と、Fn14/Jurkat細胞を交互に免疫した。定法に従い、免疫したマウスのリ

リンパ節から採取したリンパ球を、マウス由来ミエローマ細胞SP2/O-Ag14 (ATCC:CRL-1581) と細胞融合することでハイブリドーマを作製し、モノクローン化した。ヒトFn14及びFn14/Jurkat細胞に結合し、かつ、TWEAK刺激によるNF- κ Bの活性化（以下、後記実施例において、TWEAK誘発NF- κ B活性化と称する）を抑制する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。そして、そのハイブリドーマから、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子をクローニングし、配列決定した。この抗体の重鎖可変領域をコードする遺伝子（配列番号2のアミノ酸番号273から390をコードする塩基配列に該当）の3'側にL234A及びL235Aのアミノ酸変異を有するヒトIg γ 1定常領域をコードする遺伝子を連結し（配列番号13）、5'側にシグナル配列をコードする遺伝子（Whittle *et al.*、*Protein Eng.* 1987、Vol. 1、p. 499-505）を連結した上で、GSベクターpEE6.4（Lonza社）に挿入した。配列番号13をアミノ酸に翻訳した配列が配列番号14である。また、この抗体の軽鎖可変領域をコードする遺伝子（配列番号4のアミノ酸番号1から108をコードする塩基配列に該当）の5'側に前記シグナル配列をコードする遺伝子を、そして3'側にヒト κ 鎖の定常領域をコードする遺伝子（配列番号4のアミノ酸番号109から214をコードする塩基配列に該当）をそれぞれ連結し、GSベクターpEE12.4（Lonza社）に挿入した。これらのGSベクターから重鎖と軽鎖の両遺伝子が挿入されたDouble-Geneベクター（以下、DGVと称する）を構築した。このベクターをトランスフェクトしたCHO-K1SV細胞の培養上清から、定法に従い抗体を精製した。この抗体をSTF8-1と称する。

[0128] STF8-1の重鎖可変領域は配列番号2のアミノ酸番号273から390のアミノ酸配列からなる。STF8-1の軽鎖可変領域は配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる。

[0129] STF8-1の重鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3はそれぞれ

配列番号2のアミノ酸番号303から307まで、322から338まで、371から379までのアミノ酸配列からなる。STF8-1の軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3はそれぞれ配列番号4のアミノ酸番号24から34まで、50から56まで、89から97までのアミノ酸配列からなる。

[0130] 実施例4：ヒト化75E9STF8-1の作製

前記シグナル配列をコードする遺伝子、ヒト化タンデムVHH75E9をコードする遺伝子（配列番号1の塩基番号1から786に該当）、GSリンカーをコードする遺伝子（配列番号1の塩基番号787から816に該当）、STF8-1の重鎖可変領域をコードする遺伝子（配列番号1の塩基番号817から1170に該当）、及び、L234A及びL235Aのアミノ酸変異と、M252Y、S254T、T256Eのアミノ酸変異（国際公開第2002/060919号）を有するヒトIg γ 1定常領域をコードする遺伝子（配列番号1の塩基番号1171から2160に該当）を順に連結したポリヌクレオチドをGSベクターpEE6.4（Lonza社）に挿入した。また、STF8-1の軽鎖可変領域遺伝子（配列番号3の塩基番号1から324に該当）の5'側には前記シグナル配列をコードする遺伝子を、そして3'側にヒト κ 鎖の定常領域をコードする遺伝子（配列番号3の塩基番号325から642に該当）をそれぞれ連結し、GSベクターpEE12.4（Lonza社）に挿入した。これらのGSベクターから重鎖と軽鎖の両遺伝子が挿入されたDGVを構築した。このベクターをトランスフェクトしたCHO-K1SV細胞の培養上清から、定法に従い抗体を精製した。この抗体をヒト化75E9STF8-1と称する。

[0131] 実施例5：ヒト化75E9STF8-1の結合活性評価

実施例4で得たヒト化75E9STF8-1と、ActRIIA、ActRIIB及びFn14との結合活性を評価した。ActRIIA-His（LifeSpan Biosciences社、LS-G39063）、ActRIIB-His（LifeSpan Biosciences社、L

S-G38834) 及び実施例3で調製したヒトFn14の細胞外ドメインを含むヒトFc融合タンパク質をそれぞれリン酸バッファー生理食塩水 (PBS) にて1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、それぞれをマキシソープ384ウェル透明プレート (Nunc社、464718) に1ウェルあたり15 μL 添加し、一晩4°Cでインキュベーションすることで固相化した。翌日固相液を除き、0.05% Tween20入りトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) で洗浄した。その後、20%のBlocking One (ナカライテスク社、03953-95) を含むPBSを1ウェルあたり50 μL 添加し、室温で1時間静置した後、TBS-Tで洗浄した。ヒト化75E9STF8-1を最高濃度30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から12段階、4倍公比の希釈により希釈系列を作製し、1ウェルあたり20 μL 添加した。希釈液としては5%のBlocking Oneを含むTBS-Tを用いた。室温で1時間インキュベーションした後、TBS-Tで洗浄した。検出抗体として希釈液 (5%のBlocking Oneを含むTBS-T) で4000倍希釈したGoat Anti-Human Kappa, Mouse ads-HRP (SouthernBiotech、2061-05) を、1ウェルあたり20 μL 添加した。室温で1.5時間インキュベーションした後、TBS-Tで洗浄し、TMB+Substrate-Chromogen (DAKO社、S159985) を添加して静置した後、1M硫酸を加えて反応を停止させ、450nmの吸光度をInfinite (登録商標) 200Pro (TECAN) で測定した。

