

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 2 月 13 日 (2020.2.13)

【公表番号】特表 2019-503172 (P2019-503172A)

【公表日】平成 31 年 2 月 7 日 (2019.2.7)

【年通号数】公開・登録公報 2019-005

【出願番号】特願 2018-533745 (P2018-533745)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/13 Z N A

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 16/00

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 1 月 6 日 (2020.1.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 ' 、 C H 2 ' 、および C H 3 ') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 におけるアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 " 、 C H 2 " 、 C H 3 ") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 、 H 1 7 2 、および S 1 8 8 におけるアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " ドメインが、(i) 残基

K 3 9 3におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の重鎖；

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の軽鎖

を含む二重特異性免疫グロブリン G 1 (I g G 1) 抗体であって、番号付けは K a b a t に従っており、

前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 2】

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 '、C H 2 '、および C H 3 ') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 にバリンおよび残基 L 1 4 3 にアラニンを含み、前記 C H 3 ' ドメインが、残基 E 3 7 8 にリシンおよび残基 K 4 4 0 にアルギニンを含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 にアスパラギン酸および残基 N 1 3 7 にアスパラギン酸を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 "、C H 2 "、C H 3 ") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 にアスパラギン酸、残基 H 1 7 2 にアスパラギン酸、および残基 S 1 8 8 にトリプトファンを含み、前記 C H 3 " ドメインが、残基 K 3 9 3 にグルタミン酸を含む、第 2 の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L " ドメインが、Q 1 2 4 にリシン、N 1 3 7 にリシン、および T 1 7 8 にアラニンを含む、第 2 の軽鎖

を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体であって、番号付けは K a b a t に従っており

、
前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 3】

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 '、C H 2 '、および C H 3 ') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 にバリンおよび残基 L 1 4 3 にアラニンを含み、前記 C H 3 " ドメインが、残基 K 3 9 3 にグルタミン酸を含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 にアスパラギン酸および残基 N 1 3 7 にアスパラギン酸を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 "、C H 2 "、C H 3 ") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 にアスパラギン酸、残基 H 1 7 2 にアスパラギン酸、および残基 S 1 8 8 にトリプトファンを含み、前記 C H 3 ' ドメインが、残基 E 3 7 8 にリシンおよび残基 K 4 4 0 にアルギニンを含む、第 2 の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L " ドメインが、Q 1 2 4 にリシン、N 1 3 7 にリシン、および T 1 7 8 にアラニンを含む、第 2 の軽鎖

を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体であって、番号付けは K a b a t に従っており

、
前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異

性抗体。

【請求項 4】

(a) 可変ドメイン (VH1) およびヒト IgG 定常ドメイン (CH1'、CH2'、および CH3') を含む第 1 の重鎖であって、前記 CH1' ドメインが、配列番号 6 に記載の配列を含み、前記 CH3' ドメインが、配列番号 14 に記載の配列を含み、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (VL1) およびヒト IgG カッパ定常ドメイン (CL') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 CL' ドメインが、配列番号 9 に記載の配列を含み、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (VH2) およびヒト IgG 定常ドメイン (CH1"、CH2"、CH3") を含む第 2 の重鎖であって、前記 CH1" ドメインが、配列番号 7 に記載の配列を含み、前記 CH3" ドメインが、配列番号 13 に記載の配列を含み、第 2 の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン (VL2) およびヒト IgG カッパ定常ドメイン (CL") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 CL" ドメインが、配列番号 11 に記載の配列を含み、第 2 の軽鎖

を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体であって、

前記 VH1 ドメインおよび前記 VL1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 VH2 ドメインおよび前記 VL2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 5】

(a) 可変ドメイン (VH1) およびヒト IgG 定常ドメイン (CH1'、CH2'、および CH3') を含む第 1 の重鎖であって、前記 CH1' ドメインが、配列番号 6 に記載の配列を含み、前記 CH3" ドメインが、配列番号 13 に記載の配列を含み、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (VL1) およびヒト IgG カッパ定常ドメイン (CL') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 CL' ドメインが、配列番号 9 に記載の配列を含み、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (VH2) およびヒト IgG 定常ドメイン (CH1"、CH2"、CH3") を含む第 2 の重鎖であって、前記 CH1" ドメインが、配列番号 7 に記載の配列を含み、前記 CH3' ドメインが、配列番号 14 に記載の配列を含み、第 2 の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン (VL2) およびヒト IgG カッパ定常ドメイン (CL") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 CL" ドメインが、配列番号 11 に記載の配列を含み、第 2 の軽鎖

を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体であって、

前記 VH1 ドメインおよび前記 VL1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 VH2 ドメインおよび前記 VL2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 6】

前記二重特異性抗体の熱安定性が、親の単一特異性抗体の熱安定性の 10 以内である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の、軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項 10】

二重特異性抗体を産生するための方法であって、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を発現するように形質転換された宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む、増殖性疾患、腫瘍、炎症性障害、自己免疫疾患、アレルギー反応、または寄生虫反応の予防、処置、緩和、または検出において使用するための、組成物。

【請求項 1 2】

前記疾患が、がんである、請求項 1 1 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】定常領域の変異を有する二重特異性抗体およびその使用

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2015年12月28日に出願された米国仮出願第62/271,844号の優先日の利益を主張する。この仮出願は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に同時に結合することができる。この特性は、従来のモノクローナル抗体では不可能な治療戦略の開発を可能にする。これまでに開発された膨大な量の構想上の二重特異性抗体様式は、これらの分子に対する強い関心を反映している。Spies, C.ら、Molecular Immunology (2015年) 67巻(2号): 95~106頁を参照されたい。

【0003】

二重特異性抗体は、細胞融合技術(例えば、ハイブリッドハイブリドーマ)によって生成されることが多い。このプロセスは、2つの異なる細胞型を含む。2つの重鎖および2つの軽鎖がランダムに集合し、10種の抗体組み合わせの生成が起こる。所望のヘテロ二量体抗体は、産生された抗体のうちごくわずかにすぎない。さらに、所望のヘテロ二量体抗体の精製は、劇的に産生収量を低減させ、製造コストを増加させる。それゆえに、二重特異性抗体の産生および精製を改善する必要がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Spies, C.ら、Molecular Immunology (2015年) 67巻(2号): 95~106頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書に記載される本発明は、CH1/CL境界およびCH3領域中に、所望のヘテロ二量体の収量および純度を増加させる変異を有する二重特異性抗体に関する。CH1/CL境界中の相互作用するアミノ酸対間、およびヒトIgG免疫グロブリンのCH3定常領域間の、残基間の原子相互作用を決定するために、フレームワークを開発し、残基間の相互作用を2Dグラフのフォーマットにして、接続性のネットワークを分析した。構造的な分析および接続性のネットワークによって評価した場合に、より好都合な接触に寄与

るC H 1 / C L 境界およびC H 3 定常領域中の変異を同定し、新しいまたは改善された接触を媒介するかもしれない様々なアミノ酸残基を分析した。

【 0 0 0 6 】

したがって、本発明は、ヒトI g G免疫グロブリンのC H 1 / C L 境界および/またはC H 3 定常領域中の、二重特異性抗体におけるヘテロ二量体形成を増加させる変異に関する。可変領域中には変異が生じていないため、得られた二重特異性抗体は、各親抗体の機能的な特徴を保持する。また、二重特異性抗体をコードする核酸、宿主細胞、およびこれらの二重特異性抗体で疾患を処置するための方法も本明細書で提供される。

【 0 0 0 7 】

一態様において、第1の重鎖(H C ')、第2の重鎖(H C ")、第1の軽鎖(L C ')および第2の軽鎖(L C ")を含む、第1の抗原および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体であって、H C ' 、H C " またはH C ' およびH C " の両方は、以下の残基L 1 2 4、L 1 4 3、K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、E 3 7 8、K 3 9 3およびK 4 4 0のいずれか1つ、またはそれらの組み合わせにアミノ酸置換を含み；L C ' 、L C " またはL C ' およびL C " の両方は、以下の残基Q 1 2 4、V 1 3 3、N 1 3 7、T 1 7 8のいずれか1つ、またはそれらの組み合わせにアミノ酸置換を含み、番号付けはK a b a tに従っており、H C ' はL C ' と優先的に対合し、H C " はL C " と優先的に対合し、それによってヘテロ二量体を形成する、二重特異性抗体が本明細書で提供される。

【 0 0 0 8 】

一部の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C ' は、残基L 1 2 4、L 1 4 3、E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。他の態様において本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C ' は、残基L 1 2 4、L 1 4 3およびK 3 9 3にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【 0 0 0 9 】

さらに他の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C " は、残基K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、およびK 3 9 3にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。本発明の別の態様は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C " は、残基K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。他の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C " は、残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびK 3 9 3にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。さらに他の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C " は、残基K 1 4 5、H 1 7 2、E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【 0 0 1 0 】

他の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、L C ' 、L C " またはL C ' およびL C " の両方は、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。一部の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、L C ' 、L C " またはL C ' およびL C " の両方は、残基Q 1 2 4、V 1 3 3、およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。さらに他の態様において、本発明は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、L C ' 、L C " またはL C ' およびL C " の両方は、残基Q 1 2 4、N 1 3 7およびT 1 7 8にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明の一部の態様は、H C ' 、H C " 、L C ' およびL C " を有する二重特異性抗体であって、H C ' 、H C " またはH C ' およびH C " の両方は、L 1 2 4 V、L 1 4 3 A、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、S 1 8 8 W、E 3 7 8 K、K 3 9 3 E、およびK 4 4 0 Rからなる群より選択されるアミノ酸置換、またはそれらの組み合わせを含む、二重特異性抗

体に関する。他の態様において、本発明は、 $H C'$ 、 $H C''$ 、 $L C'$ および $L C''$ を有する二重特異性抗体であって、 $L C'$ 、 $L C''$ または $L C'$ および $L C''$ の両方は、Q 1 2 4 D、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 D、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 Aからなる群より選択されるアミノ酸置換、またはそれらの組み合わせを含む、二重特異性抗体に関する。

【0012】

本発明は、前述の $H C'$ 、 $H C''$ 、 $L C'$ および $L C''$ の組み合わせを有する二重特異性抗体に関する。

本発明の一態様は、

(a) 可変ドメイン($V H 1$)およびヒトIgG定常ドメイン($C H 1'$ 、 $C H 2'$ 、および $C H 3'$)を含む第1の重鎖であって、 $C H 1'$ ドメインが、(i) 残基L 1 2 4およびL 1 4 3におけるアミノ酸置換、または(ii) 野生型 $C H 1$ ドメインを含み、 $C H 3'$ ドメインが、(i) 残基K 3 9 3におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基E 3 7 8およびK 4 4 0におけるアミノ酸置換を含む、第1の重鎖；

(b) 可変ドメイン($V L 1$)およびヒトIgカッパ定常ドメイン($C L'$)を含む第1の軽鎖であって、 $C L'$ ドメインが、(i) 残基Q 1 2 4およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q 1 2 4、V 1 3 3、およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換を含む、第1の軽鎖；

(c) 可変ドメイン($V H 2$)およびヒトIgG定常ドメイン($C H 1''$ 、 $C H 2''$ 、 $C H 3''$)を含む第2の重鎖であって、 $C H 1''$ ドメインが、(i) 残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基K 1 4 5およびH 1 7 2におけるアミノ酸置換を含み、 $C H 3''$ ドメインが、(i) 残基K 3 9 3におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基E 3 7 8およびK 4 4 0におけるアミノ酸置換を含む、第2の重鎖；

(d) 可変ドメイン($V L 2$)およびヒトIgカッパ定常ドメイン($C L''$)を含む第2の軽鎖であって、 $C L''$ ドメインが、(i) 残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q 1 2 4およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換を含む、第2の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けはKabatに従っており、 $V H 1$ および $V L 1$ ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、 $V H 2$ および $V L 2$ ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体に関する。

【0013】

一部の態様において、本発明は、 $C H 1'$ ドメインが、残基L 1 2 4およびL 1 4 3にアミノ酸置換を含み、 $C L'$ ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、 $C H 1''$ ドメインが、残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8にアミノ酸置換を含み、 $C L''$ ドメインが、残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8にアミノ酸置換を含み、 $C H 3'$ が、残基K 3 9 3にアミノ酸置換を含み、 $C H 3''$ が、残基E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【0014】

他の態様において、本発明は、 $C H 1'$ ドメインが、残基L 1 2 4およびL 1 4 3にアミノ酸置換を含み、 $C L'$ ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、 $C H 1''$ ドメインが、残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8にアミノ酸置換を含み、 $C L''$ ドメインが、残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8にアミノ酸置換を含み、 $C H 3'$ が、残基E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含み、 $C H 3''$ が、残基K 3 9 3にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【0015】

別の態様において、本発明は、 $C H 1'$ ドメインが、野生型 $C H 1$ ドメインを含み、 $C L'$ ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、 $C H 1''$ ドメインが、残基K 1 4 5およびH 1 7 2にアミノ酸置換を含み、 $C L''$ ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、 $C H 3'$ が、残基K 3 9 3にアミノ酸置換を含み、 $C H 3''$ が、残基E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に

関する。

【0016】

一部の態様において、本発明は、CH1'ドメインが、野生型CH1ドメインを含み、CL'ドメインが、残基Q124およびN137にアミノ酸置換を含み、CH1''ドメインが、残基K145およびH172にアミノ酸置換を含み、CL''ドメインが、残基Q124およびN137にアミノ酸置換を含み、CH3'が、残基E378およびK440にアミノ酸置換を含み、CH3''が、残基K393にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【0017】

さらに他の態様において、本発明は、CH1'ドメインが、残基L124およびL143にアミノ酸置換を含み、CL'ドメインが、残基Q124、V133およびN137にアミノ酸置換を含み、CH1''ドメインが、残基K145、H172、およびS188にアミノ酸置換を含み、CL''ドメインが、残基Q124、N137、およびT178にアミノ酸置換を含み、CH3'が、残基K393にアミノ酸置換を含み、CH3''が、残基E378およびK440にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【0018】

本発明の他の態様は、CH1'ドメインが、残基L124およびL143にアミノ酸置換を含み、CL'ドメインが、残基Q124、V133、およびN137にアミノ酸置換を含み、CH1''ドメインが、残基K145、H172、およびS188にアミノ酸置換を含み、CL''ドメインが、残基Q124、N137、およびT178にアミノ酸置換を含み、CH3'が、残基E378およびK440にアミノ酸置換を含み、CH3''が、残基K393にアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。

【0019】

さらに他の態様において、本発明は、残基Q124、N137、K378、E393、およびK440におけるアミノ酸置換が、酸性残基または塩基性残基である、二重特異性抗体に関する。一部の態様において、本発明は、残基Q124、N137、K378、E393、およびK440におけるアミノ酸置換が、アスパラギン酸およびグルタミン酸から選択される酸性残基であるか、またはアルギニン、リシンおよびヒスチジンから選択される塩基性残基である、二重特異性抗体に関する。

【0020】

一部の態様において、本発明は、CH1'およびCH1''のアミノ酸置換が、L124V、L143A、K145D、H172D、およびS188Wを含む、二重特異性抗体に関する。他の態様において、本発明は、CL'およびCL''のアミノ酸置換が、Q124D、Q124K、Q124E、Q124R、Q124H、V133W、N137D、N137K、N137E、N137R、N137H、T178AおよびT178Rを含む、二重特異性抗体に関する。さらに他の態様において、本発明は、CH3'およびCH3''のアミノ酸置換が、K393E、K393D、K393R、K393H、E378K、E378R、E378H、E378D、K440R、K440H、K440E、K440Dを含む、二重特異性抗体に関する。

【0021】

一部の態様において、本発明は、CH1'のアミノ酸置換が、L124VおよびL143Aを含み、CL'のアミノ酸置換が、Q124DおよびN137Dを含み、CH1''のアミノ酸置換が、K145D、H172D、およびS188Wを含み、CL''のアミノ酸置換が、Q124K、N137K、およびT178Aを含み、CH3'のアミノ酸置換が、K393Eを含み、CH3''のアミノ酸置換が、E378KおよびK440Rを含む、二重特異性抗体に関する。

【0022】

他の態様において、本発明は、CH1'のアミノ酸置換が、L124VおよびL143Aを含み、CL'のアミノ酸置換が、Q124DおよびN137Dを含み、CH1''のアミノ酸置換が、K145D、H172D、およびS188Wを含み、CL''のアミノ酸置換が、

換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 Aを含み、C H 3 ' のアミノ酸置換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含み、C H 3 "のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、二重特異性抗体に関する。

【0023】

本発明の一部の態様は、C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 DおよびN 1 3 7 Dを含み、C H 1 "のアミノ酸置換が、K 1 4 5 DおよびH 1 7 2 Dを含み、C L "のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 KおよびN 1 3 7 Kを含み、C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含み、C H 3 "のアミノ酸置換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含む、二重特異性抗体に関する。

【0024】

別の態様において、本発明は、C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 DおよびN 1 3 7 Dを含み、C H 1 "のアミノ酸置換が、K 1 4 5 DおよびH 1 7 2 Dを含み、C L "のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 KおよびN 1 3 7 Kを含み、C H 3 ' のアミノ酸置換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含み、C H 3 "のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、二重特異性抗体に関する。

【0025】

さらに別の態様において、本発明は、C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 VおよびL 1 4 3 Aを含み、C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W、およびN 1 3 7 Dを含み、C H 1 "のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、およびS 1 8 8 Wを含み、C L "のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 Aを含み、C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含み、C H 3 "のアミノ酸置換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含む、二重特異性抗体に関する。

【0026】

一部の態様において、本発明は、C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 VおよびL 1 4 3 Aを含み、C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W、およびN 1 3 7 Dを含み、C H 1 "のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、およびS 1 8 8 Wを含み、C L "のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 Aを含み、C H 3 ' のアミノ酸置換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含み、C H 3 "のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、二重特異性抗体に関する。

【0027】

本発明は、前述のC H 1 ' 、C L ' 、C H 1 " 、C L " 、C H 3 ' および C H 3 "の組み合わせを有する二重特異性抗体に関する。

【0028】

本発明の一態様は、

(a) 可変ドメイン(VH1)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1'、CH2'、およびCH3')を含む第1の重鎖であって、CH1'ドメインが、残基L 1 2 4にバリンおよび残基L 1 4 3にアラニンを含み、CH3'ドメインが、残基E 3 7 8にリシンおよび残基K 4 4 0にアルギニンを含む、第1の重鎖；

(b) 可変ドメイン(VL1)およびヒトIgG定常ドメイン(CL')を含む第1の軽鎖であって、CL'ドメインが、残基Q 1 2 4にアスパラギン酸および残基N 1 3 7にアスパラギン酸を含む、第1の軽鎖；

(c) 可変ドメイン(VH2)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1"、CH2"、CH3")を含む第2の重鎖であって、CH1"ドメインが、残基K 1 4 5にアスパラギン酸、残基H 1 7 2にアスパラギン酸、および残基S 1 8 8にトリプトファンを含み、CH3"ドメインが、残基K 3 9 3にグルタミン酸を含む、第2の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン(VL2)およびヒトIgG定常ドメイン(CL")を含む第2の軽鎖であって、CL"ドメインが、Q 1 2 4にリシン、N 1 3 7にリシン、およびT 1 7 8にアラニンを含む、第2の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けはK a b a tに従っており、VH1およびVL1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、VH2およびVL2ドメインが、第2の抗

原に特異的に結合する、二重特異性抗体に関する。

【0029】

本発明の別の態様は、

(a) 可変ドメイン(VH1)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1'、CH2'、およびCH3')を含む第1の重鎖であって、CH1'ドメインが、残基L124にバリンおよび残基L143にアラニンを含み、CH3'ドメインが、残基K393にグルタミン酸を含む、第1の重鎖；

(b) 可変ドメイン(VL1)およびヒトIgG定常ドメイン(CL')を含む第1の軽鎖であって、CL'ドメインが、残基Q124にアスパラギン酸および残基N137にアスパラギン酸を含む、第1の軽鎖；

(c) 可変ドメイン(VH2)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1"、CH2"、CH3")を含む第2の重鎖であって、CH1"ドメインが、残基K145にアスパラギン酸、残基H172にアスパラギン酸、および残基S188にトリプトファンを含み、CH3"ドメインが、残基E378にリシンおよび残基K440にアルギニンを含む、第2の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン(VL2)およびヒトIgG定常ドメイン(CL")を含む第2の軽鎖であって、CL"ドメインが、Q124にリシン、N137にリシン、およびT178にアラニンを含む、第2の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けはKababに從っており、VH1およびVL1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、VH2およびVL2ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体に関する。

【0030】

本発明の他の態様は、二重特異性抗体の熱安定性が、親の単一特異性抗体の熱安定性の10以内である、前述の二重特異性抗体のいずれかに関する。

【0031】

他の態様において、本発明は、前述の二重特異性抗体のいずれかの軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に関する。一部の態様において、本発明は、該核酸を含む発現ベクターに関する。さらなる態様において、本発明は、前述の二重特異性抗体のいずれかの軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む発現ベクターで形質転換された細胞に関する。

【0032】

本発明の一態様は、二重特異性抗体を産生するための方法であって、

(a) 可変ドメイン(VH1)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1'、CH2'、およびCH3')を含む第1の重鎖であって、CH1'ドメインが、(i) 残基L124およびL143におけるアミノ酸置換、または(ii) 野生型CH1ドメインを含み、CH3'ドメインが、(i) 残基K393におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基E378およびK440におけるアミノ酸置換を含む、第1の重鎖；

(b) 可変ドメイン(VL1)およびヒトIgG定常ドメイン(CL')を含む第1の軽鎖であって、CL'ドメインが、(i) 残基Q124およびN137におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q124、V133、およびN137におけるアミノ酸置換を含む、第1の軽鎖；

(c) 可変ドメイン(VH2)およびヒトIgG定常ドメイン(CH1"、CH2"、CH3")を含む第2の重鎖であって、CH1"ドメインが、(i) 残基K145、H172、およびS188におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基K145およびH172におけるアミノ酸置換を含み、CH3"ドメインが、(i) 残基K393におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基E378およびK440におけるアミノ酸置換を含む、第2の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン(VL2)およびヒトIgG定常ドメイン(CL")を含む第2の軽鎖であって、CL"ドメインが、(i) 残基Q124、N137、およびT178におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q124およびN137におけるアミノ酸置換

換を含む、第2の軽鎖

を発現するように形質転換された宿主細胞を培養することを含み、番号付けはK a b a tに従っており、V H 1およびV L 1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、V H 2およびV L 2ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、方法に関する。

【0033】

本発明の別の態様は、

(a) 可変ドメイン(V H 1)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1')を含む第1の重鎖であって、C H 1'ドメインが、(i) 残基L 1 2 4およびL 1 4 3におけるアミノ酸置換、または(ii) 野生型C H 1ドメインを含む、第1の重鎖；

(b) 可変ドメイン(V L 1)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L')を含む第1の軽鎖であって、C L'ドメインが、(i) 残基Q 1 2 4およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q 1 2 4、V 1 3 3、およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換を含む、第1の軽鎖；

(c) 可変ドメイン(V H 2)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1'')を含む第2の重鎖であって、C H 1''ドメインが、(i) 残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基K 1 4 5およびH 1 7 2におけるアミノ酸置換を含む、第2の重鎖；ならびに

(d) 可変ドメイン(V L 2)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L'')を含む第2の軽鎖であって、C L''ドメインが、(i) 残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基Q 1 2 4およびN 1 3 7におけるアミノ酸置換を含む、第2の軽鎖

を含む抗原結合性断片(F a b)であって、番号付けはK a b a tに従っており、V H 1およびV L 1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、V H 2およびV L 2ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、抗原結合性断片(F a b)に関する。

【0034】

一部の態様において、本発明は、C H 1'ドメインが、残基L 1 2 4およびL 1 4 3にアミノ酸置換を含み、C L'ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、C H 1''ドメインが、残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8にアミノ酸置換を含み、C L''ドメインが、残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8にアミノ酸置換を含む、F a bに関する。

【0035】

他の態様において、本発明は、C H 1'ドメインが、野生型C H 1ドメインを含み、C L'ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、C H 1''ドメインが、残基K 1 4 5およびH 1 7 2にアミノ酸置換を含み、C L''ドメインが、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含む、F a bに関する。

【0036】

さらに他の態様において、本発明は、C H 1'ドメインが、残基L 1 2 4およびL 1 4 3にアミノ酸置換を含み、C L'ドメインが、残基Q 1 2 4、V 1 3 3、およびN 1 3 7にアミノ酸置換を含み、C H 1''ドメインが、残基K 1 4 5、H 1 7 2、およびS 1 8 8にアミノ酸置換を含み、C L''ドメインが、残基Q 1 2 4、N 1 3 7、およびT 1 7 8にアミノ酸置換を含む、F a bに関する。

【0037】

一部の態様において、本発明は、本明細書に記載されるC H 3領域の変異を有する定常領域を含むまたは含まない、本明細書に記載されるF a bのいずれかを含む二重特異性抗体に関する。

【0038】

さらに他の態様において、本発明は、第1のヒトI g G定常ドメイン(C H 3')および第2のヒトI g G定常ドメイン(C H 3'')を含むヘテロ二量体ポリペプチドであって、C H 3'ドメインが、(i) 残基K 3 9 3におけるアミノ酸置換、または(ii) 残基E 3 7 8およびK 4 4 0におけるアミノ酸置換を含み、C H 3''ドメインが、(i) 残基

K 3 9 3におけるアミノ酸置換、または(i i)残基E 3 7 8およびK 4 4 0におけるアミノ酸置換を含み、それによってC H 3ドメイン間でヘテロ二量体を形成する、ヘテロ二量体ポリペプチドに関する。一部の態様において、本発明は、二重特異性抗体である、ヘテロ二量体ポリペプチドに関する。

【0039】

一部の態様において、本発明は、ペルツズマブのC D R (または可変領域) およびD L 1 1のC D R (または可変領域)、ならびに本明細書に記載されるC H 1 / C L 境界の変異および/またはC H 3 定常領域の変異のいずれかを有する定常領域を含む二重特異性抗体に関する。さらに他の態様において、本発明は、配列番号1 5、1 6、1 7 および1 8を含む二重特異性抗体に関する。一部の態様において、本発明は、リツキシマブのC D R (または可変領域) およびオビヌツズマブのC D R (または可変領域)、ならびに本明細書に記載されるC H 1 / C L 境界の変異および/またはC H 3 定常領域の変異のいずれかを有する定常領域を含む二重特異性抗体に関する。他の態様において、本発明は、配列番号1 9、2 0、2 1 および2 2を含む二重特異性抗体に関する。一部の態様において、本発明は、ニボルマブのC D R (または可変領域) およびベバシズマブのC D R (または可変領域)、ならびに本明細書に記載されるC H 1 / C L 境界の変異および/またはC H 3 定常領域の変異を有する定常領域を含む二重特異性抗体に関する。さらに他の態様において、本発明は、配列番号2 3、2 4、2 5 および2 6を含む二重特異性抗体に関する。

【0040】

一部の態様において、本発明は、前述の二重特異性抗体のいずれかを投与することによって疾患または障害(例えば、がん)を処置または診断する方法に関する。他の態様において、本発明は、治療適用で使用するための前述の二重特異性抗体のいずれかに関する。さらに他の態様において、本発明は、がんの診断または処置で使用するための前述の二重特異性抗体のいずれかに関する。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

(項目1)

第1の重鎖(H C ')、第2の重鎖(H C ")、第1の軽鎖(L C ')および第2の軽鎖(L C ")を含む、第1の抗原および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体であって、

前記H C '、前記H C "または前記H C ' および前記H C "の両方は、以下の残基L 1 2 4、L 1 4 3、K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、E 3 7 8、K 3 9 3およびK 4 4 0のいずれか1つ、またはそれらの組み合わせにアミノ酸置換を含み；

前記L C '、前記L C "または前記L C ' および前記L C "の両方は、以下の残基Q 1 2 4、V 1 3 3、N 1 3 7、T 1 7 8のいずれか1つ、またはそれらの組み合わせにアミノ酸置換を含み、番号付けはK a b a tに従っており、

前記H C 'はL C 'と優先的に対合し、前記H C "はL C "と優先的に対合し、それによってヘテロ二量体を形成する、二重特異性抗体。

(項目2)

H C 'が、残基L 1 2 4、L 1 4 3、E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、項目1に記載の二重特異性抗体。

(項目3)

H C 'が、残基L 1 2 4、L 1 4 3およびK 3 9 3にアミノ酸置換を含む、項目1に記載の二重特異性抗体。

(項目4)

H C "が、残基K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、およびK 3 9 3にアミノ酸置換を含む、項目1から3のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目5)

H C "が、残基K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、E 3 7 8およびK 4 4 0にアミノ酸置換を含む、項目1から3のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目6)

H C " が、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および K 3 9 3 にアミノ酸置換を含む、項目 1 から 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 7)

H C " が、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含む、項目 1 から 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 8)

L C '、L C " または L C ' および L C " の両方が、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含む、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 9)

L C '、L C " または L C ' および L C " の両方が、残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含む、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 10)

L C '、L C " または L C ' および L C " の両方が、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7 および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含む、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 11)

H C '、H C " または H C ' および H C " の両方が、L 1 2 4 V、L 1 4 3 A、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、S 1 8 8 W、E 3 7 8 K、K 3 9 3 E、および K 4 4 0 R からなる群より選択されるアミノ酸置換、またはそれらの組み合わせを含む、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 12)

L C '、L C " または L C ' および L C " の両方が、Q 1 2 4 D、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 D、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 A からなる群より選択されるアミノ酸置換、またはそれらの組み合わせを含む、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 13)

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 '、C H 2 '、および C H 3 ') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1 ' ドメインが、(i) 残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C H 3 ' ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L ' ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1 "、C H 2 "、C H 3 ") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1 " ドメインが、(i) 残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 におけるアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の重鎖；

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L ") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L " ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けは K a b a t に従っており、

前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

(項目 14)

前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメ

インが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 5)

前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 6)

前記 C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 7)

前記 C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 8)

前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 9)

前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 ' が、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " が、残基 K 3 9 3 にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 0)

残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、K 3 7 8、E 3 9 3、および K 4 4 0 における前記アミノ酸置換が、酸性残基または塩基性残基である、項目 1 3 から 1 9 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 2 1)

残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、K 3 7 8、E 3 9 3、および K 4 4 0 における前記アミノ酸置換が、アスパラギン酸およびグルタミン酸から選択される酸性残基であるか、またはアルギニン、リシンおよびヒスチジンから選択される塩基性残基である、項目 2 0 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 2)

前記 C H 1 ' および前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、L 1 2 4 V、L 1 4 3 A、K 1 4

5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 Wを含む、項目 1 3 から 2 1 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 2 3)

前記 C L ' および前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D、Q 1 2 4 K、Q 1 2 4 E、Q 1 2 4 R、Q 1 2 4 H、V 1 3 3 W、N 1 3 7 D、N 1 3 7 K、N 1 3 7 E、N 1 3 7 R、N 1 3 7 H、T 1 7 8 A および T 1 7 8 Rを含む、項目 1 3 から 2 2 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 2 4)

前記 C H 3 ' および前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、K 3 9 3 E、K 3 9 3 D、K 3 9 3 R、K 3 9 3 H、E 3 7 8 K、E 3 7 8 R、E 3 7 8 H、E 3 7 8 D、K 4 4 0 R、K 4 4 0 H、K 4 4 0 E および K 4 4 0 Dを含む、項目 1 3 から 2 3 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目 2 5)

前記 C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 V および L 1 4 3 Aを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 Wを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 Aを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含み、前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、E 3 7 8 K および K 4 4 0 Rを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 6)

前記 C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 V および L 1 4 3 Aを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 Wを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 Aを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、E 3 7 8 K および K 4 4 0 Rを含み、前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 7)

前記 C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D および H 1 7 2 Dを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K および N 1 3 7 Kを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含み、前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、E 3 7 8 K および K 4 4 0 Rを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 8)

前記 C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D および H 1 7 2 Dを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K および N 1 3 7 Kを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、E 3 7 8 K および K 4 4 0 Rを含み、前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 2 9)

前記 C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 V および L 1 4 3 Aを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W、および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 Wを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 Aを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含み、前記 C H 3 " のアミノ酸置換が、E 3 7 8 K および K 4 4 0 Rを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 3 0)

前記 C H 1 ' のアミノ酸置換が、L 1 2 4 V および L 1 4 3 Aを含み、前記 C L ' のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W、および N 1 3 7 Dを含み、前記 C H 1 " のアミノ酸置換が、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 Wを含み、前記 C L " のアミノ酸置換が、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 Aを含み、前記 C H 3 ' のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、項目 1 3 に記載の二重特異性抗体。

換が、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 Rを含み、前記C H 3 "のアミノ酸置換が、K 3 9 3 Eを含む、項目1 3に記載の二重特異性抗体。

(項目3 1)

(a)可変ドメイン(V H 1)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1 '、C H 2 '、およびC H 3 ')を含む第1の重鎖であって、前記C H 1 'ドメインが、残基L 1 2 4にバリンおよび残基L 1 4 3にアラニンを含み、前記C H 3 'ドメインが、残基E 3 7 8にリシンおよび残基K 4 4 0にアルギニンを含む、第1の重鎖；

(b)可変ドメイン(V L 1)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L ')を含む第1の軽鎖であって、前記C L 'ドメインが、残基Q 1 2 4にアスパラギン酸および残基N 1 3 7にアスパラギン酸を含む、第1の軽鎖；

(c)可変ドメイン(V H 2)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1 "、C H 2 "、C H 3 ")を含む第2の重鎖であって、前記C H 1 "ドメインが、残基K 1 4 5にアスパラギン酸、残基H 1 7 2にアスパラギン酸、および残基S 1 8 8にトリプトファンを含み、前記C H 3 "ドメインが、残基K 3 9 3にグルタミン酸を含む、第2の重鎖；ならびに

(d)可変ドメイン(V L 2)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L ")を含む第2の軽鎖であって、前記C L "ドメインが、Q 1 2 4にリシン、N 1 3 7にリシン、およびT 1 7 8にアラニンを含む、第2の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けはK a b a tに従っており、

前記V H 1ドメインおよび前記V L 1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、前記V H 2ドメインおよび前記V L 2ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

(項目3 2)

(a)可変ドメイン(V H 1)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1 '、C H 2 '、およびC H 3 ')を含む第1の重鎖であって、前記C H 1 'ドメインが、残基L 1 2 4にバリンおよび残基L 1 4 3にアラニンを含み、前記C H 3 "ドメインが、残基K 3 9 3にグルタミン酸を含む、第1の重鎖；

(b)可変ドメイン(V L 1)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L ')を含む第1の軽鎖であって、前記C L 'ドメインが、残基Q 1 2 4にアスパラギン酸および残基N 1 3 7にアスパラギン酸を含む、第1の軽鎖；

(c)可変ドメイン(V H 2)およびヒトI g G定常ドメイン(C H 1 "、C H 2 "、C H 3 ")を含む第2の重鎖であって、前記C H 1 "ドメインが、残基K 1 4 5にアスパラギン酸、残基H 1 7 2にアスパラギン酸、および残基S 1 8 8にトリプトファンを含み、前記C H 3 'ドメインが、残基E 3 7 8にリシンおよび残基K 4 4 0にアルギニンを含む、第2の重鎖；ならびに

