

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6362587号
(P6362587)

(45) 発行日 平成30年7月25日 (2018. 7. 25)

(24) 登録日 平成30年7月6日 (2018. 7. 6)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/24 (2006. 01)

C O 7 K 16/24 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 N 15/06 (2006. 01)

C 1 2 N 15/06 1 O O

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

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 19 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-514099 (P2015-514099)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月21日 (2013. 5. 21)
 (65) 公表番号 特表2015-520169 (P2015-520169A)
 (43) 公表日 平成27年7月16日 (2015. 7. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/041928
 (87) 国際公開番号 W02013/177101
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 審査請求日 平成28年5月17日 (2016. 5. 17)
 (31) 優先権主張番号 61/650, 286
 (32) 優先日 平成24年5月22日 (2012. 5. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/784, 600
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391015708
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
 パニー
 BRISTOL-MYERS SQUIB
 B COMPANY
 アメリカ合衆国08543ニュージャージ
 ー州 プリンストン、ルート206アンド
 ・プロビンス・ライン・ロード
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-17A/F IL-23二重特異性抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL-17A/F 結合エンティティおよび IL-23 結合エンティティを含む二重特異性抗体であって、IL-23 結合エンティティが2対の免疫グロブリン鎖を含み、各対は1個の軽鎖と1個の重鎖を有し；

IL-23 軽鎖可変ドメインが配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号23のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号24のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、ならびにIL-23 重鎖可変ドメインが配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、かつ

IL-17A/F 結合エンティティが、IL-23 重鎖のC末端に結合している2個のFabフラグメントを含み、ここで、IL-17A/F 結合エンティティのFabの軽鎖可変ドメインが、配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号23のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号24のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、かつIL-17A/F 結合エンティティのFabの重鎖可変ドメインが、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む、二重特異性抗体。

【請求項 2】

IL-17A/F 結合エンティティおよび IL-23 結合エンティティのFabの軽鎖が、配列番号9のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項1に記載の二重特異性

抗体。

【請求項 3】

IL - 17 A / F 結合エンティティおよび IL - 23 結合エンティティの Fab の軽鎖が、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む定常ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

IL - 23 結合エンティティの重鎖可変ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

IL - 23 結合エンティティの重鎖定常ドメインのアイソタイプが Ig G である、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 10

【請求項 6】

IL - 23 結合エンティティの重鎖定常ドメインのアイソタイプが Ig G 1 または Ig G 4 である、請求項 1 - 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

IL - 23 結合エンティティの重鎖定常ドメインのアイソタイプが Ig G 4 である、請求項 1 - 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 8】

IL - 23 結合エンティティの重鎖定常ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列または配列番号 8 のアミノ酸残基 1 - 326 を含む、請求項 1 - 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 20

【請求項 9】

IL - 17 A / F 結合エンティティおよび IL - 23 結合エンティティの Fab の軽鎖が、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 8 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 10】

IL - 17 A / F 結合エンティティの Fab の重鎖可変ドメインが、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 11】

IL - 17 A / F 結合エンティティの Fab の重鎖の CH1 が、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 10 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 30

【請求項 12】

IL - 23 結合エンティティおよび IL - 17 A / F 結合エンティティを含む二重特異性抗体の重鎖が配列番号 74 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 11 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 13】

二重特異性抗体の軽鎖が、配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、かつ IL - 23 結合エンティティおよび IL - 17 A / F 結合エンティティを含む二重特異性抗体の重鎖が配列番号 74 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 - 12 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 40

【請求項 14】

請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 15】

請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の軽鎖および重鎖をコードする、単離核酸。

【請求項 16】

次の作動可能に結合した要素を含む発現ベクター：
転写プロモーター；

請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の軽鎖をコードする第一ポリヌク 50

レオチド；

請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の重鎖をコードする第二ポリヌクレオチド；および
転写ターミネーター。

【請求項 17】

請求項 16 の発現ベクターを含む組み換え宿主細胞であって、軽鎖および重鎖の両方を発現する、細胞。

【請求項 18】

二重特異性抗体の製造方法であって、
コードされた重鎖および軽鎖が発現され、かつ二重特異性抗体を形成する条件下で請求項 17 に記載の細胞を培養し；そして
該細胞により産生された二重特異性抗体を回収することを含む、方法。

【請求項 19】

処置を必要とする哺乳類における、IL - 17A、IL - 17F および IL - 23 の 1 種以上の上昇した発現により特徴付けられる疾患を処置するための請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む医薬組成物であって；該疾患が、過敏性腸症候群（IBS）、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス（SLE）、抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎（AAV）、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症（MS）、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症、再発進行型多発性硬化症、大腸炎、関節炎、リウマチ性関節炎（RA）、骨関節症、シェーグレン症候群、乾癬、乾癬性関節炎、喘息、臓器同種移植片拒絶反応、移植片対宿主病（GVHD）、ループス腎炎、IgA 腎症、または強皮症である、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

サイトカイン類は、免疫細胞増殖、発達、分化および／または遊走の誘発ならびに多くの細胞型の増殖および分化の制御を含む多様な生物学的作用を介在する可溶性の、小タンパク質である（例えば、Arai et al., Annu. Rev. Biochem. 59:783 (1990); Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3:311 (1991); Paul et al., Cell, 76:241 (1994) 参照）。サイトカイン誘発免疫機能はまた、免疫細胞の全身または局所蓄積により特徴付けられる、炎症性応答も誘発できる。これらは宿主保護的作用も有するが、このような免疫応答は、応答が自己免疫性障害（例えば多発性硬化症）のような過剰および／または慢性炎症および癌／新生物疾患を含むとき、病理学的結果を生じ得る（Oppenheim et al., eds., Cytokine Reference, Academic Press, San Diego, CA (2001); von Andrian et al., New Engl. J. Med., 343:1020 (2000); Davidson et al., New Engl. J. Med., 345:340 (2001); Lu et al., Mol. Cancer Res., 4:221 (2006); Dalglish et al., Cancer Treat Res., 130:1 (2006))。

【0002】

IL - 17A、IL - 17F および IL - 23 は、炎症に関与するサイトカイン類である。IL - 17A は、滑膜線維芽細胞、単球およびマクロファージによる IL - 1、TNF - 、IL - 6 および IL - 23 のような炎症性サイトカイン類の産生を促進し、この全てが、炎症および Th 17 発生を促進する。IL - 17A はまた CXCL - 1、CXCL - 2、CXCL - 5、CXCL - 8、CCL - 2 および CCL - 20 を含む多くのケモカイン類も誘発し、T 細胞、B 細胞、単球および好中球の動員に至る（Lundy, S.K., Arthritis Res. Ther., 9:202 (2007)）。IL - 17F は、IL - 17A と最大の相同性（55%）を共有し、炎症誘発性サイトカインでもある。IL - 17A および IL - 17F のいずれも Th 17 細胞により産生され、一方他の IL - 17 ファミリーメンバーである IL - 17B、IL - 17C および IL - 17D は非 T 細胞源から産生される。IL - 17

AおよびIL-17Fは、IL-17Aホモ二量体およびIL-17Fホモ二量体としてまたはIL-17A/Fヘテロ二量体として存在できる(Liang, S.C. et al., J. Immunol., 179:7791-7799 (2007). IL-17A is increased in rheumatoid arthritis sera and synovial fluid, and is present in the T-cell rich areas of the synovium. Shahrara, S., Arthritis Res. Ther., 10:R93 (2005)). IL-17Aはまた骨および軟骨損傷も誘発し得る。IL-17の効率的遮断が、IL-17Aホモ二量体、IL-17Fホモ二量体およびIL-17A/Fヘテロ二量体の中和に必要である。

【0003】

IL-23は、さらなる40kDの異なるサブユニット(IL-12p40)にジスルフィド結合した19キロダルトン(kD)4重ヘリカルコアサブユニット(IL-23p19)を含む、タイプ1ヘテロ二量体である。IL-23は、免疫応答の先天性アームと適応性アームを橋渡しする重要なサイトカインであり、抗原攻撃に対する応答の初期に産生され、初期局所免疫応答の発動に必須である。さらに、IL-23は、NK細胞の活性化、T細胞増殖の増強および抗体産生の制御に中心的役割を有する。IL-23はまた、細胞内病原体に対する細胞介在免疫に重要である炎症促進性サイトカイン類(例えば、IFN-)も制御する。最近の報告では、ヒトにおいて、IL-23量増加が、リウマチ性関節炎(RA)、ライム関節炎、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)、乾癬および多発性硬化症(MS)を含む数種の自己免疫疾患と関連していることが示されている。IL-23p19ノックアウトマウスは、自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、コラーゲン誘発関節炎(CIA)および中枢神経系自己免疫性誘発に抵抗性であった。IL-23はヒトTh17細胞の発達に必須ではないが、その生存および/または増殖に必要であるように見える(Paradowska-Gorycka, A., Scandinavian Journal of Immunology, 71:134-145 (2010))。遺伝学的研究は、IL-23受容体遺伝子と、CD、RAおよびグレーブス眼症を含む数種の自己免疫疾患の間の関係を明らかにした。IL-23-Th17軸は、自己免疫疾患発症に重大である(Leng et al., Archives of Medical Research, 41:221-225 (2010))。

【発明の概要】

【0004】

数種の自己免疫疾患に介在し、これを促進するIL-17A、IL-17FおよびIL-23p19の明らかにされた活性は、これらの標的に拮抗できる分子の臨床的可能性および必要性を説明する。ここに示す本発明は、これらのおよび他の要請を満たす。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】抗体全体およびそのモジュラー要素の略図である。

【図2】リンカーを介して結合した二重特異性抗体の第二のアームのC末端Fabユニットを有する抗体全体を含み、共通軽鎖を使用するbiAbFabLと名づけた二重特異性抗体のモデルを示す。

【図3】リンカーを介して結合した二重特異性抗体の第二のアームのN末端Fabユニットを有する抗体全体を含む、taFabと名づけた二重特異性抗体のモデルを示す。重鎖部分と同様に、リンカーを介して結合した二重特異性の各アームに2個の軽鎖がある。

【図4】伝統的抗体に似ているが、しかし、CH₃領域における静電的相補性会合を介して会合した2個の異なる重鎖を含む、ヘテロ二量体Fcと名づけた二重特異性抗体のモデルを示す。ヘテロ二量体Fcは共通軽鎖を使用する。