[0132] その結果、ヒト化75E9STF8-1はActRIIA-His (EC50=5.03 ng/mL)、ActRIIB-His (EC50=9.24 ng/mL) 及びヒトFn14の細胞外ドメインを含むヒトFc融合タンパク質 (EC50=23.3 ng/mL) のいずれにも結合した。

[0133] 実施例6：ヒト化75E9STF8-1のSmadリン酸化阻害評価

ヒト化75E9STF8-1のActRIIA及びActRIIBにおけるミオスタチン誘発Smad3リン酸化に対する阻害作用を評価した。HE

K293細胞にヒトActRIIA遺伝子（NCBIアクセッション番号：AB529011.1）を導入した安定発現細胞株（以下、ActRIIA/HEK293細胞と称する）、及びActRIIB/HEK293細胞を評価に用いた。

- [0134] ActRIIA/HEK293細胞又はActRIIB/HEK293細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEM（Sigma社、D6429）で 2×10^5 cells/mLに懸濁し、コラーゲンIコート96穴プレート（IWAKI社、4860-010）に1ウェルあたり100 μ L播種した。それを、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂に設定したCO₂インキュベーターで一晩培養した。培養後、培地を遠心除去し、2%ウシ胎児血清含有DMEMを各ウェルに80 μ Lずつ添加した。それを、上記と同条件のCO₂インキュベーターで一晩培養した。ヒト化75E9STF8-1について、ActRIIA/HEK293細胞には最高濃度300nmol/Lから、ActRIIB/HEK293細胞には最高濃度1000nmol/Lからそれぞれ8段階、約3倍公比の希釈により希釈系列を作製し、1ウェルあたり10 μ L添加した。また、対照として同希釈系列のBimagrumabを添加した。希釈溶媒としては2%ウシ胎児血清含有DMEMを使用した。それを、上記と同条件のCO₂インキュベーターで15分培養した。その後、2%ウシ胎児血清含有DMEMにて調製したミオスタチン（PEPROTECH社、120-00）を最終濃度100ng/mLになるように1ウェルあたり10 μ L添加した。上記と同条件のCO₂インキュベーターで1時間培養した後、培地を遠心除去し、AlphaLISA（登録商標） SureFire（登録商標） Ultra™ SMAD3 (p-Ser423/425) アッセイキット（PerkinElmer社、ALSU-PSM3）内のLysis bufferを1ウェルあたり50 μ L添加して室温にて10分間攪拌して細胞を溶解した。細胞溶解液中のリン酸化Smad3を、前記キットを用いて検出した。結果は、ミオスタチン100ng/mL刺激条件下の測定値を0%阻害、ミオスタチン非存在下の測定値を100%阻害とする阻害率にて示した。

ミオスタチン非存在下の測定は、ミオスタチンの代わりに培地を添加して実施した。なお、データは2試行（各試行はデュプリケートで実施）の平均値を表す。

[0135] その結果、ヒト化75E9STF8-1は、ActRIIA/HEK293細胞及びActRIIB/HEK293細胞において、ミオスタチンにより誘導されるSmad3のリン酸化を阻害した（図1）。

[0136] 実施例7：ヒト化75E9STF8-1のアンタゴニスト活性評価及びアゴニスト活性評価

TWEAK存在下又は非存在下でFn14が活性化されると、下流シグナルとしてNF-κBが活性化される。ヒト化75E9STF8-1のアンタゴニスト活性評価のため、このシグナルを指標として、ヒトFn14におけるTWEAK誘発NF-κB活性化の阻害作用を評価した。また、ヒト化75E9STF8-1のアゴニスト活性評価として、TWEAK非存在下でのNF-κB活性化作用を評価した。具体的には、TWEAK存在下又は非存在下でのヒト化75E9STF8-1のNF-κB活性化に対する作用を、レポーターアッセイで評価した。NF-κB転写応答配列が組み込まれたルシフェラーゼレポーターベクターpGL4.32（Promega社、E8491）を安定的に導入したHEK293細胞（以下、NF-κB/HEK293細胞と称する）を作製し、評価に用いた。

[0137] NF-κB/HEK293細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEM（Sigma社、D6429）で 1.25×10^5 cells/mLに懸濁し、クリアボトム白色96ウェルプレート（Corning社、3610）に1ウェルあたり80 μL播種した。それを、37°C、5%CO₂に設定したCO₂インキュベーターで2時間培養した。ヒト化75E9STF8-1について上記培地で希釈系列を作製した後、1ウェルあたり10 μL添加した。各ウェル内の最終濃度は、アンタゴニスト活性評価では最高濃度100 nmol/Lから11段階（約3倍公比）、アゴニスト活性評価では最高濃度300 nmol/Lから11段階（約3倍公比）とした。また、対照として同希釈系

列のSTF8-1を添加した。アンタゴニスト活性評価では、各ウェルに、上記培地で調製したTWEAK (PEPROTECH社、310-06)を最終濃度100 ng/mLになるように10 μ L添加した。アゴニスト活性評価では、各ウェルに上記培地を10 μ L添加した。37°C、5%CO₂で一晩培養した後、ルシフェラーゼ測定試薬ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega社、E6120)を用いて、ルシフェラーゼ発現量を測定することにより、NF- κ B活性化を定量化した。結果は、アンタゴニスト活性評価ではTWEAK 100 ng/mL刺激条件下の測定値を0%阻害、TWEAK非存在下の測定値を100%阻害とする阻害率にて示し、アゴニスト活性評価ではTWEAK 100 ng/mL刺激条件下の測定値を100%、TWEAK非存在下の測定値を0%とする活性化率にて示した。TWEAK非存在下の測定は、TWEAKの代わりに培地を添加して実施した。なお、データは2試行(各試行はデュプリケートで実施)の平均値を表す。