(d)可変ドメイン(V L 2)およびヒトI g カッパ定常ドメイン(C L ")を含む第2の軽鎖であって、前記C L "ドメインが、Q 1 2 4にリシン、N 1 3 7にリシン、およびT 1 7 8にアラニンを含む、第2の軽鎖

を含む二重特異性抗体であって、番号付けはK a b a tに従っており、

前記V H 1ドメインおよび前記V L 1ドメインが、第1の抗原に特異的に結合し、前記V H 2ドメインおよび前記V L 2ドメインが、第2の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

(項目3 3)

前記二重特異性抗体の熱安定性が、親の単一特異性抗体の熱安定性の1 0 以内である、前記項目のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目3 4)

前記項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の、軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

(項目3 5)

項目3 4に記載の核酸を含む発現ベクター。

(項目3 6)

項目 3 5 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

(項目 3 7)

二重特異性抗体を産生するための方法であって、

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1'、C H 2'、および C H 3') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1' ドメインが、(i) 残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C H 3' ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L' ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1"、C H 2"、C H 3") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1" ドメインが、(i) 残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 におけるアミノ酸置換を含み、前記 C H 3" ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の重鎖；

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L" ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の軽鎖

を発現するように形質転換された宿主細胞を培養する工程を包含し、番号付けは K a b a t に従っており、

前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、方法。

(項目 3 8)

(a) 可変ドメイン (V H 1) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1') を含む第 1 の重鎖であって、前記 C H 1' ドメインが、(i) 残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 野生型 C H 1 ドメインを含む、第 1 の重鎖；

(b) 可変ドメイン (V L 1) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L') を含む第 1 の軽鎖であって、前記 C L' ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 1 の軽鎖；

(c) 可変ドメイン (V H 2) およびヒト I g G 定常ドメイン (C H 1") を含む第 2 の重鎖であって、前記 C H 1" ドメインが、(i) 残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の重鎖；

(d) 可変ドメイン (V L 2) およびヒト I g カッパ定常ドメイン (C L") を含む第 2 の軽鎖であって、前記 C L" ドメインが、(i) 残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む、第 2 の軽鎖

を含む抗原結合性断片 (F a b) であって、番号付けは K a b a t に従っており、

前記 V H 1 ドメインおよび前記 V L 1 ドメインが、第 1 の抗原に特異的に結合し、前記 V H 2 ドメインおよび前記 V L 2 ドメインが、第 2 の抗原に特異的に結合する、抗原結合性断片 (F a b)。

(項目 3 9)

前記 C H 1' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1" ドメインが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L" ド

メインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含む、項目 3 8 に記載の F a b。

(項目 4 0)

前記 C H 1 ' ドメインが、野生型 C H 1 ドメインを含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5 および H 1 7 2 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含む、項目 3 8 に記載の F a b。

(項目 4 1)

前記 C H 1 ' ドメインが、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 にアミノ酸置換を含み、前記 C L ' ドメインが、残基 Q 1 2 4、V 1 3 3、および N 1 3 7 にアミノ酸置換を含み、前記 C H 1 " ドメインが、残基 K 1 4 5、H 1 7 2、および S 1 8 8 にアミノ酸置換を含み、前記 C L " ドメインが、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7、および T 1 7 8 にアミノ酸置換を含む、項目 3 8 に記載の F a b。

(項目 4 2)

項目 3 8 から 4 1 のいずれか一項に記載の F a b を含む二重特異性抗体。

(項目 4 3)

F c ドメインが、ノブイントゥホール変異を含有する、項目 4 2 に記載の二重特異性抗体。

(項目 4 4)

第 1 のヒト I g G 定常ドメイン (C H 3 ') および第 2 のヒト I g G 定常ドメイン (C H 3 ") を含むヘテロ二量体ポリペプチドであって、前記 C H 3 ' ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含み、前記 C H 3 " ドメインが、(i) 残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換、または (i i) 残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を含み、それによって前記 C H 3 ドメイン間でヘテロ二量体を形成する、ヘテロ二量体ポリペプチド。

(項目 4 5)

二重特異性抗体である、項目 4 4 に記載のヘテロ二量体ポリペプチド。

(項目 4 6)

項目 1 から 3 3 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、疾患を処置するための方法。

(項目 4 7)

前記疾患が、がんである、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

がんを処置または診断することにおいて使用するための、項目 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】図 1 は、2 つの異なる重鎖と 2 つの異なる軽鎖とが宿主細胞中で発現される場合の誤対合に起因する二重特異性抗体種の数为例示する。

【図 2 A】図 2 A は、指定された変異を有する精製された抗体を分離したゲル電気泳動の結果を示す。野生型 (W T) に対応するインタクトな抗体 (一番上) と半抗体 (h a l f - a n t i b o d y) (一番下) 種を丸で囲む。

【図 2 B】図 2 B は、指定された変異を有する精製された抗体を分離したゲル電気泳動の結果を示す。レーン 4、5 および 6 は半抗体断片を形成したが、それに対してレーン 2、3 および 7 は形成しなかった。

【図 3 A】図 3 A は、二重特異性抗体が、いかなる変異も含まないモノクローナル抗体 D L 1 1 およびベルツズマブ由来の重鎖および軽鎖を有する場合のカチオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。

【図 3 B】図 3 B は、二重特異性抗体が、C H 1 / C L 境界および C H 3 領域中に変異を有する、モノクローナル抗体 D L 1 1 およびベルツズマブ由来の重鎖および軽鎖を有する

場合のカチオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。精製およびさらなる試験のために、丸で囲まれたピークを選択した。

【図4】図4は、精製されたペルツズマブ/DL11二重特異性抗体(「P/D」)のネイティブ質量分析(Native Mass Spectrometry)の結果を示す。

【図5-1】図5Aは、ELISAによって測定した場合の、ペルツズマブ、DL11、およびP/Dによる、Her1への結合の結果を示す線グラフである。図5Bは、ELISAによって測定した場合の、ペルツズマブ、DL11、およびP/Dによる、Her2への結合の結果を示す線グラフである。

【図5-2】図5Cは、ELISAによって測定した場合の、ペルツズマブ、DL11、およびP/Dによる、Her3への結合の結果を示す線グラフである。

【図6】図6Aは、サンドイッチELISAによって測定した場合の、ペルツズマブ、DL11、およびP/Dによる、同時のHer1およびHer2への結合の結果を示す線グラフである。図6Bは、サンドイッチELISAによって測定した場合の、ペルツズマブ、DL11、およびP/Dによる、同時のHer2およびHer3への結合の結果を示す線グラフである。

【図7】図7は、ネイティブ質量分析によって測定した場合の、CH1/CL境界およびCH3領域中に変異を有するリツキシマブ/オビヌツズマブ二重特異性抗体(「Rxm/GA101」)の純度を示す。

【図8】図8は、円偏光二色性によって測定した場合の、親抗体であるリツキシマブ(「Rxm」)およびオビヌツズマブ(「GA101」)と比較したRxm/GA101の熱安定性を示すグラフである。

【図9】図9は、動的光散乱法によって測定した場合の、Rxm/GA101の質量パーセント(y軸)対半径(nM)(x軸)を描写する棒グラフである。ピークの幅は、多分散性(%PD)に相当する。

【図10】図10は、ELISAによって測定した場合の、親抗体であるRxmおよびGA101と比較したRxm/GA101によるCD20結合の結果を示す線グラフである。

【図11】図11は、アネキシン陽性細胞のパーセント(%Anx)によって測定した場合の、Rxm/GA101、リツキシマブ、GA101、およびハーセプチン(アイソタイプ対照)によりDauid細胞において誘導された総アポトーシスを示す棒グラフである。

【図12】図12は、蛍光によって測定した場合の、親抗体であるRxmおよびGA101と比較した、Rxm/GA101によるWIL2-S細胞における補体依存性細胞傷害の誘導を示す線グラフである。

【図13】図13は、発光によって測定した場合の、親抗体であるRxmおよびGA101と比較した、Rxm/GA101による抗体依存性細胞傷害の誘導を示す線グラフである。

【図14】図14は、ネイティブ質量分析によって測定した場合の、CH1/CL境界およびCH3領域中に変異を有するニボルマブ/ベバシズマブ二重特異性抗体の純度を示す。

【図15】図15は、円偏光二色性によって測定した場合の、親抗体であるニボルマブおよびベバシズマブと比較した、ニボルマブ/ベバシズマブ二重特異性抗体(「BsAb」)の熱安定性を示すグラフである。

【図16】図16は、動的光散乱法によって測定した場合の、ニボルマブ/ベバシズマブ二重特異性抗体の質量パーセント(y軸)対半径(nM)(x軸)を描写する棒グラフである。ピークの幅は、多分散性(%PD)に相当する。

【図17】図17は、サンドイッチELISAによって測定した場合の、親抗体であるニボルマブおよびベバシズマブと比較した、ニボルマブ/ベバシズマブ二重特異性抗体(「BsAb」)による同時のPD1およびVEGFへの結合の結果を示す線グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本明細書に記載される本発明は、 $CH1/CL$ 境界および $CH3$ 領域中に、所望のヘテロ二量体の収量および純度を増加させる変異を有する二重特異性抗体に関する。単一の宿主細胞中で重鎖および軽鎖の優先的な対合を引き起こして、重鎖および軽鎖の集合のヘテロ二量体化を制御するように、ヒトIgGの定常領域中の変異を設計した。鎖間の原子間ネットワークに対する様々なアミノ酸変異の影響を分析し、個々のノード（node）および/またはエッジ（edge）の損失または獲得を引き起こす原子間の接触（例えば、推定上の水素結合（水架橋結合（water-bridged bond）など）、パイ結合、極性相互作用、塩架橋、およびファンデルワールス相互作用（非水素））の損失または獲得による原子間ネットワークの変化を同定した。野生型と比較して原子間の接触を保持または追加するアミノ酸置換を、好都合なネットワークを形成するものとして同定し、それに対して原子間の接触の損失をもたらすアミノ酸変異を、都合の悪いネットワークを形成するものとして同定した。

【0043】

したがって、本発明は、可変領域（ VH および VL ）のドメイン中の変異を回避しながら、好都合なネットワークを増加させ、それによって所望のヘテロ二量体の収量および純度を増加させるように設計された、 $CH1/CL$ 境界および $CH3$ 定常領域の変異を有する二重特異性抗体に関する。得られた二重特異性抗体は、Fcエフェクター特性（例えば、ADCC、CDC、半減期など）を保持する。

【0044】

定義

特許請求の範囲および明細書で使用される用語は、別段の規定がない限り以下に記載した通りに定義される。

【0045】

文脈からそうではないことが示された場合を除いて、用語「第1の」抗体および「第2の」抗体、ならびにそれらの変化形は、単に総称的な識別名であり、本発明の抗体の具体的なまたは特定の抗体または構成要素を識別するとは解釈されないものとする。

【0046】

ある特定の実施形態において、「抗体」は、本明細書で述べられる場合、全抗体およびあらゆる抗原結合性断片（すなわち、「抗原結合性部分」）またはそれらの単一鎖を含む。「抗体」は、ある特定の実施形態において、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重（ HC ）鎖および2つの軽（ LC ）鎖、またはそれらの抗原結合性部分を含む糖タンパク質を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では V_H と略記される）および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 $CH1$ 、 $CH2$ および $CH3$ で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書では V_L と略記される）および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL で構成される。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域（ FR ）と呼ばれるより高度に保存された領域が散在した相補性決定領域（ CDR ）と呼ばれる超可変性を有する領域にさらに細かく分類することができる。各 V_H および V_L は、3つの CDR および4つの FR で構成されており、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ で配列される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、宿主組織または因子（例えば免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的な補体系の第1成分（ $C1q$ ）など）への、免疫グロブリンの結合を媒介することができる。抗体の例としては、本明細書に記載されるような、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）および抗体断片が挙げられる。

【0047】

抗体の「抗原結合性部分」（または単に「抗体部分」）という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つまたは複数の断片を指

す。このような「断片」は、例えば約 8 から約 1500 アミノ酸の間の長さであり、好適には約 8 から約 745 アミノ酸の間の長さであり、好適には約 8 から約 300、例えば約 8 から約 200 アミノ酸、または約 10 から約 50 もしくは 100 アミノ酸の長さである。全長抗体の断片は、抗体の抗原に結合する機能を発揮できることが示されている。抗体の「抗原結合性部分」という用語内に包含される結合性断片の例としては、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_H1 ドメインからなる 1 価断片である、Fab 断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された 2 つの Fab 断片を含む 2 価断片である、 $F(a b')_2$ 断片；(iii) V_H および C_H1 ドメインからなる Fd 断片；(iv) 抗体のシングルアームの V_L および V_H ドメインからなる Fv 断片、(v) V_H ドメインからなる dAb 断片 (Ward ら、(1989 年) Nature 341 巻: 544 ~ 546 頁)；および (vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)、または (vii) 任意選択で合成リンカーによって合体していてもよい 2 つまたはそれより多くの単離された CDR の組み合わせが挙げられる。さらに、Fv 断片の 2 つのドメイン、 V_L および V_H は、別個の遺伝子によってコードされているが、組換え方法を使用して、 V_L および V_H 領域が対合して 1 価分子 (単鎖 Fv (scFv)) として公知；例えば、Bird ら (1988 年) Science 242 巻: 423 ~ 426 頁；および Huston ら (1988 年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 巻: 5879 ~ 5883 頁を参照されたい) を形成する単一のタンパク質鎖にすることを可能にする合成リンカーによって、それらを合体させることができる。またこのような単鎖抗体は、抗体の「抗原結合性部分」という用語内にも包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、断片は、インタクトな抗体の場合と同じ方式で有用性に関してスクリーニングされる。抗原結合性部分は、組換え DNA 技術、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的な切断によって産生することができる。

【0048】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、特定のエピトープに単一の結合特異性および親和性を提示する抗体を指す。したがって、用語「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を提示し、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域および任意選択の定常領域を有する抗体を指す。一実施形態において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られた B 細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0049】

用語「二重特異性抗体」は、本明細書で使用される場合、2 つまたはそれよりも多くのエピトープに選択的に結合することが可能な抗体を指す。二重特異性抗体は、一般的に、2 つの異なる重鎖 / 軽鎖対を含み、2 つの異なる分子 (例えば、抗原) 上または同じ分子 (例えば、同じ抗原) 上のいずれかの異なるエピトープに特異的に結合する。

【0050】

「半抗体」は、本明細書で使用される場合、1 つの免疫グロブリン軽鎖と結合した 1 つの免疫グロブリン重鎖を指す。当業者であれば、半抗体もまた、単一の可変ドメインからなる抗原結合ドメインを有し得ることを容易に理解するであろう。

【0051】

用語「Fc 領域」は、本明細書で使用される場合、天然の免疫グロブリンの 2 つの重鎖のそれぞれの Fc ドメイン (または Fc 成分) によって形成された、天然の免疫グロブリンの一部分を指す。用語「Fc ドメイン」は、本明細書で使用される場合、Fc ドメインが Fv ドメインを含まない、単一の免疫グロブリン (Ig) 重鎖の一部分を指す。そのようなものとして、Fc ドメインは、「Ig」または「IgG」と称される場合もある。ある特定の実施形態において、Fc ドメインは、パライン切断部位のすぐ上流のヒンジ領域から始まり、抗体の C 末端で終わる。したがって、完全な Fc ドメインは、少なくともヒンジドメイン、 C_H2 ドメイン、および C_H3 ドメインを含む。ある特定の実施形態にお

いて、Fcドメインは、ヒンジ（例えば、上部、中央、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはそれらのバリエーション、一部分、もしくは断片の少なくとも1つを含む。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、完全Fcドメイン（すなわち、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン）を含む。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、CH3ドメイン（またはその一部分）に融合したヒンジドメイン（またはその一部分）を含む。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、CH3ドメイン（またはその一部分）に融合したCH2ドメイン（またはその一部分）を含む。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、CH3ドメインまたはその一部分からなる。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、ヒンジドメイン（またはその一部分）およびCH3ドメイン（またはその一部分）からなる。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、CH2ドメイン（またはその一部分）およびCH3ドメインからなる。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、ヒンジドメイン（またはその一部分）およびCH2ドメイン（またはその一部分）からなる。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、CH2ドメインの少なくとも一部分（例えば、CH2ドメインの全てまたは一部）を欠いている。本明細書では、Fcドメインは、一般的に、免疫グロブリン重鎖のFcドメインの全てまたは一部を含むポリペプチドを指す。このようなポリペプチドとしては、これらに限定されないが、CH1、ヒンジ、CH2、および／またはCH3ドメインの全体を含むポリペプチド、同様に、例えばヒンジ、CH2、およびCH3ドメインのみを含むこのようなペプチドの断片が挙げられる。Fcドメインは、これらに限定されないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体などの、あらゆる種および／またはあらゆるサブタイプの免疫グロブリン由来であってもよい。Fcドメインは、天然のFcおよびFcバリエーション分子を包含する。Fcバリエーションおよび天然のFcバリエーションの場合と同様に、Fcドメインという用語は、全抗体から消化されたかまたは他の手段によって産生されたかにかかわらず、単量体または多量体の形態の分子を含む。

【0052】

抗体の定常領域へのアミノ酸残基番号の割り当ては、Kabattの定義に従っている。例えば、それぞれがあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections)、第5版、Bethesda、MD:NIH 1巻:647~723頁(1991年); Kabattら、"Introduction" Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Dept of Health and Human Services、NIH、第5版、Bethesda、MD 1巻:xiii~xcvi頁(1991年); ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 196巻:901~917頁(1987年); Chothiaら、Nature 342巻:878~883頁(1989年)を参照されたい。

【0053】

本明細書に記載されるように、いずれのFcドメインも、天然に存在する免疫グロブリン分子の天然のFcドメインとはアミノ酸配列が異なるように改変され得ることが当業者には理解されるであろう。ある特定の実施形態において、Fcドメインは、低減されたエフェクター機能（例えば、FcR結合）を有する。

【0054】

本発明の抗体のFcドメインは、異なる免疫グロブリン分子由来であってもよい。例えば、Fcドメインは、IgG1分子由来のCH2および／またはCH3ドメイン、ならびにIgG3分子由来のヒンジ領域を含んでいてもよい。別の例において、Fcドメインは、一部がIgG1分子由来であり、一部がIgG3分子由来であるキメラヒンジ領域を含んでいてもよい。別の例において、Fcドメインは、一部がIgG1分子由来であり、一部がIgG4分子由来であるキメラヒンジを含んでいてもよい。

【0055】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載している。ある特定の実施形態において、FcRは、ヒトFcRである。さらに、ある特定の実施形態において、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、FcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体、例えば、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび可変スプライシングされた形態などを含む。FcRII受容体は、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「阻害受容体」）を含み、これらは、類似しているが主としてそれらの細胞質内ドメインにおいて異なるアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質内ドメイン中に、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害受容体FcRIIBは、その細胞質内ドメイン中に免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）を含有する（総説のM. Daeron、Annu. Rev. Immunol. 15巻：203～234頁（1997年）を参照）。FcRは、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol. 9巻：457～492頁（1991年）；Capelら、Immunomethods 4巻：25～34頁（1994年）；およびde Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126巻：330～41頁（1995年）に概説されている。本明細書では、他のFcRも、将来的に同定されるものも含めて用語「FcR」に包含される。この用語はまた、母体IgGの胎児への移行に関与する新生児受容体であるFcRnも含む（Guyerら、J. Immunol. 117巻：587号（1976年）およびKimら、J. Immunol. 24巻：249号（1994年））。

【0056】

「機能的なFc領域」は、天然配列のFc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合；CDC；Fc受容体結合；ADCC；貪食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方調節などが挙げられる。このようなエフェクター機能は、一般的に、Fc領域を結合ドメイン（例えば、抗体の可変ドメイン）と組み合わせることを必要とし、例えば本明細書における定義で開示されたような様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0057】

「天然配列のFc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を含む。天然配列のヒトFc領域としては、天然配列のヒトIgG₁のFc領域（非AおよびAアロタイプ）；天然配列のヒトIgG₂のFc領域；天然配列のヒトIgG₃のFc領域；および天然配列のヒトIgG₄のFc領域、加えて天然に存在するそれらのバリエーションが挙げられる。

【0058】

「バリエーションFc領域」は、天然配列のFc領域のアミノ酸配列と、少なくとも1つのアミノ酸改変によって異なっているアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、バリエーションFc領域は、天然配列のFc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、約1つから約10個のアミノ酸置換を有し、ある特定の実施形態において、天然配列のFc領域または親ポリペプチドのFc領域中に、約1つから約5つのアミノ酸置換を有する。ある特定の実施形態において、バリエーションFc領域は、天然配列のFc領域および/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の相同性を有し、それらと少なくとも約90%の相同性を有し、それらと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%の相同性を有する。

【0059】

ある特定の実施形態において、Fcを含有するポリペプチドは、IgGのFc領域を含み、好ましくは野生型ヒトIgGのFc領域由来である。「野生型」ヒトIgGのFcは、ヒト集団中において天然に存在するアミノ酸の配列を意味する。当然ながら、Fc配列は個体間でわずかに異なり得るのと同様に、1つまたは複数の変更が野生型配列になされ

る可能性があるが、それでもなお本発明の範囲内にある。例えば、Fc領域は、グリコシル化部位中の変異または非天然アミノ酸の包含などの本発明に関連しない追加の変更を含有していてもよい。

【0060】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に關与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖および軽鎖（それぞれ V_H および V_L ）の可変ドメインは、一般的に、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）および3つの超可変領域（HVR）を含む。例えば、Kindtら、Kuby Immunology、第6版、W. H. Freeman and Co.、91頁（2007年）を参照されたい。単一の V_H または V_L ドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、抗原に結合する抗体由来の V_H または V_L ドメインを使用して単離して、それぞれ相補的な V_L または V_H ドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150巻：880～887頁（1993年）；Clarksonら、Nature 352巻：624～628頁（1991年）を参照されたい。

【0061】

用語「Fab」は、本明細書で使用される場合、抗体の抗原結合性断片を指す。上述したように、パペインは、インタクトな抗体を消化するのに使用することができる。抗体のパペイン消化は、2つの同一な抗原結合性断片、すなわち「Fab」断片、および残りの「Fc」断片（すなわちFc領域、上記）を産生する。Fab断片は、H鎖の可変領域ドメインに沿ったL鎖全体（V）、および1つの重鎖の第1の定常ドメイン（ C_H1 ）からなる。

【0062】

用語「ノブイントゥホール（knob - into - hole）」または「KnH」技術は、本明細書で述べられる場合、in vitroまたはin vivoで2つのポリペプチドを、それらが相互作用する境界で、突起（pertubérance）（ノブ）を一方のポリペプチドに、腔（ホール）を他方のポリペプチドに導入することによって一緒に対合させる技術を指す。例えば、KnHは、抗体のFc：Fc結合境界、 C_L ： C_H1 境界または $V_H A_L$ 境界に導入されている（例えば、US2007/0178552、WO96/027011、WO98/050431およびZhuら、（1997年）Protein Science 6巻：781～788頁）。これは、多重特異性抗体の製造中に2つの異なる重鎖を一緒に対合させることを促進することにおいて有用である。例えば、それらのFc領域中にKnHを有する二重特異性抗体は、各Fc領域に連結された単一の可変ドメインをさらに含んでいてもよいし、または類似のまたは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインをさらに含んでいてもよい。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、残基T389、例えばT389Wにノブの変異を含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、残基T389、L391、および/またはY438にホールの変異を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、残基T389S、L391A、およびY438Vにホールの変異を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、残基T389、例えばT389Wにノブの変異を含み、残基T389、L391、および/またはY438、例えばT389S、L391A、およびY438Vにホールの変異を含む。

【0063】

用語「組換えヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製される、発現される、作り出されるまたは単離されるあらゆるヒト抗体、例えば、（a）ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックまたはトランスクロモソーム（transchromosomal）である動物（例えば、マウス）またはそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、（b）抗体を発現するように形質転換された宿主細胞

胞、例えばトランスフェクトマ (transfectoma) から単離された抗体、(c) 組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および (d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他の DNA 配列へのスプライシングを含む他のあらゆる手段によって調製された、発現された、作り出されたまたは単離された抗体などを含む。このような組換えヒト抗体は、特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を利用する可変および定常領域を含み、このような配列は、その生殖細胞系の遺伝子によってコードされるが、それに続く、例えば抗体成熟中に起こる再配列および変異を含む。当該分野で公知のように (例えば、Lonberg (2005 年) Nature Biotech. 23 巻 (9 号) : 1117 ~ 1125 頁を参照)、可変領域は、再配列されて外来抗原に特異的な抗体を形成する様々な遺伝子によってコードされる抗原結合ドメインを含有する。再配列に加えて、可変領域は、外来抗原への抗体の親和性を増加させるために、複数の単一のアミノ酸変化によってさらに改変されていてもよい (体細胞変異または超変異と称される)。抗原へのさらなる応答に対して、定常領域が変化する (すなわち、アイソタイプスイッチ)。それゆえに、抗原に応答して、再配列および体細胞変異した軽鎖および重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする核酸分子は、元の核酸分子と配列同一性を有さない場合があるが、その代わりに、実質的に同一であるかまたは類似する (すなわち、少なくとも 80 % の同一性を有する)。

【0064】

用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の可変および定常領域 (存在する場合) を有する抗体を含む。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基 (例えば、in vitro でのランダムまたは部位特異的変異誘発、または in vivo での体細胞変異によって導入された変異) を含んでいてもよい (Lonberg, N. (1994 年) Nature 368 巻 (6474 号) : 856 ~ 859 頁; Lonberg, N. (1994 年) Handbook of Experimental Pharmacology 113 巻 : 49 ~ 101 頁; Lonberg, N. および Huszar, D. (1995 年) Intern. Rev. Immunol. 13 巻 : 65 ~ 93 頁、および Harding, F. および Lonberg, N. (1995 年) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764 巻 : 536 ~ 546 頁を参照)。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、例えばマウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系由来の CDR 配列がヒトフレームワーク配列にグラフト化された抗体 (すなわちヒト化抗体) を含まない。

【0065】

「異種抗体」は、本明細書で使用される場合、このような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物からならない生物に見出されるアミノ酸配列またはそれに対応するコード化核酸配列を有する抗体であって、一般的に、トランスジェニック非ヒト動物の生物以外の種由来のものを指す。

【0066】

「中和抗体」は、本明細書で使用される場合、形成されたウイルス粒子の破壊もしくはウイルス粒子のフォーマット化の阻害、またはウイルス粒子による哺乳動物細胞への結合もしくは感染の予防が可能な抗体、例えば二重特異性抗体を指す。

【0067】

本明細書で使用される場合、「診断抗体」または「検出抗体 (detection antibody)」または「検出抗体 (detecting antibody)」は、試料中の抗原性標的の存在を検出することが可能な抗体、例えば二重特異性抗体を指す。当業者であれば認識するであろうが、このような診断抗体は、好ましくは、それらの抗原性標的に高い特異性を有する。

【0068】

用語「ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化抗体」は、少なくとも 1 つのヒト化免疫グロブリンまたは抗体鎖 (すなわち、少なくとも 1 つのヒト化軽鎖または重鎖) を含む免

疫グロブリンまたは抗体を指す。用語「ヒト化免疫グロブリン鎖」または「ヒト化抗体鎖」（すなわち、「ヒト化免疫グロブリン軽鎖」または「ヒト化免疫グロブリン重鎖」）は、実質的にヒト免疫グロブリンまたは抗体由来の可変フレームワーク領域、および実質的に非ヒト免疫グロブリンまたは抗体由来の相補性決定領域（CDR）（例えば、少なくとも1つのCDR、好ましくは2つのCDR、より好ましくは3つのCDR）を含む可変領域を有し、さらに、定常領域（例えば、軽鎖の場合、少なくとも1つの定常領域またはその一部分、および重鎖の場合、好ましくは3つの定常領域）を含む、免疫グロブリンまたは抗体鎖（すなわち、軽鎖または重鎖それぞれ）を指す。用語「ヒト化可変領域」（例えば、「ヒト化軽鎖可変領域」または「ヒト化重鎖可変領域」）は、実質的にヒト免疫グロブリンまたは抗体由来の可変フレームワーク領域、および実質的に非ヒト免疫グロブリンまたは抗体由来の相補性決定領域（CDR）を含む可変領域を指す。

【0069】

成句「実質的にヒト免疫グロブリンまたは抗体由来」または「実質的にヒト」は、比較目的でヒト免疫グロブリンまたは抗体のアミノ酸配列と整列させた場合、その領域が、ヒトフレームワークまたは定常領域配列と、少なくとも80～90%、好ましくは少なくとも90～95%、より好ましくは少なくとも95～99%の同一性（すなわち、局所的な配列同一性）を共有しており、例えば保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖細胞系の置換、復帰変異などが許容されることを意味する。保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖細胞系の置換、復帰変異などの導入は、ヒト化抗体または鎖の「最適化」と称されることが多い。成句「実質的に非ヒト免疫グロブリンまたは抗体由来」または「実質的に非ヒト」は、非ヒト生物、例えば非ヒト哺乳動物の免疫グロブリンまたは抗体配列と、少なくとも80～95%、好ましくは少なくとも90～95%、より好ましくは、96%、97%、98%、または99%同一な免疫グロブリンまたは抗体配列を有することを意味する。

【0070】

好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なっている。アミノ酸置換を保存的または非保存的として分類する目的で、アミノ酸は、以下のように群化される：群I（疎水性側鎖）：leu、met、ala、val、leu、ile；群II（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；群III（酸性側鎖）：asp、glu；群IV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys、arg；群V（鎖の配向に影響を与える残基）：gly、pro；および群VI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。保存的置換は、同じクラスのアミノ酸同士での置換を含む。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのメンバーで交換することを構成する。

【0071】

変異（例えば、復帰変異）は、前記鎖を含むインタクトな免疫グロブリンまたは抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性に、前記変異を欠く等価な鎖を含む抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性と比べて少なくとも1桁の規模で影響を与える（例えばそれを減少させる）場合、重鎖または軽鎖の抗原結合を誘導する能力に実質的に影響を与えないと言われる。変異は、前記鎖を含むインタクトな免疫グロブリンまたは抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性に、前記変異を欠く等価な鎖を含む抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性の2倍、3倍、または4倍でしか影響を与えない（例えば、それを減少させない）場合、「鎖の抗原結合を誘導する能力に実質的に影響を与えない（例えば、それを減少させない）」。

【0072】

ある特定の実施形態において、ヒト化免疫グロブリンまたは抗体は、対応する非ヒト化抗体の親和性の3倍、4倍、または5倍以内の親和性で抗原に結合する。例えば、非ヒト化抗体が 10^9 M^{-1} の結合親和性を有する場合、ヒト化抗体は、少なくとも $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ または 10^9 M^{-1} の結合親和性を有する。免疫グロブリンまたは抗体鎖の結合特性を説明する場合、その鎖は、その「抗原結合を誘導する」能力に基

づき説明することができる。鎖が、インタクトな免疫グロブリンまたは抗体（またはそれらの抗原結合性断片）に特異的な結合特性または結合親和性を付与する場合、その鎖は「抗原結合を誘導する」と言われる。変異（例えば、復帰変異）は、前記鎖を含むインタクトな免疫グロブリンまたは抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性に、前記変異を欠く等価な鎖を含む抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性と比較して少なくとも1桁の規模で影響を与える（例えばそれを減少させる）場合、重鎖または軽鎖の抗原結合を誘導する能力に実質的に影響を与えと言われる。変異は、前記鎖を含むインタクトな免疫グロブリンまたは抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性に、前記変異を欠く等価な鎖を含む抗体（またはそれらの抗原結合性断片）の結合親和性の2倍、3倍、または4倍でしか影響を与えない（例えば、それを減少させない）場合、「鎖の抗原結合を誘導する能力に実質的に影響を与えない（例えば、それを減少させない）」。

【0073】

用語「キメラ免疫グロブリン」または抗体は、可変領域が第1の種由来であり、定常領域が第2の種由来である免疫グロブリンまたは抗体を指す。キメラ免疫グロブリンまたは抗体は、例えば遺伝子工学によって、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構築することができる。用語「ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化抗体」は、以下で定義されるようなキメラ免疫グロブリンまたは抗体を包含することを意図していない。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体は、それらの構築においてキメラであるが（すなわち、1つより多くの種のタンパク質に由来する領域を含む）、それらは、本明細書において定義されるようなキメラ免疫グロブリンまたは抗体中に見出されない追加の特色（すなわち、ドナーCDR残基およびアクセプターフレームワーク残基を含む可変領域）を含む。

【0074】

「単離された抗体」は、本明細書で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される。単離された抗体は、典型的には、他の細胞性物質および/または化学物質を実質的に含まない。

【0075】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、隣接するアミノ酸またはタンパク質の3次フォールディングによって並列した隣接していないアミノ酸の両方から形成することができる。隣接するアミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒に曝露されたときに保持されるが、3次フォールディングによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理で失われる。エピトープは、典型的には、特有の空間的なコンフォメーションで、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸を含む。エピトープが所与の抗体と結合することを決定する方法（すなわち、エピトープマッピング）は当該分野において周知であり、このような方法としては、例えば、免疫プロッティングおよび免疫沈降アッセイが挙げられる。エピトープの空間的なコンフォメーションを決定する方法としては、当該分野における技術および本明細書に記載される技術、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴が挙げられる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、66巻、G. E. Morris編（1996年）を参照）。

【0076】

同じエピトープを認識する抗体は、一方の抗体が他方の抗体の標的抗原への結合をブロックする能力を示す簡単なイムノアッセイ、すなわち競合結合アッセイで同定することができる。競合結合は、試験中の免疫グロブリンが参照抗体の共通の抗原への特異的な結合を阻害するアッセイで決定される。多数のタイプの競合結合アッセイが公知であり、例えば：固相の直接的または間接的なラジオイムノアッセイ（RIA）、固相の直接的または間接的な酵素免疫検査法（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahlら、Methods in Enzymology 9巻：242号（1983年）を参照）；固

相の直接的なバイオチン - アビジン E I A (Kirkland ら、J. Immunol. 137 巻: 3614 号 (1986 年) を参照) ; 固相の直接的な標識アッセイ、固相の直接的な標識サンドイッチアッセイ (Harlow および Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press (1988 年) を参照) ; I - 125 標識を使用した固相の直接的な標識 R I A (Morel ら、Mol. Immunol. 25 巻 (1 号) : 7 頁 (1988 年) を参照) ; 固相の直接的なバイオチン - アビジン E I A (Cheung ら、Virology 176 巻: 546 号 (1990 年)) ; および直接的な標識 R I A (Moldenhauer ら、Scand. J. Immunol. 32 巻: 77 号 (1990 年)) がある。典型的には、このようなアッセイは、これらのいずれか、すなわち非標識の試験免疫グロブリンおよび標識された参照免疫グロブリンのいずれかを有する固体表面または細胞に結合した精製された抗原の使用を含む。競合阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することによって測定される。通常、試験免疫グロブリンは、過量で存在する。通常、競合抗体が過量で存在する場合、参照抗体の共通の抗原への特異的な結合を、少なくとも 50 ~ 55 %、55 ~ 60 %、60 ~ 65 %、65 ~ 70 %、70 ~ 75 % またはそれよりも高く阻害する。