【図5】リンカーを介してFab領域とヒンジの間に挿入された二重特異性抗体の第二のアームのFvユニットを有する抗体全体を含む、VCVFcと名づけた二重特異性抗体のモデルを示す。

【図6】リンカーを介してFab領域とヒンジの間に挿入された二重特異性抗体の第二のアームに単ドメイン抗体を有する抗体全体を含む、VCDFcと名づけた二重特異性抗体のモデルを示す。

【図7】IL-23p19への強い抗体結合およびIL-12への交差反応性の欠如を示す、ELISA結果を示す。

10

20

30

40

50

【図8】kit 225アッセイで観察されるIL-23シグナル伝達の強力な中和を示す。

【図9】7B7、STELARA(登録商標)(ウステキヌマブ、抗IL-23p40抗体)およびヒトIL-23受容体が種々のIL-23p19アラニンシェーピングされた変異体、野生型および精製野生型IL-23p19(陽性対照)および陰性対照に結合する能力のBiacore結果を示す。7B7 mAb結合を左カラムに示し、STELARA(登録商標)を中央カラムに示し、hIL-23R-Fc結合を右カラムに示す。星印をした4種の変異体を、これらの結果を確認するためのスケールアップのために選択した。

【図10】IL-23アラニン変異体に結合するIL-23p19抗体のBiacore動態解析を示す。

10

【図11】7B7抗体(抗IL-23p19)を同定し、選択するために使用した工程を模式的に示す。

【図12】マーマセットEAEモデルにおける経時的臨床疾患スコアを模式的に示す。

【図13】マーマセットEAEモデルにおけるMRI病巣スコアを模式的に示す。

【図14】マーマセットEAEモデルにおけるMRI視神経スコアを模式的に示す。

【図15】インターロイキンにより整列したIL-17AまたはIL-17Fを有するFabの全4構造の重層である。

【図16】IL-17A変異体の細胞機能的活性を示すグラフである。

【図17】IL-17F変異体の細胞機能的活性を示すグラフである。

【図18】Y108A変異を含む変異体の加速されたオフ速度を証明するBiAb3に結合する9nM IL-17A変異体およびその組み合わせの模式的重層を示す。

20

【図19】BiAb3に結合するIL-17A変異体のコンピューターによるエネルギー解析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0006】

発明の詳細な記載

本発明は、一つの態様において、IL-17AおよびIL-17Fに結合するIL-17A/F結合エンティティおよびp19を介してIL-23に結合するIL-23結合エンティティを含む、二重特異性抗体を提供する。本発明はまた、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単離核酸ならびに該核酸を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞および二重特異性抗体を製造および使用する方法も含む。

30

【0007】

他の態様において、本発明は、二重特異性抗体を含む組成物および二重特異性抗体を含むキットならびに二重特異性抗体を含む製品を提供する。

【0008】

本発明の二重特異性抗体は、炎症誘発性サイトカイン類、例えば、IL-17A、IL-17FおよびIL-23p19の阻害に有用である。本抗体は、IL-17Aホモ二量体、IL-17Fホモ二量体またはIL-17A/Fヘテロ二量体の炎症誘発作用の減少、制限、中和または遮断に使用できる。同様に、本抗体は、IL-17Aホモ二量体、IL-17Fホモ二量体またはIL-17A/Fヘテロ二量体の炎症誘発性作用の低減、制限、中和または遮断に使用できる。このような場合、抗体の抗IL-23p19部分を、ホモ二量体およびヘテロ二量体を含むIL-17Aおよび/またはIL-17Fを産生するであろう新T細胞の産生の低減、制限、中和または遮断に使用する。ここに記載する二重特異性抗体は、多発性硬化症(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、炎症性腸疾患、乾癬、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)および巨細胞性動脈炎のような炎症性障害および自己免疫疾患の処置に使用できる。ここに記載する二重特異性抗体はまた血管形成を含む癌の処置にも使用できる。例えば、ここに記載する二重特異性抗体は、多発性骨髄腫誘発骨溶解性骨病の処置に使用できる(Sotomayor, E.M., Blood, 116(18):3380-3382 (2010))。

40

50

【 0 0 0 9 】

以下の記載で、多くの用語を広範に使用する。次の定義を、本発明の理解を容易にするために提供する。

【 0 0 1 0 】

特に断らない限り、単数表現および“少なくとも1個”は、互換的に使用され、1個または1個より多いことを意味する。

【 0 0 1 1 】

“抗体”(A b)および“免疫グロブリン”(I g)は、同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体は特異的抗原に結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体および抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両者を含む。後者の種類のポリペチドは、例えば、リンパ系で低レベルで、そして骨髄腫で増加したレベルで産生される。それゆえに、ここで使用する用語“抗体”または“抗体ペプチド”は、インタクトな抗体または特異的結合についてインタクトな抗体に匹敵するその抗原結合フラグメントをいい、キメラ、ヒト化、完全ヒトおよび二重特異性抗体を含む。ある態様において、抗原結合フラグメントは、例えば、組み換えDNA技法により産生される。さらなる態様において、抗原結合フラグメントは、インタクトな抗体の酵素開裂または化学開裂により産生される。抗原結合フラグメントは、F a b、F a b'、F(a b)²、F(a b')²、F vおよび一本鎖抗体を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 0 1 2 】

ここで使用する用語“単離抗体”は、同定され、その自然環境から分離および/または回収されている抗体をいう。その自然環境への混入は、該抗体の診断的または治療的使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい態様において、抗体は、(1)ローリー法で測定して、抗体の95重量%を超える、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシェークエネーターの使用によりN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度までまたは(3)クーマシーブルーまたは好ましくは、銀染色を使用して、還元または非還元条件下のSDS-PAGEにより均一なまで、精製される。単離抗体は、該抗体の自然環境の少なくとも1個の成分が存在しない、組み換え細胞内でインサイチュで存在する抗体を含む。通常、しかしながら、単離抗体は、少なくとも1工程の精製により調製する。

20

30

【 0 0 1 3 】

用語“アゴニスト”は、他の分子の活性、活性化または機能を高めるタンパク質、ポリペチド、ペプチド、抗体、抗体フラグメント、大分子または小分子(10 kD未満)を含む何れかの化合物をいう。

【 0 0 1 4 】

用語“アンタゴニスト”は、他の分子の活性、活性化または機能を減ずるタンパク質、ポリペチド、ペプチド、抗体、抗体フラグメント、大分子または小分子(10 kD未満)を含む何れかの化合物をいう。

【 0 0 1 5 】

用語“ポリペチドの結合”は、本発明のリガンドポリペチドの受容体への結合；本発明の受容体ポリペチドのリガンドへの結合；本発明の抗体の抗原またはエピトープへの結合；本発明の抗原またはエピトープの抗体への結合；本発明の抗体の抗イディオタイプ抗体への結合；本発明の抗イディオタイプ抗体のリガンドへの結合；本発明の抗イディオタイプ抗体の受容体への結合；抗本発明の抗イディオタイプ抗体のリガンド、受容体または抗体などを含むが、これらに限定されない。

40

【 0 0 1 6 】

“二重特異性”または“二機能性”抗体は、2種の異なる重/軽鎖対および2個の異なる結合部位を有するハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはF a b'フラグメントの結合を含むが、これらに限定されない多様な方法で製造できる。例えば、Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostel

50

ny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992) 参照。

【 0 0 1 7 】

ここで使用する用語“エピトープ”は、抗体が特異的に結合する抗原の部分をいう。それゆえに、用語“エピトープ”は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体への特異的結合が可能である何らかのタンパク質決定因子を含む。エピトープ決定因子は、通常アミノ酸または糖側鎖のような、分子の化学的に活性な表面集団から成り、通常特異的三次元構造特性ならびに特異的荷電特性を有する。より具体的に、ここで使用する用語“IL-17エピトープ”、“IL-23エピトープ”および/または“IL-23/p19エピトープ”は、対応するポリペチドの、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはマウスまたはヒトにおける抗原性活性または免疫原性活性を有する部分をいう。免疫原性活性を有するエピトープは、例えば、IL-17AまたはIL-17FまたはIL-23/p19ポリペチドの動物に抗体応答を誘発する部分である。抗原性活性を有するエピトープは、例えば、IL-17AまたはIL-17FまたはIL-23/p19ポリペチドの、当分野で周知の方法の何れか、例えば、免疫アッセイ、プロテアーゼ消化、結晶解析またはH/D-交換により測定して抗体が免疫特異的に結合する部分である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。このようなエピトープは本来線形であってよくまたは非連続的エピトープであってよい。それゆえに、ここで使用する用語“立体構造的エピトープ”は、連続した一連のアミノ酸以外の、抗原のアミノ酸間の空間的關係により形成される非連続的エピトープである。

10

【 0 0 1 8 】

ここで使用する用語“免疫グロブリン”は、実質的に免疫グロブリン遺伝子によりコードされる1個以上のポリペチドからなる、タンパク質をいう。免疫グロブリンの一つの形態が、抗体の基本構造単位を構成する。この形態は四量体であり、免疫グロブリン鎖の2個の同一対から成り、各対は1個の軽鎖および1個の重鎖を有する。各対において、軽鎖および重鎖可変領域は、一体となって抗原への結合を担い、定常領域は、抗体エフェクター機能を担う。

20

【 0 0 1 9 】

完全長免疫グロブリン“軽鎖”(約25kDまたは約214アミノ酸)は、NH₂末端の可変領域遺伝子(約110アミノ酸)およびCOOH末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によりコードされる。完全長免疫グロブリン“重鎖”(約50kDまたは約446アミノ酸)は、同様に可変領域遺伝子(約116アミノ酸)および他の上記定常領域遺伝子の1個(約330アミノ酸)によりコードされる。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンと分類され、それぞれIgG(例えばIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4)、IgM、IgA、IgDおよびIgEとしての抗体のアイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖内で、可変領域および定常領域は、約12個以上のアミノ酸の“J”領域により一体となり、重鎖はまた約10個以上のアミノ酸の“D”領域も含む(一般に、Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd Edition, Raven Press, NY (1989)), Chapter 7参照(引用によりその全体を本明細書に包含させる))。

30

【 0 0 2 0 】

免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域は、3個の超可変領域により中断される“フレームワーク”領域からなる。それゆえに、用語“超可変領域”は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、“相補性決定領域”または“CDR”からのアミノ酸残基(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))および/または“超可変ループ”からのアミノ酸残基(Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))である(この両者とも引用により本明細書に包含させる)。“フレームワーク領域”または“FR”残基は、ここに定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。種々の軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。それゆえに、“ヒトフレームワーク領域”は、天然に存在するヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域と実質的に同一である(約85%以上、通常90~95%以上)

