

【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】平成27年4月2日(2015.4.2)

【公開番号】特開2015-12869(P2015-12869A)

【公開日】平成27年1月22日(2015.1.22)

【年通号数】公開・登録公報2015-005

【出願番号】特願2014-185553(P2014-185553)

【国際特許分類】

C 12 N 15/02 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A C

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月17日(2015.2.17)

【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】

1又は2以上の第1可変ドメインと、1又は2以上の第2可変ドメインとを含む二重特異的ポリペプチドであって、

前記第1可変ドメインが第1エピトープに結合し、前記第2可変ドメインが前記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合し、

前記第1可変ドメインと第2可変ドメインとが共に、前記第1エピトープ又は前記第2エピトープのいずれかに結合し、かつ

前記第1可変ドメイン及び/又は前記第2可変ドメインが、所望の安定性を示し、以下の(1)又は(2)の方法によって得られるウサギ可変ドメインである、二重特異的ポリペプチド。

(1)a) ファージ発現ライブラリーから、前記第1エピトープ又は第2エピトープと免疫特異的に結合する可変ドメインをコードする一組のDNA配列を選択するステップであって、前記ファージ発現ライブラリーが、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得された、可変ドメインをコードするDNA又はcDNA配列から調製されるステップと、

b) 前記一組のDNA配列又はそのサブセットをCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させ、CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギ可変ドメインに対応するアミノ酸配列をコードするDNA配列を取得するステップとを含む第1の方法であって、前記CAT-融合によって付与された細菌のクロラムフェニコール耐性が、CATに融合させた前記アミノ酸配列の安定性と相関し、前記選択が、所望の安定性を選択するのに十分なクロラムフェニコール濃度で行われる、第1の方法；

(2)a) 可変ドメインをコードするDNA又はcDNA配列をCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させるステップであって、前記DNA又はcDNA配列が、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得されたステップと、

b) CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギ可変ドメインに対応するアミノ酸配列をコードする一組のDNA配列を得し、前記CAT-融合によって付与された細菌のクロラムフェニコール耐性が、CATに融合させた前記アミノ酸配列の安定性と相関し、前記選択が、前記所望の安定性を選択

するのに十分なクロラムフェニコール濃度で行われる、ステップと、  
c) ファージ発現ライプラリーから、前記エピトープと免疫特異的に結合する可変ドメインをコードするDNA配列を選択するステップであって、前記ライプラリーが前記一組のDNA配列又はそのサブセットから調製される、ステップとを含む第2の方法

【請求項2】

第1可変ドメインがV<sub>H</sub>ドメインであり、第2可変ドメインがV<sub>L</sub>ドメインである、請求項1に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項3】

第1可変ドメイン及び第2可変ドメインのそれぞれがV<sub>H</sub>ドメインである、請求項1に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項4】

第1可変ドメイン及び第2可変ドメインのそれぞれがV<sub>L</sub>ドメインである、請求項1に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項5】

第1可変ドメイン及び第2可変ドメインのそれぞれがIgG可変ドメインである、請求項1～4のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項6】

第1可変ドメインの1若しくは2以上、及び/又は第2可変ドメインの1若しくは2以上がヒト化可変ドメインである、請求項1又は2に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項7】

ヒト化可変ドメインが、1又は2以上のウサギ相補性決定領域(CDR)及び1又は2以上のヒトフレームワーク領域(FR)を含む、請求項6に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項8】

第1可変ドメイン及び第2可変ドメインの少なくとも1つがヒト可変ドメインである、請求項1又は2に記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項9】

第1可変ドメイン及び/又は第2可変ドメインが、第1の方法又は第2の方法により取得され、前記第1の方法又は前記第2の方法が、前記第1の方法又は前記第2の方法により取得された可変ドメインをIgG定常ドメインと会合させ、完全なIgG四量体を形成するステップをさらに含む、請求項1～8のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチド。

【請求項10】

1又は2以上の第1可変ドメインと、1又は2以上の第2可変ドメインとを含む二重特異的ポリペプチドであって、

前記第1可変ドメインが第1エピトープに結合し、前記第2可変ドメインが前記第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合し、

前記第1可変ドメイン及び第2可変ドメインが、前記第1エピトープ又は前記第2エピトープのいずれかに結合する抗原結合部位を形成し、かつ

前記第1可変ドメイン及び/又は前記第2可変ドメインが、

(a) アミノ酸配列QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTCTAS(配列番号57)を有するV<sub>H</sub>FR1ドメイン；

(b) アミノ酸配列YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR(配列番号95)を有するV<sub>H</sub>FR3ドメイン；

(c) アミノ酸配列ELVLQTTPSLSASVGETVRIRC(配列番号150)を有するV<sub>L</sub>FR1ドメイン；

(d) アミノ酸配列GVSSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC(配列番号205)を有するV<sub>L</sub>FR3ドメイン；及び