【0077】

用語「エピトープマッピング」は、抗体 - 抗原認識に関する分子決定基を同定するプロセスを指す。多数のエピトープマッピングの方法が当該分野において公知であり、例えば X 線分析、プロテアーゼマッピング、水素 / 重水素交換質量分析 (HDX - MS)、2 D 核磁気共鳴、アラニンスキャニング、およびディープ変異スキャニング (deep mutational scanning) などがある。

【0078】

「結合親和性」は、一般的に、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) との間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別段示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー (例えば、抗体および抗原) 間の 1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般的に、解離定数 (K_d) によって表すことができる。例えば、 K_d は、約 200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nM であってもよいし、またはそれよりも強くてもよい。親和性は、本明細書に記載される方法などの当該分野において公知の一般的な方法によって測定することができる。低い親和性の抗体は、一般的に、抗原にゆっくり結合し、容易に解離する傾向があるが、それに対して高い親和性の抗体は、一般的に、抗原により速く結合し、より長く結合した状態のままである傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当該分野において公知であり、それらのいずれも、本発明の目的のために使用することができる。

【0079】

用語「特異的な結合」、「選択的な結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」は、本明細書で使用される場合、既定の抗原上のエピトープへの抗体結合を指す。典型的には、抗体は、分析物として所望の抗原およびリガンドとして抗体を使用した B I A C O R E 2000 機器での表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術によって決定した場合、およそ 10^{-7} M 未満、例えばおよそ 10^{-8} M、 10^{-9} M もしくは 10^{-10} M 未満の、またはさらにそれよりも低い平衡解離定数 (K_D) で既定の抗原に結合し、既定の抗原または高い関連性を有する抗原以外の非特異的な抗原 (例えば、B S A、カゼイン) への結合に関するその親和性より少なくとも 2 倍大きい親和性で既定の抗原に結合する。成句「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」は、本明細書において用語「抗原に特異的に結合する抗体」と交換可能に使用される。

【0080】

用語「 K_D 」は、本明細書で使用される場合、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離平衡定数を指すことが意図される。

【0081】

用語「kd」は、本明細書で使用される場合、抗体／抗原複合体からの抗体の解離のオフレート(off rate)定数を指すことが意図される。

【0082】

用語「ka」は、本明細書で使用される場合、抗体と抗原との会合のオンレート(on rate)定数を指すことが意図される。

【0083】

「アイソタイプ」は、本明細書で使用される場合、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)を指す。一実施形態において、本発明のヒトモノクローナル抗体は、IgG1アイソタイプのものである。ある特定の実施形態において、ヒトIgG1は、配列番号1に記載の重鎖定常ドメイン配列および配列番号2に記載の軽鎖定常ドメイン配列を有する。

【0084】

用語「核酸分子」は、本明細書で使用される場合、DNA分子およびRNA分子を含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよく、例えば、本発明の二重特異性抗体の重鎖および軽鎖をコードする一本鎖mRNAまたは二本鎖DNAであってもよい。

【0085】

本発明はまた、配列表8に記載の配列の「保存的配列改変」、すなわちヌクレオチドおよびアミノ酸配列の改変であって、そのヌクレオチド配列によってコードされた、またはそのアミノ酸配列を含有する抗体の抗原への結合を無効にしない改変も包含する。このような保存的配列改変は、保存的なヌクレオチドおよびアミノ酸の置換に加えて、ヌクレオチドおよびアミノ酸の付加および欠失も含む。例えば、改変は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発などの当該分野において公知の標準的な技術によって配列表に記載の配列に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換を含む。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。したがって、二重特異性抗体中の予測された非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えられている。抗原結合をなくさないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該分野において周知である(例えば、Brummellら、Biochem. 32巻: 1180~1187頁(1993年); Kobayashiら、Protein Eng. 12巻(10号): 879~884頁(1999年); およびBurksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻: 412~417頁(1997年)を参照)。

【0086】

核酸の場合、用語「実質的な相同性」は、2つの核酸、またはそれらの指定された配列が、最適に整列させて比較した場合、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を含んで、ヌクレオチドの少なくとも約80%、一般的には、ヌクレオチドの少なくとも約90%から95%、より好ましくは少なくとも約98%から99.5%同一であることを示す。代替として、セグメントが、選択的なハイブリダイゼーション条件下で鎖の相補物にハイブリダイズする場合、実質的な相同性が存在する。

【0087】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入

する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列に共通する同一な位置の数の関数（すなわち、相同性% = 同一な位置の数 / 位置の合計数 × 100）である。2つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、以下の非限定的な例に記載されたような数学的なアルゴリズムを使用して達成することができる。

【0088】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWS gap dna . CMPマトリクス、ならびに40、50、60、70、または80のギャップウェイト（gap weight）および1、2、3、4、5、または6の長さウェイト（length weight）を使用するGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム（<http://www.gcg.com>で入手可能）を使用して決定することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、PAM120重量残基表（weight residue table）、12のギャップ長さペナルティー（gap length penalty）および4のギャップペナルティー（gap penalty）を使用するALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた、E. MeyersおよびW. Miller（CABIOS、4巻：11～17頁（1989年））のアルゴリズムを使用して決定することもできる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用するGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム（<http://www.gcg.com>で入手可能）に組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol.（48巻）：444～453頁（1970年））のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0089】

本発明の核酸およびタンパク質配列はさらに、例えば関連配列を同定するために、公開データベースに対して検索を実行するための「クエリー配列」としても使用することができる。このような検索は、Altschulら（1990年）J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実行することができる。BLASTのヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長（word length） = 12を用いて実行することができる。BLASTのタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて実行することができる。比較目的でギャップ有りアラインメントを得るために、Altschulら（1997年）Nucleic Acids Res. 25巻（17号）：3389～3402頁に記載されたようにしてギャップ有りBLASTを利用することができる。BLASTおよびギャップ有りBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

【0090】

核酸は、全細胞中に、細胞溶解産物中に、または一部精製したまたは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動などの標準的な技術、および当該分野において周知の他の技術によって、他の細胞性構成要素または他の汚染物質、例えば他の細胞核酸またはタンパク質から精製されている場合、「単離されている」か、または「実質的に純粋にされている」。F. Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing and Wiley Interscience、New York（1987年）を参照されたい。

【0091】

アミノ酸配列が示される場合、当業者であれば、それをコードするヌクレオチド配列に

、アミノ酸配列を変更することなく遺伝子コードの重複を考慮して保存的置換を作製することができる。cDNA、ゲノムまたはそれらの混合物のいずれかからの核酸組成物は、天然配列（改変された制限部位などを除く）の状態であることが多いが、遺伝子配列を提供するための標準的な技術に従って変異させることができる。コード配列の場合、これらの変異は、所望によりアミノ酸配列に影響を与えることができる。特に、天然のV、D、J、定常、スイッチの配列および本明細書に記載された他のこのような配列に実質的に相同であるかまたはそれらに由来するDNA配列が予期される（この場合、「由来」は、配列が同一であるかまたは別の配列から改変されていることを示す）。

【0092】

用語「ペプチド」は、本明細書で使用される場合、通常、既定の配列を有するアミノ酸残基の鎖と定義される。ペプチドという用語は、本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」と交換可能である。本発明の文脈において、用語「ペプチド」は、改変されたまたは改変されていないペプチド結合によって連結された少なくとも2つのアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質と定義される。用語「ペプチド」は、オリゴペプチドもしくはオリゴマーなどの短鎖分子、またはタンパク質などの長鎖分子を指す。本発明に係るペプチドは、改変されたアミノ酸を含んでいてもよい。したがって、本発明のペプチドはまた、転写後改変などの天然のプロセス、または化学的プロセスによって改変されていてもよい。これらの改変の一部の例は、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンとの共有結合、ヘムとの共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体との共有結合、改変されたまたは改変されていない炭水化物成分への共有結合、脂質または脂質誘導体との結合、ホスファチジルイノシトール（phosphatidylinositol）との共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システイン分子形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、水酸化、ヨウ素化、メチル化、酸化、リン酸化、ラセミ化、水酸化などである。したがって、ペプチドの免疫原性をなくす作用を有さないあらゆるペプチドの改変が、本発明の範囲内に包含される。

【0093】

本明細書に記載されるペプチドの個々の残基は、ペプチド結合またはペプチド結合模倣体（peptide bond mimetic）によってペプチド中に組み込むことができる。ペプチド結合模倣体としては、当業者に周知のペプチド骨格の改変が挙げられる。このような改変は、アミド窒素、 α -炭素、アミドカルボニルの改変、アミド結合、伸長、欠失または骨格の架橋の完全な置き換えを含む。一般的に、Spatola、Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins、第VII巻（Weinstein編、1983年）を参照されたい。数種のペプチド骨格の改変が公知であり、これらとしては、 $[CH_2S]$ 、 $[CH_2NH]$ 、 $[CSNH_2]$ 、 $[NHCO]$ 、 $[COCH_2]$ および $[(E) \text{または} (Z) CH=CH]$ が挙げられる。上記で使用される学術名は、上記のSpatolaによって示唆されているものに従う。この文脈において、 $[CH_2S]$ は、アミド結合の非存在を示す。アミド基を置き換える構造は、括弧内に特定される。

【0094】

アミノ酸の模倣体が、ペプチド中に組み込まれていてもよい。「アミノ酸の模倣体」は、本明細書で使用される場合、本発明のペプチド中のアミノ酸の代替物としてコンフォメーション的および機能的に役立つ天然に存在するアミノ酸以外の成分である。このような成分は、ペプチドの抗体に結合する能力に干渉しない場合、アミノ酸残基の代替物として役立つ。アミノ酸の模倣体としては、非タンパク質アミノ酸、例えば、 β -アラミノ酸、 γ -アラミノ酸、 δ -アラミノ酸、 ϵ -アラミノ酸（例えばピペリジン-4-カルボン酸など）、加えてL- α -アミノ酸の多くの誘導体などを挙げることができる。多数の好適なアミノ酸の模倣体が当業者に公知であり、そのようなものとしては、シクロヘキシルアラニン、3-シクロヘキシルプロピオン酸、L-アダマンチルアラニン、アダマンチル酢酸などが挙げられる。加えて、D-アミノ酸は、模倣体とみなすことができる。本発明のペプチドに好適

なペプチド模倣体は、MorganおよびGainor(1989年)Ann. Repts. Med. Chem. 24巻:243~252頁で論じられている。

【0095】

用語「ベクター」は、本明細書で使用される場合、連結された別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指すことが意図される。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントをライゲーションさせることができる環状の二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、この場合、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲーションすることができる。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律複製が可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合されていてもよく、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書では、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と称される。一般的に、組換えDNA技術において有用性を有する発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であることから、交換可能に使用することができる。しかしながら、本発明は、このような発現ベクターの他の形態、例えば等価な機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損型レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス)などを含むことが意図される。

【0096】

用語「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)は、本明細書で使用される場合、組換え発現ベクターが導入された細胞を指すことが意図される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなくこのような細胞の子孫も指すことが意図されることが理解されるものとする。後の世代で変異または環境の影響のいずれかによるある特定の改変が起こる可能性があることから、このような子孫は、実際には親細胞と同一ではない可能性があるが、それでもなお本明細書で使用される用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0097】

用語「がん」および「がん性」は、典型的には無秩序な細胞成長/増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すかまたは記載するものである。この定義には、良性のがんと悪性のがんが含まれる。がんの例としては、これらに限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このようながんのより特定の例としては、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜のがん、肝細胞がん、消化器がんを含む胃がん(gastric cancer)または胃がん(stomach cancer)、膵臓がん、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸がん(cervical cancer)、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝癌、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん(例えば、腎細胞癌)、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、および様々な種類の頭頸部がんが挙げられる。「早期がん」は、侵襲性または転移性ではないか、またはステージ0、I、またはIIのがんと分類されるがんを意味する。用語「前がん性」は、典型的にはがんの前に生じるかまたはがんに発展する状態または成長を指す。「非転移性」は、良性のがん、または原発部位に留まり、リンパもしくは血管系または原発部位以外の組織に浸透していないがんを意味する。一般的に、非転移性がんは、ステージ0、I、またはIIのがん、場合によってはステージIIIがんであるあらゆるがんである。

【0098】

本明細書における「アレルギー性または炎症性障害」は、個体の免疫系の過剰活性化に起因する疾患または障害である。例示的なアレルギー性または炎症性障害としては、これらに限定されないが、喘息、乾癬、関節リウマチ、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、全身性ループス、エリテマトーデス、湿疹、臓器移植、加齢性筋肉変性、クローン病、潰瘍

性大腸炎、好酸球性食道炎、および炎症に関連する自己免疫疾患が挙げられる。

【0099】

本明細書における「自己免疫疾患」は、個体自身の組織または共分離物 (co-segregate) から生じてそれらに向けられる疾患もしくは障害、またはそれらの症状発現もしくは結果生じる状態である。自己免疫疾患または障害の例としては、これらに限定されないが、関節炎 (関節リウマチ、例えば、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変性性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎関節炎 (vertebral arthritis)、および若年発症性関節リウマチ、変形性関節症、進行性慢性関節炎 (arthritis chronica progrediente)、変形性関節炎 (arthritis deformans)、原発性慢性多発関節炎 (polyarthritis chronica primaria)、反応性関節炎、および強直性脊椎炎など)、炎症性過剰増殖性皮膚疾患、乾癬、例えば尋常性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬、および爪の乾癬など、皮膚炎、例えば接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、疱疹状皮膚炎、およびアトピー性皮膚炎など、x連鎖高IgM症候群、じんましん、例えば慢性アレルギー性じんましんおよび慢性自己免疫じんましんを含む慢性特発性じんましんなど、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症 (全身性強皮症など)、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症 (MS)、例えば脊椎視神経型MS (spino-optical MS)、一次性進行型MS (PPMS)、および再発寛解型MS (RRMS) など、全身性進行性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、多発性硬化症 (sclerosis disseminata)、および失調性硬化症など、炎症性腸疾患 (IBD) (例えば、クローン病、自己免疫媒介性の胃腸疾患、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、潰瘍性結腸炎、顕微鏡的大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、ポリープ性大腸炎 (colitis polyposa)、壊死性腸炎、および経壁性結腸炎、ならびに自己免疫炎症性腸疾患など)、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎)、呼吸窮迫症候群、例えば成人または急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) など、髄膜炎、ブドウ膜の全てまたは一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液障害、リウマチ様脊椎炎、突発性難聴、IgE媒介疾患、例えばアナフィラキシーならびにアレルギー性およびアトピー性鼻炎など、脳炎、例えばラスマッセン脳炎ならびに辺縁系領域および/または脳幹脳炎など、ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎 (phacoantigenic uveitis)、後部ブドウ膜炎、または自己免疫性ブドウ膜炎など、ネフローゼ症候群を有するおよび有さない糸球体腎炎 (GN)、例えば慢性または急性糸球体腎炎など、例えば原発性GN、免疫媒介性GN、膜性GN (膜性腎症)、特発性膜性GNまたは特発性膜性腎症、膜または膜性増殖性GN (MPGN)、例えばI型およびII型など、ならびに急速進行性GNなど、アレルギー性状態、アレルギー反応、湿疹、例えばアレルギー性またはアトピー性湿疹など、喘息、例えば気管支喘息 (asthma bronchiale)、気管支喘息 (bronchial asthma)、および自己免疫喘息など、T細胞の浸潤および慢性炎症性反応を伴う状態、慢性的な炎症性肺疾患、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) または全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythemato des)、例えば皮膚SLE、亜急性皮膚エリテマトーデス、新生児ループス症候群 (NLE)、播種性紅斑性狼瘡 (lupus erythematosus disseminatus)、ループス (例えば腎炎、脳炎、小児、非腎性、腎外、円板状、脱毛症など) など、若年発症型 (I型) 糖尿病、例えば小児インスリン依存性糖尿病 (IDDM)、成人発症型糖尿病 (II型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性尿崩症など、サイトカインおよびTリンパ球が媒介する急性および遅延型過敏症に関連する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばリンパ腫様肉芽腫症、ヴェグナー肉芽腫症など、顆粒球減少症、血管炎 (vasculitides)、例えば血管炎など (例えば、大型血管炎 (例え

ばリウマチ性多発性筋痛および巨細胞（高安）動脈炎など）、中型血管炎（例えば川崎病および結節性多発性動脈炎など）、顕微鏡的多発動脈炎、CNS血管炎、壊死性、皮膚または過敏性血管炎、全身性壊死性血管炎、およびANCA関連血管炎、例えばチャージ-ストラウス血管炎または症候群（CSS）など）、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性再生不良性貧血、クームズ陽性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、溶血性貧血または免疫性溶血性貧血、例えば自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、悪性貧血（貧血悪性熱（anemia perniciosa））、アジソン病、赤芽球ろうまたは無形成症（PRCA）、第VII因子欠乏症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球遊出を伴う疾患、CNS炎症性障害、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷または出血に続発するものなど、抗原-抗体複合体が媒介する疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット（Behcet）またはベーチェット（Behcet）病、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、ステーブンス-ジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡および皮膚類天疱瘡など、天疱瘡（例えば尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜性天疱瘡（pemphigus mucosus）、すなわち膜性類天疱瘡（membrane pemphigoid）、および紅斑性天疱瘡など）、自己免疫性多発性内分泌腺症、ライター病または症候群、免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、視神経脊髄炎、多発性ニューロパチー、慢性ニューロパチー、例えばIgM多発性ニューロパチーまたはIgM媒介性ニューロパチーなど、血小板減少症（例えば心筋梗塞患者が発症させるもの）、例えば血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）および自己免疫または免疫媒介性血小板減少症、例えば特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、例えば慢性または急性ITPなど、精巣および卵巣の自己免疫疾患、例えば自己免疫性精巣炎および卵巣炎など、原発性甲状腺機能低下症、上皮小体機能低下症、自己免疫性内分泌疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）、または亜急性甲状腺炎など、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、多腺性症候群、例えば多腺性自己免疫症候群（または多腺性内分泌障害症候群）など、腫瘍随伴症候群、例えば神経系腫瘍随伴症候群、例えばランバート-イートン筋無力症症候群またはイートン-ランバート症候群、スティッフマンまたは全身硬直症候群など、脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎（allergic encephalomyelitis）またはアレルギー性脳脊髄炎（encephalomyelitis allergic）および実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）など、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳変性、神経性筋強直症、オブソクロヌスまたはオブソクロヌス-ミオクロヌス症候群（OMS）、および感覚ニューロパチーなど、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ性間質性肺炎、NSIPに対する閉塞性細気管支炎（非移植性）、ギランバレー症候群、ベルジェ病（IgA腎症）、特発性IgA腎症、線状IgA皮膚疾患、原発性胆汁性肝硬変症、肺線維症、自己免疫性腸疾患症候群、セリアック病（Celiac disease）、小児脂肪便症（Celiac disease）、セリアックスブルー（グルテン腸症）、難治性スブルー、特発性スブルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルーゲーリック病）、冠動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例えば自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性難聴など、オブソクロヌス-ミオクロヌス症候群（OMS）、多発性軟骨炎、例えば難治性または再発性多発性軟骨炎など、肺胞タンパク症、アミロイド症、強膜炎、非がん性リンパ球増加症、原発性リンパ球増加症、例えば単クローン性B細胞リンパ球増加症（例えば、良性単クローン性免疫グロブリン血症および意味未確定の単クローン性高ガンマグロブリン血症、MGUS）など、末梢神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例えばてんかんなど、片頭痛、不整脈、筋障害、聴覚消失症、失明、周期性麻痺、およびCNSのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、網脈絡膜炎、自己免疫性肝臓障害、線維筋痛症、多重内分泌不全（multiple endocrine failure）、シュミット

症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期認知症、脱髄疾患、例えば自己免疫脱髄疾患など、糖尿病性腎症、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症、および毛細血管拡張症）、男性および女性の自己免疫性不妊症、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、反復流産、農夫肺、多形性紅斑、心術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎および線維化肺炎など、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キバノソミアシス（*kypanosomiasis*）、住血吸虫症、回虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑（*erythema elevatum et diutinum*）、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎（*eosinophilic fasciitis*）、シュルマン症候群、フェルティ症候群、フィリア症（*flariasis*）、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異虹彩色性毛様体炎（*heterochronic cyclitis*）、虹彩毛様体炎、またはフックス毛様体炎（*Fuch's cyclitis*）など、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン-バーウイルス感染、流行性耳下腺炎、エバンス症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞蹈病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎（*thromboangitis obliterans*）、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害（*endocrine ophthalmopathy*）、慢性過敏性肺臓炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎炎症候群、微小変化腎症、良性家族性および虚血再灌流傷害、網膜自己免疫、関節炎、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルミオジェネース（*aspermiogenesis*）、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎（*endophthalmia phacoanaphylactica*）、アレルギー性腸炎（*enteritis allergica*）、らい性結節性紅斑、特発性顔面麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ熱（*febris rheumatica*）、ハンマン-リッチ病、感覚神経性難聴（*sensoneural hearing loss*）、血色素尿症発作（*haemoglobinuria paroxysmatica*）、性腺機能低下症、限局性回腸炎（*ileitis regionalis*）、白血球減少症、伝染性単核症（*mononucleosis infectiosa*）、横断性脊髄炎（*transverse myelitis*）、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎（*ophthalmia sympathetica*）、肉芽腫性精巣炎（*orchitis granulomatosa*）、脾臓炎、急性多発性神経根炎（*polyradiculitis acuta*）、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎（*Quervain's thyroiditis*）、後天性脾臓萎縮（*acquired splenic atrophy*）、抗精子抗体による不妊症、非悪性胸腺腫（*non-malignant thymoma*）、白斑、SCIDおよびエプスタイン-バーウイルス関連の疾患、後天性免疫不全症候群（AIDS）、寄生虫病、例えばリーシュマニアなど、トキシックショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う状態、白血球接着不全症、サイトカインおよびTリンパ球が媒介する急性および遅延型過敏症に関連する免疫応答、白血球遊出を伴う疾患、多臓器損傷症候群、抗原-抗体複合体が媒介する疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫性多発性内分泌腺症、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ病、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、インスリン炎、多内分泌腺不全（*polyendocrine failure*）、末梢神経障害、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性上皮小体機能低下症（AOIH）、完全脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（EBA）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨、前頭、上顎、または蝶形骨洞炎

、好酸球関連の障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増多筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増加症、気管支肺炎性アスペルギルス症 (bronchopneumonic aspergillosis)、アスペルギルス腫、または好酸球を含有する肉芽腫など、アナフィラキシー、血清反応陰性脊椎関節炎、多内分泌腺自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ブルトン症候群、乳児一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット-アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調、膠原病に関連する自己免疫障害、リウマチ、神経疾患、虚血再灌流障害、血圧応答の低減、血管機能障害、血管拡張 (antgiectasis)、組織傷害、心血管虚血、痛覚過敏、脳虚血、および血管新生を伴う疾患、アレルギー性過敏性障害、糸球体腎炎 (glomerulonephritides)、再灌流傷害、心筋または他の組織の再灌流傷害、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性障害、眼および眼窩の炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、急性の重篤な炎症、慢性の難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈障害、動脈内膜過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、および子宮内膜症が挙げられる。

【0100】

用語「細胞傷害剤」は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害または妨害し、および/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体 (例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 Ra^{223} 、 P^{32} 、および Lu の放射性同位体)、化学療法剤、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン (adriamycin)、ピンカアルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤、酵素およびその断片、例えば核酸分解酵素、抗生物質、および細菌、真菌、植物または動物由来の小分子毒素または酵素的に活性な毒素などの毒素、例えばそれらの断片および/またはバリエーションなど、ならびに本明細書で開示された様々な抗腫瘍剤、抗がん剤、および化学療法剤を含むことが意図される。他の細胞傷害剤が本明細書に記載される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0101】

「化学療法剤」は、がんの処置において有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテバおよびCYTOXAN (登録商標) シクロホスファミド (cyclophosphamide) など; スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびビボスルファンなど; アジリジン、例えばベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、およびウレドーパ (uredopa) など; エチレンイミンおよびメチルメラミン (methylamelamine)、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド (triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホルアミド (triethylenethiophosphoramidate) およびトリメチロールメラミン (trimethylolomelamine) など; アセトゲニン (特にプラタシンおよびプラタシノン); デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、MARINOL (登録商標)); ベータ-ラパコン; ラパコール; コルヒチン; ベツリン酸; カンプトテシン (例えば合成類似体であるトポテカン (HYCAMTIN (登録商標))、CPT-11 (イリノテカン、CAMPTOSAR (登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン (scopolactin)、および9-アミノカンプトテシンなど); プリオスタチン; カリスタチン; CC-1065 (例えばそのアドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成類似体など); ポドフィロトキシン; ポドフィリン酸; テニポシド; クリプトフィシン (特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8); ドラスタチン; デュオカルマイシン (例えば合成類似体であるKW-2189およびCB1-TM1など); エリュテロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン; スポンギスタチン; ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシ

ル、クロルナファジン、クロロホスファミド (chlorophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノボエンビキン (novembichin)、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソウレア (nitrosourea)、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン (ranimnustine) など；抗生物質、例えばエンジン抗生物質など（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマ1（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33巻：183～186頁（1994年）を参照）；ダイネマイシン (dynemicin)、例えばダイネマイシンAなど；エスペラマイシン；加えてネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質である抗生物質のエンジン発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン (anthramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カルピシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルチノフィリン、クロモマイシン (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキシソルピシン（例えばモルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンなど）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなど；代謝拮抗物質、例えばメトトレキセートおよび5 - フルオロウラシル (5 - FU) など；葉酸類似体、例えばデノブテリン、メトトレキセート、プテロブテリン、トリメトレキセートなど；プリン類似体、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprine)、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなど；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎剤 (anti - adrenal)、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補充剤、例えばフォリン酸 (frolinic acid) など；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ピサントレン；エダトレキセート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン (elfornithine)；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン (lonidainine)；メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシンなど；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール (mopidamol)；ニトラクリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン (losoxantrone)；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT - 2毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridin) Aおよびアングイジン (anguidine)）；ウレタン；ビンデシン (ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標）)；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド（「Ara - C」）；チオテバ；タキソイド、例えば、TAXOL（登録商標）パクリタキセル (Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、パクリタキセルのクレモフォル

(Cremophor) 非含有のアルブミンで操作されたナノ粒子製剤である ABRAXANE (商標) (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL)、および TAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); クロラムブシル (chlorambucil); ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標)); 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキセート; 白金類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチンなど; ビンブラスチン (VELBAN (登録商標)); 白金; エトポシド (VP-16); イフォスファミド; ミトキサントロン; ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)); オキサリプラチン; ロイコボリン (leucovorin); ビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)); ノバントロン; エダトレキセート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロネート; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO); レチノイド、例えばレチノイン酸など; カペシタビン (XELODA (登録商標)); 上記のもののいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体; 加えて上記のものの2つまたはそれよりも多くの組み合わせ、例えばシクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、およびブレドニゾロンの併用療法略語である CHOP、およびオキサリプラチン (ELOXATIN (商標)) と 5-FU およびロイコボリンとを併用した処置レジメンの略語である FOLFOX などが挙げられる。

【0102】

またこの定義には、がんの成長を促進する可能性があるホルモンの作用を、調節する、低減する、ブロックする、または阻害するように作用し、しばしば全身性または全身処置の形態である抗ホルモン剤も含まれる。これらは、ホルモンそれ自体であってもよい。例としては、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)、例えば、タモキシフェン (例えば NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンなど)、EVISta (登録商標) ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、および FARESTON (登録商標) トレミフェンなど; 抗プロゲステロン; エストロゲン受容体下方調節因子 (ERD); 卵巣を抑制するかまたは活動停止させるように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン (leutinizing hormone) 放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、例えば LUPRON (登録商標) および ELIGARD (登録商標) 酢酸ロイプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンおよびトリプトレリン (tripterelin) など; 他の抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミドおよびピカルタミドなど; ならびに副腎でのエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標) 酢酸メゲストロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、フォルメスタン (formestane)、ファドロゾール、RIVISOR (登録商標) ボロゾール、FEMARA (登録商標) レトロゾール、および ARIMIDEX (登録商標) アナストロゾールなどが挙げられる。加えて、化学療法剤のこのような定義は、ビスホスホネート、例えばクロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) または OSTAC (登録商標))、DIDROCAL (登録商標) エチドロネート、NE-58095、ZOMETHA (登録商標) ゴレドロン酸 / ゴレドロン酸塩、FOSAMAX (登録商標) アレンドロネート、AREDIA (登録商標) パミドロネート、SKELID (登録商標) チルドロネート、または ACTONEL (登録商標) リセドロネートなど; 加えてトキシサシタビン (1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体); アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-アルファ、Raf、H-Ras、および上皮成長因子受容体 (EGF-R) など; ワクチン、例えば THERATOPE (登録商標) ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、および VAXID (登録商標)

標) ワクチンなど; LURTOTECAN (登録商標) トポイソメラーゼ1阻害剤; ABARELIX (登録商標) r m R H; トシル酸ラパチニブ (E r b B - 2 および E G F R 二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤、GW572016としても公知); ならびに上記のものいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含む。

【0103】

「成長阻害薬剤」は、本明細書で使用される場合、in vitro または in vivo のいずれかで細胞の成長を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、成長阻害薬剤は、S期の細胞のパーセンテージを有意に低減するものであり得る。成長阻害薬剤の例としては、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)ブロックする薬剤、例えばG1停止およびM期停止を誘発する薬剤などが挙げられる。古典的なM期ブロック剤としては、ビンカ(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)、タキサン、およびトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エビルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンなどが挙げられる。またG1を停止する薬剤は、S期の停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、およびara-Cがある。さらなる情報は、Murakamiらによる、The Molecular Basis of Cancer、MendelsohnおよびIsrael編、第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogenesis, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia、1995年)、特に13頁に見出すことができる。タキサン(パクリタキセルおよびドセタキセル)は、いずれもイチイ属の木由来の抗がん薬である。ドセタキセル(TAXOTERE (登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer)は、ヨーロッパイチイ由来であり、パクリタキセル(TAXOL (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)の半合成類似体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、脱重合を防ぐことによって微小管を安定化させることで、細胞における有糸分裂の阻害をもたらす。

【0104】

「抗がん治療」は、本明細書で使用される場合、被験体におけるがんを低減または阻害する処置を指す。抗がん治療の例としては、細胞傷害性放射線治療に加えて、治療有効量の細胞傷害剤、化学療法剤、成長阻害薬剤、がんワクチン、血管形成阻害剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、コルチコステロイド、免疫抑制剤、制吐剤、抗体もしくは抗体断片、または鎮痛薬の被験体への投与が挙げられる。

【0105】

用語「プロドラッグ」は、本出願で使用される場合、腫瘍細胞に対する細胞傷害が親の薬物と比較して低く、酵素的に活性化されたりまたはより活性な親の形態に変換されたりすることが可能な医薬活性物質の前駆体または誘導体の形態を指す。例えば、Wilman、「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」、Biochemical Society Transactions、14巻、375~382頁、第615回ミーティング、Belfast (1986年)およびStellaら、「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」、Directed Drug Delivery、Borchardtら(編)、247~267頁、Humana Press (1985年)を参照されたい。プロドラッグとしては、これらに限定されないが、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、スルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ベータ-ラクタム含有プロドラッグ、任意選択で置換されていてもよいフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、または任意選択で置換されていてもよいフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグが挙げられ、これらは、より活性な細胞傷害性の遊離薬物に変換され得る。本発明で使用するためのプロドラッグの形態に誘導体化可能な細胞傷害性薬物の例としては、これら

に限定されないが、上述した化学療法剤が挙げられる。

【0106】

用語「サイトカイン」は、細胞間媒介物質として別の細胞に作用する1つの細胞集団によって放出されるタンパク質の一般名称である。このようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインのなかでも特に、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン（HGH）、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなど；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）など；上皮成長因子（EGF）；肝臓成長因子；線維芽細胞成長因子（FGF）；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-アルファおよびベータ；ミューラー管抑制因子；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；神経成長因子、例えばNGF-アルファなど；血小板成長因子；トランスフォーミング成長因子（TGF）、例えばTGF-アルファおよびTGF-ベータなど；インスリン様成長因子IおよびII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン、例えばインターフェロン-アルファ、ベータおよびガンマなど；コロニー刺激因子（CSF）、例えばマクロファージ-CSF（M-CSF）など；顆粒球マクロファージ-CSF（GM-CSF）；ならびに顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）、例えばIL-1、IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18など；腫瘍壊死因子、例えばTNF-アルファまたはTNF-ベータなど；ならびに他のポリペプチド因子、例えばLIFおよびkitリガンド（KL）などが挙げられる。サイトカインという用語は、本明細書で使用される場合、天然の供給源由来または組換え細胞培養由来のタンパク質、および天然配列のサイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0107】

「サイトカインアンタゴニスト」は、少なくとも1つのサイトカインの生物活性を、部分的にまたは完全に、ブロックする、阻害する、または中和する分子を意味する。例えば、サイトカインアンタゴニストは、サイトカインの発現および/または分泌を阻害することによって、またはサイトカインまたはサイトカイン受容体に結合することによってサイトカイン活性を阻害することができる。サイトカインアンタゴニストとしては、サイトカインまたはサイトカイン受容体に結合する、抗体、合成または天然配列のペプチド、イムノアドヘシン、および小分子アンタゴニストが挙げられる。サイトカインアンタゴニストは、任意選択で細胞傷害剤にコンジュゲートまたは融合されている。例示的なTNFアンタゴニストは、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））、インフリキシマブ（REMICADE（登録商標））、およびアダリムマブ（HUMIRA（商標））である。

【0108】

用語「免疫抑制剤」は、本明細書で使用される場合、処置される被験体の免疫系を抑制または遮蔽するように作用する物質を指す。これには、サイトカイン産生を抑制する物質、自己抗原発現を下方調節もしくは抑制する物質、またはMHC抗原を遮蔽する物質が含まれる。免疫抑制剤の例としては、2-アミノ-6-アリール-5-置換ピリミジン（米国特許第4,665,077号を参照）；ミコフェノール酸モフェチル、例えばCELLCEPT（登録商標）など；アザチオプリン（IMURAN（登録商標））、AZASAN（登録商標）/6-メルカプトプリン；プロモクリブチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド（米国特許第4,120,649号に記載されたようにMHC抗原を遮蔽する）；MHC抗原およびMHC断片のための抗イディオタイプ抗体；シクロスポリンA；コルチコステロイドおよびグルココルチコステロイドなどのステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、例えばPEDIAPRED（登録商標）（リン酸プレドニゾロンナトリウム）またはORAPRED（登録商標）（リン酸プレドニゾロンナトリウム経口溶液）、メチルプレドニゾロン、およびデキサメタゾンなど；メトトレキセート（経