40

50

フレームワーク領域である。成分軽鎖および重鎖の組み合わせフレームワーク領域である、抗体のフレームワーク領域は、C D Rの配置および整列をさせる。C D Rは、主に抗原のエピトープへの結合を担う。したがって、用語“ヒト化”免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域および非ヒト(通常マウスまたはラット)免疫グロブリン由来の1個以上のC D Rを含む免疫グロブリンをいう。C D Rを提供する非ヒト免疫グロブリンは、“ドナー”と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは“アクセプター”と呼ばれる。定常領域は存在する必要はないが、存在するならば、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならず、すなわち、少なくとも約85~90%、好ましくは約95%以上同一である。それゆえに、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、恐らくC D R以外、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。さらに、ヒトフレームワーク領域内の1個以上の残基は、最適抗原結合親和性および特異性を保持するために、親配列に復帰変異させてよい。このような方法で、非ヒト親抗体からのある種のフレームワーク残基は、その免疫原性を最小化しながら、親抗体の結合特性を保持するために、ヒト化抗体に保持される。ここで使用する用語“ヒトフレームワーク領域”は、このような復帰変異を有する領域を含む。“ヒト化抗体”は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。例えば、ヒト化抗体は、例えば、キメラ抗体の可変領域全体が非ヒトであるため、上に定義した典型的キメラ抗体を含まない。

10

【0021】

用語“ヒト化”免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域および非ヒト、例えば、マウス、ラットまたはウサギ免疫グロブリン由来の1個以上のC D Rを含む免疫グロブリンをいう。C D Rを提供する非ヒト免疫グロブリンは“ドナー”と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、“アクセプター”と呼ばれる。定常領域は存在する必要はないが、存在するならば、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならず、すなわち、少なくとも約85~90%、好ましくは約95%以上同一である。それゆえに、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、恐らくC D Rおよび恐らくフレームワーク領域内の数個の復帰変異アミノ酸残基(例えば、1~15残基)以外、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。“ヒト化抗体”は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。例えば、ヒト化抗体は、例えば、キメラ抗体の可変領域全体が非ヒトであるため、上に定義した典型的キメラ抗体を含まない。

20

【0022】

ここで使用する用語“ヒト抗体”は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーまたは、例えば、Kucherlapati et al. が米国特許番号5,939,598において記載した、1個以上のヒト免疫グロブリンが遺伝子導入され、内在性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を含む。

30

【0023】

用語“遺伝子改変抗体”は、アミノ酸配列が天然抗体から変更されている抗体を意味する。抗体の産生における組み換えDNA技法の適切性のために、自然抗体で見られるアミノ酸配列にとらわれる必要はなく、抗体は所望の特徴を得るために再設計できる。可能なバリエーションは多く、1個または数個のみのアミノ酸変化から、例えば、可変領域および/または定常領域の完全な再設計までの範囲である。定常領域における変更は、一般に、補体結合、膜との相互作用および他のエフェクター機能のような特徴を改善または変更するために行う。可変領域における変更は、抗原結合特徴を改善するために行う。

40

【0024】

“Fabフラグメント”は、1個の軽鎖ならびに重鎖のC_{H1}および可変領域を含む。Fab分子の重鎖は、他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【0025】

“Fab'フラグメント”は、1個の軽鎖ならびにF(ab')₂分子を形成するために2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成できるようにC_{H1}ドメインとC_{H2}ドメインの間に多くの定常領域を含む1個の重鎖を含む。

【0026】

50

“ $F(ab')_2$ フラグメント”は、2個の軽鎖ならびに2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成できるように C_{H1} ドメインと C_{H2} ドメインの間に定常領域の一部を含む2個の重鎖を含む。

【0027】

“ F_v フラグメント”は、重鎖および軽鎖からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0028】

“単ドメイン抗体”は、単ドメイン F_v ユニット、例えば、 V_H または V_L からなる抗体フラグメントをいう。抗体全体と同様、それは特異的抗原に選択的に結合できる。分子量わずか12～15kDaで、単ドメイン抗体は、2個の重タンパク質鎖および2個の軽鎖からなる一般的抗体(150～160kDa)よりはるかに小さく、 Fab フラグメント(～50kDa、1個の軽鎖および重鎖の半分)および一本鎖可変フラグメント(～25kDa、1個は軽鎖由来、他方は重鎖由来の2個の可変ドメイン)よりも小さい。最初の単ドメイン抗体は、ラクダ科の動物で見られた重鎖抗体から設計された。単ドメイン抗体のほとんどの研究が、現在重鎖可変ドメインに基づくが、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖由来のナノボディも、標的エピトープに特異的に結合することが示されている。

【0029】

ここで使用する用語“モノクローナル抗体”または“ mAb ”または“ MAb ”または“ MaB ”または“ maB ”は、ハイブリドーマテクノロジーにより産生された抗体に限定されない。用語“モノクローナル抗体”または“ mAb ”または“ MAb ”または“ MaB ”または“ maB ”は、真核、原核またはファージクローンの何れかを含む単クローンに由来する抗体をいい、それが産生された方法には由来しない。

【0030】

ここで使用する“核酸”または“核酸分子”は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により産生されたフラグメントおよびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用およびエキソヌクレアーゼ作用の何れかにより産生されたフラグメントのような、ポリヌクレオチドをいう。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド(例えばDNAおよびRNA)または天然に存在するヌクレオチドのアナログ(例えば、天然に存在するヌクレオチドの - エナンチオマー形態)または両者の組み合わせである単量体である。修飾ヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジンまたはプリン塩基部分に改変を有してよい。糖修飾は、例えば、1個以上のヒドロキシル基のハロゲン、アルキル基、アミン基およびアジド基での置換を含みまたは糖類は、エーテルまたはエステルとして官能化できる。さらに、糖部分全体を、含窒素糖類および炭素環式糖アナログのような立体的および電子工学的に類似した構造で置き換えることができる。塩基部分の修飾の例は、アルキル化プリン類およびピリミジン類、アシル化プリン類またはピリミジン類または他の周知ヘテロ環式代替物を含む。核酸単量体は、ホスホジエステル結合またはこのような結合の類似結合により結合できる。ホスホジエステル結合の類似結合は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ホスホロアミデートなどを含む。用語“核酸分子”はまた、ポリアミド主鎖に結合した天然に存在するまたは修飾された核酸塩基を含むいわゆる“ペプチド核酸”も含む。核酸は一本鎖でも二本鎖でもよい。

【0031】

用語“核酸分子の補体”は、対照ヌクレオチド配列に対して相補的ヌクレオチド配列または逆方向性を有する核酸分子をいう。

【0032】

用語“縮重ヌクレオチド配列”は、ポリペチドをコードする対照核酸分子と比較して、1個以上の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列をいう。縮重コドンはヌクレオチドの異なるトリプレットを含むが、同じアミノ酸残基をコードする(すなわち、GAUおよびGACトリプレットは各々Aspをコードする)。

【0033】

10

20

30

40

50

“遊離核酸分子(isolated nucleic acid molecule)”は、生物のゲノムDNAに統合されていない核酸分子である。例えば、細胞のゲノムDNAから分離されている増殖因子をコードするDNA分子は、遊離DNA分子である。遊離核酸分子の他の例は、生物のゲノムに統合されていない化学合成された核酸分子である。特定の種から遊離されている核酸分子は、その種の染色体の完全DNA分子より小さい。

【0034】

“核酸分子構築物”は、本来存在しない配置で組み合わせたり、かつ並置された核酸セグメントを含むように、人的介入により修飾されている、一本鎖または二本鎖の核酸分子をいう。

【0035】

“相補的DNA(cDNA)”は、逆転写酵素である酵素によりmRNA鋳型から形成される一本鎖DNA分子である。典型的に、mRNAの部分に相補的なプライマーを、逆転写の開始に用いる。当業者はまた、このような一本鎖DNA分子とその相補的DNA鎖からなる二本鎖DNA分子をいうために用語“cDNA”も使用する。用語“cDNA”はまたRNA鋳型から合成されたcDNA分子のクローンもいう。

【0036】

“プロモーター”は、構造遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列である。典型的に、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位近位の、遺伝子の5'非コーディング領域に位置する。転写開始において機能するプロモーター内の配列要素は、しばしばコンセンサスヌクレオチド配列により特徴付けられる。これらのプロモーター要素は、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的要素(DSE; McGehee et al., Mol. Endocrinol., 7:551 (1993))、サイクリックAMP応答要素(CRE)、血清応答要素(SRE; Treisman, Seminars in Cancer Biol., 1:47 (1990))、グルココルチコイド応答要素(GRE)ならびにCRE/ATF、AP2(Ye et al., J. Biol. Chem., 269:25728 (1994))、SP1、cAMP応答要素結合タンパク質(CREB; Loeken, Gene Expr., 3:253 (1993))および八量体因子(一般に、Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1987), and Lemaigre et al., Biochem. J., 303:1 (1994)参照)のような他の転写因子の結合部位(O'Reilly et al., J. Biol. Chem., 267:19938 (1992))を含む。プロモーターが誘導型プロモーターであるならば、誘発剤に応答して転写率が上がる。対照的に、プロモーターが構成的プロモーターであるならば、転写率は誘発剤により制御されない。抑制的プロモーターも知られている。

【0037】

“制御要素”は、コアプロモーターの活性を調節するヌクレオチド配列である。例えば、制御要素は、特定の細胞、組織または小器官で排他的にまたは優先的に転写を可能とする、細胞性因子と結合したヌクレオチド配列である。これらのタイプの制御要素は、“細胞特異的”、“組織特異的”または“小器官特異的”方法で発現される遺伝子と通常結合している。

【0038】

“エンハンサー”は、転写開始部位に対するエンハンサーの距離または配向に関係なく、転写効率を上げることができるタイプの制御要素である。

【0039】

“異種性DNA”は、ある宿主細胞内に自然に存在しないDNA分子またはDNA分子の集団をいう。特定の宿主細胞に対して異種性のDNA分子は、宿主DNAが非宿主DNA(すなわち、外来性DNA)と組み合わせられている限り、宿主細胞種由来のDNA(すなわち、内在性DNA)を含み得る。例えば、転写プロモーターを含む宿主DNAセグメントに作動可能に結合したポリペチドをコードする非宿主DNAセグメントを含むDNA分子は、異種性DNA分子であると見なす。逆に、異種性DNA分子は、外来性プロモーターと作動可能に結合している内在性遺伝子を含み得る。他の例として、野生型細胞由来の遺伝子を含むDNA分子は、該DNA分子が野生型遺伝子を欠く変異体細胞に導入される