[0138] その結果、ヒト化75E9 STF8-1は100 ng/mLのTWEAKによるFn14を介したNF- κ B活性化を完全に阻害した。また、ヒト化75E9 STF8-1はTWEAK非存在下でのNF- κ B活性化を誘導しなかった(図2)。したがって、ヒト化75E9 STF8-1はアンタゴニスト活性を有するが、アゴニスト活性は有しないことが認められた。

[0139] 実施例8: マウス *in vivo* 薬効評価で用いる抗体の調製と機能評価

マウス *in vivo* 薬効評価に向けて、ヒト化タンデムVHH75E9、STF8-1、及び、ヒト化75E9 STF8-1のアミノ酸配列に基づいて、75E9 (mFc)、STF8-1 (mFc)、及び、75E9 STF8-1 (mFc)をそれぞれ調製した。75E9 (mFc)は実施例2におけるタンデムVHHの75E9のC末端にmouse IgG1重鎖定常領域のHinge、CH2、及び、CH3を連結した抗体である(配列番号15)。STF8-1 (mFc)は実施例3のSTF8-1の定常領域を重鎖、軽鎖ともにマウス定常領域に置き換えた抗体である(STF8-1 (m

F c) の重鎖を配列番号16に、STF8-1 (mFc) の軽鎖を配列番号17に示す)。75E9STF8-1 (mFc) は、実施例2の75E9のC末端にSTF8-1 (mFc) 重鎖のN末端をペプチドリンカー (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号7))₂で連結したポリペプチド (配列番号18)、及びSTF8-1 (mFc) の軽鎖からなる抗体である。

[0140] 75E9STF8-1 (mFc) の第一のVHHのCDR1、CDR2、CDR3及び75E9STF8-1 (mFc) の第二のVHHのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列はそれぞれヒト化75E9STF8-1の第一のVHHのCDR1、CDR2、CDR3及びヒト化75E9STF8-1の第二のVHHのCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列と同一である。さらに、75E9STF8-1 (mFc) に含まれるSTF8-1 (mFc) の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はそれぞれヒト化75E9STF8-1に含まれるSTF8-1の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域と同一である。

[0141] 75E9 (mFc)、及び、75E9STF8-1 (mFc) は、実施例6に記載の機能評価を行いSmadリン酸化阻害活性があることを確認した。また、実施例7に記載の機能評価を行い、STF8-1 (mFc)、及び、75E9STF8-1 (mFc) は、アンタゴニスト活性があることを、75E9STF8-1 (mFc) にはアゴニスト活性が無いことを確認した。

[0142] 実施例9：ステロイド誘発ミオパチーモデルマウスに対する *in vivo* 薬効評価

マウスにおいて、筋重量及び握力を指標として、筋萎縮と筋機能に対する *in vivo* 薬効を評価した。筋萎縮モデル動物として、ステロイドの持続投与によるステロイド誘発ミオパチーモデル (SIMモデル) を用い、被験物質の連続投与後14日目に四肢握力及び摘出大腿四頭筋重量を測定した。

[0143] マウスの体重及び握力を測定し、体重及び握力が群間で均等となるように各群10例ずつ割り付けた。群構成は、正常群を1群、SIMモデル群を5群の全6群とし、SIMモデルの5群は溶媒投与群、75E9 (mFc) 群、STF8-1 (mFc) 群、75E9 (mFc) + STF8-1 (mFc) 群、75E9 STF8-1 (mFc) 群とした。SIMモデル群にはコルチコステロン (100 µg/mLの濃度でエタノールを1%混合した濾過水に溶解) を自由飲水にて14日間持続飲水投与し、筋委縮を誘発した。なお、正常群には濾過水を自由飲水させた。コルチコステロンの投与開始と同日より被験物質1及び被験物質2の投与を開始した。各群の被験物質投与の詳細は表1に示す。なお、75E9 STF8-1 (mFc) 群の用量はそれぞれの単独投与群の投与量と同程度のモル濃度となるように設定した。被験物質投与開始後14日に、小動物握力測定装置 (MELQUEST社、GPM-100) にて握力測定を実施した。その後、マウスを麻酔下放血致死し、大腿四頭筋を摘出し重量を測定した。

[0144] [表1]

群		被験物質1 (週1回、腹腔内投与、 20mL/kg)	被験物質2 (週3回、皮下投与、 10mL/kg)
正常群		溶媒 (PBS)	溶媒 (PBS)
SIM モデル	溶媒投与群	溶媒 (PBS)	溶媒 (PBS)
	75E9 (mFc) 群	75E9 (mFc) 100mg/kg	溶媒 (PBS)
	STF8-1 (mFc) 群	溶媒 (PBS)	STF8-1 (mFc) 100mg/kg
	75E9 (mFc) + STF8-1 (mFc) 群	75E9 (mFc) 100mg/kg	STF8-1 (mFc) 100mg/kg
	75E9 STF8-1 (mFc) 群	75E9 STF8-1 (mFc) 140mg/kg	溶媒 (PBS)

[0145] その結果、75E9 (mFc) 又はSTF8-1 (mFc) は、SIMモデルの骨格筋委縮及び握力低下を部分的に抑制した。さらに、75E9 (mFc) とSTF8-1 (mFc) の混合処置により、それぞれの単独投与より有意に強い骨格筋萎縮抑制作用及び握力低下抑制作用を示した。また、75E9 STF8-1 (mFc) は75E9 (mFc) とSTF8-1 (mF

c) の混合処置に比較して有意に強い骨格筋萎縮抑制作用及び握力低下抑制作用を示した (図3)。

[0146] 実施例10：ステロイド誘発ミオパチーモデルサルに対する *in vivo* 薬効評価

ステロイド誘発ミオパチーモデルのカニクイザルにおいて、被験物質の投与後4週における大腿部除脂肪重量に対する *in vivo* 薬効を評価した。なお、除脂肪重量は脂肪を除いた筋、骨、血液などの総重量であり、骨格筋量と相関することが知られている (Walowski CO et al., *Nutrients*, 2020, Vol. 12, 755)。