口または皮下) (RHEUMATREX (登録商標)、TREXALL (商標)); ヒドロキシクロロキン (hydroxychloroquine) / クロロキン; スルファサラジン; レフルノミド; サイトカインまたはサイトカイン受容体アンタゴニスト、例えば抗インターフェロン- α 、 β 、または γ 抗体、抗腫瘍壊死因子- α 抗体 (インフリキシマブまたはアダリムマブ)、抗TNF α イムノアドヘシン (ENBREL (登録商標)、エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子- β 抗体、抗インターロイキン-2抗体および抗IL-2受容体抗体など; 抗LFA-1抗体、例えば抗CD11aおよび抗CD18抗体など; 抗L3T4抗体; 異種抗リンパ球グロブリン; ポリクローナルまたは汎T抗体、またはモノクローナル抗CD3または抗CD4/CD4 α 抗体; LFA-3結合ドメインを含有する可溶性ペプチド (WO90/08187); ストレプトキナーゼ; TGF- β ; ストレプトドルナーゼ; 宿主由来のRNAまたはDNA; FK506; RS-61443; デオキシスベルグアリン; ラパマイシン; T細胞受容体 (Cohenら、米国特許第5,114,721号); T細胞受容体断片 (Offnerら、Science 251巻: 430~432頁 (1991年); WO90/11294; laneway、Nature 341巻: 482頁 (1989年); およびWO91/01133); T細胞受容体抗体 (EP340,109)、例えばT10B9など; シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標)); ダブソン; ペニシラミン (CUPRIMINE (登録商標)); 血漿交換; または静脈内免疫グロブリン (IVIG) が挙げられる。これらは、単独で使用してもよいし、または互いに組み合わせて使用してもよく、特に、ステロイドと別の免疫抑制剤とを組み合わせて使用してもよいし、またはこのような組み合わせに続いてステロイドへの必要性を低減するために非ステロイド剤を含む維持用量を使用してもよい。

【0109】

「鎮痛薬」は、被験体における疼痛を阻害または抑制するように作用する薬物を指す。例示的な鎮痛薬としては、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)、例えばイブプロフェン (MOTRIN (登録商標))、ナプロキセン (NAPROSYN (登録商標))、アセチルサリチル酸、インドメタシン、スリンダク、およびトルメチン、ならびにそれらの塩および誘導体など、加えて、発生し得る刺すような疼痛を低減するのに使用される様々な他の薬物療法、例えば抗痙攣薬 (ガバペンチン、フェニトイン (phenytoin)、カルバマゼピン) または三環系抗うつ薬などが挙げられる。具体的な例としては、アセトアミノフェン、アスピリン、アミトリプチリン (ELAVIL (登録商標))、カルバマゼピン (TEGRETOL (登録商標))、フェニトイン (phenytoin) (DILANTIN (登録商標))、ガバペンチン (NEURONTIN (登録商標))、(E)-N-バニリル-8-メチル-6-ノネンアミド (noneamid) (CAPSAICIN (登録商標))、または神経ブロックが挙げられる。

【0110】

「コルチコステロイド」は、天然に存在するコルチコステロイドの作用を模倣するかまたは増強するステロイドの一般的な化学構造を有する数種の合成または天然に存在する物質のいずれか1つを指す。合成コルチコステロイドの例としては、プレドニゾン、プレドニゾロン (例えばメチルプレドニゾロンなど)、デキサメタゾン、トリラムシノロン、およびベタメタゾンが挙げられる。

【0111】

「がんワクチン」は、本明細書で使用される場合、被験体におけるがんに対する免疫応答を刺激する組成物である。がんワクチンは、典型的には、抗原に対する免疫応答をさらに刺激してブーストするための他の構成要素 (例えば、アジュバント) と共に、被験体にとって自己 (自己由来) または同種 (他者由来) であり得るがんに関連する材料または細胞 (抗原) の供給源からなる。がんワクチンは、被験体の免疫系を刺激して、1つまたは数種の特異的な抗原に対する抗体を産生させ、および/またはそのような抗原を有するがん細胞を攻撃するためのキラーT細胞を産生させることができる。

【0112】

用語「処置する」、「処置すること」、および「処置」は、本明細書で使用される場合

、本明細書に記載される治療または予防措置を指す。「処置」方法は、障害または再発性の障害を予防する、治癒する、遅延させる、その重症度を低減する、またはその1つまたは複数の症状を緩和するために、またはこのような処置の非存在下で予想される生存期間を超えて被験体の生存期間を延長するために、このような処置が必要な被験体への、例えば、特定の抗原に対する免疫応答の強化が必要な被験体、または最終的にこのような障害に罹る可能性がある被験体への、本発明のヒト抗体の投与を採用する。

【0113】

用語「有効用量」または「有効投薬量」は、所望の作用を達成するかまたは少なくとも部分的に達成するのに十分な量と定義される。用語「治療有効用量」は、すでに疾患に罹っている患者において疾患およびその合併症を治癒するかまたは少なくとも一部停止するのに十分な量と定義される。この使用に有効な量は、処置される障害の重症度および患者自身の免疫系の全身状態に依存する。

【0114】

用語「患者」は、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒトおよび他の哺乳動物被験体を含む。

【0115】

用語「被験体」は、本明細書で使用される場合、あらゆるヒトまたは非ヒト動物を含む。例えば、本発明の方法および組成物は、免疫障害を有する被験体を処置するのに使用することができる。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。

【0116】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、ある特定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、その後細胞傷害剤で標的細胞を殺滅することを可能にする細胞傷害性の形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装させ（arm）」、このような殺滅に必要不可欠である。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現し、それに対して単球は、FcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、RavetchおよびKinetic、Annu. Rev. Immunol. 9巻：457～92頁（1991年）の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、in vitroでのADCCアッセイ、例えば米国特許第5,500,362号または5,821,337号に記載されるアッセイなどを実行することができる。このようなアッセイにとって有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代替として、または加えて、目的の分子のADCC活性は、in vivoで、例えば動物モデル、例えばClynesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻：652～656頁（1998年）で開示されたモデルなどで評価することができる。

【0117】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体の存在下における標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体系の第1成分（C1q）がそれらの同源抗原に結合する抗体（適切なサブクラスのもの）に結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202巻：163号（1996年）に記載されたようなCDCアッセイを実行することができる。

【0118】

以下のサブセクションで、本発明の様々な態様をさらに詳細に説明する。

【0119】

定常領域の変異を有する二重特異性抗体

定常領域

二重特異性抗体は、第1の抗体の軽鎖および重鎖（LC'およびHC'）ならびに第2の抗体の軽鎖および重鎖（LC''およびHC''）を含有する。これらの4つの鎖の組み合わせは、誤対合の可能性をもたらす。図1は、これらの9つの誤対合および1つの所望の対合を例示する。所望の対合は、LC'とHC'との間、およびLC''とHC''との間でヘテロ二量体を形成する。実質的に均一なヘテロ二量体抗体の集団を生成するために、抗体のドメインは、ホモ二量体よりもヘテロ二量体を形成する強い傾向を有していなければならない。単一の宿主細胞中で重鎖および軽鎖の優先的な対合を引き起こして、重鎖および軽鎖の集合のヘテロ二量体化を制御するように、ヒトIgGの定常領域中の変異を設計した。鎖間の原子間ネットワークに対する様々なアミノ酸変異の影響を分析し、個々のノードおよび/またはエッジの損失または獲得を引き起こす原子間の接触の損失または獲得による原子間ネットワークの変化を同定した。野生型と比較して原子間の接触を保持または追加するアミノ酸置換を、好都合なネットワークを形成するものとして同定し、それに対して原子間の接触の損失をもたらすアミノ酸変異を、都合の悪いネットワークを形成するものとして同定した。

【0120】

したがって、本発明は、ヒトIgG定常ドメイン（CH1、CL、および/またはCH3領域）のいずれか1つまたは複数において1つまたは複数のアミノ酸置換を有する重鎖および軽鎖に関する。これらの置換は、好都合なネットワークの形成を容易にし、それによって、(i) HC'およびLC''ならびに(ii) HC''およびLC'と比較して、HC'およびLC'の優先的な対合、それと共に、(i) HC''およびLC'ならびに(ii) HC'およびLC''と比較して、HC''およびLC''の優先的な対合が生じる。ある特定の実施形態において、HC'におけるアミノ酸置換は、LC''との都合の悪い相互作用ではなく、LC'との好都合な相互作用をもたらす。ある特定の実施形態において、LC'におけるアミノ酸置換は、HC''との都合の悪い相互作用ではなく、HC'との好都合な相互作用をもたらす。ある特定の実施形態において、HC''におけるアミノ酸置換は、LC'との都合の悪い相互作用ではなく、LC''との好都合な相互作用をもたらす。ある特定の実施形態において、LC''におけるアミノ酸置換は、HC'との都合の悪い相互作用ではなく、HC''との好都合な相互作用をもたらす。

【0121】

本明細書に記載されるCH1/CL境界およびCH3定常領域の変異を有する二重特異性抗体は、第1の抗体由来の第1の重鎖および第1の軽鎖ならびに第2の抗体由来の第2の重鎖および第2の軽鎖を含む。第1の重鎖は、CH1'、CH2'、およびCH3'として示されるIgG重鎖定常ドメインを含み、それに対して第2の重鎖は、CH1''、CH2''、およびCH3''として示されるIgG重鎖定常ドメインを含む。ある特定の実施形態において、CH1'およびCH1''は、ヒトIgG1のCH1（配列番号3）である。ある特定の実施形態において、CH3'およびCH3''は、ヒトIgG1のCH3（配列番号4）である。二重特異性抗体は、CL'として示されるIgカッパ定常ドメインを含む第1の軽鎖、およびCL''として示されるIgカッパ定常ドメインを含む第2の軽鎖をさらに含む。ある特定の実施形態において、CL'およびCL''は、ヒトIgカッパCL（配列番号5）である。細胞中で本明細書に記載される重鎖および軽鎖が共発現される場合、それらは優先的に一緒に対合して、ヘテロ二量体を形成する。具体的には、CH1/CL境界およびCH3領域中の変異は、CH1'とCL'との対合；CH1''とCL''との対合；およびCH3'とCH3''との対合を優先させる。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される変異は、CH1'とCL''との二量体；CH1'とCH1''との二量体；CH1''とCL'との二量体；およびCL'とCL''との二量体の形成を優先させない。別段示されない限り、残基の番号付けは、Kabatsの番号付けの慣例に基づく。例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sec

tions)、第5版、Bethesda、MD:NIH 1巻:647~723頁(1991年);Kabatら、“Introduction” Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Dept of Health and Human Services、NIH、第5版、Bethesda、MD 1巻:xiii~xcvi頁(1991年)を参照されたい。

【0122】

CH1/CL境界の置換

本明細書に記載される構造ベースのアプローチの結果として、CH1/CL野生型の境界と比較して原子間の接触を優先させるヒトIgG1のCH1/CL境界内の特定のアミノ酸を同定した。このような接触は、好都合なネットワークを形成し、ヘテロ二量体の優先的な形成をもたらし、本明細書に記載されるFabおよび二重特異性抗体に組み込まれる。CH1中のこれらの残基としては、これらに限定されないが、L124、A125、P126、K129、A139、L140、L143、K145、H172、F174、P175、L178、S188、V190、K221、K228、およびC233が挙げられる。ある特定の実施形態において、CH1のヘテロ二量体形成を優先させる残基は、L124、L143、K145、H172および/またはS188である。本明細書に記載されるFabおよび二重特異性抗体は、これらのアミノ酸残基のいずれか1つまたは組み合わせにおいて1つまたは複数の置換を有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、以下の残基：L124、L143、K145、H172、およびS188のいずれか1つまたは組み合わせにおけるアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、CH1ドメイン中における以下の置換：L124V、L143A、L143D、K145D、H172D、およびS188Wの1つまたは複数を含む。

【0123】

ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、CH1'、CH1''、CL'、およびCL''領域を有し、CH1'ドメインは、残基L124およびL143にアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、アミノ酸置換は、L124VおよびL143Aである。ある特定の実施形態において、CH1'ドメインは、配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、CH1'ドメインは、野生型である。ある特定の実施形態において、CH1'ドメインは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、残基K145、H172、およびS188にアミノ酸置換を含むCH1''ドメインを有する。ある特定の実施形態において、アミノ酸置換は、K145D、H172DおよびS188Wである。ある特定の実施形態において、CH1''ドメインは、配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、CH1''ドメインは、残基K145およびH172にアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、置換は、K145DおよびH172Dである。ある特定の実施形態において、CH1''ドメインは、配列番号8に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、CH1'ドメイン中にL124VおよびL143A置換、ならびにCH1''ドメイン中にK145D、H172DおよびS188W置換を有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、配列番号6に記載のCH1'ドメイン、および配列番号7に記載のCH1''ドメインを有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、CH1'ドメイン中に置換を有さず(野生型)、CH1''ドメイン中にK145DおよびH172D置換を有する。ある特定の実施形態において、Fabまたは二重特異性抗体は、配列番号3に記載のCH1'ドメイン、および配列番号8に記載のCH1''ドメインを有する。

【0124】

同様に、二重特異性抗体のCLドメイン内の特定のアミノ酸を、上述されたCH1変異と組み合わせた場合にヘテロ二量体の形成を優先させるものとして同定した。これらが、

本明細書に記載される F a b および二重特異性抗体に組み込まれる。I g カップ C L 中のこれらの残基としては、これらに限定されないが、F 1 1 6、F 1 1 8、D 1 2 2、E 1 2 3、Q 1 2 4、V 1 3 3、L 1 3 5、N 1 3 7、N 1 3 8、Q 1 6 0、S 1 6 2、V 1 6 3、D 1 6 7、S 1 7 4、L 1 7 5、T 1 7 8、F 2 0 9、E 2 1 3、および C 2 1 4 が挙げられる。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、Q 1 2 4、N 1 3 7、T 1 7 8 および V 1 3 3 から選択される残基、またはそれらの組み合わせ中の変異を含む。ある特定の実施形態において、これらの残基のいずれか 1 つまたは複数は、使用に好適な別のアミノ酸で置き換えられている。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C L ドメイン中における以下の置換：Q 1 2 4 D、Q 1 2 4 K、V 1 3 3 W、N 1 3 7 D、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 A の 1 つまたは複数を含む。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C L ' および C L " ドメインを有し、C L ' ドメインは、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D である。ある特定の実施形態において、C L ' ドメインは、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、残基 Q 1 2 4、V 1 3 3 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を有する C L ' ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W および N 1 3 7 D である。ある特定の実施形態において、C L ' ドメインは、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C L ' および C L " ドメインを有し、C L " ドメインは、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7 および T 1 7 8 におけるアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A である。ある特定の実施形態において、C L " ドメインは、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 におけるアミノ酸置換を有する C L " ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 K および N 1 3 7 K である。ある特定の実施形態において、C L " ドメインは、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C H 1 '、C H 1 "、C L ' および C L " ドメインを含み、C L ' ドメインは、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D 置換を有し、C L " ドメインは、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A 置換を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の C L '、および配列番号 11 に記載の C L " を含む。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D 置換を有する C L ' ドメイン、ならびに Q 1 2 4 K および N 1 3 7 K 置換を有する C L " ドメインを含む。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の C L '、および配列番号 12 に記載の C L " ドメインを有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W および N 1 3 7 D 置換を有する C L ' ドメイン、ならびに Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A 置換を有する C L " ドメインを含む。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、配列番号 10 に記載の C L ' ドメイン、および配列番号 11 に記載の C L " ドメインを含む。

【0125】

ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C H 1 '、C H 1 "、C L '、および C L " 領域を有し、C H 1 ' ドメインは、置換 L 1 2 4 V および L 1 4 3 A を有し、C L 1 ' ドメインは、置換 Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D を有し、C H 1 " ドメインは、置換 K 1 4 5 D、H 1 7 2 D および S 1 8 8 W を有し、C L " ドメインは、置換 Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C H 1 '、C H 1 "、C L '、および C L " 領域を有し、C H 1 ' ドメインは、置換を有さず、C L 1 ' ドメインは、置換 Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D を有し、C H 1 " ドメインは、置換 K 1 4 5 D および H 1 7 2 D を有し、C L " ドメインは、置換 Q 1 2 4 K および N 1 3 7 K を有する。ある特定の実施形態において、F a b または二重特異性抗体は、C H 1 '、C H 1 "、C L '、および C L " 領域を有し、C H

1'ドメインは、置換 L 1 2 4 V および L 1 4 3 A を有し、C L 1'ドメインは、置換 Q 1 2 4 D、V 1 3 3 W、および N 1 3 7 D を有し、C H 1"ドメインは、置換 K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、および S 1 8 8 W を有し、C L "ドメインは、置換 Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K、および T 1 7 8 A を有する。

【0126】

C H 3 の置換

本発明の他の態様は、二重特異性抗体における F c ドメインのヘテロ二量体化を優先させる新たに同定された C H 3 変異に関する。C H 3 ドメイン内の特定のアミノ酸を、本明細書に記載されるように、ヘテロ二量体の形成を容易にするものとして同定した。ヒト I g G 1 中のこれらの C H 3 残基としては、これらに限定されないが、L 3 7 2、P 3 7 3、P 3 7 4、D 3 7 7、E 3 7 8、L 3 8 8、T 3 8 9、K 3 9 3、K 4 2 0、P 4 2 3、V 4 2 5、D 4 2 7、F 4 3 6、Y 4 3 8、K 4 4 0、および K 4 7 0 が挙げられる。ある特定の実施形態において、C H 3 ヘテロ二量体形成に重要な残基は、E 3 7 8、K 3 9 3 または K 4 4 0、またはそれらの組み合わせである。ある特定の実施形態において、これらの残基のいずれか 1 つまたは複数は、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体中で、使用に好適な他のいずれかのアミノ酸と置き換えられている。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、C H 3 ドメイン中における以下の置換：E 3 7 8 K、K 3 9 3 E および K 4 4 0 R の 1 つまたは複数を含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換を有する C H 3 'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 3 9 3 E である。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列を有する C H 3 'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を有する C H 3 'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、E 3 7 8 K および K 4 4 0 R である。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有する C H 3 'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、残基 K 3 9 3 におけるアミノ酸置換を有する C H 3 "ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 3 9 3 E である。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列を有する C H 3 "ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、残基 E 3 7 8 および K 4 4 0 におけるアミノ酸置換を有する C H 3 "ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、E 3 7 8 K および K 4 4 0 R である。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有する C H 3 "ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、K 3 9 3 E 置換を有する C H 3 'ドメイン、および E 3 7 8 K および K 4 4 0 R 置換を有する C H 3 "を含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 13 に記載の C H 3 'ドメイン、および配列番号 14 に記載の C H 3 "ドメインを有する。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、E 3 7 8 K および K 4 4 0 R 置換を有する C H 3 '、ならびに K 3 9 3 E 置換を有する C H 3 "ドメインを含む。ある特定の実施形態において、ヘテロ二量体ポリペプチドまたは二重特異性抗体は、配列番号 14 に記載の C H 3 'ドメイン、および配列番号 13 に記載の C H 3 "ドメインを有する。

【0127】

これまで、C H 3 ドメイン中のヘテロ二量体は、ノブイントゥホール技術を使用することによって優先的に形成された。二重特異性抗体を産生する方法としてのノブイントゥホールの使用は当該分野において周知である。1998年3月24日に付与され Genentech に譲渡された米国特許第 5,731,168 号、2009年7月16日に公開さ

れ Amgen に譲渡された PCT 公開 WO 2009089004 号、および 2009 年 7 月 16 日に公開され Novo Nordisk A/S に譲渡された米国特許公開第 20090182127 号を参照されたい。また、Marvin および Zhu、Acta Pharmacologica Sincia (2005 年) 26 巻 (6 号): 649~658 頁および Kontermann (2005 年) Acta Pharmacol. Sin.、26 巻: 1~9 頁も参照されたい。一部の実施形態において、本明細書に記載される CH1/CL 変異を有する Fab は、ノブイントゥホールの変異を有する CH3 ドメインと組み合わせることができる。例えば、Fab は、ノブの変異 T389W ならびにホールの変異 T389S、L391A、および Y438V を有する定常領域と組み合わせることができる。

【0128】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体の Fc は、野生型定常領域を有する二重特異性抗体またはノブイントゥホールの CH3 変異を有する二重特異性抗体と比較して、ヘッド-テール (head-to-tail) 形成を減少させるかまたは全体的な収量を増加させる変異を有する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、野生型 Fc ポリペプチド中に存在するアミノ酸と異なるアミノ酸を有する少なくとも 1 つの重鎖の、S252、V253、F254、F256、V277、R320、K353、Y370、T371、L391、K393、N417、Y419、K420、P423、P424、D427、F436、Y438 から選択される残基において、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の置換を含む。エフェクター機能を変更することが望ましい場合があり、変異の一部がエフェクター機能を強化するかまたは減少させ得ることが予期される。変異が、抗体の他の機能的な特徴、例えばエフェクター機能を有意に変更しないことが好ましい。

【0129】

CH1/CL および CH3 定常領域の変異の組み合わせ

定常領域の適したヘテロ二量体化は、所望の二重特異性抗体の均一な集団を生成するのに重要である。ある特定の実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、CL' ドメイン中に Q124D および N137D 置換を含み；CH1' ドメイン中に L124V および L143A 置換を含み；CH3' ドメイン中に K393E 置換を含み；CL'' ドメイン中に Q124K、N137K および T178A 置換を含み；CH1'' ドメイン中に K145D、H172D および S188W 置換を含み；CH3'' ドメイン中に E378K および K440R 置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の CL' ドメイン、配列番号 6 に記載の CH1' ドメイン、配列番号 13 に記載の CH3' ドメイン、配列番号 11 に記載の CL'' ドメイン、配列番号 7 に記載の CH1'' ドメイン、および配列番号 14 に記載の CH3'' ドメインを含む。

【0130】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CL' ドメイン中に Q124D および N137D 置換を含み；CH1' ドメイン中に L124V および L143A 置換を含み；CH3' ドメイン中に E378K および K440R 置換を含み；CL'' ドメイン中に Q124K、N137K および T178A 置換を含み；CH1'' ドメイン中に K145D、H172D および S188W 置換を含み；CH3'' ドメイン中に K393E 置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の CL' ドメイン、配列番号 6 に記載の CH1' ドメイン、配列番号 14 に記載の CH3' ドメイン、配列番号 11 に記載の CL'' ドメイン、配列番号 7 に記載の CH1'' ドメイン、および配列番号 13 に記載の CH3'' ドメインを有する。

【0131】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CL' ドメイン中に Q124D および N137D 置換を含み；CH1' ドメイン中に置換を含まず；CH3' ドメイン中に K393E 置換を含み；CL'' ドメイン中に Q124K および N137K 置換を含み；CH1'' ドメイン中に K145D および H172D 置換を含み；CH3'' ドメイン中に E37

8 KおよびK 4 4 0 R置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号9に記載のCL'ドメイン、配列番号3に記載のCH1'ドメイン、配列番号13に記載のCH3'ドメイン、配列番号12に記載のCL''ドメイン、配列番号8に記載のCH1''ドメイン、および配列番号14に記載のCH3''ドメインを含む。

【0132】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CL'ドメイン中にQ 1 2 4 DおよびN 1 3 7 D置換を含み；CH1'ドメイン中に置換を含まず；CH3'ドメイン中にE 3 7 8 KおよびK 4 4 0 R置換を含み；CL''ドメイン中にQ 1 2 4 KおよびN 1 3 7 K置換を含み；CH1''ドメイン中にK 1 4 5 DおよびH 1 7 2 D置換を含み；CH3''ドメイン中にK 3 9 3 E置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号9に記載のCL'ドメイン、配列番号3に記載のCH1'ドメイン、配列番号14に記載のCH3'ドメイン、配列番号12に記載のCL''ドメイン、配列番号8に記載のCH1''ドメイン、および配列番号13に記載のCH3''ドメインを含む。

【0133】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CL'ドメイン中にQ 1 2 4 D、V 1 3 3 WおよびN 1 3 7 D置換を含み；CH1'ドメイン中にL 1 2 4 VおよびL 1 4 3 A置換を含み；CH3'ドメイン中にK 3 9 3 E置換を含み；CL''ドメイン中にQ 1 2 4 K、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 A置換を含み；CH1''ドメイン中にK 1 4 5 D、H 1 7 2 D、およびS 1 8 8 W置換を含み；CH3''ドメイン中にE 3 7 8 KおよびK 4 4 0 R置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号10に記載のCL'ドメイン、配列番号6に記載のCH1'ドメイン、配列番号13に記載のCH3'ドメイン、配列番号11に記載のCL''ドメイン、配列番号7に記載のCH1''ドメイン、および配列番号14に記載のCH3''ドメインを含む。

【0134】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CL'ドメイン中にQ 1 2 4 D、V 1 3 3 WおよびN 1 3 7 D置換を含み；CH1'ドメイン中にL 1 2 4 VおよびL 1 4 3 A置換を含み；CH3'ドメイン中にE 3 7 8 KおよびK 4 4 0 R置換を含み；CL''ドメイン中にQ 1 2 4 K、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 A置換を含み；CH1''ドメイン中にK 1 4 5 D、H 1 7 2 D、およびS 1 8 8 W置換を含み；CH3''ドメイン中にK 3 9 3 E置換を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号10に記載のCL'ドメイン、配列番号6に記載のCH1'ドメイン、配列番号14に記載のCH3'ドメイン、配列番号11に記載のCL''ドメイン、配列番号7に記載のCH1''ドメイン、および配列番号13に記載のCH3''ドメインを含む。

【0135】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、以下の位置：L 1 2 4、L 1 4 3、K 1 4 5、H 1 7 2、S 1 8 8、E 3 7 8、K 3 9 3、およびK 4 4 0 Rのいずれか1つまたは組み合わせに、重鎖定常ドメイン（HC'、HC''、またはHC'およびHC''の両方）内の置換を含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、以下の重鎖定常ドメイン中の置換：L 1 2 4 V、L 1 4 3 A、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D、S 1 8 8 S、E 3 7 8 K、K 3 9 3 E、およびK 4 4 0 Rのいずれか1つまたは組み合わせを含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、以下の位置：Q 1 2 4、N 1 3 7およびT 1 7 8のいずれか1つまたは組み合わせに、軽鎖定常ドメイン（LC'、LC''、またはLC'およびLC''の両方）内の置換を含む。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、以下の軽鎖定常ドメイン中の置換：Q 1 2 4 K、Q 1 2 4 D、N 1 3 7 D、N 1 3 7 K、およびT 1 7 8 Aのいずれか1つまたは組み合わせを含む。

【0136】

可変領域

ある特定の実施形態において、第1および第2の抗体の可変領域は不変のままである。ある特定の実施形態において、可変領域は、結合（すなわち、未改変の二重特異性抗体と

同じエピトープへの)を保持している構造的に関連する二重特異性抗体を作り出すように改変される。したがって、ある特定の実施形態において、本明細書に記載される操作された抗体のCDR1、2、および/または3領域は、親の単一特異性抗体のアミノ酸配列とまったく同様のアミノ酸配列を含んでいてもよい。しかしながら、他の実施形態において、二重特異性抗体は、本明細書で開示された抗体の正確なCDR配列からの誘導体を含み、それでもなお所望のエピトープに結合する能力を保持する。このような配列改変としては、1つまたは複数のアミノ酸付加、欠失、または置換、例えば上述したような保存的配列改変を挙げることができる。

【0137】

したがって、一実施形態において、二重特異性抗体は、本明細書で開示された抗体の1つまたは複数のCDRと例えば90%、95%、98%または99.5%同一な1つまたは複数のCDRで構成されていてもよい。上記で列挙された値の間の範囲、例えば、上記の配列の1つまたは複数と90~95%、95~98%、または98~100%同一なCDRも、本発明に包含されることが意図される。

【0138】

別の実施形態において、CDRの1つまたは複数の残基を変更することにより、理想的な結合定数が達成されるように、結合を改変し、より有利な結合のオンレート、より有利な結合のオフレート、または両方を達成してもよい。この戦略を使用すれば、例えば 10^{10} M^{-1} またはそれよりも高い極めて高い結合親和性を有する抗体を得ることができる。当該分野において周知の親和性成熟技術および本明細書に記載されるものを使用して、CDR領域を変更し、それに続いて生じる結合分子を所望の結合の変化に関してスクリーニングすることができる。したがって、CDRを変更することにより、結合親和性に加えて免疫原性の変化をモニターし、最もよく組み合わせられた結合および低い免疫原性に最適化された抗体が得られるようにスコア付けすることができる。

【0139】

したがって、VHおよび/またはVLのCDR1、CDR2および/またはCDR3領域内の可変領域の改変に関して、部位特異的変異誘発またはPCR媒介変異誘発を実行して、変異を導入することができ、抗体結合に対する作用または他の目的の機能特性は、*in vitro*または*in vivo*でのアッセイで評価することができる。好ましくは保存的改変(本明細書で論じられるような)が導入される。変異は、アミノ酸置換、付加または欠失であり得るが、好ましくは置換である。さらに、典型的には、CDR領域内の1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下または5つ以下の残基が変更される。

【0140】

追加の抗体改変

本発明の開示の抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかに1つまたは複数のグリコシル化部位を含有していてもよい。このようなグリコシル化部位は、抗体の免疫原性の増加、または抗原結合の変更による抗体のpKの変更をもたらす可能性がある(Marshallら(1972年) *Ann Rev Biochem* 41巻: 673~702頁; GalaおよびMorrison(2004年) *J Immunol* 172巻: 5489~5494頁; Wallickら(1988年) *J Exp Med* 168巻: 1099~1109頁; Spiro(2002年) *Glyco-biology* 12巻: 43R~56R頁; Parekhら(1985年) *Nature* 316巻: 452~7頁; Mimuraら(2000年) *Mol Immunol* 37巻: 697~706頁)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフで起こることが公知である。一部の場合において、可変領域のグリコシル化を含有しない二重特異性抗体を有することが好ましい。これは、可変領域中にグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択すること、またはグリコシル化領域内の残基を変異させることのいずれかによって達成することができる。

【0141】

例えば、ある特定の実施形態において、抗体のグリコシル化が改変されており、例えば

、可変領域に存在する１つまたは複数のグリコシル化部位がなくなるように、可変領域が変更されている。より特に、本発明の抗体の配列において、グリコシル化しやすい部位をなくすことが望ましい。これは、親の可変領域に存在する１つまたは複数の N - X - (S / T) 配列 (式中 X は、あらゆるアミノ酸残基である) の出現を変更することによって、特に、N 残基および / または S もしくは T 残基を置換することによって達成される。一実施形態において、T 9 5 は、K 9 5 に変異している。別の実施形態において、N 4 7 は、R 4 7 に変異している。

【 0 1 4 2 】

例えば、アグリコシル化抗体 (すなわち、グリコシル化を欠いた) を作製することができる。グリコシル化は、例えば抗原への抗体の親和性を増加させるように変更することができる。このような炭水化物の改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の１つまたは複数の部位を変更することによって達成することができる。例えば、１つまたは複数の可変領域のフレームワークのグリコシル化部位をなくす１つまたは複数のアミノ酸置換を作製することができ、それによってその部位におけるグリコシル化をなくすことができる。このようなアグリコシル化は、抗原への抗体の親和性を増加させることができる。例えば、米国特許第 5 , 7 1 4 , 3 5 0 号および 6 , 3 5 0 , 8 6 1 号を参照されたい。

【 0 1 4 3 】

加えて、または代替として、抗体は、グリコシル化のタイプが変更されていてもよく、例えばフコシル残基の量が低減された低フコシル化抗体、またはバイセクティング G 1 c N a c 構造が増加した抗体などである。このような変更されたグリコシル化パターンは、抗体の A D C C 能力を増加させることが実証されている。このような炭水化物の改変は、例えば、グリコシル化機構が変更された宿主細胞中で抗体を発現することによって達成することができる。グリコシル化機構が変更された細胞は、当該分野において説明されており、これを宿主細胞として使用して、本発明の組換え抗体を発現させ、それによってグリコシル化が変更された抗体を産生することができる。例えば、細胞株 M s 7 0 4 、 M s 7 0 5 、および M s 7 0 9 は、M s 7 0 4 、 M s 7 0 5 、および M s 7 0 9 細胞株で発現された抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U T 8 ((1 , 6) - フコシルトランスフェラーゼ) を欠いている。M s 7 0 4 、 M s 7 0 5 、および M s 7 0 9 F U T 8 - / - 細胞株を、２つの置換ベクターを使用した C H O / D G 4 4 細胞における F U T 8 遺伝子の標的化破壊により作り出した (米国特許公開第 2 0 0 4 0 1 1 0 7 0 4 号および Y a m a n e - O h n u k i ら (2 0 0 4 年) B i o t e c h n o l B i o e n g 8 7 巻 : 6 1 4 ~ 2 2 頁を参照) 。別の例として、E P 1 , 1 7 6 , 1 9 5 は、- 1 , 6 結合に関連する酵素を低減させるかまたはなくすことによって、このような細胞株で発現される抗体が低フコシル化を呈示するようにフコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子を機能的に破壊した細胞株を記載している。E P 1 , 1 7 6 , 1 9 5 はまた、抗体の F c 領域に結合する N - アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関する酵素活性が低いまたは酵素活性を有さない細胞株、例えばラット骨髓腫細胞株 Y B 2 / 0 (A T C C C R L 1 6 6 2) も記載している。P C T 公報 W O 0 3 / 0 3 5 8 3 5 は、A s n (2 9 7) が連結された炭水化物にフコースと結合する能力を低減して、結果としてその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化をもたらす、バリエーション C H O 細胞株である L e c 1 3 細胞株を記載している (S h i e l d s ら (2 0 0 2 年) J . B i o l . C h e m . 2 7 7 巻 : 2 6 7 3 3 ~ 2 6 7 4 0 頁も参照) 。グリコシル化プロファイルが改変された抗体はまた、P C T 公報 W O 0 6 / 0 8 9 2 3 1 に記載されたようにして、ニワトリの卵でも産生させることができる。代替として、グリコシル化プロファイルが改変された抗体は、植物細胞で産生させることができる。P C T 公報 W O 9 9 / 5 4 3 4 2 は、操作された細胞株で発現された抗体が、抗体の A D C C 活性の増加をもたらすバイセクティング G 1 c N a c 構造の増加を呈示するように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ (例えば、(1 , 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I (G n T I I I)) を発現するように操作された細胞株を記載している (U m a n a ら (1 9 9 9 年) N a t . B i o

t e c h . 17 巻 : 176 ~ 180 頁も参照)。代替として、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切り離すことができ、例えばフコシダーゼである - L - フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する (T a r e n t i n o ら (1975 年) B i o c h e m . 14 巻 : 5516 ~ 23 頁)。

【0144】

上記で説明したようにして産生された抗体の可変性のセグメント (例えば、ヒト、キメラまたはヒト化抗体の重鎖および軽鎖可変領域) は、典型的には、免疫グロブリン定常領域 (F c 領域)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分に連結されている。ヒト定常領域 D N A 配列は、周知の手順に従って、様々なヒト細胞から、ただし好ましくは不死化した B 細胞から単離することができる (K a b a t ら、上記、および L i u ら、W O 87 / 02671 を参照) (これらのそれぞれは、あらゆる目的で参照によりその全体が組み込まれる)。抗体は、通常、軽鎖および重鎖定常領域の両方を含有するものである。重鎖定常領域は通常、C H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3、および C H 4 領域を含む。本明細書に記載される抗体は、あらゆるタイプの定常領域を有する抗体、例えば、I g M、I g G、I g D、I g A および I g E、ならびにあらゆるアイソタイプ、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 などを含む。抗体 (例えば、ヒト化抗体) が細胞傷害活性を呈示することが望ましい場合、定常ドメインは通常、補体結合性定常ドメインであり、クラスは、典型的には I g G 1 である。ヒトアイソタイプ I g G 1 が好ましい。軽鎖定常領域は、ラムダまたはカッパであり得る。ヒト化抗体は、1 つより多くのクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでいてもよい。抗体は、2 つの軽鎖および 2 つの重鎖を含有する四量体として、別個の重鎖、軽鎖として、F a b、F a b'、F (a b') 2、および F v として、または重鎖および軽鎖の可変ドメインがスパーサーを介して連結されている単鎖抗体として発現させることができる。