10

20

30

40

50

ならば、異種性DNAと見なされる。

【0040】

“発現ベクター”は、宿主細胞で発現される遺伝子をコードする核酸分子である。典型的に、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は、通常プロモーターの制御下に置かれ、このような遺伝子はプロモーターに“作動可能に結合した”と言われる。同様に、制御要素およびコアプロモーターは、制御要素がコアプロモーターの活性を調節するならば、作動可能に結合している。

【0041】

“組み換え宿主”は、クローニングベクターまたは発現ベクターのような異種性核酸分子を含む細胞である。本発明では、組み換え宿主の例は、発現ベクターから本発明のアンタゴニストを産生する細胞である。これに対して、このようなアンタゴニストは、該アンタゴニストの“天然源”であって、発現ベクターを欠く細胞により産生され得る。

10

【0042】

用語“アミノ末端”および“カルボキシル末端”は、ここでは、ポリペチド内の位置をいうために使用する。矛盾がなければ、これらの用語は、ポリペチドの特定の配列または部分において、近接または対応する位置を意味するために使用する。例えば、ポリペチド内の対照配列において、カルボキシル末端に位置するある種の配列は、対照配列のカルボキシル末端の近位に位置するが、必ずしも完全ポリペチドのカルボキシル末端ではない。

【0043】

“融合タンパク質”は、少なくとも2個の遺伝子のヌクレオチド配列を含む核酸分子により発現されるハイブリッドタンパク質である。例えば、融合タンパク質は、親和性マトリクスに結合するポリペチドと融合した、IL-17RAポリペチドの少なくとも一部を含む。このような融合タンパク質は、親和性クロマトグラフィーを使用して大量のIL-17Aを単離するための手段を提供する。

20

【0044】

用語“受容体”は、“リガンド”と呼ばれる生理活性分子と結合する細胞関連タンパク質をいう。この相互作用は、リガンドの作用を細胞に伝達する。受容体は膜結合型、細胞質または核であってよく、単量体(例えば、甲状腺刺激ホルモン受容体、ベータ-アドレナリン受容体)または多量体(例えば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリスロポエチン受容体およびIL-6受容体)であってよい。膜結合型受容体は、典型的にシグナル伝達に關与する細胞外リガンド結合ドメインおよび細胞内エフェクタードメインを含む多ドメイン構造により特徴付けられる。ある種の膜結合型受容体において、細胞外リガンド結合ドメインおよび細胞内エフェクタードメインは、完全機能的受容体を含む別々のポリペチドに位置する。

30

【0045】

一般に、リガンドの受容体への結合は受容体の立体構造的変化を起こし、これは細胞のエフェクタードメインと他の分子の相互作用を生じ、続いて細胞代謝の変更に至る。しばしば受容体-リガンド相互作用と関連する代謝事象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクリックAMP産生増加、細胞性カルシウム動員、膜脂質動員、細胞接着、イノシトール脂質加水分解およびリン脂質加水分解を含む。

40

【0046】

用語“発現”は、遺伝子産物の生合成をいう。例えば、構造遺伝子の場合、発現は、構造遺伝子のmRNAへの転写およびmRNAの1個以上のポリペチドへの翻訳を含む。

【0047】

用語“補体/抗補体対”は、適当な条件下で非共有結合的結合した、安定な対を形勢する非同一部分を意味する。例えば、ピオチンおよびアビジン(またはストレプトアビジン)は、補体/抗補体対のプロトタイプメンバーである。補体/抗補体対の他の例は、受容体/リガンド対、抗体/抗原(またはハプテンまたはエピトープ)対、センス/アンチセンスポリヌクレオチド対などを含む。補体/抗補体対が後に解離することが望まれるとき、補体/抗補体対は、好ましくは 10^{-9} M^{-1} 未満の結合親和性を有する。

50

【 0 0 4 8 】

ここで使用する“治療剤”は、抗体部分にコンジュゲートして治療に有用であるコンジュゲートを生じる分子または原子である。治療剤の例は、薬物、毒素、免疫調節剤、キレート剤、ホウ素化合物、光活性剤または色素および放射性同位体を含む。

【 0 0 4 9 】

“検出可能標識”は、抗体部分にコンジュゲートして、診断に有用な分子を産生できる分子または原子である。検出可能標識の例は、キレート剤、光活性剤、放射性同位体、蛍光剤、常磁性イオンまたは他のマーカー部分を含む。

【 0 0 5 0 】

用語“親和性タグ”は、ここで、第二のポリペチドの精製または検出のために第二のポリペチドに結合できるまたは第二のポリペチドの基質への結合部位を提供する、ポリペチドセグメントである。原則として、抗体または他の特異的結合剤が利用可能であるあらゆるペプチドまたはタンパク質を親和性タグとして使用できる。親和性タグは、ポリ-ヒスチジン・トラクト、プロテイン A (Nilsson et al., EMBO J., 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol., 198:3 (1991)), グルタチオン S トランスフェラーゼ (Smith et al., Gene, 67:31 (1988)), G l u - G l u 親和性タグ (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7952 (1985)), サブスタンス P、F L A G (登録商標) ペプチド (Hopp et al., Biotechnology, 6:1204 (1988)), ストレプトアビジン結合ペプチドまたは他の抗原性エピトープまたは結合ドメインを含む。総論としては、Ford et al., Protein Expression and Purification, 2:95 (1991) 参照のこと。親和性タグをコードする D N A 分子は、市販されている (例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)。

【 0 0 5 1 】

“ I L - 1 7 A 結合エンティティ ” は、そのホモ二量体形態 (I L - 1 7 A / I L - 1 7 A) およびそのヘテロ二量体形態 (I L - 1 7 A / I L - 1 7 F) の I L - 1 7 A に特異的に結合する抗体のような結合エンティティである。

【 0 0 5 2 】

“ I L - 1 7 F 結合エンティティ ” は、そのホモ二量体形態 (I L - 1 7 F / I L - 1 7 F) およびそのヘテロ二量体形態 (I L - 1 7 A / I L - 1 7 F) の I L - 1 7 F に特異的に結合する抗体のような結合エンティティである。

【 0 0 5 3 】

“ I L - 1 7 A / F 結合エンティティ ” は、 I L - 1 7 A および I L - 1 7 F が共有する、同一または類似エピトープ、例えば、連続的または非連続的エピトープを認識し、結合することにより、 I L - 1 7 A および I L - 1 7 F に特異的に結合する、抗体のような結合エンティティである。 I L - 1 7 A / F 結合エンティティは、 I L - 1 7 A ホモ二量体、 I L - 1 7 F ホモ二量体および I L - 1 7 A / I L - 1 7 F ヘテロ二量体に結合する。

【 0 0 5 4 】

一つの問題は、 I L - 1 7 A、 I L - 1 7 F および I L - 2 3 p 1 9 が、数種の炎症性および / または自己免疫性障害で過発現し、原因および / または持続可能性と関連付けられていることである。本発明のいくつかの態様が提供する一つの解決手段は、各サイトカインに結合し、各サイトカインの同族受容体を介するシグナル伝達を阻害するまたは減少させる二重特異性抗体、例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体形態の投与によりサイトカイン類が細胞に信号を送るのを阻害するまたは減少させることである。

【 0 0 5 5 】

他の問題は、二重特異性 I L - 1 7 A / F および I L - 2 3 p 1 9 二重特異性抗体、例えば、 b i a b 3 の製造に際して遭遇したのは、 I L - 1 7 A に高親和性を有し、かつ I L - 1 7 A の有効な中和剤、例えば、 I C ₅₀ である二重特異性抗体の製造の難しさであった。表 1 に示すマウス親抗体 (例えば、キメラ 3 3 9 . 1 5、 3 3 9 . 1 5 . 3 . 5、 3 3 9 . 1 5 . 5 . 3 または 3 3 9 . 1 5 . 3 . 6) は、 I L - 1 7 A / F に対して 0 . 3 0 nM の I C ₅₀ および I L - 1 7 F に対して 0 . 2 6 nM の I C ₅₀ を有したが、 I L - 1 7 A に対す

10

20

30

40

50

る IC_{50} はわずか 11 nM であった。IL - 17 A のシグナル伝達を阻害または中和する抗体の能力を増強する必要があった。表 3 に示すとおり、マウス親キメラ 339.15 およびヒト化親 339.134 は、IL - 17 A に同等な結合親和性であった。さらに、表 8 に示すとおり、ヒト化親 339.134 が IL - 17 A を阻害する能力 (IC_{50} の 1.3 nM) は、IL - 17 A / F (0.27 nM の IC_{50}) および IL - 17 F (0.24 nM の IC_{50}) を阻害する能力を比較して、なお顕著に低かった。この問題は、biAb3 の IL - 23 p19 抗体の軽鎖 (配列番号 17) を使用することにより驚くべきことに解決された。IL - 23 p19 軽鎖を、339.134 のヒト化重鎖と対にしたとき、得られたモノクローナル抗体は、IL - 17 A のシグナル伝達を阻害する能力が顕著に高く (表 9 参照)、IL - 17 A に対する親和性が顕著に増加した (表 10 参照)。この増強された親和性および中和能を提供し得る、例えば、biAb3 の IL - 23 p19 / IL - 17 A / F 軽鎖によりここで共有されている重要な残基は、実施例 9 の X 線結晶解析およびアラニン変異体試験により証明されるとおり、配列番号 2 の Y108 または Tyr108 であり得る。