[0147] 二重エネルギーX線吸収測定法による骨密度測定装置 (Hologic社、Discovery C) にてカニクイザルの大腿部除脂肪重量を測定し、群間で均等となるように4群に割り付けた。群構成は、正常群 (n=2)、SIMモデル群を3群 (各群n=3) の全4群とし、SIMモデルの3群は溶媒投与群、ヒト化75E9STF8-1群及び、Bimagrumab群とした。SIMモデル群にはプレドニゾン (30mg/3mL/kg) を4-5日/週に1日2回背部皮下に投与し、筋萎縮を誘発した。正常群には生理食塩水を同様に背部皮下に投与した。被験物質は、正常群及び溶媒投与群にはPBSを、ヒト化75E9STF8-1群にはヒト化75E9STF8-1 40mg/2.4mL/kgを、Bimagrumab群にはBimagrumab 30mg/2.4mL/kgを、プレドニゾン投与1日目に静脈内投与した。投与用量は、ヒト化75E9STF8-1とBimagrumabの投与モル数が同程度となるように設定した。被験物質投与後4週に、大腿部除脂肪重量測定を実施した。左右それぞれの大腿部で除脂肪重量を測定し、その平均値を個体の測定値とした。

[0148] その結果、SIMモデルサルにおいて、ヒト化75E9STF8-1群の大腿部除脂肪重量は、溶媒投与群の大腿部除脂肪重量と比較して有意に重かった。Bimagrumab群は、溶媒投与群と比較して有意な差は認められなかった (図4)。

産業上の利用可能性

[0149] 本発明の多重特異性抗体は、ヒトActRIIA、ヒトActRIIB及びヒトFn14が病態形成に関与する各種疾患の予防又は治療に有用である。また、本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換された宿主細胞及び抗体を生産する方法は、前記多重特異性抗体を生産するのに有用であると期待される。

配列表フリーテキスト

[0150] 以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には配列表の配列番号1で表される塩基配列は、多重特異性抗体の第一のVHH、該多重特異性抗体の第二のVHH、及び該多重特異性抗体のFn14に結合する抗体の重鎖を含むポリペプチドをコードする塩基配列であり、配列番号3で表される塩基配列は、該多重特異性抗体のFn14に結合する抗体の軽鎖をコードする塩基配列である。配列番号2で表されるアミノ酸配列は、配列番号1によりコードされる該多重特異性抗体の第一のVHH、該多重特異性抗体の第二のVHH、及び該多重特異性抗体のFn14に結合する抗体の重鎖を含むポリペプチドであり、配列番号4で表されるアミノ酸配列は、配列番号3によりコードされる該多重特異性抗体のFn14に結合する抗体の軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号5～12は例示的なペプチドリンカーのアミノ酸配列である。配列番号13で表される塩基配列は、Fn14に結合する抗体の重鎖をコードする塩基配列であり、配列番号14で表されるアミノ酸配列は、配列番号13の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列である。配列番号15で表されるアミノ酸配列は、タンDEM VHHのC末端にマウス定常領域を連結した抗体のアミノ酸配列である。配列番号16で表されるアミノ酸配列は、Fn14に結合する抗体の重鎖のアミノ酸配列であり、配列番号17で表されるアミノ酸配列は、Fn14に結合する抗体の軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号18で表されるアミノ酸配列は、タンDEM VHH、及びFn14に結合する抗体の重鎖を含むポリペプチドである。

請求の範囲

[請求項1] ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体であって、

(a) ActRIIA及びActRIIBに結合する第一のVHH及び第二のVHHを含むポリペプチド、並びに

(b) Fn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、

第一のVHHが配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から65までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号98から105までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

第二のVHHが配列番号2のアミノ酸番号172から176までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号195から210までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号243から251までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

(a) のポリペプチドのC末端がFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域のN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、
多重特異性抗体。

[請求項2] 第一のVHHが配列番号2のアミノ酸番号1から116までのアミノ酸配列からなり、第二のVHHが配列番号2のアミノ酸番号142から262までのアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の多重特異性抗体。

[請求項3] 第一のVHHのC末端が第二のVHHのN末端にペプチドリンカーを介して連結されている、請求項1又は2に記載の多重特異性抗体。

[請求項4] (a) のポリペプチドが配列番号2のアミノ酸番号1から262までのアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の多重特異性抗体。

- [請求項5] F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号303から307までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号322から338までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号2のアミノ酸番号371から379までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、及び、配列番号4のアミノ酸番号24から34までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号50から56までのアミノ酸配列からなるCDR2、配列番号4のアミノ酸番号89から97までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。
- [請求項6] F n 1 4 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。
- [請求項7] F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、L234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。
- [請求項8] F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から390までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及びL234A、L235A、M252Y、S254T、及びT256Eのアミノ酸変異を有する重鎖定常領域を含む重鎖、並びに、配列番号4のアミノ酸番号1から108までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。
- [請求項9] F n 1 4 に結合する抗体を含み、該F n 1 4 に結合する抗体が、配列番号2のアミノ酸番号273から720までのアミノ酸配列からな

る重鎖及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[請求項10] 配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項1に記載の多重特異性抗体。

[請求項11] 翻訳後修飾を受けた、請求項1～10のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

[請求項12] 請求項1～4のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項13] 請求項5～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項14] 請求項5～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項15] 請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項16] 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項17] 請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項18] 請求項12～15のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項19] 請求項14及び／又は請求項15に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項20] 請求項16及び／又は請求項17に記載のポリヌクレオチドを含む