【0145】

ある特定の実施形態において、抗体は、抗体の物理的安定性を改善するように変異した可変領域を含む。一実施形態において、抗体は、重鎖定常領域のヒンジ領域中の 228 位 (S 228 P ; E U インデックス) に対応する位置にセリンからプロリンへの変異を含む I g G 4 アイソタイプ抗体である。この変異は、ヒンジ領域における重鎖間のジスルフィド架橋の不均一性を消失させることが報告されている (A n g a l ら、上記 ; 241 位は K a b a t の番号付けシステムに基づく)。例えば、ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、A n g a l ら、上記に記載されているような 241 位に対応する位置のセリンがプロリンに変異した、ヒト I g G 4 定常領域に連結されたいずれかの抗体の重鎖可変領域を含んでいてもよい。したがって、ヒト I g G 4 定常領域に連結された重鎖可変領域の場合、この変異は、E U インデックスによれば S 228 P 変異に相当する。

【0146】

ある特定の実施形態において、C H 1 のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変更されるように、例えば増加または減少するように改変されている。このアプローチは、米国特許第 5,677,425 号でさらに記載されている。C H 1 のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の集合を容易にするために、または抗体の安定性を増加もしくは減少させるために変更される。

【0147】

加えて、例えば抗体の生物学的 (例えば、血清) 半減期を増加させるために、抗体をペグ化することができる。抗体をペグ化するためには、典型的には、抗体またはそれらの断片を、1 つまたは複数の P E G 基が抗体または抗体断片に結合するようになる条件下で、ポリエチレングリコール (P E G)、例えば P E G の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などと反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性 P E G 分子 (または類似の反応性水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われる。用語「ポリエチレングリコール」は、本明細書で使用される場合、他のタンパク質を誘導体化するのに使用されてきた P E G の形態、例えばモノ (C 1 ~ C 10) アルコキシ - もしくはアリ

ールオキシ - ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール - マレイミドなどのいずれも包含することが意図される。ある特定の実施形態において、ペグ化される抗体は、アグリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当該分野において公知であり、本発明の抗体に適用することができる。例えば、E P O 1 5 4 3 1 6 および E P O 4 0 1 3 8 4 を参照されたい。

【 0 1 4 8 】

二重特異性抗体の産生

本明細書に記載される二重特異性抗体の組換え産生のために、それをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング (D N A の増幅) または発現のための複製可能なベクターに挿入する。抗体をコードする D N A または m R N A は、従来の手順を使用して (例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離し、配列決定することができる。多くのベクターが、D N A または m R N A の発現に利用することができる。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に一部依存する。一般的に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物 (一般的に哺乳動物であるが、真菌 (例えば、酵母)、昆虫、植物、および他の多細胞生物由来の有核細胞も含む) 起源のいずれかのものである。

【 0 1 4 9 】

原核生物の宿主細胞

本明細書に記載される二重特異性抗体の構成要素をコードするヌクレオチド配列は、標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のヌクレオチド配列は、例えば、ハイブリドーマ細胞などの抗体産生細胞から単離され、配列決定される。代替として、ヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機または P C R 技術を使用して合成することができる。二重特異性抗体をコードする配列が一旦得られたら、これは、原核生物宿主中で異種抗体を複製および発現することが可能な組換えベクターに挿入される。利用可能であり当該分野において公知の多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主としてベクターに挿入される核酸のサイズ、およびベクターで形質転換される特定の宿主細胞に依存する。各ベクターは、ベクターの機能 (異種抗体の増幅もしくは発現、または両方) およびベクターが存在する特定の宿主細胞とのベクターの適合性に応じて、様々な構成要素を含有する。ベクター構成要素としては、一般的に、これらに限定されないが、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位 (R B S)、シグナル配列、異種核酸インサートおよび転写終結配列が挙げられる。

【 0 1 5 0 】

一般的に、宿主細胞に適合する種由来のレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主と共に使用される。ベクターは、通常、複製部位に加えて、形質転換細胞における表現型選択を提供することが可能なマーキング配列を有する。例えば、E . c o l i は、典型的には、E . c o l i 種由来のプラスミドである p B R 3 2 2 を使用して形質転換される。p B R 3 2 2 は、アンピシリン (A m p) およびテトラサイクリン (T e t) 耐性をコードする遺伝子を含有し、したがって形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。p B R 3 2 2、その誘導体、または他の微生物プラスミドまたはバクテリオファージはまた、内因性タンパク質の発現のために微生物が使用できるプロモーターを含有していてもよいし、またはそれを含有するように改変されていてもよい。特定の抗体の発現に使用される p B R 3 2 2 誘導体の例は、C a r t e r ら、米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 3 7 号で詳細に記載されている。

【 0 1 5 1 】

加えて、宿主微生物に適合するレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターは、これらの宿主と共に形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、

. . - 1 1 などのバクテリオファージは、感受性宿主細胞、例えば E . c o l i L E 3 9 2 などを形質転換するのに使用できる組換えベクターの作製に利用することができる。

【 0 1 5 2 】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成要素のそれぞれをコードする、2つまたはそれよりも多くのプロモーター-シストロン対を含んでいてもよい。プロモーターは、シストロンの発現をモジュレートするシストロン上流(5')に配置される非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、2つのクラス、すなわち誘導性および構成性に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば栄養素の存在もしくは非存在または温度の変化に応答して、その制御下でシストロンの転写レベルの増加を開始させるプロモーターである。

【0153】

様々な可能性のある宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化によって供給源のDNAからプロモーターを除去し、本発明のベクターに単離されたプロモーター配列を挿入することによって、例えば軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAに作動可能に連結することができる。天然のプロモーター配列と多くの異種プロモーターの両方を使用して、標的遺伝子の増幅および/または発現を誘導することができる。一部の実施形態において、異種プロモーターは、一般的に、天然の標的ポリペプチドのプロモーターと比較して、発現された標的遺伝子のより多くの転写およびより高い収量を可能にするため、異種プロモーターを利用してもよい。

【0154】

原核生物宿主との使用に好適なプロモーターとしては、PhoAプロモーター、-ガラクトナーゼ(galactamase)およびラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系およびハイブリッドプロモーター、例えばtacまたはtrcプロモーターなどが挙げられる。しかしながら、細菌中で機能的な他のプロモーター(例えば他の公知の細菌またはファージプロモーターなど)も同様に好適である。それらのヌクレオチド配列は公開されており、それによって、当業者は、いずれかの必要な制限部位を供給するために、リンカーまたはアダプターを使用して、ヘテロ多量体タンパク質、例えば標的軽鎖および重鎖の遺伝子をコードするシストロンにそれらを作動可能にライゲーションすることが可能である(Siebenlistら、(1980年)Cell 20巻:269頁)。

【0155】

ある特定の実施形態において、組換えベクター内の各シストロンは、膜を横切った発現されたポリペプチドのトランスロケーションを指示する分泌シグナル配列構成要素を含む。一般的に、シグナル配列は、ベクターの構成要素であってもよいし、またはベクターに挿入されている標的ポリペプチドDNAの一部であってもよい。本発明の目的のために選択されたシグナル配列は、宿主細胞によって認識されプロセッシングされる(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであるべきである。異種ポリペプチドにとって天然のシグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核生物宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpAおよびMBPからなる群より選択される原核生物のシグナル配列で置換されている。本発明の一実施形態において、発現系の両方のシストロンで使用されるシグナル配列は、STIIシグナル配列またはそれらのバリエーションである。

【0156】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される免疫グロブリンの産生は、宿主細胞の細胞質中で起こる可能性があり、それゆえに各シストロン内の分泌シグナル配列の存在を必要としない。それについて、細胞質内で、免疫グロブリンの軽鎖および重鎖が発現され、フォールディングし、集合して、機能的な免疫グロブリンが形成される。ある特定の宿主株(例えば、E.coli trxB株)は、ジスルフィド結合形成に好都合な細胞質の条件を提供し、それによって発現されたタンパク質サブユニットの適したフォールディングおよび集合が可能になる。ProbaおよびPluckthun、Gene、159巻:203号(1995年)を参照されたい。

【0157】

本明細書に記載される二重特異性抗体の発現に好適な原核生物宿主細胞としては、古細菌および真正細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物などが挙げられる。有用な細菌の例としては、*Escherichia* (例えば、*E. coli*)、*Bacilli* (例えば、*B. subtilis*)、*Enterobacteriaceae*、*Pseudomonas* 種 (例えば、*P. aeruginosa*)、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescans*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Shigella*、*Rhizobia*、*Vitreoscilla*、または *Paracoccus* が挙げられる。一実施形態において、グラム陰性細胞が使用される。ある特定の実施形態において、*E. coli* 細胞が、本発明のための宿主として使用される。*E. coli* 株の例としては、W3110 株 (*Bachmann, Cellular and Molecular Biology*, 2 巻 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987 年)、1190~1219 頁; ATCC 寄託番号 27, 325) およびそれらの誘導体、例えば遺伝子型 W3110 *Afhua* (*AtonA*) *ptr3 lac Iq lac L8 AompTA* (*nmpc-fepE*) *degP41kan^R* を有する 33D3 株 (米国特許第 5,639,635 号) などが挙げられる。他の株およびそれらの誘導体、例えば *E. coli* 294 (ATCC 31446)、*E. coli* B、*E. coli* x1776 (ATCC 31537) および *E. coli* RV308 (ATCC 31608) なども好適である。ある特定の実施形態において、*E. coli* *Alpp* が特に有用である。これらの例は、限定というより例示である。既定の遺伝子型を有する上述の細菌のいずれかの誘導体を構築するための方法は当該分野において公知であり、例えば、*Bass*ら、*Proteins*、8 巻: 309~314 頁 (1990 年) に記載されている。一般的に、細菌の細胞におけるレプリコンの再現可能性を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。例えば、周知のプラスミド、例えば pBR322、pBR325、pACYC177、または pKN410 などを使用してレプリコンを供給する場合、*E. coli*、*Serratia*、または *Salmonella* 種を宿主として好適に使用することができる。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、望ましくは、細胞培養物に追加のプロテアーゼ阻害剤を組み込ませてもよい。

【0158】

宿主細胞は、上述した発現ベクターで形質転換され、プロモーターを誘導したり、形質転換体を選択したり、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅したりするために適宜改変された従来の栄養培地中で培養される。

【0159】

形質転換は、染色体外エレメントとして、または染色体組み込み体 (*chromosomal integrant*) によってのいずれかで DNA が複製可能になるように、DNA を原核生物宿主に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、このような細胞に適切な標準的な技術を使用してなされる。実質的な細胞壁バリアを含有する細菌細胞には、一般的に、塩化カルシウムを採用するカルシウム処理が使用される。形質転換のための別の方法は、ポリエチレングリコール/DMSOを採用する。使用されるさらに別の技術は、エレクトロポレーションである。

【0160】

本発明のポリペプチドを産生するのに使用される原核細胞は、当該分野において公知の、選択された宿主細胞の培養に好適な培地中で成長させる。好適な培地の例としては、必要な栄養素補充物質を加えたルリアブロス (LB) が挙げられる。ある特定の実施形態において、培地は、発現ベクターを含有する原核細胞の成長を選択的に許容するための、発現ベクターの構築に基づき選択される選択薬剤 (*selection agent*) も含有する。例えば、アンピシリンは、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の成長のために培地に添加される。

【0161】

炭素、窒素、および無機ホスフェートの供給源以外のあらゆる必要な補充物質が、適切な濃度で含まれていてもよく、これらは、単独で、または別の補充物質または培地との混合物、例えば複合窒素源などとして導入される。任意選択で、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリールおよびジチオスレイトリールからなる群より選択される１つまたは複数の還元剤を含有していてもよい。

【0162】

原核生物宿主細胞は、好適な温度で培養される。E. coli の成長の場合、温度は、例えば、約 20 から約 39、または約 25 から約 37 の範囲である。ある特定の実施形態において、温度は、約 30 である。培地の pH は、主として宿主生物に応じて、約 5 から約 9 の範囲のいずれの pH であってもよい。E. coli の場合、pH は、好ましくは約 6.8 から約 7.4 であり、より好ましくは約 7.0 である。

【0163】

発現ベクターで誘導性プロモーターが使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。ある特定の実施形態において、PhoA プロモーターは、ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、形質転換宿主細胞は、誘導のためにホスフェートを制限した培地中で培養される。好ましくは、ホスフェートを制限した培地は、C. R. A. P 培地である（例えば、Simmons ら、J. Immunol. Methods (2002 年)、263 巻：133～147 頁を参照）。当該分野において公知の通り、採用されるベクター構築物に従って様々な他の誘導物質を使用することができる。

【0164】

ある特定の実施形態において、第 1 および第 2 の抗体を含有する宿主細胞は、別々に培養され、発現された本発明のポリペプチドが、宿主細胞のペリプラズムに分泌され、それから別々に回収される。ある特定の実施形態において、第 1 および第 2 の抗体を含有する宿主細胞は、別々に培養され、抗体を単離する前に、2 つの宿主細胞培養物が一緒に混合され、細胞がベレット化される。ある特定の実施形態において、第 1 および第 2 の抗体を含有する宿主細胞は、別々に培養され、遠心分離され、別々に再懸濁され、次いで抗体を単離する前に一緒に混合される。ある特定の実施形態において、第 1 および第 2 の抗体を含有する宿主細胞は、同じ培養容器中で一緒に培養される。典型的に、タンパク質の回収は、一般的に浸透圧性ショック、超音波処理または溶解のような手段によって微生物の細胞膜を破壊することを含む。細胞を破壊したら、遠心分離または濾過によって細胞残屑または全細胞を除去してもよい。例えば親和性樹脂クロマトグラフィーによってタンパク質をさらに精製してもよい。代替として、タンパク質を培養培地に移してその中で単離してもよい。産生されたタンパク質をさらに精製するために、細胞を培養物から除去して、培養上清を濾過し、濃縮してもよい。発現されたポリペプチドをさらに、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) およびウェスタンブロットアッセイなどの一般的に公知の方法を使用して、単離し同定してもよい。単離されたポリペプチドは、ヘテロ多量体タンパク質を産生するのに使用される。

【0165】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体の産生は、発酵プロセスによって大量に行われる。様々なラージスケールの流加培養の発酵手順を、組換えタンパク質の産生に利用することができる。ラージスケールの発酵は、少なくとも 1000 リットルの容量、好ましくは約 1,000 から 100,000 リットルの容量を有する。これらの発酵槽は、酸素および栄養素、特にグルコース（好ましい炭素 / エネルギー源）を分散させるために、攪拌機のインペラーを使用する。スモールスケールの発酵は、一般的に、容積がおよそ 100 リットル以下の発酵槽での発酵を指し、容積は、約 1 リットルから約 100 リットルの範囲であってもよい。

【0166】

発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が、好適な条件下で、所望の密度、例えば細胞がこの段階で初期の定常期にある約 180～220 の OD₅

50まで成長した後に開始される。当該分野において公知のように、かつ上述したように、採用されるベクター構築物に従って様々な誘導物質を使用することができる。細胞は、誘導の前に、より短い期間で成長させてもよい。細胞は、通常、約12～50時間で誘導されるが、それより長いまたは短い誘導時間が使用される場合もある。

【0167】

本明細書に記載される二重特異性抗体の産生収量および品質を改善するために、様々な発酵条件を改変することができる。例えば、分泌された二重特異性抗体の適した集合およびフォールディングを改善するために、シャペロンタンパク質、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbDおよびまたはDsbG)またはFkpA(シャペロン活性を有するペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ)を過剰発現する追加のベクターを使用して、宿主原核細胞を共形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は、細菌の宿主細胞で産生された異種タンパク質の適したフォールディングおよび溶解性を促進することが実証されている。Chenら、(1999年)J. Bio. Chem. 274巻:19601～19605頁; Georgiouら、米国特許第6,083,715号; Georgiouら、米国特許第6,027,888号; BothmannおよびPluckthun(2000年)J. Biol. Chem. 275巻:17100～17105頁; RammおよびPluckthun(2000年)J. Biol. Chem. 275巻:17106～17113頁; Arieら、(2001年)Mol. Microbiol. 39巻:199～210頁。

【0168】

発現された二重特異性抗体(特にタンパク質分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小化するために、タンパク質分解酵素が欠乏した特定の宿主株を本発明のために使用することができる。例えば、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVIおよびそれらの組み合わせなどの公知の細菌プロテアーゼをコードする遺伝子に遺伝子変異がなされるように、宿主細胞株を改変することができる。いくつかのE. coliプロテアーゼが欠乏した株が利用可能であり、例えば、Jolyら、(1998年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻:2773～2777頁; Georgiouら、米国特許第5,264,365号; Georgiouら、米国特許第5,508,192号; Haraら、Microbial Drug Resistance、2巻:63～72頁(1996年)に記載されている。

【0169】

ある特定の実施形態において、タンパク質分解酵素が欠乏しており、1つまたは複数のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換されたE. coli株を、本発明の発現系における宿主細胞として使用した。第2の実施形態において、E. coli株は、外膜のリポタンパク質が欠乏している()。

【0170】

ある特定の実施形態において、さらなるアッセイおよび使用のために、本明細書において産生された二重特異性抗体をさらに精製して、実質的に均一な調製物を得る。当該分野において公知の標準的なタンパク質精製方法を採用することができる。以下の手順は、好適な精製手順の例示である:免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカまたはDEAEなどのカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング(chromatofocusing)、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、および例えばSephadex G-75を使用するゲル濾過。

【0171】

ある特定の実施形態において、固相に固定されたプロテインAは、例えば本発明の全長抗体産物の免疫親和性精製に使用される。プロテインAは、高親和性で抗体のFc領域に結合する、Staphylococcus aureus由来の41kDの細胞壁タンパク質である。Lindmarkら、(1983年)J. Immunol. Meth.

62巻：1～13頁。プロテインAが固定されている固相は、好ましくはガラスまたはシリカ表面を含むカラムであり、より好ましくは制御多孔質ガラスカラム（controlled pore glass column）またはケイ酸カラムである。いくつかの適用において、カラムは、汚染物質の非特異的な接着を防ぐために、例えばグリセロールなどの試薬でコーティングされている。

【0172】

精製の第1のステップとして、プロテインAが固定された固相上に、上述したような細胞培養由来の調製物を適用して、目的の抗体をプロテインAに特異的に結合させる。次いで固相を洗浄して、固相に非特異的に結合した汚染物質を除去する。固相から溶出によって二重特異性抗体を回収する。

【0173】

真核宿主細胞

ベクター構成要素としては、一般的に、これらに限定されないが、以下：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列の1つまたは複数が挙げられる。

【0174】

真核宿主細胞で使用するためのベクターはまた、目的の成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有する、シグナル配列または他のポリペプチドを含有していてもよい。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識されプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列に加えて、ウイルスの分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスのgDシグナルが利用可能である。このような前駆体領域に関するDNAは、リーディングフレーム中で所望のヘテロ多量体タンパク質（例えば、抗体）をコードするDNAにライゲーションされる。

【0175】

一般的に、複製起点構成要素は、哺乳動物発現ベクターに必要なではない。例えば、SV40起点を典型的に使用することができるが、これは単にSV40起点が初期プロモーターを含有するためである。

【0176】

発現およびクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含有していてもよい。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、（b）関連する場合、栄養要求性の欠乏を補完するタンパク質、または（c）複合培地から利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0177】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止するための薬物を利用する。異種遺伝子でうまく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生することから、選択レジメンから生き残る。このような優勢な選択の例は、薬物のネオマイシン、ミコフェノール酸およびハイグロマイシンを使用する。

【0178】

哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの別の例は、抗体の核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするものであり、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよび-II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

【0179】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合アンタゴニストであるメトトレキセート（Mtx）を含有する培養培地中で形質転換体の全てを培養することによって同定される。野生型DHFRが採用される場合に適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠乏したチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株（例えば、ATCC CRL-9096）である。

【 0 1 8 0 】

代替として、抗体、野生型 D H F R タンパク質、および別の選択可能マーカー、例えばアミノグリコシド 3' - ホスホトランスフェラーゼ (A P H) などをコードする D N A 配列で形質転換または共形質転換した宿主細胞 (特に内因性 D H F R を含有する野生型宿主) は、選択可能マーカーでの選択薬剤、例えばアミノグリコシド系抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、または G 4 1 8 などを含有する培地中で細胞を成長させることによって選択することができる。例えば、米国特許第 4 , 9 6 5 , 1 9 9 号を参照されたい。

【 0 1 8 1 】

発現およびクローニングベクターは通常、宿主生物によって認識され、所望の核酸に作動可能に連結しているプロモーターを含有する。真核生物に関して、プロモーター配列は公知である。実質的に全ての真核生物遺伝子が、転写開始部位からおよそ 2 5 から 3 0 塩基上流に配置された A T リッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から 7 0 から 8 0 塩基上流で見出される別の配列は、C N C A A T 領域 (式中 N は、あらゆるヌクレオチドであり得る) である。ほとんどの真核生物遺伝子の 3' 末端に、コード配列の 3' 末端にポリ A テールを付加するためのシグナルであり得る A A T A A A 配列がある。これらの配列の全ては、好適には、真核生物の発現ベクターに挿入されている。

【 0 1 8 2 】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの所望のポリペプチド (例えば、二重特異性抗体) の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2 など)、ウシバビローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) などのウイルスのゲノムから得られたプロモーターによって、異種哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーター、または熱ショックプロモーター由来のプロモーターによって制御され、ただしこのようなプロモーターは、宿主細胞系に適合している。

【 0 1 8 3 】

S V 4 0 ウイルスの初期および後期プロモーターは、S V 4 0 ウイルス複製起点も含有する S V 4 0 制限断片として都合よく得られる。ヒトサイトメガロウイルスの前初期プロモーターは、H i n d 1 1 1 E 制限断片として都合よく得られる。米国特許第 4 , 4 1 9 , 4 4 6 号に、ベクターとしてウシバビローマウイルスを使用して哺乳動物宿主中で D N A を発現するための系が開示されている。米国特許第 4 , 6 0 1 , 9 7 8 号に、この系の改変が記載されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下におけるマウス細胞におけるヒト - インターフェロン c D N A の発現については、R e y e s ら、N a t u r e 2 9 7 巻 : 5 9 8 ~ 6 0 1 頁 (1 9 8 2 年) も参照されたい。代替として、ラウス肉腫ウイルスの末端反復配列 (l o n g t e r m i n a l r e p e a t) をプロモーターとして使用することができる。

【 0 1 8 4 】

高等真核生物による所望の抗体をコードする D N A の転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加させることができる。現在、哺乳動物遺伝子 (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン遺伝子) 由来の多くのエンハンサー配列が公知である。また、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーも使用することができる。例としては、複製起点の後期側における S V 4 0 エンハンサー (b p 1 0 0 ~ 2 7 0)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側におけるポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。また、真核生物プロモーターの活性化を強化するためのエレメントの説明に関しては、Y a n i v、N a t u r e 2 9 7 巻 : 1 7 ~ 1 8 頁 (1 9 8 2 年) も参照されたい。エンハンサーは、強化が達成されるという条件で、抗体のポリペプチドコード配列に対して 5' 位または 3' 位でベクターにスプライシングされ得るが、一般的にプロモーターから 5' の部位に配置される。

【 0 1 8 5 】

真核宿主細胞で使用する発現ベクターは、典型的には、転写の終結およびmRNAの安定化のために必要な配列も含有する。このような配列は、一般的に、5'、場合によっては3'の真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分中に、ポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終結構成要素は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026およびそこで開示された発現ベクターを参照されたい。

【 0 1 8 6 】

本明細書におけるベクター中のDNAをクローニングまたは発現するのに好適な宿主細胞としては、本明細書に記載される高等真核生物細胞、例えば脊椎動物宿主細胞などが挙げられる。培養（組織培養）での脊椎動物細胞の増殖は、慣例的手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40で形質転換したサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胎児腎臓株（懸濁培養での成長のためにサブクローニングされた293または293細胞、Grahamら、J. Gen Virol. 36巻：59号（1977年））；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巢細胞ノ-DHFR（CHO、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77巻：4216号（1980年））；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather、Biol. Reprod. 23巻：243～251頁（1980年））；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；パッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳がん（MMT060562、ATCC CCL 51）；TRI細胞（Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383巻：44～68頁（1982年））；MRC 5細胞；FS 4細胞；およびヒト肝癌株（Hep G2）である。

【 0 1 8 7 】

宿主細胞は、所望のポリペプチド（例えば、二重特異性抗体）産生のために上述した発現またはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導したり、形質転換体を選択したり、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅したりするために適宜改変された従来の栄養培地中で培養される。

【 0 1 8 8 】

所望のポリペプチド（例えば、二重特異性抗体）を産生するのに使用される宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。市販の培地、例えばハムF10（Sigma）、最小必須培地（MEM）、（Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、およびダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Sigmaなどが、宿主細胞の培養に好適である。加えて、Hamら、Meth. Enz. 58巻：44号（1979年）、Barnesら、Anal. Biochem. 102巻：255号（1980年）、米国特許第4,767,704号；4,657,866号；4,927,762号；4,560,655号；もしくは5,122,469号；WO90/03430；WO87/00195；または米国特許再発行第30,985号に記載される培地のいずれかを、宿主細胞のための培養培地として使用することができる。これらの培地のいずれかに、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の成長因子（例えばインスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子など）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびホスフェートなど）、緩衝液（例えばHEPESなど）、ヌクレオチド（例えばアデノシンおよびチミジンなど）、抗生物質（例えばGENTAMYCIN（商標）薬物など）、微量元素（通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、およびグルコースまたは同等のエネルギー源が補充されていてもよい。また他のあらゆる

る必要な補充物質が、当業者に公知であろう適切な濃度で含まれていてもよい。培養条件、例えば温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞でこれまでに使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

【0189】

組換え技術を使用する場合、二重特異性抗体は、細胞内で産生させることもできるし、または培地に直接分泌させることもできる。第1のステップとして、二重特異性抗体が細胞内で産生される場合、宿主細胞または溶解した断片のいずれかである微粒子残屑を、例えば遠心分離または限外濾過によって除去する。二重特異性抗体が培地に分泌される場合、このような発現系からの上清は、一般的に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用してまず濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、プロテアーゼ阻害剤、例えばPMSEFなどが、前述のステップのいずれかに含まれてもよいし、偶発的な汚染物質の成長を防ぐために、抗生物質が含まれてもよい。

【0190】

細胞から調製された二重特異性組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができる。プロテインAの親和性リガンドとしての適性は、抗体中に存在するいずれかの免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、または4重鎖をベースとする抗体を精製するのに使用することができる(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62巻:1~13頁(1983年))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプおよびヒト3に推奨されている(Gussら、EMBO J. 5巻:1567~1575頁(1986年))。親和性リガンドを結合させたマトリクスは、ほとんどの場合、アガロースであるが、他のマトリクスも利用可能である。機械的に安定なマトリクス、例えば制御多孔質ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどは、アガロースで達成可能なものより速い流量およびより短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J. T. Baker、Phillipsburg、NJ)が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE(商標)でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラムなど)でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿なども、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0191】

いずれの予備的な精製ステップの後でも、目的の抗体および汚染物質を含む混合物は、約2.5~4.5のpHで溶出緩衝液を使用した、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0~0.25Mの塩から)で実行される低pHの疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することができる。二重特異性抗体の産生は、(前述の特定の方法のいずれかの)代替として、またはそれに加えて、ポリペプチドの混合物を含む溶液を透析することを含んでもよい。

【0192】

組換えバキュロウイルスは、例えばリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販されている)を使用して、昆虫細胞、例えばSpodoptera frugiperda細胞(例えば、Sf9細胞;ATCC CRL1711)またはDrosophila melanogaster S2細胞などに、抗体または抗体断片をコードするプラスミドとBaculoGold(商標)ウイルスDNA(Pharmingen)とを共にトランスフェクトすることによって生成することができる。特定の例において、抗体配列は、バキュロウイルス発現ベクター内に含有されているエピトープタグの上流で融合される。このようなエピトープタグとしては、ポリ-Hisタグが挙げられる。例えば市販のプラスミド、例えばpVL1393(Novagen)またはpAcGP67B(Pharm

ingen) に由来するプラスミドなどの様々なプラスミドを採用することができる。簡単に言えば、抗体またはその断片をコードする配列は、5' および 3' 領域に相補的なプライマーを用いた PCR によって増幅することができる。5' プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を組み込んでいてもよい。次いでその産物を選択された制限酵素で消化し、発現ベクターにサブクローニングしてもよい。

【0193】

発現ベクターでのトランスフェクションの後、宿主細胞(例えば、Sf9細胞)を28で4~5日インキュベートし、放出されたウイルスを採取し、さらなる増幅に使用する。ウイルス感染およびタンパク質発現は、例えば、O'Reillyら、(Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994年))によって記載されたようにして実行することができる。

【0194】

次いで、発現されたポリ-Hisタグを有する抗体は、例えば、Ni²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーによって以下のようにして精製することができる。抽出物は、Rupertら(Nature 362巻: 175~179頁(1993年))により記載されるようにして組換えウイルスで感染させたSf9細胞から調製することができる。簡単に言えば、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理緩衝液(25mLのHEPES、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mMのEDTA; 10%グリセロール; 0.1%NP-40; 0.4MのKCl)に再懸濁し、氷上で20秒間、2回超音波処理する。超音波処理物(sonicate)を遠心分離によって清澄化し、上清をローディング緩衝液(50mMのホスフェート; 300mMのNaCl; 10%グリセロール、pH7.8)で50倍に希釈し、0.45μmのフィルターに通過させて濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販されている)を5mLのベッド体積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出物を毎分0.5mLでカラムにローディングする。カラムをA280のベースラインまでローディング緩衝液で洗浄し、その時点で画分の収集を開始する。次にカラムを二次洗浄緩衝液(50mMのホスフェート; 300mMのNaCl; 10%グリセロール、pH6.0)で洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を溶出させる。A280のベースラインに再度到達した後、カラムを、二次洗浄緩衝液中の0から500mMのイミダゾール勾配で展開する。1mLの画分を収集し、SDS-PAGE、および銀染色またはアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたNi²⁺-NTA(Qiagen)でのウェスタンブロットによって分析する。溶出したHis10-タグを有する抗体を含有する画分をプールし、ローディング緩衝液に対して透析する。

【0195】

代替として、抗体の精製は、公知のクロマトグラフィー技術、例えばプロテインAまたはプロテインGカラムクロマトグラフィーなどを使用して実行することができる。一実施形態において、目的の抗体は、カラムの固相から、カオトロピック剤または温和な洗浄剤を含有する溶液への溶出によって回収することができる。例示的なカオトロピック剤および温和な洗浄剤としては、これらに限定されないが、グアニジン-HCl、尿素、過塩素酸リチウム(lithium perchlorate)、アルギニン、ヒスチジン、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、Tween、Triton、およびNP-40が挙げられ、これらはいずれも市販されている。

【0196】

標的分子

本明細書に記載される二重特異性抗体によって標的化することができる分子の例としては、これらに限定されないが、可溶性血清タンパク質およびその受容体、ならびに他の膜結合タンパク質(例えば、アドヘシン)が挙げられる。可溶性抗原またはその断片は、任意選択で他の分子にコンジュゲートしていてもよく、抗体を生成するための免疫原として使用することができる。膜貫通分子、例えば受容体の場合、これらの断片(例えば、受容

体の細胞外ドメイン)を免疫原として使用することができる。代替として、膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として使用することができる。このような細胞は、天然の供給源(例えば、がん細胞株)由来であってもよいし、または膜貫通分子を発現するように組換え技術で形質転換した細胞であってもよい。他の抗原およびその抗体調製に有用な形態は、当業者に明らかであろう。

【0197】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、BMP1、BMP2、BMP3B(GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(aFGF)、FGF2(bFGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNBI、IFNG、IFNWI、FELI、FELI(EPSELON)、FELI(ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA(TNF-b)、LTB、TNF(TNF-a)、TNFSF4(OX40リガンド)、TNFSF5(CD40リガンド)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27リガンド)、TNFSF8(CD30リガンド)、TNFSF9(4-1BBリガンド)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(AP03L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、HGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIR、HGF、LEP(レプチン)、PTN、およびTHPOからなる群より選択される、1つ、2つまたはそれよりも多くのサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質、およびサイトカイン受容体に結合することが可能である。

【0198】

ある特定の実施形態において、標的分子は、CCL1(I-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCL11(エオタキシン)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MDP-3b)、CCL20(MIP-3a)、CCL21(SLC/エキソダス(exodus)-2)、CCL22(MDC/STC-I)、CCL23(MPIF-I)、CCL24(MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL25(TECK)、CCL26(エオタキシン-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1(GRO1)、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP10)、CXCL11(I-TAC)、CXCL12(SDFI)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4(CXCL4)、PPBP(CXCL7)、CX3CL1(SCYDI)、SCYEI、XCLI(リンフォタクチン)、XCL2(SCM-1b)、BLR

1 (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-1RB/RA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8Ra)、IL8RB (IL8Rb)、LTBR4 (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1A、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2、およびVHLからなる群より選択される、ケモカイン、ケモカイン受容体、またはケモカイン関連のタンパク質である。

【0199】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、ABCFI；ACVRI；ACVRI B；ACVR2；ACVR2 B；ACVRLI；ADORA2A；アグリカン；AGR2；AICDA；AIR；AIGI；AKAPI；AKAP2；AMH；AMHR2；ANGPT1；ANGPT2；ANGPTL3；ANGPTL4；ANPEP；APC；APOCI；AR；AZGPI（垂鉛-a-糖タンパク質）；B7.1；B7.2；BAD；BAFF (Blys)；BAGI；BAN；BCL2；BCL6；BDNF；BLNK；BLRI (MDR15)；BMP1；BMP2；BMP3B (GDFIO)；BMP4；BMP6；BMP8；BMPRIA；BMPRI B；BMPR2；BPAGI (プレクチン)；BRCAI；C19orf10 (IL27w)；C3；C4A；C5；C5R1；CANTI；CASP1；CASP4；CAVI；CCBP2 (D6/JAB61)；CCLI (1~309)；CCLII (エオタキシン)；CCL13 (MCP-4)；CCL15 (MIP-1d)；CCL16 (HCC-4)；CCL17 (TARC)；CCL18 (PARC)；CCL19 (MIP-3b)；CCL2 (MCP-1)；MCAF；CCL20 (MIP-3a)；CCL21 (MTP-2)；SLC；エキソダス-2；CCL22 (MDC/STC-I)；CCL23 (MPIF-1)；CCL24 (MPIF-2/エオタキシン-2)；CCL25 (TECK)；CCL26 (エオタキシン-3)；CCL27 (CTACK/ILC)；CCL28；CCL3 (MTP-1a)；CCL4 (MDP-1b)；CCL5 (RANTES)；CCL7 (MCP-3)；CCL8 (mcp-2)；CCNA1；CCNA2；CCND1；CCNE1；CCNE2；CCR1 (CKR1/HM145)；CCR2 (mcp-1RB/RA)；CCR3 (CKR3/CMKBR3)；CCR4；CCR5 (CMKBR5/ChemR13)；CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)；CCR7 (CKR7/EBI1)；CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)；CCR9 (GPR-9-6)；CCRL1 (VSHK1)；CCRL2 (L-CCR)；CD164；CD19；CDIC；CD20；CD200；CD22；CD24；CD28；CD3；CD37；CD38；CD3E；CD3G；CD3Z；CD4；CD40；CD40L；CD44；CD45RB；CD52；CD69；CD72；CD74；CD79A；CD79B；CD8；CD80；CD81；CD83；CD86；CDH1 (E-カドヘリン)；CDH10；CDH12；CDH13；CDH18；CDH19；CDH20；CDH5；CDH7；CDH8；CDH9；CDK2；CDK3；CDK4；CDK5；CDK6；CDK7；CDK9；CDKNIA (p21Wapl/Cipl)；CDKNIB (p27Kipl)；CDKNIC；CDKN2A (P16INK4a)；CDKN2B；CDKN2C；CDKN3；CEBPB；CERI；CHGA；CHGB；