【0056】

一つの態様において、本発明は、二重特異性抗体、抗体およびその抗原結合フラグメントを提供する。本発明の二重特異性抗体は、IL - 17 A に結合する IL - 17 A 結合エンティティおよび p19 を介して IL - 23 に結合する IL - 23 結合エンティティを含む。他の面において、本発明の二重特異性抗体は、IL - 17 F に結合する IL - 17 F 結合エンティティおよび p19 を介して IL - 23 に結合する IL - 23 結合エンティティを含む。他の面において、本発明の二重特異性抗体は、IL - 17 A および IL - 17 F に結合する IL - 17 A / F 結合エンティティおよび p19 を介して IL - 23 に結合する IL - 23 結合エンティティを含む。p19 を介して IL - 23 に結合する IL - 23 結合エンティティは、以後、IL - 23 に結合する結合エンティティまたは“IL - 23 結合エンティティ”と呼ぶ。ヒト IL - 17 A のポリヌクレオチド配列を配列番号 1 に示し、対応するポリペチド配列を配列番号 2 に示す。IL - 17 A ポリペチドのシグナル配列は、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 ~ 23 である。それゆえに、配列番号 2 のアミノ酸残基 24 ~ 155 は成熟 IL - 17 A ポリペチドを構成する。IL - 17 A に結合するここに開示する抗体 (およびその抗原結合フラグメント) および二重特異性抗体は、成熟 IL - 17 A ポリペチド (配列番号 2 のアミノ酸残基 24 ~ 155) に結合する。ヒト IL - 17 F のポリヌクレオチド配列を配列番号 3 に示し、対応するポリペチド配列を配列番号 4 に示す。IL - 17 F ポリペチドのシグナル配列は、配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ 30 である。それゆえに、配列番号 4 のアミノ酸残基 31 ~ 163 は成熟 IL - 17 F ポリペチドを構成する。IL - 17 F に結合するここに開示する抗体 (およびその抗原結合フラグメント) および二重特異性抗体は、成熟 IL - 17 F ポリペチド (配列番号 4 のアミノ酸残基 31 ~ 163) に結合する。IL - 23 のヒト p19 サブユニットのポリヌクレオチド配列を配列番号 5 に示し、対応するポリペチド配列を配列番号 6 に示す。IL - 23 p19 ポリペチドのシグナル配列は、配列番号 6 のアミノ酸残基 1 ~ 19 である。それゆえに、配列番号 6 のアミノ酸残基 20 ~ 189 は成熟 IL - 23 p19 ポリペチドを構成する。IL - 23 p19 に結合するここに開示する抗体 (およびその抗原結合フラグメント) および二重特異性抗体は、成熟 IL - 23 p19 ポリペチド (配列番号 6 のアミノ酸残基 20 ~ 189) に結合する。

【0057】

本発明の一つの面において、IL - 17 A / F 結合エンティティは、抗体、すなわち、各対 1 個の軽鎖と 1 個の重鎖を有する 2 対の免疫グロブリン鎖を含み、IL - 23 結合エンティティは、各々軽鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域を含む 2 個の Fab フラグメントを含み、IL - 23 結合エンティティの Fab フラグメントは IL - 17 A / F 結合エンティティの重鎖の C 末端 (Fc) に結合している。この二重特異性抗体形式をここでは biAbFabL と呼ぶ (図 2 参照)。他の態様において、IL - 23 結合エンティティの Fab フラグメントを含む軽鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域の各々は、それぞ

れ I L - 1 7 A / F 結合エンティティの軽鎖および重鎖の N 末端に結合する。この二重特異性抗体形式をここでは t a F a b と呼ぶ(図 3 参照)。

【 0 0 5 8 】

本発明の他の面において、I L - 2 3 結合エンティティは、抗体、すなわち、各対 1 個の軽鎖と 1 個の重鎖を有する 2 対の免疫グロブリン鎖を含み、I L - 1 7 A / F 結合エンティティは、各々軽鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域を含む 2 個の F a b フラグメントを含み、I L - 1 7 A / F 結合エンティティの F a b フラグメントは、I L - 2 3 結合エンティティの重鎖の C 末端(F c)に結合する。この二重特異性抗体形式をここでは b i A b F a b L と呼ぶ(図 2 参照)。他の態様において、I L - 1 7 A / F 結合エンティティの F a b フラグメントを含む軽鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域の各々は、それぞれ I L - 2 3 結合エンティティの軽鎖および重鎖の N 末端に結合する。この二重特異性抗体形式をここでは t a F a b と呼ぶ(図 3 参照)。

【 0 0 5 9 】

本発明の他の面において、I L - 2 3 結合エンティティは軽鎖および I L - 2 3 重鎖を含み、I L - 1 7 A / F 結合エンティティは軽鎖および I L - 1 7 A / F 重鎖を含む。この二重特異性抗体は、C_{H3} 領域において静電的相補性会合を介して会合している 2 個の異なる重鎖を含む以外、伝統的抗体に似る。これは共通軽鎖を利用する。この二重特異性抗体形態をここではヘテロ二量体 F c と呼ぶ(図 4 参照)。

【 0 0 6 0 】

他の態様において、本発明は、抗体、すなわち、各対 1 個の軽鎖と 1 個の重鎖を有する 2 対の免疫グロブリン鎖を含む第一結合エンティティおよび F v ユニット、すなわち、重鎖および軽鎖由来の可変ドメインを含む第二結合エンティティを含み、ここで、F v ユニットを含む第二結合エンティティが、図 5 に示すとおり、第一結合エンティティの F a b 領域とヒンジの間に位置する、二重特異性抗体を提供する。F v ユニットは、リンカー分子により第一結合エンティティの F a b 領域に結合する。より具体的に、F v ユニットは、F a b フラグメントの軽鎖定常領域に結合した可変軽ドメインおよび F a b フラグメントの C_{H1} 領域に結合した可変重ドメインを含む。この二重特異性抗体形式をここでは V C V F c と呼ぶ。V C V F c の第一結合エンティティおよび第二結合エンティティは共通軽鎖を共有せず、b i A b F a b L の第一結合エンティティおよび第二結合エンティティは共通軽鎖を共有する。本発明のこの態様の一つの面において、第一結合エンティティはリンパ球抗原、サイトカイン、サイトカイン受容体、増殖因子、増殖因子受容体、インターロイキン(例えば、I L - 1 7 A、I L - 1 7 F、I L - 1 7 A / F および I L - 2 3) またはインターロイキン受容体に特異的に結合し、第二結合エンティティはリンパ球抗原、サイトカイン、サイトカイン受容体、増殖因子、増殖因子受容体、インターロイキン(例えば、I L - 1 7 A、I L - 1 7 F、I L - 1 7 A / F および I L - 2 3) またはインターロイキン受容体に特異的に結合する。本発明のこの態様の他の面において、第一結合エンティティは I L - 1 7 A / F 結合エンティティであり、第二結合エンティティは I L - 2 3 結合エンティティである。本発明のこの態様の他の面において、第一結合エンティティは I L - 2 3 結合エンティティであり、第二結合エンティティは I L - 1 7 A / F 結合エンティティである。

【 0 0 6 1 】

他の態様において、本発明は、抗体、すなわち、各対 1 個の軽鎖と 1 個の重鎖を有する 2 対の免疫グロブリン鎖を含む第一結合エンティティおよび単ドメイン抗体を含む第二結合エンティティを含む二重特異性抗体を提供する。この二重特異性抗体形式をここでは V C D F c と呼ぶ。V C D F c 二重特異性抗体の図を図 6 に記載する。単ドメイン抗体を含む第二結合エンティティは第一結合エンティティの F a b 領域、より具体的に F a b フラグメントの C_{H1} 領域とヒンジの間に位置する。単ドメイン抗体は、リンカー分子(例えば、式(G₄S)₂または S S A S T K G P S (配列番号 8 6)により表される 1 0 量体 G₄S)により第一結合エンティティの F a b の C_{H1} 領域に結合する。本発明のこの態様の一つの面において、第一結合エンティティはリンパ球抗原、サイトカイン、サイト

カイン受容体、増殖因子、増殖因子受容体、インターロイキン(例えば、IL - 17A、IL - 17F、IL - 17A / FおよびIL - 23)またはインターロイキン受容体に特異的に結合し、第二結合エンティティはリンパ球抗原、サイトカイン、サイトカイン受容体、増殖因子、増殖因子受容体、インターロイキン(例えば、IL - 17A、IL - 17F、IL - 17A / FおよびIL - 23)またはインターロイキン受容体に特異的に結合する。本発明のこの態様の一つの面において、第一結合エンティティはIL - 23結合エンティティであり、第二結合エンティティはIL - 17A / F結合エンティティである。本発明のこの態様の他の面において、第一結合エンティティはIL - 17A / F結合エンティティであり、第二結合エンティティはIL - 23結合エンティティである。

【0062】

結合エンティティのアミノ酸配列は、好ましくはリンパ球抗原、サイトカイン、サイトカイン受容体、増殖因子、増殖因子受容体、インターロイキン(例えば、IL - 17A、IL - 17F、IL - 17A / FおよびIL - 23)またはインターロイキン受容体に対するヒトおよび/またはヒト化モノクローナル抗体の配列に基づく。

【0063】

本発明の前記の面の一つの態様において、二重特異性抗体のIL - 17A / F結合エンティティおよびIL - 23結合エンティティの軽鎖は、各々、配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号23のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号24の配列を有するCDR3を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティおよびIL - 23結合エンティティの軽鎖は、各々、配列番号9のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティおよびIL - 23結合エンティティの軽鎖は、各々、配列番号10のアミノ酸配列を含む定常ドメインを含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティおよびIL - 23結合エンティティの軽鎖の各々は、配列番号9のアミノ酸配列を含む可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列を含む定常ドメインを含む。

【0064】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL - 17A / F結合エンティティの重鎖は、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティの重鎖は、配列番号13のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティが抗体を含むとき、重鎖定常ドメインは、配列番号8、配列番号11、配列番号127または配列番号128のアミノ酸配列を含む。他の態様において、IL - 17A / F結合エンティティがFabフラグメントを含むとき、重鎖のCH1領域は配列番号14または配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0065】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL - 17A / F結合エンティティは配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。所望により、置換、付加または欠失の全ては重鎖可変ドメインのフレームワーク領域内である。所望により、二重特異性抗体のIL - 17A / F結合エンティティは、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含み、ここで、可変ドメインは配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む。所望により、重鎖可変ドメインは配列番号13のアミノ酸配列を含む。所望により、3個のIL - 17A / F重鎖可変ドメインCDRは、配列番号25のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%