発現ベクター。

[請求項21] 請求項18～20のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[請求項22] 以下の(i)及び/若しくは(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の(i)のポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び/若しくは以下の(ii)のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞：

(i) 請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(ii) 請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項23] 以下の(A)～(D)からなる群より選択される、宿主細胞：

(A) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(B) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(C) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(D) 請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主

細胞。

[請求項24]

以下の (i) 及び (i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された又は以下の (i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターと以下の (i i) のポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体を生産する方法：

(i) 請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体のFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(i i) 請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の(a)のポリペプチドとFn14に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項25]

以下の(E)～(G)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、多重特異性抗体を発現させる工程を包含する、ActRIIA、ActRIIB及びFn14に結合する多重特異性抗体を生産する方法：

(E) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

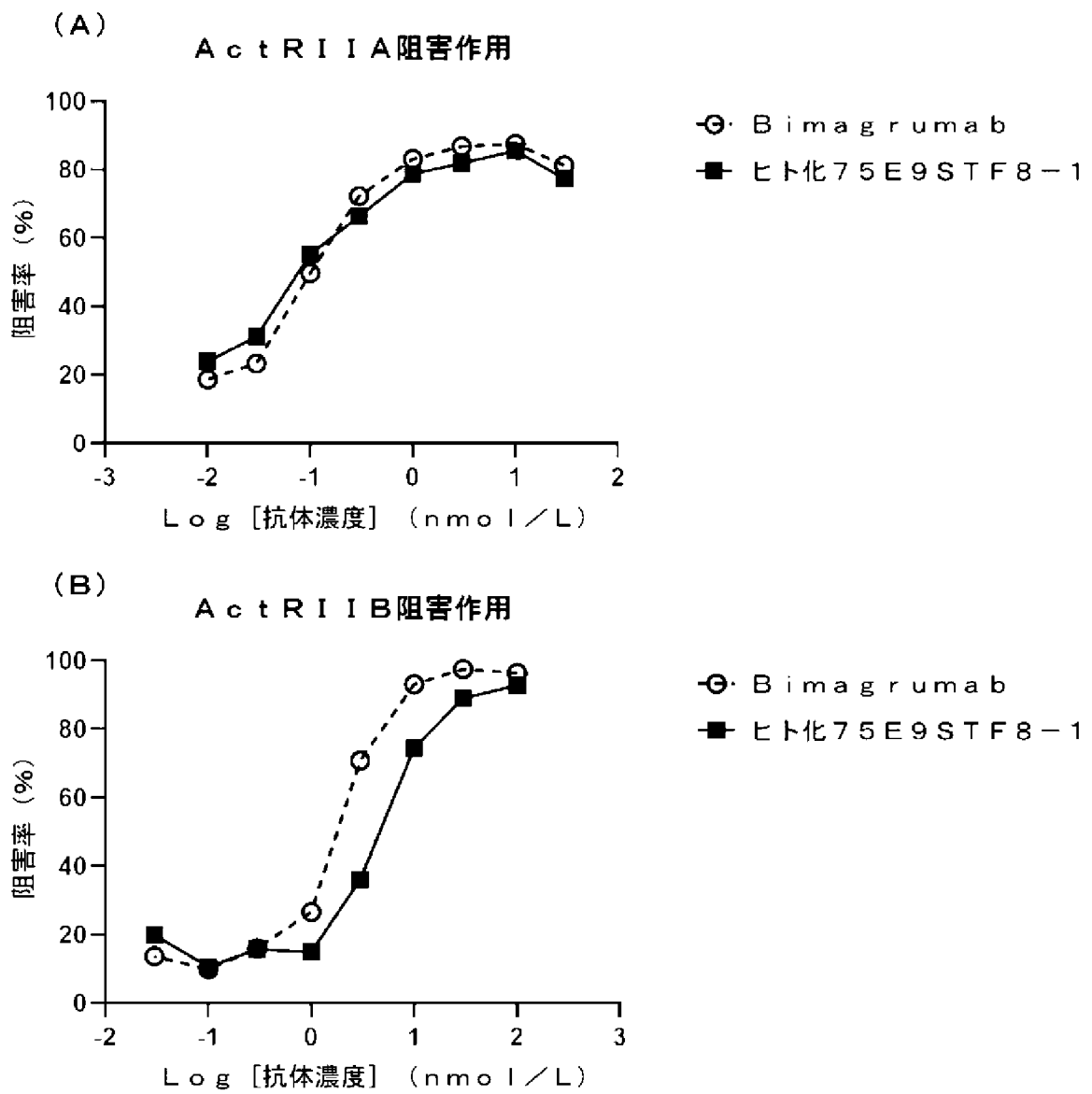
(F) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(G) 請求項10に記載の多重特異的抗体のポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換さ