キチナーゼ; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7
(クローディン-7); CLN3; CLU(クラスタリン); CMKLRI; CMKOR
I(RDCI); CNRI; COL18A1; COLIAI; COL4A3; COL6A
1; CR2; CRP; CSFI(M-CSF); CSF2(GM-CSF); CSF3(G
CSF); CTLA4; CTNNBI(b-カテニン); CTSB(カテプシンB);
CX3CL1(SCYD1); CX3CR1(V28); CXCL1(GRO1); CX
CL10(IP-10); CXCL11(1-TAC/IP-9); CXCL12(SD
F1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2(GRO2); CX
CL3(GRO3); CXCL5(ENA-78/LIX); CXCL6(GCP-2);
CXCL9(MIG); CXCR3(GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR
6(TYMSTR/STR/L33/Bonzon); CYB5; CYC1; CYSLTR1
; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F
1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFN2; EGF; EGFR;
ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2
(Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3(TF); FADD;
FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1(a
FGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF1
4; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2(bFGF); FGF
20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3(int-2); FGF4(HS
T); FGF5; FGF6(HST-2); FGF7(KGF); FGF8; FGF9;
FGFR3; FIGF(VEGFD); FELI(EPSILON); FILI(ZET
A); FLJ12584; FLJ25530; FLRTI(フィブロネクチン); FLT
I; FOS; FOSLI(FRA-I); FY(DARC); GABRP(GABAa)
; GAGEBI; GAGECI; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; G
FI1; GGT1; GM-CSF; GNASI; GNRHI; GPR2(CCRIO);
GPR31; GPR44; GPR81(FKSG80); GRCC10(C10); GR
P; GSN(ゲルソリン); GSTPI; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HD
AC7A; HDAC9; HGF; HIFIA; HDPI; ヒスタミンおよびヒスタミン受
容体; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOXI; HUMCYT2A; ICE
BERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; I
FNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFNガンマ; DFNWI; IGBP
1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; I
L-1; IL10; MORA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; I
L12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1;
IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B
; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP;
IL19; IL1A; IL1B; ILIF10; IL1F5; IL1F6; IL1F7;
IL1F8; IL1F9; IL1HYI; IL1RI; IL1R2; IL1RAP; IL
1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2、ILIRN; IL2;
IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL2
3; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; I
L2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R
; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST(糖タンパク質130); EL7
; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK
; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAKI; ERAK2; ITGA
1; ITGA2; ITGA3; ITGA6(a6インテグリン); ITGAV; ITGB
3; ITGB4(b4インテグリン); JAGI; JAKI; JAK3; JUN; K6H
F; KAN; KDR; KITLG; KLF5(GC Box BP); KLF6; KLK
IO; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK

5 ; K L K 6 ; K L K 9 ; K R T 1 ; K R T 1 9 (ケラチン 1 9) ; K R T 2 A ; K H T H B 6 (毛髪特異的 H 型ケラチン) ; L A M A S ; L E P (レブチン) ; L i n g o - p 7 5 ; L i n g o - T r o y ; L P S ; L T A (T N F - b) ; L T B ; L T B 4 R (G P R 1 6) ; L T B 4 R 2 ; L T B R ; M A C M A R C K S ; M A G または O m g p ; M A P 2 K 7 (c - J u n) ; M D K ; M I B I ; ミッドカイン ; M E F ; M I P - 2 ; M K I 6 7 ; (K i - 6 7) ; M M P 2 ; M M P 9 ; M S 4 A 1 ; M S M B ; M T 3 (メタロチオネクチン - I I I) ; M T S S I ; M U C I (ムチン) ; M Y C ; M Y D 8 8 ; N C K 2 ; ニューロカン ; N F K B I ; N F K B 2 ; N G F B (N G F) ; N G F R ; N g R - L i n g o ; N g R - N o g o 6 6 (N o g o) ; N g R - p 7 5 ; N g R - T r o y ; N M E 1 (N M 2 3 A) ; N O X 5 ; N P P B ; N R O B 1 ; N R O B 2 ; N R I D 1 ; N R I D 2 ; N R 1 H 2 ; N R 1 H 3 ; N R 1 H 4 ; N R 1 I 2 ; N R 1 I 3 ; N R 2 C 1 ; N R 2 C 2 ; N R 2 E 1 ; N R 2 E 3 ; N R 2 F 1 ; N R 2 F 2 ; N R 2 F 6 ; N R 3 C 1 ; N R 3 C 2 ; N R 4 A 1 ; N R 4 A 2 ; N R 4 A 3 ; N R 5 A 1 ; N R 5 A 2 ; N R 6 A 1 ; N R P 1 ; N R P 2 ; N T 5 E ; N T N 4 ; O D Z 1 ; O P R D 1 ; P 2 R X 7 ; P A P ; P A R T 1 ; P A T E ; P A W R ; P C A 3 ; P C N A ; P D G F A ; P D G F B ; P E C A M 1 ; P F 4 (C X C L 4) ; P G F ; P G R ; ホスファカン ; P I A S 2 ; P I K 3 C G ; P L A U (u P A) ; P L G ; P L X D C I ; P P B P (C X C L 7) ; P P I D ; P R I ; P R K C Q ; P R K D I ; P R L ; P R O C ; P R O K 2 ; P S A P ; P S C A ; P T A F R ; P T E N ; P T G S 2 (C O X - 2) ; P T N ; R A C 2 (p 2 1 R a c 2) ; R A R B ; R G S I ; R G S 1 3 ; R G S 3 ; R N F I I O (Z N F 1 4 4) ; R O B 0 2 ; S 1 0 0 A 2 ; S C G B 1 D 2 (リポフィリン B) ; S C G B 2 A 1 (マンマグロビン 2) ; S C G B 2 A 2 (マンマグロビン 1) ; S C Y E I (内皮単球活性化サイトカイン) ; S D F 2 ; S E R P I N A 1 ; S E R P I N A 3 ; S E R P I N B 5 (マスピン) ; S E R P I N E I (P A I - 1) ; S E R P D M F 1 ; S H B G ; S L A 2 ; S L C 2 A 2 ; S L C 3 3 A 1 ; S L C 4 3 A 1 ; S L I T 2 ; S P P I ; S P R R I B (S p r 1) ; S T 6 G A L 1 ; S T A B I ; S T A T 6 ; S T E A P ; S T E A P 2 ; T B 4 R 2 ; T B X 2 1 ; T C P I O ; T D G F I ; T E K ; T G F A ; T G F B I ; T G F B I I I ; T G F B 2 ; T G F B 3 ; T G F B I ; T G F B R I ; T G F B R 2 ; T G F B R 3 ; T H I L ; T H B S 1 (トロンボスポンジン - 1) ; T H B S 2 ; T H B S 4 ; T H P O ; T I E (T i e - 1) ; T M P 3 ; 組織因子 ; T L R 1 0 ; T L R 2 ; T L R 3 ; T L R 4 ; T L R 5 ; T L R 6 ; T L R 7 ; T L R 8 ; T L R 9 ; T N F ; T N F - a ; T N F A E P 2 (B 9 4) ; T N F A I P 3 ; T N F R S F I I A ; T N F R S F I A ; T N F R S F I B ; T N F R S F 2 1 ; T N F R S F 5 ; T N F R S F 6 (F a s) ; T N F R S F 7 ; T N F R S F 8 ; T N F R S F 9 ; T N F S F 1 0 (T R A I L) ; T N F S F I 1 (T R A N C E) ; T N F S F 1 2 (A P 0 3 L) ; T N F S F 1 3 (A p r i l) ; T N F S F 1 3 B ; T N F S F 1 4 (H V E M - L) ; T N F S F 1 5 (V E G I) ; T N F S F 1 8 ; T N F S F 4 (O X 4 0 リガンド) ; T N F S F 5 (C D 4 0 リガンド) ; T N F S F 6 (F a s L) ; T N F S F 7 (C D 2 7 リガンド) ; T N F S F 8 (C D 3 0 リガンド) ; T N F S F 9 (4 - 1 B B リガンド) ; T O L L I P ; T o l l 様受容体 ; T O P 2 A (トポイソメラーゼ E a) ; T P 5 3 ; T P M I ; T P M 2 ; T R A D D ; T R A F I ; T R A F 2 ; T R A F 3 ; T R A F 4 ; T R A F 5 ; T R A F 6 ; T R E M I ; T R E M 2 ; T R P C 6 ; T S L P ; T W E A K ; V E G F ; V E G F B ; V E G F C ; パーシカン ; V H L C 5 ; V L A - 4 ; X C L I (リンフォタクチン) ; X C L 2 (S C M - 1 b) ; X C R I (G P R 5 / C C X C R I) ; Y Y I ; および Z F P M 2 からなる群より選択される 1 つまたは複数の標的に結合することが可能である。

【 0 2 0 0 】

本発明に包含される抗体のための分子標的分子としては、CDタンパク質、例えばCD 3、CD 4、CD 8、CD 16、CD 19、CD 20、CD 34、CD 64、CD 200

など、E r b B 受容体ファミリーのメンバー、例えばE G F 受容体、H E R 2、H E R 3 またはH E R 4 受容体など；細胞接着分子、例えばL F A - 1、M a d、p 1 5 0、9 5、V L A - 4、I C A M - 1、V C A M、アルファ4 / ベータ7 インテグリン、およびアルファv / ベータ3 インテグリンなど、例えばそれらのアルファまたはベータサブユニットのいずれかなど（例えば、抗C D 1 1 a、抗C D 1 8 または抗C D 1 1 b 抗体）；成長因子、例えばV E G F - A、V E G F - C など；組織因子（T F）；アルファインターフェロン（アルファI F N）；T N F アルファ、インターロイキン、例えばI L - 1 ベータ、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 8、I L - 9、I L - 1 3、I L 1 7 A / F、I L - 1 8、I L - 1 3 R アルファ1、I L 1 3 R アルファ2、I L - 4 R、I L - 5 R、I L - 9 R、I g E など；血液型抗原；f l k 2 / f l t 3 受容体；肥満（O B）受容体；m p l 受容体；C T L A - 4；R A N K L、R A N K、R S V F タンパク質、プロテインCなどが挙げられる。

【0201】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質（L R P）- 1 もしくはL R P - 8 またはトランスフェリン受容体、ならびに1）ベータ - セクレターゼ（B A C E 1 またはB A C E 2）、2）アルファ - セクレターゼ、3）ガンマ - セクレターゼ、4）タウ - セクレターゼ、5）アミロイド前駆タンパク質（A P P）、6）死受容体6（D R 6）、7）アミロイドベータペプチド、8）アルファ - シヌクレイン、9）パーキン、10）ハンチンチン、11）p 7 5 N T R、および12）カスパーゼ - 6 からなる群より選択される少なくとも1つの標的に結合する。

【0202】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、I L - 1 アルファおよびI L - 1 ベータ、I L - 1 2 およびI L - 1 8；I L - 1 3 およびI L - 9；I L - 1 3 およびI L - 4；I L - 1 3 およびI L - 5；I L - 5 およびI L - 4；I L - 1 3 およびI L - 1 ベータ；I L - 1 3 およびI L - 2 5；I L - 1 3 およびT A R C；I L - 1 3 およびM D C；I L - 1 3 およびM E F；I L - 1 3 およびT G F -；I L - 1 3 およびL H R アゴニスト；I L - 1 2 およびT W E A K、I L - 1 3 およびC L 2 5；I L - 1 3 およびS P R R 2 a；I L - 1 3 およびS P R R 2 b；I L - 1 3 およびA D A M 8、I L - 1 3 およびP E D 2、I L 1 7 A およびI L 1 7 F、C D 3 およびC D 1 9、C D 1 3 8 およびC D 2 0；C D 1 3 8 およびC D 4 0；C D 1 9 およびC D 2 0；C D 2 0 およびC D 3；C D 3 8 およびC D 1 3 8；C D 3 8 およびC D 2 0；C D 3 8 およびC D 4 0；C D 4 0 およびC D 2 0；C D - 8 およびI L - 6；C D 2 0 およびB R 3、T N F アルファおよびT G F - ベータ、T N F アルファおよびI L - 1 ベータ；T N F アルファおよびI L - 2、T N F アルファおよびI L - 3、T N F アルファおよびI L - 4、T N F アルファおよびI L - 5、T N F アルファおよびI L 6、T N F アルファおよびI L 8、T N F アルファおよびI L - 9、T N F アルファおよびI L - 1 0、T N F アルファおよびI L - 1 1、T N F アルファおよびI L - 1 2、T N F アルファおよびI L - 1 3、T N F アルファおよびI L - 1 4、T N F アルファおよびI L - 1 5、T N F アルファおよびI L - 1 6、T N F アルファおよびI L - 1 7、T N F アルファおよびI L - 1 8、T N F アルファおよびI L - 1 9、T N F アルファおよびI L - 2 0、T N F アルファおよびI L - 2 3、T N F アルファおよびI F N アルファ、T N F アルファおよびC D 4、T N F アルファおよびV E G F、T N F アルファおよびM I F、T N F アルファおよびI C A M - 1、T N F アルファおよびP G E 4、T N F アルファおよびP E G 2、T N F アルファおよびR A N K リガンド、T N F アルファおよびT e 3 8；T N F アルファおよびB A F F；T N F アルファおよびC D 2 2；T N F アルファおよびC T L A - 4；T N F アルファおよびG P 1 3 0；T N F a およびI L - 1 2 p 4 0；V E G F およびH E R 2、V E G F - A およびH E R 2、V E G F - A およびP D G F、H E R 1 およびH E R 2、V E G F - A およびV E G F - C、V E G F - C およびV E G F - D、H E R 2 およびD R 5、V E G F およびI L - 8、V E G F およびM E T、V E G F

R および M E T 受容体、V E G F R および E G F R、H E R 2 および C D 6 4、H E R 2 および C D 3、H E R 2 および C D 1 6、H E R 2 および H E R 3；E G F R (H E R 1) および H E R 2、E G F R および H E R 3、E G F R および H E R 4、I L - 1 3 および C D 4 0 L、I L 4 および C D 4 0 L、T N F R 1 および I L - 1 R、T N F R 1 および I L - 6 R および T N F R 1 および I L - 1 8 R、E p C A M および C D 3、M A P G および C D 2 8、E G F R および C D 6 4、C S P G および R G M A；C T L A - 4 および B T N 0 2；I G F 1 および I G F 2；I G F 1 / 2 および E r b 2 B；M A G および R G M A；N g R および R G M A；N o g o A および R G M A；O M G p および R G M A；P D L - 1 および C T L A - 4；ならびに R G M A および R G M B からなる群より選択される少なくとも 2 つの標的分子に結合する。

【0203】

二重特異性抗体の例

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、H E R 2 および E G F R / H E R 3 に同時に結合する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、抗 H E R 2 抗体であるペルツズマブ由来の軽 (L ') および重 (H ') 鎖、および抗 E G F R / H E R 3 抗体である D L 1 1 由来の軽 (L ") および重 (H ") 鎖を含む。一部の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 Q 1 2 4 および N 1 3 7 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペルツズマブの定常軽鎖ドメイン (C L ') を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D (K a b a t の番号付けの慣例) である。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、配列番号 1 5 に記載の置換を有するペルツズマブの軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペルツズマブの C H 1 ' ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、L 1 2 4 V および L 1 4 3 A (K a b a t の番号付けの慣例) である。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、E 3 7 8 および K 4 4 0 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペルツズマブの C H 3 ' ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、E 3 7 8 K および K 4 4 0 R (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 1 6 に記載の置換を有するペルツズマブの重鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7 および T 1 7 8 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有する D L 1 1 の定常軽鎖ドメイン (C L ") を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 1 7 に記載の置換を有する D L 1 1 の軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 K 1 4 5、H 1 7 2 および S 1 8 8 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有する D L 1 1 の C H 1 " ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D および S 1 8 8 W (K a b a t の番号付けの慣例) である。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、K 3 9 3 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有する D L 1 1 の C H 3 " ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 3 9 3 E (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 1 8 に記載の置換を有する D L 1 1 の重鎖を含む。一部の態様において、二重特異性抗体は、C L 変異を有するペルツズマブの軽鎖 (配列番号 1 5)、C H 1 および C H 3 変異を有するペルツズマブの重鎖 (配列番号 1 6)、C L 変異を有する D L 1 1 の軽鎖 (配列番号 1 7) ならびに C H 1 および C H 3 変異を有する D L 1 1 の重鎖 (配列番号 1 8) を含む。

【0204】

ペルツズマブおよび D L 1 1 の重鎖および軽鎖を含む二重特異性抗体は、両方の単一特異性の親抗体の機能的な特徴を保持する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体およびペルツズマブは、H E R 2 に結合し、D L 1 1 は結合しない。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、2 0 0 ~ 5 0 p M の範囲の K d で H E R 2 に結合する。ある特定の実施形態において、K d は、約 1 0 0 p M である。ある特定の実施形態において

、二重特異性抗体およびD L 1 1は、H E R 1およびH E R 3に結合し、ペルツズマブは結合しない。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、2 0 0 ~ 5 0 p Mの範囲のK dでH E R 1およびH E R 2に結合する。ある特定の実施形態において、K dは、約1 0 0 p Mである。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、H E R 1、H E R 2およびH E R 3に同時に結合し、それに対して単一特異性の親抗体はそれらに結合できない。

【0 2 0 5】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、C D 2 0に結合する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、リツキシマブ由来の軽(L')および重(H')鎖、ならびにオビヌツズマブ由来の軽(L'')および重(H'')鎖を含む。一部の態様において、二重特異性抗体は、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を含有するリツキシマブの定常軽鎖ドメイン(C L')を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 DおよびN 1 3 7 D(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号19に記載の置換を有するリツキシマブの軽鎖を含む。一部の態様において、二重特異性抗体は、残基L 1 2 4およびL 1 4 3(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するリツキシマブのC H 1'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、L 1 2 4 VおよびL 1 4 3 A(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、K 3 9 3(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するリツキシマブのC H 3'ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 3 9 3 E(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号20に記載の置換を有するリツキシマブの重鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基Q 1 2 4、N 1 3 7およびT 1 7 8(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するオビヌツズマブの定常軽鎖ドメイン(C L'')を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 KおよびT 1 7 8 A(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号21に記載の置換を有するオビヌツズマブの軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基K 1 4 5、H 1 7 2およびS 1 8 8(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するオビヌツズマブのC H 1''ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 1 4 5 D、H 1 7 2 DおよびS 1 8 8 W(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、E 3 7 8およびK 4 4 0(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するオビヌツズマブのC H 3''ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、E 3 7 8 KおよびK 4 4 0 R(K a b a tの番号付けの慣例)である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号22に記載の置換を有するオビヌツズマブの重鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、C L変異を有するリツキシマブの軽鎖(配列番号19)、C H 1およびC H 3変異を有するリツキシマブの重鎖(配列番号20)、C L変異を有するオビヌツズマブの軽鎖(配列番号21)、ならびにC H 1およびC H 3変異を有するオビヌツズマブの重鎖(配列番号22)を含む。

【0 2 0 6】

リツキシマブおよびオビヌツズマブの重鎖および軽鎖を含む二重特異性抗体は、両方の単一特異性の親抗体の機能的な特徴を保持する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体およびオビヌツズマブは、アポトーシスおよび補体依存性細胞傷害を誘導し、リツキシマブはそれらを誘導しない。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、両方の単一特異性の親抗体に類似したレベルに抗体依存性細胞傷害を誘導する。

【0 2 0 7】

ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、P D 1およびV E G Fに結合する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、抗P D 1抗体であるニボルマブ由来の軽(L')および重(H')鎖、および抗V E G F抗体であるペバシズマブ由来の軽(L'')および重(H'')鎖を含む。一部の態様において、二重特異性抗体は、残基Q 1 2 4およびN 1 3 7(K a b a tの番号付けの慣例)に置換を有するニボルマブの定常軽鎖ド

メイン (C L') を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 D および N 1 3 7 D (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 23 に記載の置換を有するニボルマブの軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 L 1 2 4 および L 1 4 3 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するニボルマブの C H 1' ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、L 1 2 4 V および L 1 4 3 A (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、K 3 9 3 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するニボルマブの C H 3' ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 3 9 3 E (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 24 に記載の置換を有するニボルマブの重鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 Q 1 2 4、N 1 3 7 および T 1 7 8 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペバシズマブの定常軽鎖ドメイン (C L") を含む。ある特定の実施形態において、置換は、Q 1 2 4 K、N 1 3 7 K および T 1 7 8 A (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 25 に記載の置換を有するペバシズマブの軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、残基 K 1 4 5、H 1 7 2 および S 1 8 8 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペバシズマブの C H 1" ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、K 1 4 5 D、H 1 7 2 D および S 1 8 8 W (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、E 3 7 8 および K 4 4 0 (K a b a t の番号付けの慣例) に置換を有するペバシズマブの C H 3" ドメインを含む。ある特定の実施形態において、置換は、E 3 7 8 K および K 4 4 0 R (K a b a t の番号付けの慣例) である。一部の態様において、二重特異性抗体は、配列番号 26 に記載の置換を有するペバシズマブの重鎖を含む。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、C L 変異を有するニボルマブの軽鎖 (配列番号 23)、C H 1 および C H 3 変異を有するニボルマブの重鎖 (配列番号 24)、C L 変異を有するペバシズマブの軽鎖 (配列番号 25)、ならびに C H 1 および C H 3 変異を有するペバシズマブの重鎖 (配列番号 26) を含む。

【0208】

ニボルマブおよびペバシズマブの重鎖および軽鎖を含む二重特異性抗体は、両方の単一特異性の親抗体の機能的な特徴を保持する。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、P D 1 および V E G F に同時に結合し、それに対して単一特異性の親抗体はそれらに結合できない。

【0209】

活性アッセイ

本明細書に記載される二重特異性抗体は、当該分野において公知の様々なアッセイによって、それらの物理的 / 化学的特性および生物学的機能に関して特徴付けることができる。

【0210】

精製された二重特異性抗体はさらに、これらに限定されないが、N 末端シーケンシング、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー (H P L C)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィーおよびババイン消化などの一連のアッセイによって特徴付けることができる。

【0211】

ある特定の実施形態において、本明細書において産生された二重特異性抗体は、それらの生物活性に関して分析される。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体は、それらの抗原結合活性に関して試験される。当該分野において公知であり、本明細書において使用できる抗原結合アッセイとしては、これらに限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、E L I S A (酵素結合イムノソルベント検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテイン A イムノアッセイなど技術を使用するあらゆる直接的または競合結合アッセイが挙げられる。例示的な抗原結合アッセイは、以下の実施例の章で提供される。

【0212】

ある特定の実施形態において、本発明は、*in vivo*における抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（例えば補体およびADCCなど）が不必要であるかまたは有害である多くの適用のための所望の候補にする、全てではないが一部のエフェクター機能を有する変更された抗体を予期する。ある特定の実施形態において、産生されたヘテロ多量体タンパク質のFc活性を測定して、所望の特性のみが維持されていることを確実にする。*in vitro*および/または*in vivo*の細胞傷害性アッセイを行って、CDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行って、ヘテロ多量体タンパク質が、FcR結合を欠いているが（したがってADCC活性を欠いている可能性がある）、FcRn結合能力を保持することを確実にすることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現し、それに対して単球は、FcRI、FcγRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol. 9巻：457～92頁（1991年）の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するための*in vitro*のアッセイの例は、米国特許第5,500,362号または5,821,337号に記載されている。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代替として、または加えて、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、動物モデル、例えばClynesら、PNAS（USA）95巻：652～656頁（1998年）で開示されたものなどで評価してもよい。またC1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合できず、したがってCDC活性を欠いていることを確認することもできる。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202巻：163頁（1996年）に記載されたようにして実行することができる。FcRn結合および*in vivo*でのクリアランス/半減期の決定はまた、当該分野において公知の方法を使用して実行することもできる。

【0213】

コンジュゲートしたタンパク質

本発明はまた、本明細書に記載される二重特異性抗体のいずれかを含む、コンジュゲートしたタンパク質、例えばコンジュゲートした二重特異性抗体またはイムノコンジュゲート（例えば、「抗体-薬物コンジュゲート」または「ADC」）であって、軽鎖または重鎖の定常領域のうちの1つが、化学的分子、例えば色素もしくは細胞傷害剤、例えば化学療法剤、薬物、成長阻害薬剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートしている、コンジュゲートしたタンパク質も提供する。特に、本明細書に記載される定常ドメインの使用は、2つの異なる重鎖（H'およびH''）に加えて2つの異なる軽鎖（L'およびL''）を含有する抗体の構築を可能にする。本明細書に記載される方法を使用して構築されたイムノコンジュゲートは、重鎖（H'またはH''）の一方のみまたは軽鎖（L'またはL''）の一方のみの定常領域にコンジュゲートした細胞傷害剤を含有していてもよい。また、イムノコンジュゲートは、一つのみの重鎖または軽鎖に結合した細胞傷害剤を有し得るため、両方の重鎖または軽鎖に結合した細胞傷害剤を有する抗体の投与に比べて、被験体に投与される細胞傷害剤の量が低減される。被験体に投与される細胞傷害剤の量を低減させることにより、細胞傷害剤に関連する有害な副作用が制限される。

【0214】

細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制性薬剤、すなわち、がん処置中に腫瘍細胞を殺滅するかまたは阻害する薬物を局所送達するための抗体-薬物コンジュゲートの使用（SyngosおよびEpenetos、Anticancer Research 19巻：605～614頁（1999年）；Niculescu-DuvazおよびSpring

er、Adv. Drg. Del. Rev. 26巻：151～172頁（1997年）；米国特許第4,975,278号）は、腫瘍への薬物成分の標的化送達、およびそこの細胞内蓄積を可能にし、これらのコンジュゲートしていない薬物、薬剤の全身投与は、正常細胞ならびに排除しようとする腫瘍細胞にとって許容できない毒性レベルを生じる可能性がある（Baldwinら、Lancet（1986年3月15日）：603～605頁（1986年）；Monoclonal Antibodies '84：Biological And Clinical Applications、A. Pincheraら（編）中のThorpe、（1985年）「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy：A Review」、475～506頁）。そのため最小の毒性で効能を最大にすることが求められている。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が、これらの戦略において有用であるとして報告されている（Rowlandら、Cancer Immunol. Immunother. 21巻：183～187頁（1986年））。これらの方法で使用される薬物としては、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンデシン（Rowlandら、（1986年）上記）が挙げられる。抗体-毒素コンジュゲートで使用される毒素としては、細菌毒素、例えばジフテリア毒素など、植物毒素、例えばライシン（ricin）など、小分子毒素、例えばゲルダナマイシンなど（Mandlerら、J. of the Nat. Cancer Inst. 92巻（1990年）：1573～1581頁（2000年）；Mandlerら、Bioorganic & Med. Chem. Letters 10巻：1025～1028頁（2000年）；Mandlerら、Bioconjugate Chem. 13巻：786～791頁（2002年））、メイタンシノイド（EP1391213；Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻：8618～8623頁（1996年））、およびカリケアマイシン（Lodeら、Cancer Res. 58巻：2928頁（1998年）；Hinmanら、Cancer Res. 53巻：3336～3342頁（1993年））が挙げられる。毒素は、例えばチューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害などのメカニズムによってそれらの細胞傷害作用および細胞増殖抑制作用を発揮することができる。一部の細胞傷害性薬物は、大きい抗体またはタンパク質受容体リガンドにコンジュゲートされると、不活性であるかまたは活性がより低くなる傾向がある。

【0215】

イムノコンジュゲートの生成において有用な化学療法剤が本明細書に記載される（例えば、上記）。使用可能な酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌由来）、ライシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordiiのタンパク質、ジアンシン（dianthin）タンパク質、Phytolacca americanaのタンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）、およびトリコテセン（tricothecene）が挙げられる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照されたい。様々な放射性核種が、放射性コンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが挙げられる。抗体および細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質-カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばアジブイミド酸ジメチルHClなど）、活性エステル（例えばスベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（例えばビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-（p-ジアゾニウムベンゾイ

ル) - エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)を使用して作製される。例えば、ライシン免疫毒素は、V i t e t t aら、S c i e n c e 238巻:1098号(1987年)に記載されるようにして調製してもよい。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。例えば、WO94/11026を参照されたい。

【0216】

また、抗体および1つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン(aurostatin)、トリコテシンなど、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体のコンジュゲートも本明細書において予期される。

【0217】

一部の実施形態において、イムノコンジュゲートは、1つまたは複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートした本発明の抗体(全長または断片)を含む。

【0218】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは最初に、東アフリカの低木のMaytenus serrataから単離された(米国特許第3,896,111号)。その後、特定の微生物も、マイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを産生することが発見された(米国特許第4,151,042号)。合成マイタンシノールならびにそれらの誘導体および類似体は、例えば、米国特許第4,137,230号;4,248,870号;4,256,746号;4,260,608号;4,265,814号;4,294,757号;4,307,016号;4,308,268号;4,308,269号;4,309,428号;4,313,946号;4,315,929号;4,317,821号;4,322,348号;4,331,598号;4,361,650号;4,364,866号;4,424,219号;4,450,254号;4,362,663号;および4,371,533号に開示されている。

【0219】

メイタンシノイド薬物成分は、(i)発酵または化学修飾、発酵産物の誘導体化による調製に比較的利用しやすく、(ii)非ジスルフィドリンカーを介した抗体へのコンジュゲーションに好適な官能基での誘導体化に適しており、(iii)血漿中で安定であり、(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効であることから、抗体薬物コンジュゲートにおいて魅力的な薬物成分である。

【0220】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法、およびその治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号、5,416,064号および欧州特許0425235号B1に開示されており、これらの開示は、本明細書に参照により明示的に組み込まれる。Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻:8618~8623頁(1996年)は、ヒト結腸直腸がんに対して向けられたモノクローナル抗体C242に連結された、DM1と称されるメイタンシノイドを含むイムノコンジュゲートを記載している。このコンジュゲートは、培養された結腸がん細胞に対して高度に細胞傷害性であることが見出され、in vivoの腫瘍成長アッセイで抗腫瘍活性を示した。Chariら、Cancer Research 52巻:127~131頁(1992年)は、メイタンシノイドが、ヒト結腸がん細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7、またはHER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA-1に、ジスルフィドリンカーを介してコンジュゲートされたイムノコンジュゲートを記載している。TA-1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞傷害を、in vitroで、細胞1個当たり 3×10^5 個のHER-2表面抗原を発現する

ヒト乳がん細胞株 S K - B R - 3 で試験した。薬物コンジュゲートは、遊離のメイタンシノイド薬物に類似した程度の細胞傷害を達成したが、これは、抗体分子 1 個当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることによって増加する可能性がある。A 7 - メイタンシノイドコンジュゲートは、マウスにおいて低い全身性の細胞傷害を示した。

【0221】

抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれかの生物活性を有意に減らすことなくメイタンシノイド分子に抗体を化学的に連結させることによって調製される。例えば、米国特許第 5, 208, 020 号（この開示は、本明細書に参照により明示的に組み込まれる）を参照されたい。コンジュゲートしたメイタンシノイド分子が抗体分子 1 個当たり平均 3 ~ 4 個であれば、標的細胞の細胞傷害を強化することにおいて、抗体の機能または溶解性に負の影響を及ぼすことなく効能があることが示されたが、1 個の毒素 / 抗体分子でも、裸の抗体を使用するよりも細胞傷害を強化することが予想される。メイタンシノイドは当該分野において周知であり、公知の技術によって合成してもよいし、または天然の供給源から単離してもよい。好適なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第 5, 208, 020 号、ならびに本明細書の上記で述べられた他の特許および非特許刊行物に開示されている。ある特定の実施形態において、メイタンシノイドは、マイタンシノール、およびマイタンシノール分子の芳香環中または他の位置で改変されたマイタンシノール類似体、例えば様々なマイタンシノールエステルなどである。

【0222】

抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートを作製するための技術分野において公知の多くの連結基があり、例えば、米国特許第 5, 208, 020 号または欧州特許第 0 425 235 号 B1、Charlson、Cancer Research 52 巻：127 ~ 131 頁（1992 年）、および米国特許公開公報第 2005 / 0169933 号で開示されたものなどがあり、これらの開示は、本明細書に参照により明示的に組み込まれる。リンカー構成要素である S M C C を含む抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートは、米国特許公開公報第 2005 / 0169933 号で開示されたようにして調製することができる。連結基としては、上記で特定された特許で開示されたような、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基（acid labile group）、感光性基（photolabile group）、ペプチダーゼ不安定性基（peptidase labile group）、またはエステラーゼ不安定性基（esterase labile group）が挙げられる。ある特定の実施形態において、連結基は、ジスルフィドおよびチオエーテル基である。追加の連結基は、本明細書で記載され例示される。

【0223】

抗体およびメイタンシノイドのコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば N - スクシンイミジル - 3 - （2 - ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル - 4 - （N - マレイミドメチル）シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート（SMCC）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばアジブイミド酸ジメチル HCl など）、活性エステル（例えばスベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒドなど）、ビス - アジド化合物（例えばビス（p - アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えばビス - （p - ジアゾニウムベンゾイル） - エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（例えばトルエン 2, 6 - ジイソシアネートなど）、およびビス活性フッ素化合物（例えば 1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼンなど）を使用して作製することができる。ある特定の実施形態において、カップリング剤としては、N - スクシンイミジル - 3 - （2 - ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）（Carlssonら、Biochem. J. 173 巻：723 ~ 737 頁（1978 年））および N - スクシンイミジル - 4 - （2 - ピリジルジチオ）ペンタノエート（SPP）が挙げられ、ジスルフィド連結をもたらすことができる。

【0224】

リンカーは、連結のタイプに応じて様々な位置でメイタンシノイド分子に結合させることができる。例えば、エステル連結は、従来のカップリング技術を使用したヒドロキシル基との反応によって形成することができる。反応は、ヒドロキシル基を有するC - 3位、ヒドロキシメチルで改変されたC - 14位、ヒドロキシル基で改変されたC - 15位、およびヒドロキシル基を有するC - 20位で起こすことができる。ある特定の実施形態において、連結は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類似体のC - 3位で形成される。