(e) アミノ酸配列FAFGGGTELEIL(配列番号210)を有するV<sub>L</sub>FR4ドメインからなる群から選択される配列を含む、二重特異的ポリペプチド。

【請求項11】

- ( f ) アミノ酸配列 WVRQAPGKGLEWIG (配列番号 69) を有する V<sub>H</sub> F R 2 ドメイン；  
 ( g ) アミノ酸配列 WGQGTLTVSS (配列番号 139) を有する V<sub>H</sub> F R 4 ドメイン；  
 ( h ) アミノ酸配列 ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (配列番号 155) を有する V<sub>L</sub> F R 1 ドメイ  
ン；  
 ( i ) アミノ酸配列 WYQQKPEKPPTLLIS (配列番号 174) 又は WYQQKPGQRPKLLIY (配列番号  
181) を有する V<sub>L</sub> F R 2 ドメイン；  
 ( j ) アミノ酸配列 GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC (配列番号 183) を有する V<sub>L</sub>  
F R 3 ドメイン；及び  
 ( k ) アミノ酸配列 FGAGTNVEIK (配列番号 206) を有する V<sub>L</sub> F R 4 ドメイン  
の少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 10 に記載の二重特異的ポリペプチド。

## 【請求項 12】

第 1 可変ドメイン及び / 又は第 2 可変ドメインが、

- ( a ) V<sub>H</sub> F R 2 ドメインの 46 位フェニルアラニン；  
 ( b ) V<sub>H</sub> F R 2 ドメインの 53 位グルタミン酸；  
 ( c ) V<sub>H</sub> F R 2 ドメインの 54 位アルギニン；  
 ( d ) V<sub>H</sub> F R 2 ドメインの 56 位グリシン；  
 ( e ) V<sub>H</sub> F R 2 ドメインの 58 位アラニン；  
 ( f ) V<sub>H</sub> C D R 1 ドメインの 44 位システイン；  
 ( g ) V<sub>H</sub> C D R 2 ドメインの 59 位システイン；  
 ( h ) V<sub>H</sub> F R 4 ドメインの 126 位アルギニン；  
 ( i ) V<sub>L</sub> F R 2 ドメインの 39 位フェニルアラニン又はチロシン；  
 ( j ) V<sub>L</sub> F R 2 ドメインの 45 位リジン；及び  
 ( k ) V<sub>L</sub> F R 3 ドメインの 91 位システイン

の少なくとも 1 つをさらに含み、

前記 ( a ) ~ ( h ) 位置が、1 ~ 31 位の F R 1 ドメイン、32 ~ 44 位の C D R 1 ドメ  
イン、45 ~ 58 位の F R 2 ドメイン、59 ~ 69 位の C D R 2 ドメイン、70 ~ 110  
位の F R 3 ドメイン、111 ~ 125 位の C D R 3 ドメイン、及び 126 ~ 136 位の F  
R 4 ドメインに対応する V<sub>H</sub> ドメイン配列アラインメントの位置に一致し、かつ

前記 ( i ) ~ ( k ) 位置が、1 ~ 23 位の F R 1 ドメイン、24 ~ 37 位の C D R 1 ドメ  
イン、38 ~ 52 位の F R 2 ドメイン、53 ~ 59 位の C D R 2 ドメイン、60 ~ 91 位  
の F R 3 ドメイン、92 ~ 105 位の F R 4 ドメイン、及び 106 ~ 116 B 位の F R 4  
ドメインに対応する V<sub>L</sub> ドメイン配列アラインメントの位置に一致する、

請求項 10 又は 11 に記載の二重特異的ポリペプチド。

## 【請求項 13】

1 又は 2 以上の第 1 可変ドメインと、1 又は 2 以上の第 2 可変ドメインとを含む二重特異  
的ポリペプチドであって、

前記第 1 可変ドメインが第 1 エピトープに結合し、前記第 2 可変ドメインが前記第 1 エピ  
トープとは異なる第 2 エピトープに結合し、

前記第 1 可変ドメイン及び第 2 可変ドメインが、前記第 1 エピトープ又は前記第 2 エピト  
ープのいずれかに結合する抗原結合部位を形成し、かつ

前記第 1 可変ドメイン及び / 又は前記第 2 可変ドメインが、

- ( F ) アミノ酸配列 WVRQAPGKGLEWIG (配列番号 69) を有する V<sub>H</sub> F R 2 ドメイン；  
 ( G ) アミノ酸配列 WGQGTLTVSS (配列番号 139) を有する V<sub>H</sub> F R 4 ドメイン；  
 ( H ) アミノ酸配列 ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (配列番号 155) を有する V<sub>L</sub> F R 1 ド  
メイン；  
 ( I ) アミノ酸配列 WYQQKPEKPPTLLIS (配列番号 174) 又は WYQQKPGQRPKLLIY (配列番号  
181) を有する V<sub>L</sub> F R 2 ドメイン；  
 ( J ) アミノ酸配列 GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC (配列番号 183) を有する V<sub>L</sub>  
F R 3 ドメイン；及び  
 ( K ) アミノ酸配列 FGAGTNVEIK (配列番号 206) を有する V<sub>L</sub> F R 4 ドメイン