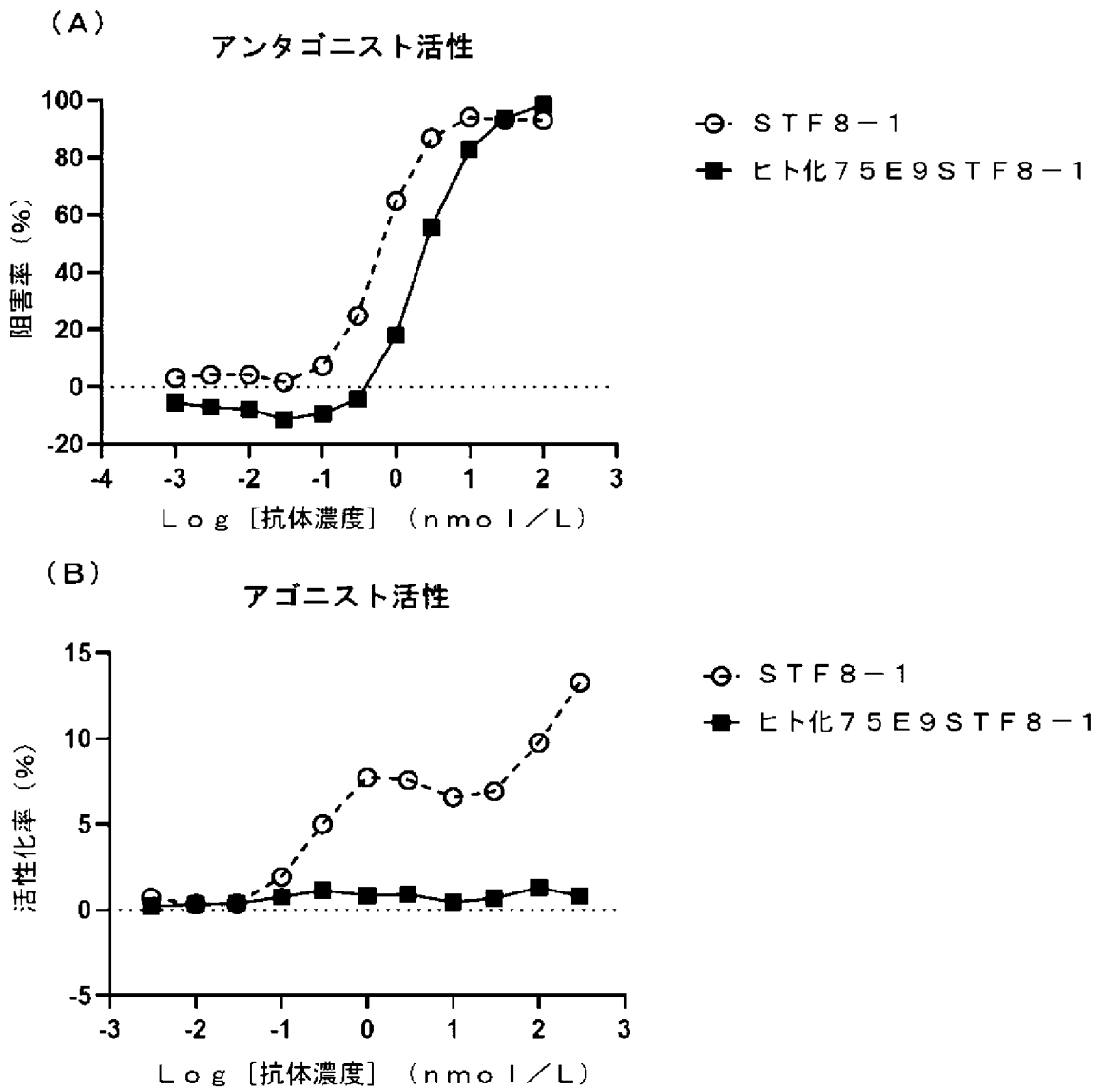
れた宿主細胞、及び、請求項10に記載の多重特異的抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

- [請求項26] 請求項24に記載の方法で生産された多重特異性抗体。
- [請求項27] 請求項25に記載の方法で生産された多重特異性抗体。
- [請求項28] 請求項1～11、26及び27のいずれか1項に記載の多重特異性抗体、並びに、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
- [請求項29] 封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物である、請求項28に記載の医薬組成物。
- [請求項30] 請求項1～11、26及び27のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の治療有効量を投与する工程を包含する、封入体筋炎を予防又は治療する方法。
- [請求項31] 封入体筋炎の予防又は治療に使用するための、請求項1～11、26及び27のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。
- [請求項32] 封入体筋炎の予防又は治療用医薬組成物の製造における、請求項1～11、26及び27のいずれか1項に記載の多重特異性抗体の使用。
- 。

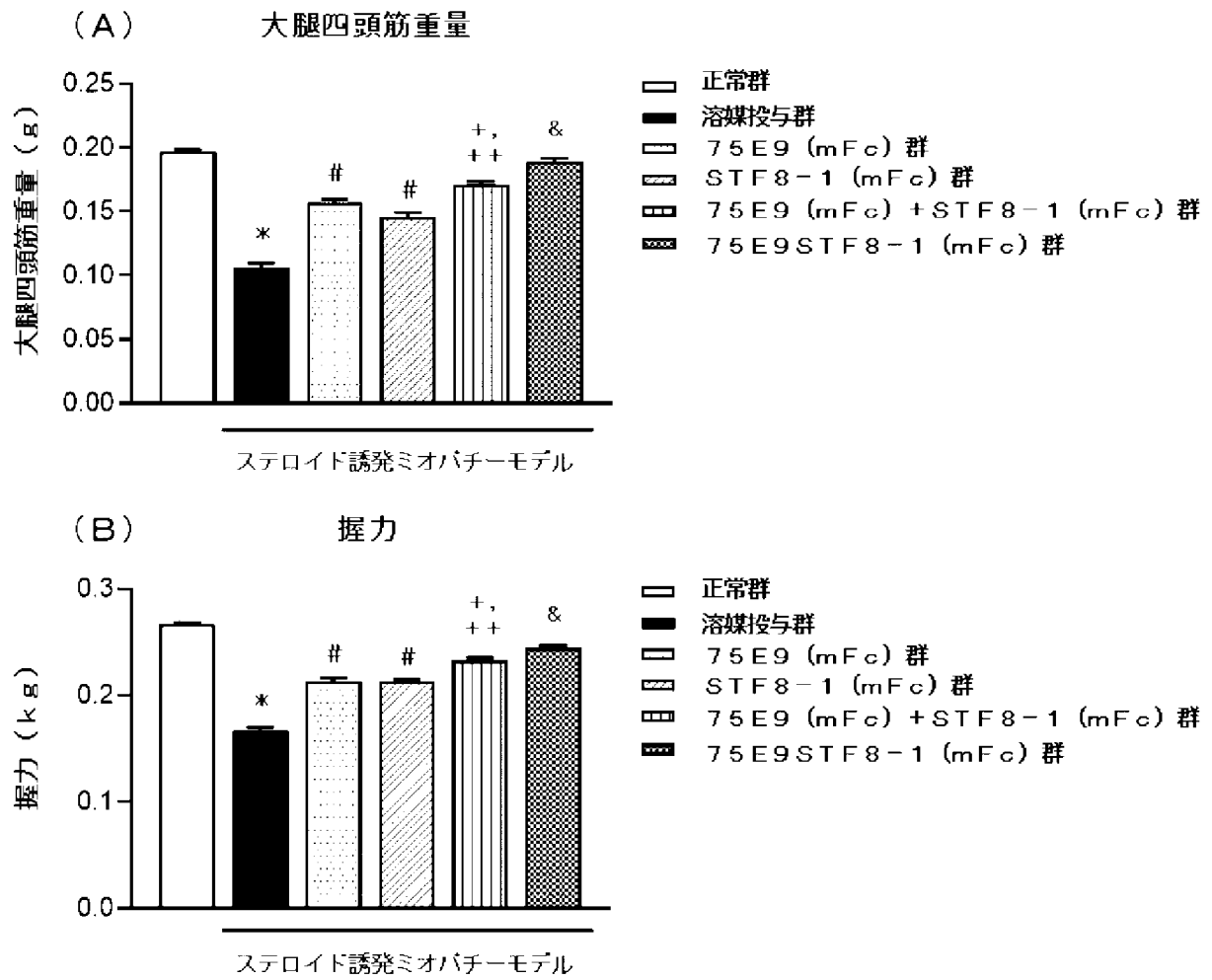
[図1]