10

20

30

40

50

、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 1 領域；配列番号 26 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 2 領域；および配列番号 27 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 3 領域を含む。所望により、IL - 17 A / F 重鎖可変ドメイン CDR 1 は配列番号 25 のアミノ酸配列を有し、重鎖可変ドメイン CDR 2 は配列番号 26 のアミノ酸配列を有し、そして重鎖可変ドメイン CDR 3 は配列番号 27 のアミノ酸配列を有する。IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 結合エンティティは、配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む。所望により、置換、付加または欠失の全ては軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域内である。所望により、二重特異性抗体の IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 結合エンティティは、配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを有し、ここで、可変ドメインは配列番号 22 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 23 のアミノ酸配列を有する CDR 2 および配列番号 24 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含む。所望により、軽鎖可変ドメインは配列番号 9 のアミノ酸配列を含む。所望により、3 個の IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 軽鎖可変ドメイン CDR は、配列番号 22 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 1 領域；配列番号 23 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 2 領域；および配列番号 24 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む CDR 3 領域を含む。所望により、IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 軽鎖可変ドメイン CDR 1 は配列番号 22 のアミノ酸配列を有し、IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 軽鎖可変ドメイン CDR 2 は配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、そして IL - 17 A / F および / または IL - 23 p 19 軽鎖可変ドメイン CDR 3 は配列番号 24 のアミノ酸配列を有する。IL - 23 p 19 結合エンティティは、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含む。所望により、置換、付加または欠失の全て IL - 23 p 19 重鎖可変ドメインのフレームワーク領域内である。所望により、二重特異性抗体の IL - 23 p 19 結合エンティティは、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含み、ここで、可変ドメインは配列番号 19 のアミノ酸配列を有する CDR 1、配列番号 20 のアミノ酸配列を有する CDR 2 および配列番号 21 のアミノ酸配列を有する CDR 3 を含む。所望により、IL - 23 p 19 重鎖可変ドメインは配列番号 7 のアミノ酸配列を含

10

20

30

40

50

む。所望により、3個のIL-23p19重鎖可変ドメインCDRは、配列番号19のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR1領域；配列番号20のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR2領域；および配列番号21のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む。所望により、IL-23p19重鎖可変ドメインCDR1は配列番号19のアミノ酸配列を有し、重鎖可変ドメインCDR2は配列番号20のアミノ酸配列を有し、そして重鎖可変ドメインCDR3は配列番号21のアミノ酸配列を有する。

【0066】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL-23結合エンティティの重鎖は、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR3を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL-23結合エンティティの重鎖は配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。他の態様において、IL-23結合エンティティが抗体を含むとき、重鎖定常ドメインは配列番号8、配列番号11、配列番号127または配列番号128のアミノ酸配列を含む。ある態様において、配列番号8のC末端リシンは開裂されており、それゆえに重鎖定常ドメインは配列番号8の残基1~326のアミノ酸配列を含む。他の態様において、IL-23結合エンティティがFabフラグメントを含むとき、重鎖のCH1領域は配列番号14または配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0067】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL-23結合エンティティまたはIL-17A/F結合エンティティがFvユニットであるとき、軽鎖の可変ドメインは配列番号22のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号23のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号24の配列を有するCDR3を含む。他の態様において、IL-17A/F結合エンティティおよびIL-23結合エンティティ各々の軽鎖は配列番号9のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0068】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL-17A/F結合エンティティがFvユニットであるとき、重鎖の可変ドメインは配列番号25のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR3を含む。他の態様において、IL-17A/F結合エンティティの重鎖は配列番号13のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0069】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL-23結合エンティティがFvユニットであるとき、重鎖の可変ドメインは配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR2および配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR3を含む。他の態様において、IL-23結合エンティティの重鎖は配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0070】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体のIL-23結合エンティティのFabフラグメントはIL-17A/F結合エンティティの重鎖のC末端(Fc)に結合しまたはIL-17A/F結合エンティティのFabフラグメントは、例えば、リンカー分子によりIL-23結合エンティティの重鎖のC末端(Fc)に結合する(例えば、図2参照)。他の態様において、IL-23結合エンティティのFabフラグメントを含む軽

10

20

30

40

50

鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域の各々は、それぞれ $IL-17A/F$ 結合エンティティの軽鎖および重鎖の N 末端に結合するかまたは $IL-17A/F$ 結合エンティティの Fab フラグメントを含む軽鎖ならびに重鎖の C_{H1} および可変領域の各々は、リンカー分子を介して、それぞれ $IL-23$ 結合エンティティの軽鎖および重鎖の N 末端に結合する(例えば、図3参照)。 $VCVFc$ 二重特異性抗体の他の態様において、第二結合エンティティを含む Fv ユニットの軽鎖可変領域および重鎖可変領域の各々は、リンカー分子を介して、それぞれ第一結合エンティティの Fab フラグメントの軽鎖定常領域および C_{H1} 領域に結合する(図5参照)。適切なリンカー分子は当分野で知られ、例えば、短ポリペチドを含む。適切なリンカーは、柔軟性を与えるグリシンおよび溶解度を与えるセリンまたはスレオニンを含む短ポリペチドであり得る。適切なリンカーは、 Gly_4Ser_1 ユニットを含み得る。例えば、リンカーは $(Gly_4Ser_1)_x$ (ここで、 x は1、2または3である)であり得る。所望により、リンカーポリペチドは配列番号12のアミノ酸配列を有する。 $VCVFc$ 二重特異性抗体の他の態様において、軽鎖のリンカーは配列番号85のアミノ酸配列を有し、重鎖のリンカーは配列番号86のアミノ酸配列を有する。

【0071】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体は、各々配列番号16、配列番号18、配列番号28、配列番号29、配列番号74または配列番号84のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む。好ましい態様において、二重特異性抗体は、配列番号74のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む。

【0072】

本発明の前記の面の他の態様において、 $IL-17A/F$ 抗体(またはその抗原結合フラグメント)または $biAbFabL$ (図2参照)、 $tFab$ (図3参照)、ヘテロ二量体 Fc (図4参照)、 $VCVFc$ (図5参照)または $VCDFc$ (図6参照)のような二重特異性抗体の $IL-17A/F$ 結合エンティティは、(a)少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $8 \times 10^{-10} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ の結合親和性(K_{D1})で $IL-17A$ ホモ二量体；(b)少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $2 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $3 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $4 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-10} M$ または少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ の結合親和性(K_{D1})で $IL-17F$ ホモ二量体；および/または(c)少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $2 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $3 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $4 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $6 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $7 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $9 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ または少なくとも $5 \times 10^{-10} M$ の結合親和性(K_{D1})で $IL-17A/F$ ヘテロ二量体に結合し、ここで、結合親和性は $Biacore$ のような表面プラズモン共鳴により測定する。

【0073】

本発明の前記の面の他の態様において、 $IL-23p19$ 抗体(またはその抗原結合フラグメント)または $biAbFabL$ (図2参照)、 $tFab$ (図3参照)、ヘテロ二量体 Fc (図4参照)、 $VCVFc$ (図5参照)または $VCDFc$ (図6参照)のような二重特異性抗体の $IL-23p19$ 結合エンティティは、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $5 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $2 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $3 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $4 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも 5×10^{-10} 、少なくとも 6×10^{-10} 、少なくとも 7×10^{-10} 、少なくとも 8×10^{-10} または少なくとも 9×10^{-10} 、少なくとも 1×10^{-11} の結合親和性(K_{D1})で $IL-23p19$ に結合し、ここで、結合親和性は $Biacore$ のような表面プラズモン共鳴により測定する。

【0074】

本発明の前記の面の他の態様において、 $biAbFabL$ (図2参照)、 $tFab$ (図

3 参照)、ヘテロ二量体 F c (図 4 参照)、V C V F c (図 5 参照)または V C D F c (図 6 参照)のような二重特異性抗体の I L - 1 7 A / F 結合エンティティは、(a)少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} M、少なくとも 8×10^{-10} M または少なくとも 1×10^{-11} M の結合親和性 (K_{D1}) で I L - 1 7 A ホモ二量体；(b)少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 2×10^{-10} M、少なくとも 3×10^{-10} M、少なくとも 4×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} M または少なくとも 1×10^{-11} M の結合親和性 (K_{D1}) で I L - 1 7 F ホモ二量体；および/または(c)少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 5×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 2×10^{-9} M、少なくとも 3×10^{-9} M、少なくとも 4×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 6×10^{-9} M、少なくとも 7×10^{-9} M、少なくとも 9×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M または少なくとも 5×10^{-10} M の結合親和性 (K_{D1}) で I L - 1 7 A / F ヘテロ二量体に結合し；そして二重特異性抗体の I L - 2 3 p 1 9 結合エンティティは少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 2×10^{-10} M、少なくとも 3×10^{-10} M、少なくとも 4×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} M、少なくとも 6×10^{-10} M、少なくとも 7×10^{-10} M、少なくとも 8×10^{-10} M または少なくとも 9×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} の結合親和性 (K_{D1}) で I L - 2 3 p 1 9 に結合し、ここで、結合親和性はBiacoreのような表面プラズモン共鳴により測定する。

【0075】

本発明の前記の面の他の態様において、I L - 1 7 A / F 抗体(またはその抗原結合フラグメント)または二重特異性抗体の I L - 1 7 A / F 結合エンティティは、(a)初代ヒト小気道上皮細胞(S A E C)における G - C S F の I L - 1 7 A による誘発を $0.5 \mu\text{m}$ 以下の IC_{50} で；(b)初代ヒト小気道上皮細胞(S A E C)における G - C S F の I L - 1 7 F による誘発を 2.0 nM 以下、 1.5 nM 以下、 1.4 nM 以下、 1.3 nM 以下、 1.2 nM 以下、 1.1 nM 以下または 1.0 nM 以下の IC_{50} で；および/または(c)初代ヒト小気道上皮細胞(S A E C)における G - C S F の I L - 1 7 A / F による誘発を 1.3 nM 以下、 1.2 nM 以下、 1.1 nM 以下、 1.0 nM 以下、 0.9 nM 以下、 0.8 nM 以下、 0.7 nM 以下、 0.6 nM 以下または 0.5 nM 以下の IC_{50} で中和または阻害する。