からなる群から選択される配列を含み、かつ、

前記ポリペプチドが、

- (a)  $V_H$  F R 2 ドメインの 4 6 位フェニルアラニン；
- (b)  $V_H$  F R 2 ドメインの 5 3 位グルタミン酸；
- (c)  $V_H$  F R 2 ドメインの 5 4 位アルギニン；
- (d)  $V_H$  F R 2 ドメインの 5 6 位グリシン；
- (e)  $V_H$  F R 2 ドメインの 5 8 位アラニン；
- (f)  $V_H$  C D R 1 ドメインの 4 4 位システイン；
- (g)  $V_H$  C D R 2 ドメインの 5 9 位システイン；
- (h)  $V_H$  F R 4 ドメインの 1 2 6 位アルギニン；
- (i)  $V_L$  F R 2 ドメインの 3 9 位フェニルアラニン又はチロシン；
- (j)  $V_L$  F R 2 ドメインの 4 5 位リジン；及び
- (k)  $V_L$  F R 3 ドメインの 9 1 位システイン

の少なくとも 1 つをさらに含み、

前記 (a) ~ (h) 位置が、1 ~ 3 1 位の F R 1 ドメイン、3 2 ~ 4 4 位の C D R 1 ドメイ  
ン、4 5 ~ 5 8 位の F R 2 ドメイン、5 9 ~ 6 9 位の C D R 2 ドメイン、7 0 ~ 1 1 0  
位の F R 3 ドメイン、1 1 1 ~ 1 2 5 位の C D R 3 ドメイン、及び 1 2 6 ~ 1 3 6 位の F  
R 4 ドメインに対応する  $V_H$  ドメイン配列アラインメントの位置に一致し、かつ  
前記 (i) ~ (k) 位置が、1 ~ 2 3 位の F R 1 ドメイン、2 4 ~ 3 7 位の C D R 1 ドメ  
イン、3 8 ~ 5 2 位の F R 2 ドメイン、5 3 ~ 5 9 位の C D R 2 ドメイン、6 0 ~ 9 1 位  
の F R 3 ドメイン、9 2 ~ 1 0 5 位の F R 4 ドメイン、及び 1 0 6 ~ 1 1 6 B 位の F R 4  
ドメインに対応する  $V_L$  ドメイン配列アラインメントの位置に一致する、二重特異的ポリ  
ペプチド。

#### 【請求項 1 4】

軽鎖定常領域又は重鎖定常領域における 1 又は 2 以上の免疫グロブリン定常ドメインをさ  
らに含み、前記ドメインが、C L ドメイン、C H<sub>1</sub> ドメイン、C H<sub>2</sub> ドメイン、及び C H  
<sub>3</sub> ドメインからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の二重特異的ポ  
リペプチド。

#### 【請求項 1 5】

免疫グロブリン定常ドメインが、ヒト I g G 定常領域のドメインである、請求項 1 4 に記  
載の二重特異的ポリペプチド。

#### 【請求項 1 6】

第 1 可変ドメイン及び / 又は第 2 可変ドメインが、

V i f、H I V G P 4 1、H I V インテグラーゼ、T N F - アルファ、v W F、D e l  
t a 4、アブリン、リシン A、P E - 4 0、ジフテリア毒素、ゲロニン、アメリカヤマゴ  
ボウ抗ウイルスタンパク質、I F N - アルファ、I F N - ベータ、N G F、P D G F、T  
P A、T N F - ベータ、A I M I、A I M II、F a s リガンド、V E G I、アンギオス  
タチン、エンドスタチン、I L - 1、I L - 2、I L - 6、G M - C S F、G - C S F、  
M - C S F、G H、プロテアーゼ、及びリボヌクレアーゼ  
からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチド

#### 【請求項 1 7】

第 1 可変ドメイン及び / 又は第 2 可変ドメインが、T N F - アルファ及び D e l t a 4 か  
らなる群から選択される抗原のエピトープに結合する、請求項 1 6 に記載の二重特異的ポ  
リペプチド。

#### 【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチドと、薬学的に許容される担体  
とを含む医薬組成物。

#### 【請求項 1 9】

それを必要とする対象において疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための薬剤の調製

のための、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチドの有効量の使用。

【請求項 20】

疾患又は障害が、TNF - アルファ又は白介素 4 に関する状態である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の二重特異的ポリペプチドを作製する方法であって、

1 又は 2 以上の第 1 可変ドメインを提供するステップと、

1 又は 2 以上の第 2 可変ドメインを提供するステップと、

前記第 1 可変ドメインと、前記第 2 可変ドメインとを会合させて前記二重特異的ポリペプチドを作製するステップと

を含む方法。