【0225】

ある特定の実施形態において、イムノコンジュゲートは、ドラスタチンまたはドロスタチン(dolostatin)ペプチド類似体および誘導体、オーリスタチン(米国特許第5,635,483号および5,780,588号)にコンジュゲートした本明細書で開示された二重特異性抗体を含む。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管の動力学、GTP加水分解、ならびに核および細胞分裂に干渉すること(Woykeら、Antimicrob. Agents and Chemother. 45巻(12号): 3580~3584頁(2001年))、および、抗がん活性(米国特許第5,663,149号)および抗真菌活性(Pettitら、Antimicrob. Agents Chemother. 42巻: 2961~2965頁(1998年))を有することが示されている。ドラスタチンまたはオーリスタチン薬物成分は、ペプチド薬物成分のN - (アミノ)末端またはC - (カルボキシル)末端を介して抗体に結合されていてもよい(WO02/088172)。

【0226】

例示的なオーリスタチンの実施形態としては、その開示が明示的にその全体が参照により組み込まれる「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、米国特許出願公報第2005/0238649号に開示された、N末端に連結されたモノメチルオーリスタチン薬物成分DEおよびDFが挙げられる。

【0227】

典型的には、ペプチドベースの薬物成分は、2つまたはそれよりも多くのアミノ酸および/またはペプチド断片の間でペプチド結合を形成することによって調製することができる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法(E. SchröderおよびK. Lijbke、「The Peptides」、1巻、76~136頁、1965年、Academic Pressを参照)に従って調製することができる。オーリスタチン/ドラスタチン薬物成分は、米国特許第5,635,483号および5,780,588号;Pettitら、J. Nat. Prod. 44巻: 482~485頁(1981年);Pettitら、Anti-Cancer Drug Design 13巻: 47~66頁(1998年);Poncet、Curr. Pharm. Des. 5巻: 139~162頁(1999年);およびPettit、Fortsch. Chem. Org. Naturst. 70巻: 1~79頁(1997年)の方法に従って調製してもよい。また、参照により本明細書にその全体が組み込まれるDoronina、Nat. Biotechnol. 21巻(7号): 778~784頁(2003年);および「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、米国特許出願公報第2005/0238649号(例えば、リンカーおよびモノメチルバリン化合物、例えばリンカーにコンジュゲートしたMMAEおよびMMAFなどを調製する方法を開示する)も参照されたい。

【0228】

ある特定の実施形態において、イムノコンジュゲートは、1つまたは複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートした本明細書で開示された二重特異性抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル濃度未満で二本鎖DNA破断を生じさせることが可能である。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製に関して、米国特

許第 5, 712, 374 号、5, 714, 586 号、5, 739, 116 号、5, 767, 285 号、5, 770, 701 号、5, 770, 710 号、5, 773, 001 号、および 5, 877, 296 号（全て American Cyanamid Company）を参照されたい。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体としては、これらに限定されないが、 1^1 、 2^1 、 3^1 、N - アセチル - 1^1 、PSAG および 1^1 （Hinman ら、Cancer Research 53 巻：3336 ~ 3342 頁（1993 年）、Lode ら、Cancer Research 58 巻：2925 ~ 2928 頁（1998 年）および上述の American Cyanamid の米国特許）が挙げられる。抗体がコンジュゲートできる別の抗腫瘍薬物は、葉酸代謝拮抗剤の QFA である。カリケアマイシンおよび QFA の両方が、細胞内作用部位を有し、容易に原形質膜を通過しない。それゆえに、抗体が媒介する内在化を介したこれらの薬剤の細胞内取り込みは、それらの細胞傷害作用を大きく強化する。

【0229】

本明細書で開示されたまたは本明細書に記載される方法に従って作製された二重特異性抗体にコンジュゲートできる他の抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾシン（streptozocin）、ピンクリスチンおよび 5 - フルオロウラシル、米国特許第 5, 053, 394 号および 5, 770, 710 号に記載の LL - E33288 複合体として集合的に公知の薬剤のファミリー、加えてエスペラミシン（米国特許第 5, 877, 296 号）が挙げられる。

【0230】

使用可能な酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素 A 鎖（緑膿菌由来）、ライシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデシン A 鎖、アルファ - サルシン、Aleurites fordii のタンパク質、ジアンシンタンパク質、Phytolacca americana のタンパク質（PAPI、PAPII、および PAP - S）、momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis 阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセン（例えば、1993 年 10 月 28 日に公開された WO93/21232 を参照）が挙げられる。

【0231】

ある特定の実施形態において、イムノコンジュゲートは、二重特異性抗体と、核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼまたは DNA エンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNA アーゼなど）との間で形成される。

【0232】

腫瘍の選択的な破壊のために、二重特異性抗体は、高放射性の原子を含んでもよい。放射性コンジュゲート抗体の産生のために様々な放射性同位体が利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} および Lu の放射性同位体が挙げられる。コンジュゲートは、検出に使用される場合、シンチグラフィー研究のための放射性原子、例えば tc^{99m} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴（NMR）画像化（磁気共鳴画像化、mri としても公知）のためのスピン標識、例えばここでもヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガンもしくは鉄などを含んでもよい。

【0233】

放射性標識または他の標識は、公知の方法でコンジュゲートに組み込むことができる。例えば、ペプチドは、水素の代わりに例えばフッ素 - 19 を含む好適なアミノ酸前駆体を使用して、生合成されてもよいし、または化学的なアミノ酸合成によって合成されてもよい。標識、例えば tc^{99m} または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} および In^{111} などは、ペプチド中のシステイン残基を介して結合させることができる。イットリウム - 90 は、リシン残基を介して結合させることができる。IODOGEN 方法（Frake

rら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 80巻：49～57頁（1978年））を使用して、ヨウ素 - 123を組み込むことができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」（Chatall、CRC Press 1989年）は、他の方法を詳細に記載している。

【0234】

抗体および細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばアジブイミド酸ジメチルHClなど）、活性エステル（例えばスベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒドなど）、ビス - アジド化合物（例えばビス (p - アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えばビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（例えばトルエン2, 6 - ジイソシアネートなど）、およびビス活性フッ素化合物（例えば1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼンなど）を使用して作製することができる。例えば、ライシン免疫毒素は、Vitettaら、Science 238巻：1098頁（1987年）に記載されるようにして調製してもよい。炭素 - 14 - 標識1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。例えば、WO94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞中での細胞傷害性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー（Chariら、Cancer Research 52巻：127～131頁（1992年）；米国特許第5, 208, 020号）が使用され得る。

【0235】

ある特定の実施形態において、化合物としては、これらに限定されないが、市販されている（例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL、米国から）架橋剤試薬：BMPS、EMCS、GMBs、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ - EMCS、スルホ - GMBs、スルホ - KMUS、スルホ - MBS、スルホ - SIAB、スルホ - SMCC、およびスルホ - SMPB、ならびにSVSB（スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン)ベンゾエート）を用いて調製されたADCが挙げられる。2003 - 2004 Applications Handbook and Catalogの467～498頁を参照されたい。

【0236】

コンジュゲート二重特異性抗体において、二重特異性抗体は、1つまたは複数の成分（例えば、薬物成分）、例えば、抗体1つ当たり約1から約20個の成分に、任意選択でリンカーを介してコンジュゲートされる。コンジュゲート二重特異性抗体は、(1)抗体の求核性基と2価リンカー試薬との共有結合を介した反応、それに続く目的の成分との反応；および(2)成分の求核性基と2価リンカー試薬との共有結合を介した反応、それに続く抗体の求核性基との反応を含む、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬を採用する数種の経路によって調製することができる。コンジュゲートした抗体を調製するための追加の方法が本明細書に記載される。

【0237】

リンカー試薬は、1つまたは複数のリンカー構成要素で構成されていてもよい。例示的なリンカー構成要素としては、6 - マレイミドカプロイル（「MC」）、マレイミドプロパノイル（「MP」）、パリン - シトルリン（「val-cit」）、アラニン - フェニルアラニン（「ala-phe」）、p - アミノベンジルオキシカルボニル（「PAB」）、N - スクシンイミジル4 - (2 - ピリジルチオ)ペンタノエート（「SPP」）、N

- スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 カルボキシレート (「 S M C C 」) 、および N - スクシンイミジル (4 - ヨード - アセチル) アミノベンゾエート (「 S I A B 」) が挙げられる。追加のリンカー構成要素が当該分野において公知であり、一部が本明細書に記載される。また、その内容が参照により本明細書にその全体が組み込まれる「 Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、米国特許出願公報第 2005/0238649 号も参照されたい。

【0238】

ある特定の実施形態において、リンカーは、アミノ酸残基を含んでいてもよい。例示的なアミノ酸リンカー構成要素としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリン - シトルリン (v c または v a l - c i t) 、アラニン - フェニルアラニン (a f または a l a - p h e) が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) およびグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y) が挙げられる。アミノ酸リンカー構成要素を構成するアミノ酸残基としては、天然に存在するものに加えて、希少なアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸類似体、例えばシトルリンなどが挙げられる。アミノ酸リンカー構成要素は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C および D、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に関するそれらの選択性において設計および最適化することができる。

【0239】

抗体上の求核性基としては、これらに限定されないが、(i) N 末端アミン基、(i i) 側鎖アミン基、例えばリシン、(i i i) 側鎖チオール基、例えばシステイン、および(i v) 抗体がグリコシル化されている場合、糖ヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられる。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー成分およびリンカー試薬上の求電子性基と反応して共有結合を形成することが可能であり、このような求電子性基としては、(i) 活性エステル、例えば N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、および酸ハライドなど；(i i) ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えばハロアセトアミドなど；(i i i) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基が挙げられる。特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えば D T T (ジチオスレイトール) などでの処理によって、リンカー試薬とのコンジュゲーションに反応性を有するようにすることができる。したがって各システイン架橋は、理論上、2 つの反応性チオール求核剤を形成する。追加の求核性基は、リシンと 2 - イミノチオラン (トラウト試薬) との反応を介して抗体に導入することができ、結果としてアミンのチオールへの変換が起こる。反応性チオール基は、1、2、3、4、またはそれよりも多くのシステイン残基を導入すること (例えば、1 つまたは複数の非天然システインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製すること) によって抗体 (またはその断片) に導入されてもよい。

【0240】

本明細書に記載されるコンジュゲートした二重特異性抗体はまた、リンカー試薬もしくは薬物または他の成分上の求核性置換基と反応できる求電子性成分を導入するための抗体の改変によって産生することもできる。グリコシル化抗体の糖を、例えば過ヨウ素酸塩酸化試薬で酸化して、リンカー試薬もしくは薬物または他の成分のアミン基と反応できるアルデヒドまたはケトン基を形成してもよい。得られたイミンシッフ塩基の基は、安定な連結を形成する場合もあるし、または例えば水素化ホウ素試薬によって還元されて安定なアミン連結を形成する場合もある。一実施形態において、グリコシル化抗体の炭水化物部分と、ガラクトース (g l a c t o s e) オキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応は、薬物または他の成分上の適切な基と反応できるタンパク質中のカルボニル (アルデヒドおよびケトン) 基を生じる可能性がある (H e r m a n s o n 、 B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s) 。別の実施形態において、N 末端セリンまたはスレオニン残基を含有するタンパク質は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応するこ

とができ、結果として第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドが産生される (GeogheganおよびStroh、Bioconjugate Chem. 3巻: 138~146頁(1992年); 米国特許第5,362,852号)。このようなアルデヒドは、薬物成分またはリンカーの求核剤と反応することができる。

【0241】

同様に、成分(例えば薬物成分など)上の求核性基としては、これらに限定されないが、リンカー成分およびリンカー試薬上の求電子性基と反応して共有結合を形成することが可能な、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリアルヒドラジド基が挙げられ、このような求電子性基としては、(i) 活性エステル、例えばNHSESTER、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライドなど; (ii) ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えばハロアセトアミドなど; および(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基などが挙げられる。

【0242】

代替として、二重特異性抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパク質は、例えば組換え技術またはペプチド合成によって作製してもよい。所定長さのDNAに、コンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域が、互いに隣接しているかまたはコンジュゲートの所望の特性を壊さないリンカーペプチドをコードする領域によって隔てられているかのいずれかで含まれていてもよい。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、腫瘍の事前標的化で利用するための「受容体」(例えばストレプトアビジン)にコンジュゲートされていてもよく、この場合、抗体-受容体コンジュゲートを個体に投与し、続いて清浄剤を使用して循環系から未結合のコンジュゲートを除去し、次いで細胞傷害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートした「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0243】

有用性

本明細書に記載される本発明の二重特異性抗体は、二重特異性抗体の産生において産業上の利用可能性がある。

【0244】

本明細書に記載される二重特異性抗体は、例えば、in vitro、ex vivo およびin vivoでの治療方法において使用される。本発明は、これらの抗体の1つまたは複数の使用に基づく様々な方法を提供する。ある特定の病態において、二重特異性抗体であることが必要であるか、および/または望ましい。本発明は、例えば治療剤、予防剤および診断剤として様々な目的に使用可能なこれらの二重特異性抗体を提供する。例えば、本発明は、疾患を処置する方法であって、処置が必要な被験体に、本明細書に記載される二重特異性抗体を投与すること、それによって疾患を処置することを含む、方法を提供する。本明細書に記載される二重特異性抗体はいずれも、本明細書に記載される治療(または予防または診断)方法に使用することができる。

【0245】

同じ抗原分子上の2つの別個のエピトープに対して向けられた二重特異性抗体は、アビディティを強化する利益(2価の結合のため)を提供するだけでなく、親抗体のどちらにも関連しない新規の特性を獲得する可能性がある。したがって、本明細書で開示された二重特異性抗体は、例えば受容体-リガンド相互作用をブロックすることにおいて使用される。

【0246】

また本明細書に記載される二重特異性抗体は、2つの標的のシグナル伝達経路を1つの分子で同時にブロックする適用でも使用される。

【0247】

治療的使用

本明細書に記載される二重特異性抗体は、治療適用に使用することができる。例えば、

このような抗体は、腫瘍、例えば前がん性、非転移性、転移性、およびがん性の腫瘍（例えば、早期がん）などの処置のために、アレルギー性または炎症性障害の処置のために、または自己免疫疾患の処置のために、またはがん（例えば、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、腎細胞癌、神経膠腫、または卵巣がん）、アレルギー性もしくは炎症性障害、または自己免疫疾患を発症するリスクがある被験体の処置のために使用することができる。

【0248】

がんという用語は、これらに限定されないが、前がん性の成長、良性腫瘍、および悪性腫瘍などの一群の増殖性障害を含む。良性腫瘍は、元の部位に局在したままであり、遠位部位に浸潤する、侵襲する、または転移する能力を有さない。悪性腫瘍は、それらの周辺の他の組織に侵入してダメージを与える。悪性腫瘍はまた、それらが生じた場所から離脱して、通常血流を介して、またはリンパ節が存在する場合はリンパ系を介して体の他の部位に広がる（転移する）能力を獲得することもある。原発性腫瘍は、それらが発生する組織のタイプによって分類され、転移性腫瘍は、がん細胞が由来する組織のタイプによって分類される。時間の経過とともに、悪性腫瘍の細胞はより異常になり、外観が正常細胞のようではなくなる。このがん細胞の外観の変化は腫瘍悪性度と称され、がん細胞は、高分化型、中分化型、低分化型、または未分化型と記載される。高分化型細胞は、外観が極めて正常であり、それらの起源となる正常細胞と似ている。未分化型細胞は、細胞の起源を決定することがもはや不可能なほど異常になった細胞である。

【0249】

腫瘍は、固形腫瘍、または非固形もしくは軟部組織腫瘍であり得る。軟部組織腫瘍の例としては、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、成熟B細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、前リンパ球性白血病（*polymphocytic leukemia*）、またはヘアリーセル白血病）、またはリンパ腫（例えば、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、またはホジキン病）が挙げられる。固形腫瘍としては、血液、骨髄、またはリンパ系以外の体内組織のあらゆるがんが挙げられる。固形腫瘍は、上皮細胞起源のもの、および非上皮細胞起源のものにさらに分けられる。上皮細胞固形腫瘍の例としては、消化管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、胆嚢、口唇、上咽頭、皮膚、子宮、男性生殖器官、泌尿器、膀胱、および皮膚の腫瘍が挙げられる。非上皮起源の固形腫瘍としては、肉腫、脳腫瘍、および骨腫瘍が挙げられる。

【0250】

上皮がんは、一般的に、良性腫瘍から侵襲前のステージ（例えば、上皮内癌）に発達し、悪性のがんになって、基底膜を貫通し上皮下の間質に侵入したものである。

【0251】

二重特異性抗体も、これらの治療適用に使用することができ、HER2に結合する抗体は特に、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、腎細胞癌、神経膠腫、または卵巣がんを処置するのに使用することができる。

【0252】

本明細書に記載される二重特異性抗体が与えられる候補である他の被験体は、血管結合組織の異常な増殖、しゅさ性ざ瘡、後天性免疫不全症候群、動脈閉塞、アトピー性角膜炎、細菌性の潰瘍、ベーチェット病、血液由来の腫瘍、頸動脈閉塞疾患、脈絡膜血管新生、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、コンタクトレンズの過度装用、角膜移植片拒絶反応、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、クローン病、イールズ病、流行性角結膜炎、真菌性潰瘍、単純ヘルペス感染、帯状疱疹の感染、過粘稠度症候群、カポジ肉腫、白血病、脂質変性、ライム病、辺縁角質溶解（*marginal keratolysis*）、モーレン潰瘍、ハンセン病以外のマイコバクテリア感染、近視、眼の血管新生疾患、乳頭小窩、オスラー-ウェーバー症候群（オスラー-ウェーバー-ランデュ）、変形性関節症、ページェット病、毛様体扁平部炎、類天疱瘡、フリクテン症（*phyllectenulosis*）、多発動脈炎、レーザー後合併症、原生動物感染、弾性線維

性偽性黄色腫、翼状片乾性角膜炎、放射状角膜切開、網膜血管新生、未熟児網膜症、水晶体後線維増殖、サルコイド、強膜炎、鎌状赤血球貧血、シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome)、固形腫瘍、シュタルガルト病 (Stargardt's disease)、ステーブンスジョンソン病、上輪部角膜炎 (superior limbic keratitis)、梅毒、全身性ループス、テリエン辺縁変性症、トキソプラズマ病、ユーイング肉腫の腫瘍、神経芽細胞腫の腫瘍、骨肉腫の腫瘍、網膜芽細胞腫の腫瘍、横紋筋肉腫の腫瘍、潰瘍性大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠乏症、ヴェグナーサルコイドーシス、糖尿病に関連する望ましくない血管形成、寄生虫病、異常な創傷治癒、外科手術、傷害または外傷後の肥大 (例えば、急性肺損傷 / ARDS)、毛髪成長の阻害、排卵および黄体形成の阻害、移植の阻害、ならびに子宮中での胚発生の阻害を有するか、またはそれらを発症させるリスクがある。

【0253】

本明細書に記載される方法に従って作製される二重特異性抗体を使用して処置され得るアレルギー性もしくは炎症性障害または自己免疫疾患または障害の例としては、これらに限定されないが、関節炎 (関節リウマチ、例えば、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変性性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、および若年発症性関節リウマチ、変形性関節症、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、原発性慢性多発関節炎、反応性関節炎、および強直性脊椎炎など)、炎症性過剰増殖性皮膚疾患、乾癬、例えば尋常性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬、および爪の乾癬など、皮膚炎、例えば接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、疱疹状皮膚炎、およびアトピー性皮膚炎など、x連鎖高IgM症候群、じんましん、例えば慢性アレルギー性じんましんおよび慢性自己免疫じんましんを含む慢性特発性じんましんなど、多発性筋炎 / 皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症 (全身性強皮症など)、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症 (MS)、例えば脊椎視神経型MS、一次性進行型MS (PPMS)、および再発寛解型MS (RRMS) など、全身性進行性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、多発性硬化症 (sclerosis disseminata)、および失調性硬化症など、炎症性腸疾患 (IBD) (例えば、クローン病、自己免疫媒介性の胃腸疾患、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、潰瘍性結腸炎、顕微鏡的大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、ポリープ性大腸炎、壊死性腸炎、および経壁性結腸炎、ならびに自己免疫炎症性腸疾患など)、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎)、呼吸窮迫症候群、例えば成人または急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) など、髄膜炎、ブドウ膜の全てまたは一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液障害、リウマチ様脊椎炎、突発性難聴、IgE媒介疾患、例えばアナフィラキシーならびにアレルギー性およびアトピー性鼻炎など、脳炎、例えばラスマッセン脳炎ならびに辺縁系領域および / または脳幹脳炎など、ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、または自己免疫性ブドウ膜炎など、ネフローゼ症候群を有するおよび有さない糸球体腎炎 (GN)、例えば慢性または急性糸球体腎炎など、例えば原発性GN、免疫媒介性GN、膜性GN (膜性腎症)、特発性膜性GNまたは特発性膜性腎症、膜または膜性増殖性GN (MPGN)、例えばI型およびII型など、ならびに急速進行性GNなど、アレルギー性状態、アレルギー反応、湿疹、例えばアレルギー性またはアトピー性湿疹など、喘息、例えば気管支喘息 (asthma bronchiale)、気管支喘息 (bronchial asthma)、および自己免疫喘息など、T細胞の浸潤および慢性炎症性反応を伴う状態、慢性的な炎症性肺疾患、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) または全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythemato des)、例えば皮膚SLE、亜急性皮膚エリテマトーデス、新生児ループス症候群 (NLE)、播種性紅斑性狼瘡、ループス (例えば腎炎、脳炎、小児、非腎性、腎外、円板状、脱毛症など) など、若年発症型 (I型) 糖尿病、例えば小児インスリン依存性糖尿病 (IDDM)、成人発

症型糖尿病（ⅠⅠ型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性尿崩症など、サイトカインおよびＴリンパ球が媒介する急性および遅延型過敏症に関連する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばリンパ腫様肉芽腫症、ヴェグナー肉芽腫症など、顆粒球減少症、血管炎、例えば血管炎など（例えば、大型血管炎（例えばリウマチ性多発性筋痛および巨細胞（高安）動脈炎など）、中型血管炎（例えば川崎病および結節性多発性動脈炎など）、顕微鏡的多発動脈炎、ＣＮＳ血管炎、壊死性、皮膚または過敏性血管炎、全身性壊死性血管炎、およびＡＮＣＡ関連血管炎、例えばチャージ-ストラウス血管炎または症候群（ＣＳＳ）など）、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性再生不良性貧血、クームズ陽性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、溶血性貧血または免疫性溶血性貧血、例えば自己免疫性溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、悪性貧血（貧血悪性熱）、アジソン病、赤芽球ろうまたは無形成症（ＰＲＣＡ）、第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球遊出を伴う疾患、ＣＮＳ炎症性障害、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷または出血に続発するものなど、抗原-抗体複合体が媒介する疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット（Ｂｅｃｈｅｔ）またはベーチェット（Ｂｅｈｃｅｔ）病、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス-ジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡および皮膚類天疱瘡など、天疱瘡（例えば尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜性天疱瘡、すなわち膜性類天疱瘡、および紅斑性天疱瘡など）、自己免疫性多発性内分泌腺症、ライター病または症候群、免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、視神経脊髄炎、多発性ニューロパチー、慢性ニューロパチー、例えばⅠｇＭ多発性ニューロパチーまたはⅠｇＭ媒介性ニューロパチーなど、血小板減少症（例えば心筋梗塞患者が発症させるもの）、例えば血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）および自己免疫または免疫媒介性血小板減少症、例えば特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、例えば慢性または急性ＩＴＰなど、精巣および卵巣の自己免疫疾患、例えば自己免疫性精巣炎および卵巣炎など、原発性甲状腺機能低下症、上皮小体機能低下症、自己免疫性内分泌疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）、または亜急性甲状腺炎など、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、多腺性症候群、例えば多腺性自己免疫症候群（または多腺性内分泌障害症候群）など、腫瘍随伴症候群、例えば神経系腫瘍随伴症候群、例えばランバート-イートン筋無力症症候群またはイートン-ランバート症候群、スティッフマンまたは全身硬直症候群など、脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎（ａｌｌｅｒｇｉｃ ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｅｌｉｔｉｓ）またはアレルギー性脳脊髄炎（ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｅｌｉｔｉｓ ａｌｌｅｒｇｉｃａ）および実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）など、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳変性、神経性筋強直症、オブソクロヌスまたはオブソクロヌス-ミオクロヌス症候群（ＯＭＳ）、および感覚ニューロパチーなど、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ性間質性肺炎、ＮＳＩＰに対する閉塞性細気管支炎（非移植性）、ギランバレー症候群、ベルジェ病（ⅠｇＡ腎症）、特発性ⅠｇＡ腎症、線状ⅠｇＡ皮膚疾患、原発性胆汁性肝硬変症、肺線維症、自己免疫性腸疾患症候群、セリアック病、小児脂肪便症、セリアックスブルー（グルテン腸症）、難治性スブルー、特発性スブルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ；ルーゲーリック病）、冠動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例えば自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫性難聴など、オブソクロヌス-ミオクロヌス症候群（ＯＭＳ）、多発性軟骨炎、例えば難治性または再発性多発性軟骨炎など、肺泡タンパク症、アミロイド症、強膜炎、非がん性リンパ球増加症、原発性リンパ球増加症、例えば単クローン性Ｂ細胞リンパ球増加症（例えば、良性単クローン性免疫グロブリン血症および意味未確定の単クローン性高ガンマグロブリン血症、ＭＧＵＳ）など、末梢神経障害、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例えばてんかんなど、片頭痛、不整脈、筋障害、聴覚消失症、失明、周期性麻痺、およびＣＮＳのチャンネル病、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状分節性系球体硬化症（ＦＳＧＳ）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、網脈絡膜炎、自

己免疫性肝臓障害、線維筋痛症、多重内分泌不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期認知症、脱髄疾患、例えば自己免疫脱髄疾患など、糖尿病性腎症、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症、および毛細血管拡張症）、男性および女性の自己免疫性不妊症、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、反復流産、農夫肺、多形性紅斑、心術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎および線維化肺炎など、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キバノソミアシス、住血吸虫症、回虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シュルマン症候群、フェルティイ症候群、フィラリア症、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異虹彩色性毛様体炎、虹彩毛様体炎、またはフックス毛様体炎など、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、バルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン-バーウイルス感染、流行性耳下腺炎、エバンス症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞蹈病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性過敏性肺臓炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎炎症候群、微小変化腎症、良性家族性および虚血再灌流傷害、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルミオジェネーシス、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、アレルギー性腸炎、らい性結節性紅斑、特発性顔面麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ熱、ハンマン-リッチ病、感覚神経性難聴、血色素尿症発作、性腺機能低下症、限局性回腸炎、白血球減少症、伝染性単核症、横断性脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎、肉芽腫性精巣炎、脾臓炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、抗精子抗体による不妊症、非悪性胸腺腫、白斑、SCIDおよびエプスタイン-バーウイルス関連の疾患、後天性免疫不全症候群（AIDS）、寄生虫病、例えばリーシュマニアなど、トキシックショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う状態、白血球接着不全症、サイトカインおよびTリンパ球が媒介する急性および遅延型過敏症に関連する免疫応答、白血球遊出を伴う疾患、多臓器損傷症候群、抗原-抗体複合体が媒介する疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫性多発性内分泌腺症、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ病、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、インスリン炎、多内分泌腺不全、末梢神経障害、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性上皮小体機能低下症（AOIH）、完全脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（EBA）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨、前頭、上顎、または蝶形骨洞炎、好酸球関連の障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増多筋痛症候群、レフラ症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増加症、気管支肺炎性アスペルギルス症、アスペルギルス腫、または好酸球を含有する肉芽腫など、アナフィラキシー、血清反応陰

性脊椎関節炎、多内分泌腺自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ブルトン症候群、乳児一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット-アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調、膠原病に関連する自己免疫障害、リウマチ、神経疾患、虚血再灌流障害、血圧応答の低減、血管機能障害、血管拡張、組織傷害、心血管虚血、痛覚過敏、脳虚血、および血管新生を伴う疾患、アレルギー性過敏性障害、糸球体腎炎、再灌流傷害、心筋または他の組織の再灌流傷害、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性障害、眼および眼窩の炎症性障害、顆粒球

輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、急性の重篤な炎症、慢性の難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈障害、動脈内膜過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、および子宮内膜症が挙げられる。

【0254】

治療的使用に加えて、本明細書に記載される二重特異性抗体は、診断方法、例えば本明細書に記載される疾患および状態のための診断方法などの他の目的にも使用することができる。

【0255】

投薬量、製剤、および持続時間

本明細書で開示された二重特異性抗体は、良好な医療上の実施と一致する状態で、製剤化され、投薬され、投与される。この状況における考察のための要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個々の被験体の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュールリング、および医療従事者に公知の他の要因が挙げられる。投与される抗体の「治療有効量」は、このような考察によって決まり、特定の障害（例えば、がん、アレルギー性もしくは炎症性障害、または自己免疫障害）を予防する、緩和する、または処置するのに必要な最小量である。抗体は、障害を予防または処置するのに現状で使用されている1つまたは複数の薬剤と、必ずしも製剤化されていなくてもよいが、任意選択で製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在するタンパク質の量、障害または処置のタイプ、および上記で論じられた他の要因に依存する。これらは、一般的に、同じ投薬量で、前述で使用されたような投与経路で、またはこれまでに採用された投薬量の約1から99%で使用される。一般的に、がんの軽減または処置は、がんに関連する1つまたは複数の症状または医学的問題を減らすことを含む。薬物の治療有効量は、以下：がん細胞の数を低減すること（少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれよりも多く）；腫瘍のサイズまたは腫瘍負荷量を低減または阻害すること；末梢器官へのがん細胞の浸潤を阻害すること（すなわち、ある程度減少させるか、および/または止める）；腺腫の場合、ホルモン分泌を低減すること；血管密度を低減すること；腫瘍転移を阻害すること；腫瘍成長を低減または阻害すること；および/またはがんに関連する症状の1つまたは複数がある程度和らげることの1つまたは組み合わせを達成することができる。一部の実施形態において、タンパク質は、被験体におけるがんまたは自己免疫障害の出現または再発を予防するのに使用される。

【0256】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示された二重特異性抗体は、がんまたは自己免疫障害になりやすいかまたはそれと診断されているヒト被験体の生存期間を増加させるのに使用することができる。生存期間は、最初の薬物投与から死亡までの時間と定義される。生存期間はまた、処置中の被験体の死亡リスクを表す処置群対対照群の層別化したハザード比（HR）によって測定することもできる。

【0257】

ある特定の実施形態において、本明細書で開示された二重特異性抗体の処置は、がんになりやすいかまたは様々な抗がん治療で処置されるがんと診断されているヒト被験体の群において、応答率を有意に増加させる。応答率は、処置された被験体のうち処置に応答したパーセンテージと定義される。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される二重特異性抗体と、外科手術、放射線療法、または1つまたは複数の化学療法剤とを使用する併用処置は、外科手術、放射線療法、または化学療法単独で処置した群と比較して、処置した被験体群における応答率を有意に増加させ、その増加は、0.005未満のカイ二乗p値を有する。がんの処置における治療効能の追加の測定は、米国特許公開公報第20050186208号に記載されている。

【0258】

治療製剤は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して、所望の純度を有する活性成分を、任意選択の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と共に混合するこ

とによって調製される (Remington's Pharmaceutical Sciences (第20版) A. Gennaro 編、2000年、Lippincott, Williams & Wilkins、Philadelphia、PA)。許容される担体としては、食塩溶液、または緩衝液、例えばホスフェート、シトレートおよび他の有機酸など；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸など；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンなど、アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど；単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリンなど；キレート剤、例えばEDTAなど；糖アルコール、例えばマンニトールまたはソルビトールなど；塩を形成する対イオン、例えばナトリウムなど；および/または非イオン界面活性剤、例えばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）など、またはPEGが挙げられる。

【0259】

ある特定の実施形態において、製剤は、薬学的に許容される塩、好ましくは塩化ナトリウムを、好ましくはほぼ生理学的な濃度で含有する。ある特定の実施形態において、本発明の製剤は、薬学的に許容される保存剤を含有する。ある特定の実施形態において、保存剤の濃度は、典型的にはv/vで0.1から2.0%の範囲である。好適な保存剤としては、薬学分野において公知のものが挙げられる。ある特定の実施形態において、保存剤は、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンである。任意選択で、本発明の製剤は、薬学的に許容される界面活性剤を、0.005から0.02%の濃度で含んでいてもよい。

【0260】

ある特定の実施形態において、製剤は、処置される特定の適応のために必要とされる1つより多くの活性化化合物、好ましくは互いに有害作用を与えない相補的な活性を有するものを含有する。このような分子は、好適には、意図した目的にとって有効な量での組み合わせで存在する。

【0261】

ある特定の実施形態において、活性成分は、例えばコアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ-（メチルメタクリレート（methyl methacrylate））マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封じ込められる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、上記に開示されている。

【0262】

ある特定の実施形態において、持続放出調製物が調製される。持続放出調製物の好適な例としては、ヘテロ多量体タンパク質を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形物品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解可能な乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注射可能なマイクロスフェア）など、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日を超える期間にわたり分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、それより短い期間にわたりタンパク質を放出する。カプセル化されたヘテロ多量体タンパク質が長時間体内に留まる場合、それらは、37℃で水分に曝露される結果として変性したりまたは凝集したりする場合があり、結果として生物活性の損

失および免疫原性の起こり得る変化が生じる。関与するメカニズムに応じて、安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集メカニズムが、チオ-ジスルフィド交換を介した分子間のS-S結合形成であることがわかる場合、安定化は、スルフヒドリル残基を改変すること、酸性溶液から凍結乾燥すること、含水量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的な高分子マトリクス組成物を開発することによって達成することができる。

【0263】

本明細書に記載される二重特異性抗体は、公知の方法に従って、例えば、ボラスとしての静脈内投与によって、または所定時間にわたる連続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内 (intracerebrospinal)、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所、もしくは吸入経路によって、ヒト被験体に投与される。局所投与は、甚大な副作用または毒性が、タンパク質によって認識される標的分子への拮抗作用に関連する場合に、特に所望される場合がある。ex vivoの戦略も治療適用に使用することができる。ex vivoの戦略は、被験体から得られた細胞を本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトまたは形質導入することを含む。次いでトランスフェクトまたは形質導入された細胞を被験体に戻す。細胞は、限定されないが、造血細胞 (例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、T細胞、またはB細胞)、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、または筋肉細胞などの多様なタイプのいずれであってもよい。

【0264】

ある特定の実施形態において、障害または腫瘍の場所が許す場合、二重特異性抗体は、例えば直接注射によって局所投与され、注射は定期的に繰り返すことができる。ある特定の実施形態において、局所的な再発または転移を予防または低減するために、腫瘍の外科的切除後に、二重特異性抗体を被験体に全身送達するか、または腫瘍細胞に、例えば腫瘍または腫瘍床に直接的に送達する。

【0265】

製品

1つまたは複数の二重特異性抗体を含有する製品は、障害 (例えば、自己免疫疾患またはがん) の処置または診断に有用な材料と共に本明細書に記載される。製品は、容器、および容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、様々な材料、例えばガラスまたはプラスチックなどから形成されてもよい。容器は、状態を処置するのに有効な組成物を保持し、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、または皮下注射針によって突き刺すことができるストッパーを有するバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本明細書に記載される二重特異性抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が特定の状態を処置するのに使用されることを示す。ラベルまたは添付文書は、被験体にヘテロ多量体タンパク質組成物を投与するための指示をさらに含む。また、本明細書に記載される組み合わせ療法を含む製品およびキットも予期される。