【0076】

本発明の前記の面の他の態様において、I L - 1 7 A / F 抗体(またはその抗原結合フラグメント)または二重特異性抗体の I L - 1 7 A / F 結合エンティティは、(a)ヒト初代線維芽細胞(H F F F)における I L - 6 の I L - 1 7 A による誘発を 0.5 nM 以下、 0.4 nM 以下、 0.3 nM 以下、 0.2 nM 以下、 0.1 nM 以下、 0.09 nM 以下、 0.08 nM 以下、 0.07 nM 以下、 0.06 nM 以下、 0.05 nM 以下、 0.04 nM 以下、 0.03 nM 以下、 0.02 nM 以下または 0.01 nM 以下の IC_{50} で；(b)ヒト初代線維芽細胞(H F F F)における I L - 6 の I L - 1 7 F による誘発を 30 nM 以下、 28 nM 以下、 26 nM 以下、 25 nM 以下、 22 nM 以下、 20 nM 以下、 19 nM 以下、 18 nM 以下、 17 nM 以下、 16 nM 以下、 15 nM 以下、 14 nM 以下、 13 nM 以下、 12 nM 以下、 11 nM 以下または 10 nM 以下の IC_{50} で；および/または(c)ヒト初代線維芽細胞(H F F F)における I L - 6 の I L - 1 7 A / F による誘発を 30 nM 以下、 28 nM 以下、 26 nM 以下、 22 nM 以下、 20 nM 以下、 18 nM 以下、 17 nM 以下、 16 nM 以下、 15 nM 以下、 14 nM 以下、 13 nM 以下、 12 nM 以下、 11 nM 以下、 10 nM 以下、 9.5 nM 以下、 9.4 nM 以下、 9.3 nM 以下、 9.2 nM 以下、 9.1 nM 以下または 9.0 nM 以下の IC_{50} で中和または阻害する。

【0077】

本発明の前記の面の他の態様において、I L - 2 3 p 1 9 抗体(またはその抗原結合フラグメント)または二重特異性抗体の I L - 2 3 p 1 9 結合エンティティは、(a)マウス脾細胞における I L - 2 3 誘発 I L - 1 7 A および I L - 1 7 F 産生を 0.5 nM 以下、 0.4 nM 以下、 0.3 nM 以下、 0.2 nM 以下、 0.1 nM 以下、 0.09 nM 以下、 0.08 nM 以下、

0.07 nM以下または0.06 nM以下の IC_{50} で中和または阻害する。

【0078】

本発明の前記の面の他の態様において、IL-23p19抗体(またはその抗原結合フラグメント)または二重特異性抗体のIL-23p19結合エンティティは、活性化初代ヒトT細胞におけるIL-23誘発STAT3リン酸化を0.1 nM以下、0.2 nM以下、0.3 nM以下、0.4 nM以下、0.5 nM以下、0.8 nM以下、0.9 nM以下、0.01 nM以下、0.02 nM以下、0.03 nM以下、0.04 nM以下または0.05 nM以下の IC_{50} で中和または阻害する。

【0079】

本発明の前記の面の他の態様において、biAbFabL(図2参照)、taFab(図3参照)、ヘテロ二量体Fc(図4参照)、VCVFc(図5参照)またはVCDFc(図6参照)のような二重特異性抗体のIL-17A/F結合エンティティは、(a)少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} M、少なくとも 8×10^{-10} Mまたは少なくとも少なくとも 1×10^{-11} Mの結合親和性(K_{D1})でIL-17Aホモ二量体；(b)少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 2×10^{-10} M、少なくとも 3×10^{-10} M、少なくとも 4×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} Mまたは少なくとも 1×10^{-11} Mの結合親和性(K_{D1})でIL-17Fホモ二量体；および/または(c)少なくとも 1×10^{-8} M、少なくとも 5×10^{-8} M、少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 2×10^{-9} M、少なくとも 3×10^{-9} M、少なくとも 4×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 6×10^{-9} M、少なくとも 7×10^{-9} M、少なくとも 9×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} Mまたは少なくとも 5×10^{-10} Mの結合親和性(K_{D1})でIL-17A/Fヘテロ二量体と結合する。所望により、二重特異性抗体のIL-23p19結合エンティティは少なくとも 1×10^{-9} M、少なくとも 5×10^{-9} M、少なくとも 1×10^{-10} M、少なくとも 2×10^{-10} M、少なくとも 3×10^{-10} M、少なくとも 4×10^{-10} M、少なくとも 5×10^{-10} M、少なくとも 6×10^{-10} M、少なくとも 7×10^{-10} M、少なくとも 8×10^{-10} Mまたは少なくとも 9×10^{-10} M、少なくとも 1×10^{-11} Mの結合親和性(K_{D1})でIL-23p19に結合し、ここで、結合親和性はBiacoreのような表面プラズモン共鳴により測定する。所望により、二重特異性抗体のIL-17A/F結合エンティティは、(a)初代ヒト小気道上皮細胞(SAEC)におけるG-CSFのIL-17Aによる誘発を0.5 pm以下、0.5 nM以下の IC_{50} で；(b)初代ヒト小気道上皮細胞(SAEC)におけるG-CSFのIL-17Fによる誘発を2.0 nM以下、1.5 nM以下、1.4 nM以下、1.3 nM以下、1.2 nM以下、1.1 nM以下または1.0 nM以下の IC_{50} で；および/または(c)初代ヒト小気道上皮細胞(SAEC)におけるG-CSFのIL-17A/Fによる誘発を1.3 nM以下、1.2 nM以下、1.1 nM以下、1.0 nM以下、0.9 nM以下、0.8 nM以下、0.7 nM以下、0.6 nM以下または0.5 nM以下の IC_{50} で中和または阻害する。所望により、二重特異性抗体のIL-17A/F結合エンティティは(a)ヒト初代線維芽細胞(HFF)におけるIL-6のIL-17Aによる誘発を0.5 nM以下、0.4 nM以下、0.3 nM以下、0.2 nM以下、0.1 nM以下、0.09 nM以下、0.08 nM以下、0.07 nM以下、0.06 nM以下、0.05 nM以下、0.04 nM以下、0.03 nM以下、0.02 nM以下または0.01 nM以下の IC_{50} で；(b)ヒト初代線維芽細胞(HFF)におけるIL-6のIL-17Fによる誘発を30 nM以下、28 nM以下、26 nM以下、25 nM以下、22 nM以下、20 nM以下、19 nM以下、18 nM以下、17 nM以下、16 nM以下、15 nM以下、14 nM以下、13 nM以下、12 nM以下、11 nM以下または10 nM以下の IC_{50} で；および/または(c)ヒト初代線維芽細胞(HFF)におけるIL-6のIL-17A/Fによる誘発を30 nM以下、28 nM以下、26 nM以下、22 nM以下、20 nM以下、18 nM以下、17 nM以下、16 nM以下、15 nM以下、14 nM以下、13 nM以下、12 nM以下、11 nM以下、10 nM以下、9.5 nM以下、9.4 nM以下、9.3 nM以下、9.2 nM以下、9.1 nM以下または9.0 nM以下の IC_{50} で中和または阻害する。所望により、二重特異性抗体のIL-23p1

10

20

30

40

50

9 結合エンティティは、活性化初代ヒトT細胞におけるIL-23誘発STAT3リン酸化を0.1 nM以下、0.2 nM以下、0.3 nM以下、0.4 nM以下、0.5 nM以下、0.8 nM以下、0.9 nM以下、0.01 nM以下、0.02 nM以下、0.03 nM以下、0.04 nM以下または0.05 nM以下のIC₅₀で中和または阻害する。

【0080】

本発明の前記の面の他の態様において、配列番号28のアミノ酸配列を含む重鎖の対および配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む二重特異性抗体を、ここで“biAb1”、“bAb1”または“23/17bAb1”と呼ぶ。各々配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む二重特異性抗体を、ここでは“biAb2”、“bAb2”または“23/17bAb2”と呼ぶ。各々配列番号74のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む二重特異性抗体を、ここでは“biAb3”、“bAb3”または“23/17bAb3”と呼ぶ。配列番号29のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む二重特異性抗体を、ここでは“biAb4”、“bAb4”または“23/17bAb4”と呼ぶ。

【0081】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体は各々配列番号77のアミノ酸配列を含む重鎖の対および各々配列番号79のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含み、ここで“taFab1”と呼ぶ。

【0082】

本発明の前記の面の他の態様において、二重特異性抗体は、配列番号63のアミノ酸配列を含むIL-23重鎖、配列番号65のアミノ酸配列を含むIL-17A/F重鎖および各々配列番号17の配列を含む軽鎖の対を含み、ここで“ヘテロ1”と呼ぶ。他の態様において、二重特異性抗体は、配列番号61のアミノ酸配列を含むIL-23重鎖、配列番号81のアミノ酸配列を含むIL-17A/F重鎖および各々配列番号17の配列を含む軽鎖の対を含み、ここで“ヘテロ2”と呼ぶ。

【0083】

本発明の前記の面の他の態様において、VCVFc形式の二重特異性抗体(図5参照)は、各々配列番号88のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号92のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号94のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号96のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号90のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号98のアミノ酸配列の対と各々配列番号94のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号100のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号102のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号104のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号106のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号112のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号114のアミノ酸配列を含む軽鎖の対または各々配列番号116のアミノ酸配列を含む重鎖の対と各々配列番号118のアミノ酸配列を含む軽鎖の対を含む。

【0084】

本発明の前記の面の他の態様において、IL-17A(配列番号2)およびIL-17F(配列番号4)に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含みここで、重鎖可変ドメインは配列番号13のアミノ酸残基を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号9のアミノ酸残基を含む。所望により、モノクローナル抗体は、ヒト定常領域、例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む。IgG4ヒト定常領域は、Kabatによる241位にセリンからプロリン変異を有し得る。所望により、重鎖は配列番号16、18、28、29または74のアミノ酸残基を含む。所望により、軽鎖は配列番号17のアミノ酸残基を含む。所望により、重鎖は配列番号16、18、28、29または74のアミノ酸残基を含み、軽鎖は配列番号17のアミノ酸残基を含む。所望により、二重特異性抗体はモノクローナル

抗体を含む。

【0085】

重鎖および軽鎖定常領域は、I g G 1.1 (配列番号 11、これは配列番号 82 によりコードされ得る)、C 末端リシンを欠く I g G 1.1 f (配列番号 127)、C 末端リシンを有する I g G 1.1 f (配列番号 128)、ヒトカップ定常領域 (配列番号 10、これは配列番号 83 によりコードされ得る) または I g G 4.1 (配列番号 8) を含む。I g G 4 重鎖定常ドメインは、ヒンジ領域、S 228 P (EU index numbering system) または S 241 P (Kabat numbering system) に変異を有する野生型 I g G 4 の変異体である。マウス/ヒトキメラ重鎖における、241 位のセリン (Kabat) (I g G 1 および I g G 2 においてその位置に見られる) のプロリンへの変更は、均一抗体の産生をもたらす、不均一性を排除する。さらに、変異体 I g G 4 は、元のキメラ I g G 4 と比較して顕著に伸びた血清半減期を有し、組織分布の改善を示す。Angal et al., Molecular Immunology, 30(1):105-108 (1993); Schuurman et al., Molecular Immunology, 38:1-8 (2001); Lewis et al., Molecular Immunology, 46:3488-3494 (2009)。