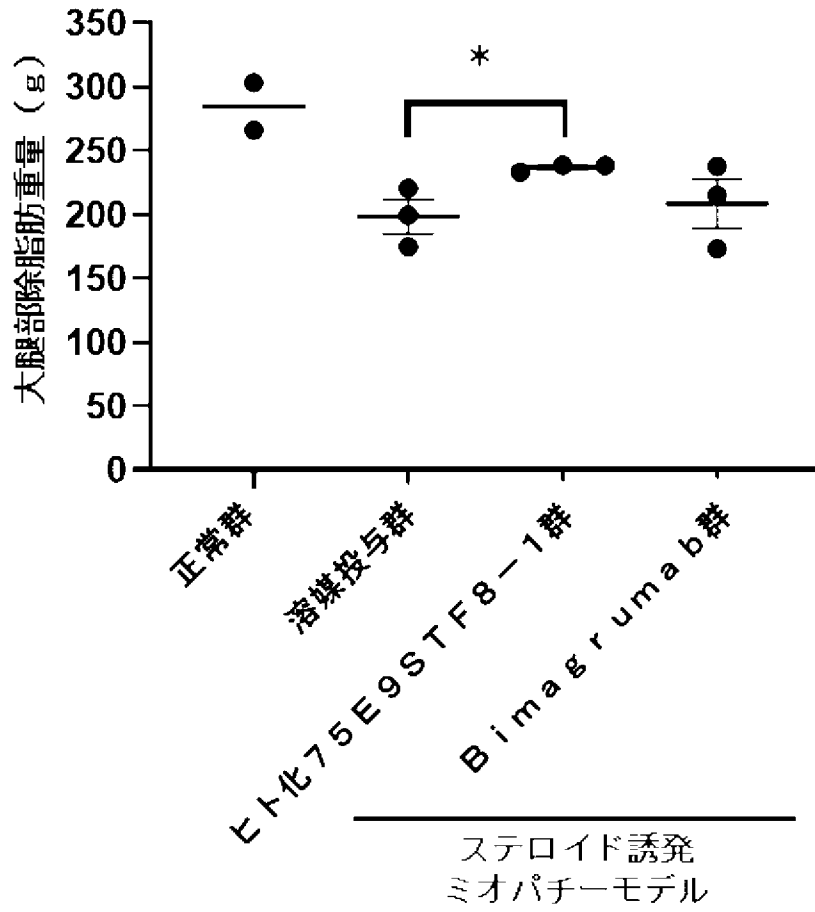
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/000661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/13</i>(2006.01)i; <i>A61K 39/395</i>(2006.01)i; <i>A61P 21/00</i>(2006.01)i; <i>C07K 16/28</i>(2006.01)i; <i>C07K 16/46</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/62</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/63</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/02</i>(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/13; C07K16/28; C12N15/62 Z; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02 C; A61K39/395 N; A61K39/395 D; A61P21/00; C07K16/46 ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/00-15/90; C07K1/00-19/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/128927 A1 (KYOWA KIRIN CO., LTD.) 25 June 2020 (2020-06-25) abstract, claims, examples	13-14, 17-23
Y		1-4, 7, 11-24, 26, 28-32
A		5-6, 8-10, 25, 27
X	WO 2020/090892 A1 (ASTELLAS PHARMA INC) 07 May 2020 (2020-05-07) abstract, claims, examples	13-14, 17-23
Y		1-4, 7, 11-24, 26, 28-32
A		5-6, 8-10, 25, 27
Y	JP 2016-528247 A (NOVARTIS AG) 15 September 2016 (2016-09-15) claims, paragraphs [0202], [0229]-[0233]	1-4, 7, 11-24, 26, 28-32
A		5-6, 8-10, 25, 27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
08 March 2022		22 March 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
<p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p>		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/000661