【0266】

添付文書は、このような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌および/または警告についての情報を含む、治療用製品の市販のパッケージに習慣的に含まれる指示を指す。ある特定の実施形態において、添付文書は、組成物は、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、腎細胞癌、神経膠腫、または卵巣がんを処置するのに使用されることを示す。

【0267】

ある特定の実施形態において、製品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用静水 (BWF I)、リン酸緩衝食塩溶液、リンゲル液およびデキストロース溶液などを含む第2の容器をさらに含む。製品は、商業的な観点および使用者の観点から考慮される他の材料、例えば他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジなどをさらに含んで

いてもよい。

【0268】

様々な目的、例えば細胞からの抗原（例えば、HER2またはEGFR）の精製または免疫沈降に有用なキットも提供される。抗原（例えば、HER2またはEGFR）の単離および精製の場合、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）にカップリングされた二重特異性抗体（例えば、EGFR HER2抗体）を含有していてもよい。ある特定の実施形態において、キットは、*in vitro*における、例えばELISAまたはウェスタンブロットにおける抗原の検出および定量化のための二重特異性抗体を含有する。製品の場合と同様に、キットは、容器、および容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含む。容器は、本発明の少なくとも1つのヘテロ多量体タンパク質（例えば、多重特異性抗体または抗体断片）を含む組成物を保持する。例えば希釈剤および緩衝液または対照抗体を含有する追加の容器が含まれていてもよい。ラベルまたは添付文書は、組成物の説明に加えて、意図した*in vitro*または診断法での使用に関する指示も提供することができる。

【実施例】

【0269】

材料および方法

部位特異的変異誘発およびDNAの調製：

全てのmAb配列を、表1に示した通りUSPTO、RCSB（タンパク質データバンク）およびIMGT（国際的なImmunogenetics情報システム）から得て、DNA2.0で合成した。部位特異的変異誘発を、QuickChange IIXL（Agilent Technologies）を使用して実行した。配列が検証されたプラスミドを、PureLink HiPure Maxiprep Kit（Life Technologies）を使用して増幅した。

【表1】

表1

mAb	供給源	受託/URL
リツキシマブ	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OSL
GA101	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3PP4
ベバシズマブ	IMGT	http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=8017
ニボルマブ	USPTO	米国特許第 8,008,449 号
ペルツズマブ	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1S78
DL11	RCSB	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3P11

【0270】

抗体の発現および精製：

ポリエチレンイミン（PEI）での一過性トランスフェクションによってFreeStyle 293細胞中で抗体を発現させ、プロテインAクロマトグラフィーによって精製した。二重特異性抗体を、HiPrep Sephacryl S-100HRカラム（GE Healthcare）を使用したゲル濾過でさらに精製した。

【0271】

分析的カチオン交換：

Agilent 1200システムおよびWCX-NP5 4.6×250mm（Sepax）カチオン交換カラムを使用して、分析的カチオン交換クロマトグラフィーを実行した。抗体をpH=6.0の20mMリン酸ナトリウム中でローディングし、20～200mMのNaClの勾配を使用して溶出させ、280nmにおけるインラインの吸光度を使用して検出した。

【0272】

非還元クーマシーゲル：

XCell SureLock Miniチャンバーを使用したNuPAGE Novex 4～12%ピストリスタンパク質ゲル(Invitrogen)を使用して、精製された抗体を分離した。SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)を使用してバンドを発色させた。

【0273】

酵素結合イムノソルベント検定法：

培養上清中のIgGの定量化：簡単に言えば、96-ウェルプレートに、Ms Hu IgG (abcam)で4で一晚コーティングした。プレートを洗浄し、5%ブロット(blotto)(Santa Cruz Biotechnologies)でブロックした。培養上清の希釈物およびヒトIgG標準(Invitrogen)をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。Dk Hu IgG HRPコンジュゲート二次抗体(Jackson Immuno Research)、続いてTMB基質(KPL)の添加を使用して、結合したIgGを検出した。

【0274】

単一抗原ELISA：簡単に言えば、96-ウェルプレートを適切な抗原で4で一晚コーティングした。プレートを洗浄し、1%ブロット(Santa Cruz Biotechnologies)でブロックした。抗体の連続希釈物をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。Rb Hu IgG HRPコンジュゲート二次抗体(Jackson ImmunoResearch)、続いてTMB基質(KPL)の添加を使用して、抗原が結合したIgGを検出した。

【0275】

二重抗原ELISA：簡単に言えば、96-ウェルプレートを、適切な抗原で4で一晚コーティングした。プレートを洗浄し、1%ブロット(Santa Cruz Biotechnologies)でブロックした。抗体の連続希釈物をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。洗浄後に第2の抗原をプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。適切なHRPコンジュゲート抗体、続いてTMB基質(KPL)の添加を使用して第2の抗原を検出した。このアッセイは、両方の抗原に同時に結合する二重特異性抗体のみを検出する。

【0276】

ネイティブ質量分析：

抗体を、37でPngaseF(New England Biolabs)と共に24時間インキュベートした。脱グリコシル化した抗体を、プロテインAの親和性によって精製した。試料をProSwift RP-10Rカラム(Thermo Scientific)にローディングし、QExactiiveオービトラップ(Thermo Scientific)を使用して分析した。データを、タンパク質デコンボリューションソフトウェア(Thermo Scientific)を使用してデコンボリューションした。

【0277】

動的光散乱法：

抗体の溶液相凝集を、DynaPro NanoStar光散乱装置(Wyatt Technology Corporation)を使用して評価した。

【0278】

円偏光二色性熱溶解：

モデル202の円偏光二色性分光計(Aviv biomedical inc.)において、218nmの波長、40～90、1c/分の加熱速度で温度依存性円偏光二色性を測定することによって、熱によるアンフォールディングをモニターした。

【0279】

細胞ベースの結合アッセイ

R a j i 細胞 (A T C C (登 録 商 標) C C L - 8 6 (商 標)) を、培 養 物 から 採 取 し、洗 浄 し、P B S 中 の 1 % B S A で、4 で 1 時 間 ブ ロ ッ ク し た。洗 浄 し た 細 胞 を、様 々 な 濃 度 の 抗 体 構 築 物 と 共 に、4 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。洗 浄 し た 細 胞 を、P e r C P - C y 5 . 5 M s H u C D 1 9 (B D P h a r m i n g e n) お よ び A F 6 4 7 コ ン ジ ュ ゲ ー ト A f f i n i P u r e F (a b ') ₂ 断 片 D k H u I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) の カ ク テ ル と 共 に 4 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。洗 浄 し た 細 胞 を D A P I 溶 液 に 懸 濁 し、L S R F o r t e s s a (B D B i o s c i e n c e s) で F A C S D I V A ソ フ ト ウ ェ ア (B D B i o s c i e n c e s) を 使 用 し て 処 理 し た デ ー タ を 用 い て 分 析 し た。

【 0 2 8 0 】

アポトーシスアッセイ

D a u d i 細胞 (A T C C (登 録 商 標) C C L - 2 1 3 (商 標)) を、3 7 / 5 % C O ₂ で 静 置 さ れ た 2 4 - ウ ェ ル プ レ ー ト 中、1 0 μ g / m L の 抗 体 構 築 物 と 共 に 2 0 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。ア イ ソ タ イ プ 対 照 と し て ハ ー セ プ チ ン を 使 用 し た。細 胞 を 採 取 し、M o l e c u l a r P r o b e s の A l e x a F l u o r 4 8 8 A n n e x i n V / D e a d C e l l A p o p t o s i s K i t (L i f e T e c h n o l o g i e s) を 使 用 し て 処 理 し た。L S R F o r t e s s a (B D B i o s c i e n c e s) で F A C S D I V A ソ フ ト ウ ェ ア (B D B i o s c i e n c e s) を 使 用 し て 処 理 し た デ ー タ を 用 い て 試 料 を 分 析 し た。

【 0 2 8 1 】

補体依存性細胞傷害

W I L 2 - S 細胞 (A T C C (登 録 商 標) C R L - 8 8 5 (商 標)) を 9 6 - ウ ェ ル プ レ ー ト に 播 種 し た。抗 体 の 連 続 希 釈 物、続 い て ウ サ ギ 補 体 (C e d a r l a n e B i o l a b s) を 添 加 し、3 7 で 2 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。ア ラ マ ー ブ ル ー (I n v i t r o g e n) を 添 加 し、3 7 で 1 6 時 間 発 色 さ せ た。S p e c t r a m a x M 5 ^e (M o l e c u l a r D e v i c e s) を 5 3 0 n m で の 励 起 お よ び 5 9 0 n m で の 放 出 で 使 用 し て 蛍 光 を 測 定 し た。

【 0 2 8 2 】

抗体依存性細胞傷害

S p e c t r a m a x M 5 ^e (M o l e c u l a r D e v i c e s) を 使 用 し て 発 光 を 測 定 す る A D C C R e p o r t e r B i o a s s a y K i t (P r o m e g a) を 使 用 し て、抗 体 依 存 性 細 胞 傷 害 を 定 量 化 し た。

【 0 2 8 3 】

(実 施 例 1 : 二 重 特 異 性 抗 体 プ ラ ッ ト フ ォ ー ム 操 作 に 関 す る 残 基 の 同 定 お よ び 変 異 の 試 験)

ど の 変 異 が 二 重 特 異 性 抗 体 の ヘ テ ロ 二 量 体 化 を 容 易 に し、い ず れ か の 目 的 の 親 の 単 一 特 異 性 抗 体 の 可 変 重 鎖 お よ び 可 変 軽 鎖 領 域 を 有 す る 二 重 特 異 性 抗 体 を 生 成 す る の に 使 用 す る こ と が で き る の か を 決 定 す る た め に、ヒ ト 野 生 型 I g G 1 の 定 常 領 域 内 の 残 基 を 分 析 し た。ヘ テ ロ 二 量 体 の 形 成 に 重 要 な C H 1、C L 1 お よ び C H 3 領 域 内 の 個 々 の 残 基 を 同 定 し た。ま ず、境 界 の 残 基、埋 め 込 ま れ た 表 面 積、な ら び に 定 常 領 域 の 物 理 化 学 的 な 特 性 お よ び 幾 何 を 分 析 す る こ と に よ っ て、こ れ ら の 残 基 を 同 定 し た。

【 0 2 8 4 】

各 残 基 の 構 造 的 な 原 理 を 分 析 し、ア ミ ノ 酸 置 換 の 組 み 合 わ せ を 生 成 す る の に 使 用 し た。C H 1 お よ び C L 境 界 中 の 変 異 の 組 み 合 わ せ を 同 定 し た。誤 対 合 を 防 ぎ な が ら 同 源 I g G 発 現 を 保 持 す る で あ ろ う 組 み 合 わ せ を 決 定 す る た め に、2 つ の ヒ ト 野 生 型 I g G 1 抗 体 を 使 用 し た (「 m A b 1 」 と し て 示 さ れ る D L 1 1 お よ び 「 m A b 2 」 と し て 示 さ れ る ペ ル ツ ズ マ プ)。各 組 み 合 わ せ に つ き、原 子 間 の 相 互 作 用 ネ ッ ト ワ ー ク を 生 成 し て、組 み 合 わ せ の 影 響 を 決 定 し た (例 え ば、R o b i n s o n L N ら、C e l l . 2 0 1 5 年 7 月 3 0 日 ; 1 6 2 巻 (3 号) : 4 9 3 ~ 5 0 4 頁 を 参 照)。所 望 の 作 用 を 有 す る (す な わ ち、所 望 の 二 重 特 異 性 種 を 生 成 す る) 組 み 合 わ せ が 予 測 さ れ た ら、そ の 組 み 合 わ せ を 実 験 的

に試験した。mAb1をCL'およびCH1'で構成し、それに対してmAb2をCL''およびCH1''で構成した。これらの領域で作製された変異は、それぞれ表2の1、3、4、および6列で特定される。変異を鎖に作製し、正しい軽鎖または誤対合した軽鎖のいずれかを有する単一特異性抗体としてトランスフェクトした。同源の重鎖 - 軽鎖対合（同源IgGと称する）および誤対合した重鎖 - 軽鎖（誤対合したIgGと称する）を有するIgGを全長の様式で発現させ、それらの発現レベルをIgG ELISAによって定量化し、対応するWT抗体に対するパーセンテージとして表した。表2の2列および5列は、同源IgG、CL' - CH1'およびCL'' - CH1''それぞれの相対的な発現を示す。表2の7および8列は、誤対合したIgG、CL'' - CH1'およびCL' - CH1''それぞれの相対的な発現を示す。さらなる試験のために、CL'では124Dおよび137D、CH1'では124Vおよび143A、CL''では124K、137K、および178A、ならびにCH1''では145D、172Dおよび188Wの組み合わせを選択した。

【表2】

表2

正確に集合した mAb1			正確に集合した mAb2			誤対合	
mAb1			mAb2				
CL'	%発現 (CL'-CH1' IgG/ WT mAb1)	CH1'	CL''	%発現 (CL''-CH1'' IgG/ WT mAb1)	CH1''	%発現 (CL''-CH1' 誤対合した IgG/ WT 誤対合した IgG)	%発現 (CL'-CH1'' 誤対合した IgG/ WT 誤対合した IgG)
124D, 137D	73%	WT	124K,1 37K	84%	145D, 172D	47%	37%
124D, 137D	87%	124V, 143A	124K,1 37K, 118A	63%	145D, 172D, 188W	0%	48%
124D, 133W, 137D	43%	124V, 143A	124K,1 37K, 118A	57%	145D, 172D, 188W	0%	23%
1	2	3	4	5	6	7	8

【0285】

次いで、アミノ酸の相互作用ネットワークを分析することによって、CH3変異の組み合わせを同定した。CH3'において同定されたE378KおよびK440変異を、DL11抗体で試験した。この変異の半抗体種を形成させる能力を試験し、精製された抗体をゲルで泳動し、クーマシー染色を使用することによって、ノブイントゥホールの変異（T389W（ノブ）；T389S、L391A、Y438V（ホール））と比較した。図2Aは、CH3変異（レーン6）がノブイントゥホールの変異（レーン4および5）に匹敵するインタクトな種および半抗体種を形成したことを示す。どの変異の組み合わせがインタクトなヘテロ二量体抗体のみを生成するのかを決定するために、E378KおよびK440変異を含有するCH3'を、様々な変異を有する数種の異なるCH3''ドメインと組み合わせた（図2B）。CH3''におけるK393E変異は、半抗体断片の形成を低減し（レーン7）、それに対してL391E（レーン6）およびD377K（レーン5）の変異は低減しなかった。CH3'におけるE378KおよびK440と、CH3''におけるK393Eとの組み合わせは、ノブイントゥホールの変異（レーン3）と同じレベルに半抗体断片の形成を低減したことから、この新規の組み合わせは、CH3ヘテロ二量体を有効に形成するのに使用できることが示される。

【0286】

表 3 に、実施例 2、3 および 4 でのさらなる試験のために選択された変異の組み合わせを示す。

【表 3】

表 3

抗体	CH1 変異	CL 変異	CH3 変異
<i>mAb1</i>	L124V, L143A	Q124D, N137D	K393E または E378K および K440R
<i>mAb2</i>	K145D, H172D, S188W	Q124K, N137K, T178A	E378K および K440R または K393E

【0287】

(実施例 2: HER2 および EGFR / HER3 を標的化する二重特異性抗体)

二重特異性抗体を、ペルツズマブ (抗 HER2; Genentech; CAS 番号: 380610-27-5) および DL11 (抗 EGFR / HER3; MEHD7945A としても公知; Genentech; WO2010/108127) の配列に基づき生成した。表 4 は、二重特異性抗体の CL、CH1、および CH3 中の変異の組み合わせを示す。

【表 4】

表 4

抗体	CH1 変異	CL 変異	CH3 変異
ペルツズマブ	L124V, L143A	Q124D, N137D	E378K, K440R
<i>DL11</i>	K145D, H172D, S188W	Q124K, N137K, T178A	K393E

【0288】

表 8 に、ペルツズマブ / DL11 二重特異性抗体のアミノ酸配列を記載する。具体的には、表 4 に記載の変異を有するペルツズマブについては配列番号 15 および 16 (それぞれ軽鎖および重鎖)、表 4 に記載の変異を有する DL11 については配列番号 17 および 18 (それぞれ軽鎖および重鎖) である。4 つの抗体鎖を組み合わせた場合にこれらの変異が二重特異性抗体を生成するかどうかを決定するために、カチオン交換クロマトグラフィーを使用して、変異を有さない鎖 (図 3A) と表 4 に記載の変異を有する鎖 (図 3B) との差を比較した。図 3A は、多数のピークを示しており、これは、多くの種が生成されたことを示す。対照的に、図 3B は、丸で囲んだ単一の主要なピークを示し、これは、1 つの二重特異性抗体種が生成されたことを示す。このピークを溶出し精製した。精製された抗体をネイティブ質量分析によって分析したところ、単一の主要なピークは、二重特異性抗体の所望の分子量に対応することが示された (図 4)。

【0289】

精製された二重特異性抗体 (「P/D」) の HER1、HER2、および HER3 への結合特徴を ELISA によって分析した (図 5A ~ 5C)。HER1 および HER3 は P/D および DL11 の両方に結合したが、ペルツズマブとは結合しなかった (図 5A および 5C)。HER2 は P/D およびペルツズマブの両方に結合したが、DL11 とは結合しなかった (図 5B)。4 パラメーターフィッティングを使用して K_d 値を決定した。それを表 5 に示す。

【表 5】

表5

抗体	HER 1 (Kd')	HER2 (Kd')	HER3 (Kd')
ペルツズマブ WT	N/A	103.3 pM	N/A
DL11 WT	41.52 pM	N/A	48.44
P/D 二重特異性	89.76 pM	124.48 pM	89.76 pM

【0290】

これらの結果から、二重特異性抗体は、単一特異性の親抗体によって標的化された同じ抗原に結合することが示される。

【0291】

二重特異性抗体（例えば、P/D）の所望の特徴は、2つの異なる抗原に同時に結合する能力である。サンドイッチ ELISA を使用して、ペルツズマブ/DL11 二重特異性抗体の HER 1 および HER 2 への結合を決定した。HER 1 抗原をプレート上にコーティングし、続いて二重特異性抗体をコーティングした。次いで HER 2 を添加し、HER 2 抗原を検出した。図 6 A は、P/D 二重特異性抗体は HER 1 および HER 2 の両方に結合するが、それに対して親抗体は両方に結合しないことを示す。HER 2 および HER 3 への結合を試験するために、最初に HER 3 抗原をプレート上にコーティングし、続いて二重特異性抗体をコーティングした。次いで HER 2 を添加し、HER 2 抗原を検出した。図 6 B は、P/D 二重特異性抗体は HER 2 および HER 3 の両方に結合するが、それに対して親抗体は両方に結合しないことを示す。これらの結果は、二重特異性抗体が、2つの異なる抗原、HER 1 および HER 2、または HER 3 および HER 2 に同時に結合することを示す。

【0292】

（実施例 3：CD20 上の異なるエピトープに結合する二重特異性抗体）

二重特異性抗体を、両方とも抗 CD20 抗体であるリツキシマブ（Genentech；Cas 番号：174722-31-7）およびオビヌツズマブ（Ga101 としても公知；Genentech；Cas 番号：949142-50-1）の配列に基づき生成した。表 6 は、二重特異性抗体中の変異を示す。

【表 6】

表 6

抗体	CH1 変異	CL 変異	CH3 変異
リツキシマブ	L124V, L143A	Q124D, N137D	K393E
オビヌツズマブ	K145D, H172D, S188W	Q124K, N137K, T178A	E378K, K440R

【0293】

表 8 に、二重特異性抗体のアミノ酸配列（「Rxm/Ga101」）を示す。具体的には、表 6 に記載の変異を有するリツキシマブについては配列番号 19 および 20（それぞれ軽鎖および重鎖）、ならびに表 6 に記載の変異を有するオビヌツズマブについては配列番号 21 および 22（それぞれ軽鎖および重鎖）である。図 7 は、ネイティブ質量分析を使用して生成した二重特異性抗体の純度を示し、それにおいて、一つのみの主要なピークが存在し、それは IgG 二重特異性抗体の予想される質量を有する。円偏光二色性を使用して、Rxm/Ga101 二重特異性抗体の熱安定性を試験した。抗体は、親の単一特異性抗体であるリツキシマブ（「Rxm」）およびオビヌツズマブ（「Ga101」）とまったく同様に安定していることが見出された（図 8）。動的光散乱法を使用して凝集体の形成を測定した。このデータから、凝集体は存在せず、質量分布は、単量体 IgG 1 分子から予想されるものであることが示された（図 9）。全体的に、二重特異性抗体の収量お

よび生物物理学的特性は、親の単一特異性抗体の収量および特性または I g G 1 から予想されるものに類似していた。

【 0 2 9 4 】

R x m / G a 1 0 1 二重特異性抗体の機能的な特徴を試験した。両方の単一特異性抗体は C D 2 0 に結合するため、二重特異性抗体の C D 2 0 への結合を E L I S A によって測定した (図 1 0)。二重特異性抗体は、親抗体と同様に C D 2 0 に結合する。G a 1 0 1 およびリツキシマブの両方は C D 2 0 に結合するが、これらは、異なる作用メカニズムを誘導する。G a 1 0 1 は、アポトーシスおよび補体依存性細胞傷害 (C D C) を誘導する。R x m / G a 1 0 1 二重特異性抗体は、G a 1 0 1 と類似したレベルにアポトーシス (図 1 1) および C D C (図 1 2) を誘導する。加えて、リツキシマブおよび G a 1 0 1 の両方は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を誘導する。R x m / G a 1 0 1 二重特異性抗体は、両方の親抗体と類似した A D C C を誘導する (図 1 3)。

【 0 2 9 5 】

これらの結果はさらに、定常領域の変異が、親抗体と同様に機能する、同じ抗原、C D 2 0 上の既定のエピトープに対する二重特異性抗体を生じることを実証する。

【 0 2 9 6 】

(実施例 4 : P D 1 および V E G F を標的化する二重特異性抗体)

異なる生物学的機能を有する 2 つの異なる抗原に対する二重特異性抗体を、ニボルマブ (抗 P D 1 ; B r i s t o l - M y e r s S q u i b b ; C a s 番号 : 9 4 6 4 1 4 - 9 4 - 4) およびベバシズマブ (抗 V E G F ; G e n e n t e c h ; C a s 番号 : 2 1 6 9 7 4 - 7 5 - 3) の配列に基づき生成した。表 7 は、二重特異性抗体で使用される変異を示す。

【 表 7 】

表 7

抗体	CH1 変異	CL 変異	CH3 変異
ニボルマブ	L124V, L143A	Q124D, N137D	K393E
ベバシズマブ	K145D, H172D, S188W	Q124K, N137K, T178A	E378K, K440R

【 0 2 9 7 】

表 8 に、二重特異性抗体のアミノ酸配列を記載する。具体的には、表 7 に記載の変異を有するニボルマブについては配列番号 2 3 および 2 4 (それぞれ軽鎖および重鎖)、表 7 に記載の変異を有するベバシズマブについては配列番号 2 5 および 2 6 (それぞれ軽鎖および重鎖) である。図 1 4 は、ネイティブ質量分析を使用して生成した二重特異性抗体の純度を示し、それにおいて、一つのみの主要なピークが存在し、それは予想される質量を有する。また二重特異性抗体の熱安定性 (「 B s A b 」) も円偏光二色性によって試験したところ、二重特異性抗体 (B s A b) は、親の単一特異性抗体とまったく同様に安定していることが示された (図 1 5)。動的光散乱法を使用して凝集体の形成を測定した。このデータから、凝集体は存在せず、質量分布は、単量体 I g G 1 分子から予想されるものであることが示された (図 1 6)。全体的に、二重特異性抗体の収量および生物物理学的特性は、親の単一特異性抗体の収量および特性または I g G 1 から予想されるものに類似していた。

【 0 2 9 8 】

二重特異性抗体 (B s A b) の機能的な特徴を試験した。サンドイッチ E L I S A を行って、二重特異性抗体 (B s A b) の P D 1 および V E G F の両方への結合を試験した (図 1 7)。二重特異性抗体 (B s A b) は、単一特異性の親抗体によって標的化された両方の抗原に結合することができた。

【 0 2 9 9 】

これらの結果から、本明細書で同定された C L、C H 1 および C H 3 ドメイン中の変異

は、2つの親抗体、抗PD1および抗VEGFの機能を保持する二重特異性抗体を生じることが示される。

【表8-1】

表8:配列表

配列番号	説明	配列
1	ヒトIgG1 重鎖	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFPLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	ヒトIgG1 軽鎖 (カッパ)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	ヒトIgG1 CH1 領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
4	ヒトIgG1 CH3 領域	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSL
5	ヒトIgG1 CL 領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
6	ヒトIgG1 CH1 領域 L124V, L143A (CH1')	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCAVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
7	ヒトIgG1 CH1 領域 K145D, H172D, S188W (CH1'')	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEPVTV SWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
8	ヒトIgG1 CH1 領域 K145D, H172D (CH1'')	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEPVTV SWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
9	ヒトIgG1 CL 領域 Q124D, N137D (CL')	RTVAAPSVFIFPPSDEDLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	ヒトIgG1 CL 領域 Q124D, V133W, N137D (CL')	RTVAAPSVFIFPPSDEDLKSGTASVWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	ヒトIgG1 CL 領域 Q124K, N137K, T178A (CL'')	RTVAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
12	ヒトIgG1 CL 領域 Q124K, N137K (CL'')	RTVAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表 8 - 2】

13	ヒト IgG1 CH3 領域 K393E (CH3')	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
14	ヒト IgG1 CH3 領域 E378K, K440R (CH3'')	GQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
15	ペルツズマブ 軽鎖 Q124D および N137D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI <u>FPPSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREAKVQWKVDNAL</u> <u>QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY</u> <u>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
16	ペルツズマブ 重鎖 L124V, L143A, E378K および K440R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWV RQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFVPAPSSKSTSGGTAALGCAVKDY FPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ <u>PREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ</u> <u>GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
17	DL11 軽鎖 Q124K, N137K, および T178A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDLATDVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSEPEPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI <u>PSDEKLKSGTASVVCLLDNFYPREAKVQWKVDNALQS</u> <u>GNSQESVTEQDSKDYSLSSALTLSKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
18	DL11 重鎖 K145D, H172D, S188W および K393E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSGDWVHWVR QAPGKGLEWLGEISAAGGYTDYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVSFEAAMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVD <u>DYFPEPVTVSWSNGALTSGVDITFPAVLQSSGLYSLWSV</u> <u>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT</u> <u>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u> <u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</u> <u>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS</u> <u>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
19	リツキシマブ 軽鎖 Q124D および N137D	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKP GSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI <u>PSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREAKVQWKVDNALQS</u> <u>GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

【表 8 - 3】

20	リツキシマブ重鎖 L124V, L143A および K393E	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWV GAGTTVTVSAASTKGPSVFVPAPSSKSTSGGTAALGCA VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	オビヌツマブ軽鎖 Q124K, N137K および T178A	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCAQNELEPYTFGGGKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSALTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	オビヌツマブ重鎖 K145D, H172D, S188W, E378K および K440R	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDIDYNGKFKGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDD YFPEPVTVSWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLWSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	ニボルマブ軽鎖 Q124D および N137D	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFP PSDEDLKSGTASVVCLLDNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
24	ニボルマブ重鎖 L124V, L143A および K393E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWV RQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFVPAPSSKSTSGGTAALGCAVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【表 8 - 4】

25	ベバシズマブ軽鎖 Q124K, N137K および T178A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEKLKSGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSALTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	ベバシズマブ重鎖 K145D, H172D, S188W, E378K および K440R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVDDYFPEPEPTVSWNSGALTSGVDTFPAVLQSSGLYSLWSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 A

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 2 A 】

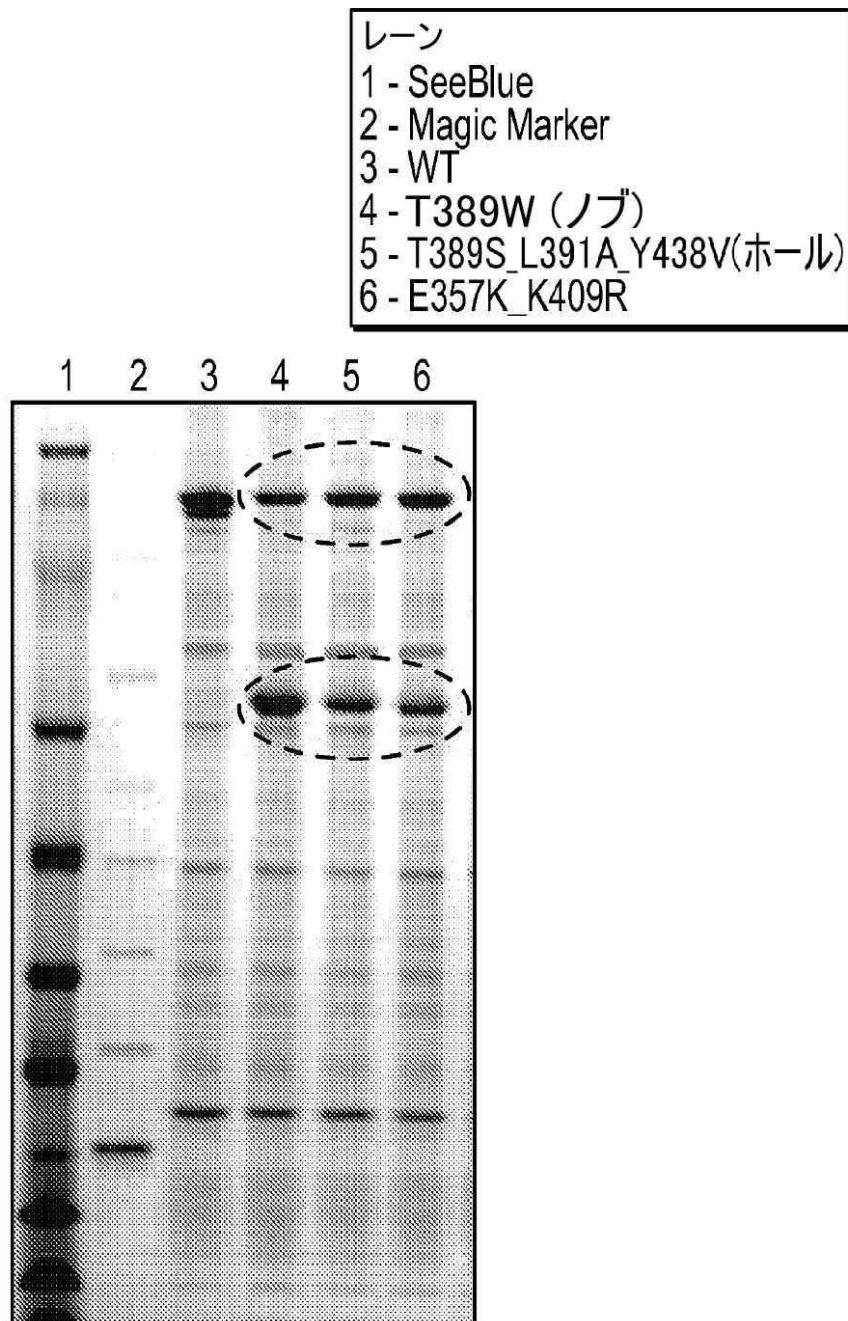


Figure 2A

【 手続補正 4 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 2 B

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 2 B 】

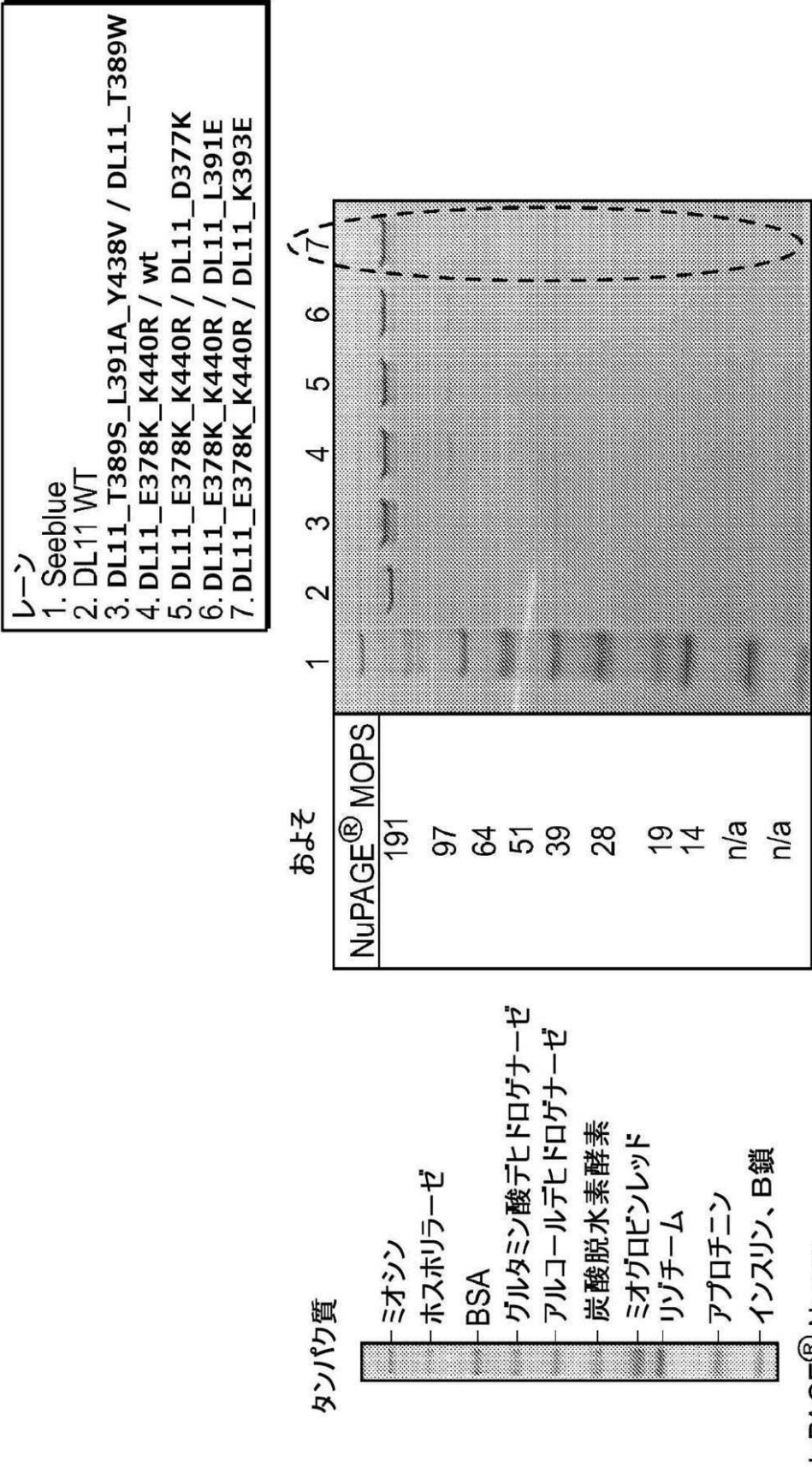


Figure 2B