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/134710 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.) 11 July 2019 (2019-07-11) fig. 2	1-4, 7, 11-24, 26, 28-32
A		5-6, 8-10, 25, 27

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/000661

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/128927	A1	25 June 2020	JP 2022-514903	A
				EP 3898687	A1
				AU 2019402163	A
				CA 3124356	A
				TW 202031684	A
<hr/>					
WO	2020/090892	A1	07 May 2020	US 2021/388096	A1
				abstract, claims, examples	
				EP 3875114	A1
				KR 20210084473	A
				CN 112930195	A
				CA 3117930	A
				SG 11202104463Y	A
				AU 2019369771	A
TW 202035459	A				
<hr/>					
JP	2016-528247	A	15 September 2016	US 2016/0200818	A1
				claims, paragraphs [0292], [0324]-[0330]	
				US 2018/0066061	A1
				WO 2015/022658	A2
				EP 3033358	A2
				TW 201536318	A
				CA 2918300	A
				AU 2014307589	A
				KR 10-2016-0042987	A
				IL 243883	D
				CN 105960414	A
				MX 2016001969	A
				HK 1219280	A
				RU 2016108652	A
				AU 2017228600	A
				SG 11201600212V	A
				BR 112016002198	A
SG 10201801063T	A				
MA 38836	A				
CL 2016000341	A				
<hr/>					
WO	2019/134710	A1	11 July 2019	US 2020/0369770	A1
				fig. 2	
				EP 3740510	A1
				KR 10-2020-0118423	A
				CN 111836832	A
				CA 3085864	A
				AU 2019205406	A
				SG 11202006362R	A
TW 201930349	A				
<hr/>					

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i FI: C12N15/13; C07K16/28; C12N15/62 Z; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02 C; A61K39/395 N; A61K39/395 D; A61P21/00; C07K16/46 ZNA</p>																								
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/00-15/90; C07K1/00-19/00</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年														
日本国実用新案公報	1922-1996年																							
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																							
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																							
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																							
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td rowspan="3">WO 2020/128927 A1 (KYOWA KIRIN CO., LTD.) 25.06.2020 (2020-06-25) 要約、請求の範囲、実施例</td> <td>13-14, 17-23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5-6, 8-10, 25, 27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td rowspan="3">WO 2020/090892 A1 (アステラス製薬株式会社) 07.05.2020 (2020-05-07) 要約、請求の範囲、実施例</td> <td>13-14, 17-23</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5-6, 8-10, 25, 27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td rowspan="2">JP 2016-528247 A (ノバルティス アーゲー) 15.09.2016 (2016-09-15) 特許請求の範囲、[0202]、[0229] - [0233]</td> <td>1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>5-6, 8-10, 25, 27</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2020/128927 A1 (KYOWA KIRIN CO., LTD.) 25.06.2020 (2020-06-25) 要約、請求の範囲、実施例	13-14, 17-23	Y	1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32	A	5-6, 8-10, 25, 27	X	WO 2020/090892 A1 (アステラス製薬株式会社) 07.05.2020 (2020-05-07) 要約、請求の範囲、実施例	13-14, 17-23	Y	1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32	A	5-6, 8-10, 25, 27	Y	JP 2016-528247 A (ノバルティス アーゲー) 15.09.2016 (2016-09-15) 特許請求の範囲、[0202]、[0229] - [0233]	1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32	A	5-6, 8-10, 25, 27
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																						
X	WO 2020/128927 A1 (KYOWA KIRIN CO., LTD.) 25.06.2020 (2020-06-25) 要約、請求の範囲、実施例	13-14, 17-23																						
Y		1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32																						
A		5-6, 8-10, 25, 27																						
X	WO 2020/090892 A1 (アステラス製薬株式会社) 07.05.2020 (2020-05-07) 要約、請求の範囲、実施例	13-14, 17-23																						
Y		1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32																						
A		5-6, 8-10, 25, 27																						
Y	JP 2016-528247 A (ノバルティス アーゲー) 15.09.2016 (2016-09-15) 特許請求の範囲、[0202]、[0229] - [0233]	1-4, 7, 11- 24, 26, 28-32																						
A		5-6, 8-10, 25, 27																						
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																								
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献											
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																							
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																							
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																							
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献																							
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																								
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																								
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																							
08.03.2022	22.03.2022																							
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																							
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	竹内 祐樹 4B 5082																							
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448																							

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2019/134710 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.) 11.07.2019 (2019 - 07 - 11) F I G. 2	1-4, 7, 11-24, 26, 28-32
A		5-6, 8-10, 25, 27

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/000661

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/128927 A1	25.06.2020	JP 2022-514903 A EP 3898687 A1 AU 2019402163 A CA 3124356 A TW 202031684 A	
WO 2020/090892 A1	07.05.2020	US 2021/388096 A1 要約、請求の範囲、実施例 EP 3875114 A1 KR 20210084473 A CN 112930195 A CA 3117930 A SG 11202104463Y A AU 2019369771 A TW 202035459 A	
JP 2016-528247 A	15.09.2016	US 2016/0200818 A1 請求の範囲、[029 2]、[0324] - [0 330] US 2018/0066061 A1 WO 2015/022658 A2 EP 3033358 A2 TW 201536318 A CA 2918300 A AU 2014307589 A KR 10-2016-0042987 A IL 243883 D CN 105960414 A MX 2016001969 A HK 1219280 A RU 2016108652 A AU 2017228600 A SG 11201600212V A BR 112016002198 A SG 10201801063T A MA 38836 A CL 2016000341 A	
WO 2019/134710 A1	11.07.2019	US 2020/0369770 A1 F I G. 2 EP 3740510 A1 KR 10-2020-0118423 A CN 111836832 A CA 3085864 A AU 2019205406 A SG 11202006362R A TW 201930349 A	