10

【0086】

本発明の前記の面の他の態様において、I L - 23 p 19 (配列番号 6) に特異的に結合する単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、ここで、重鎖可変ドメインは配列番号 7 のアミノ酸残基を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号 9 のアミノ酸残基を含む。所望により、モノクローナル抗体はヒト定常領域、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 を含む。所望により、I g G 4 ヒト定常領域は、Kabat による 241 位にセリンからプロリン変異を有する。所望により、重鎖は配列番号 16、18、28、29 または 74 のアミノ酸残基を含む。所望により、軽鎖は配列番号 17 のアミノ酸残基を含む。所望により、重鎖は配列番号 16、18、28、29 または 74 のアミノ酸残基を含み、軽鎖は配列番号 17 のアミノ酸残基を含む。所望により、二重特異性抗体はモノクローナル抗体を含む。

20

【0087】

本発明の前記の面の他の態様において、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは I L - 23 p 19 に特異的にし、ここで、抗体または抗原結合フラグメントは第一エピトープおよび第二エピトープを含む I L - 23 p 19 上の非連続的エピトープに結合し、ここで、第一エピトープは配列番号 6 のアミノ酸残基 33 ~ 59 の少なくとも 1 個のアミノ酸から成り、第二エピトープは配列番号 6 のアミノ酸残基 89 ~ 125 の少なくとも 1 個のアミノ酸からなる。所望により、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは第一エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 54 に結合する。所望により、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは第一エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 55 に結合する。所望により、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは第一エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 54 および 55 に結合する。所望により、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは第二エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 116 に結合する。所望により、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは第一エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 54 および 55 にならびに第二エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 116 に結合する。

30

40

【0088】

本発明の前記面の他の態様において、抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは I L - 23 p 19 に特異的に結合し、ここで、抗体または抗原結合フラグメントは第一エピトープおよび第二エピトープを含む I L - 23 p 19 上の非連続的エピトープに結合し、ここで、抗体または抗原結合フラグメントは第一エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 54 および 55 にならびに第二エピトープの配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 116 に結合する。

【0089】

本発明の前記面の他の態様において、I L - 17 A / F 結合エンティティは、配列番号

50

2の少なくともアミノ酸残基108(Tyr)を含むエピトープでIL-17A(IL-17A/IL-17Aホモ二量体およびIL-17A/IL-17Fヘテロ二量体)に特異的に結合し、ここで、IL-17A/F結合エンティティはモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである。所望により、IL-17A上のエピトープはアラニン変異誘発および/またはX線結晶解析により決定する。IL-17A/F結合エンティティがIL-17Aに結合するエピトープは連続的エピトープでも非連続的エピトープでもよい。

【0090】

本発明の前記面の他の態様において、IL-17A/F交差反応性モノクローナル抗体またはその抗原フラグメントは、配列番号2の少なくともアミノ酸残基108(Tyr)を含むエピトープでIL-17Aに結合する。所望により、IL-17A上のエピトープはアラニン変異誘発および/またはX線結晶解析により決定する。IL-17A/F交差反応性モノクローナル抗体またはその抗原フラグメントがIL-17Aに結合するエピトープIL-17Aは連続的エピトープでも非連続的エピトープでもよい。

【0091】

本発明の二重特異性抗体は単独で使用しても、細胞毒性剤との免疫コンジュゲートとして使用してもよい。ある態様において、該薬物は化学療法剤である。ある態様において、該薬物は、鉛-212、ビスマス-212、アスタチン-211、ヨウ素-131、スカンジウム-47、レニウム-186、レニウム-188、イットリウム-90、ヨウ素-123、ヨウ素-125、臭素-77、インジウム-111およびホウ素-10またはアクチニドのような核分裂性核種を含むが、これらに限定されない放射性同位体である。他の態様において、該薬物はリシン、アブリン、修飾シュードモナスエンテロトキシンA、シュードモナス外毒素、カリチアマイシン、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、ジフテリア毒素などを含むが、これらに限定されない毒素または細胞毒性薬物である。抗体のこのような薬物へのコンジュゲーション方法は文献で知られ、直接的および間接的コンジュゲーションを含む。

【0092】

適切な検出可能分子は、本発明の抗体に直接的または間接的に結合し得る。適切な検出可能分子は、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁性粒子などを含む。検出可能または細胞毒性分子の間接的結合について、検出可能または細胞毒性分子を相補性/抗相補性対のメンバーとコンジュゲートでき、ここで、他のメンバーは結合ポリペプチドまたは抗体部分に結合する。これらの目的のために、ビオチン/ストレプトアビジンは相補性/抗相補性対の例である。

【0093】

本発明の二重特異性抗体、抗体および抗原結合フラグメントはまた、例えば、何れかのタイプの分子の抗体の、抗体のエピトープへの結合を妨害しないような共有結合により、修飾された誘導体も含む。適切な誘導体の例は、フコシル化抗体、グリコシル化抗体、アセチル化抗体、ペグ化抗体、リン酸化抗体およびアミド化抗体を含むが、これらに限定されない。本発明の抗体およびその誘導体は、それ自体、既知保護基/ブロック基により、タンパク質切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより誘導体化され得る。本発明のある態様において、抗体の少なくとも1個の重鎖はフコシル化されている。ある態様において、フコシル化はN結合している。ある好ましい態様において、抗体の少なくとも1個の重鎖は、フコシル化された、N結合オリゴ糖を含む。

【0094】

本発明の二重特異性抗体、抗体および抗原結合フラグメントは、本発明の抗体の生物学的特性(例えば、IL-17AまたはIL-17Fおよび/またはIL-23の各受容体への結合の阻止、IL-17AまたはIL-17FおよびIL-23の生物学的活性の阻害)を保持した、1個または複数個のアミノ酸置換、欠失、付加または置き換えを有する変異体を含む。当業者は1個または複数個のアミノ酸置換、欠失、付加または置き換えを有する変異体を製造できる。これらの変異体は、とりわけ、(a)1個以上のアミノ酸残基

10

20

30

40

50

が保存的または非保存的アミノ酸で置換された変異体、(b) 1 個以上のアミノ酸がポリペチドに付加されるかポリペチドから欠失された変異体、(c) 1 個以上のアミノ酸が置換基を含む変異体および(d) ポリペチドが、ポリペチドに有用な特性を付与し得る、例えば、抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ピオチン部分などのような融合パートナー、タンパク質タグまたは他の化学的部分のような他のペプチドまたはポリペチドと融合している変異体を含み得る。本発明の抗体は、ある種由来のアミノ酸残基が他の種由来の対応する残基に保存的または非保存的位置のいずれかで置換されている、変異体も含み得る。他の態様において、非保存的位置でのアミノ酸残基は、保存的または非保存的残基で置換される。遺伝学的技法(抑制、欠失、変異など)、化学的技法および酵素技法を含むこれらの変異体を得る技法は、当業者に知られる。

10

【0095】

本発明はまた本発明の二重特異性抗体をコードする単離核酸も含み、これは、例えば、ここに開示する二重特異性抗体の軽鎖、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域、重鎖、重鎖可変領域、重鎖定常領域、リンカーおよび任意のかつ全ての成分およびその組み合わせを含む。本発明の核酸は、本発明の核酸と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%および最も好ましくは少なくとも約98%相同性を有する核酸を含む。用語“類似性パーセント”、“同一性パーセント”および“相同性パーセント”は、特定の配列についていうとき、University of Wisconsin GCG(登録商標)ソフトウェアプログラムに示されるとおりに使用する。本発明の核酸はまた相補的核酸も含む。ある例において、配列は、整列したとき完全相補的(ミスマッチなし)である。他の例において、最大約20%ミスマッチが配列中に存在し得る。本発明のある態様において、本発明の抗体の重鎖および軽鎖の両者をコードする核酸を提供する。

20

【0096】

本発明の核酸を、結合した配列または要素を複製するように、他の遺伝子配列または要素(DNAまたはRNAのいずれか)を挿入し得る、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージ、人工染色体(BAC、YAC)またはウイルスのようなベクターにクローン化できる。ある態様において、発現ベクターは、構成的活性型プロモーターセグメント(例えばCMV、SV40、伸長因子またはLTR配列であるが、これらに限定されない)またはステロイド誘導型pINDベクター(Invitrogen)のような誘導型プロモーター配列を含み、核酸の発現を制御できる。本発明の発現ベクターは、さらに制御配列、例えば、内部リボソーム進入部位を含み得る。発現ベクターは、例えば、トランスフェクションにより細胞に導入できる。

30

【0097】

それ故に、他の態様において、本発明は、次の作動可能に結合した要素を含む発現ベクターを提供する；転写プロモーター；本発明の二重特異性抗体の重鎖をコードする核酸分子；および転写ターミネーター。他の態様において、本発明は、次の作動可能に結合した要素を含む発現ベクターを提供する；転写プロモーター；本発明の二重特異性抗体の軽鎖をコードする核酸分子；および転写ターミネーター。このようなベクターを含み、重鎖および軽鎖を発現する組み換え宿主細胞も提供される。

【0098】

他の態様において、本発明は、次の作動可能に結合した要素を含む発現ベクターを提供する；転写プロモーター；本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖をコードする第一核酸分子；本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの軽鎖をコードする第二核酸分子；および転写ターミネーター。他の態様において、本発明は、次の作動可能に結合した要素を含む発現ベクターを提供する；第一転写プロモーター；本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖をコードする第一核酸分子；第一転写ターミネーター；第二転写プロモーター；本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの軽鎖をコードする第二核酸分子；および第二転写ターミネーター。このようなベクターを含み、重鎖および軽鎖を発現する組み換え宿主細胞も提供される。

40

50

【 0 0 9 9 】

本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの重鎖をコードする核酸および軽鎖をコードする核酸を含む抗体産生細胞は、当分野で知られる技法による二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの産生に使用できる。本発明は、一つの態様において、重鎖および軽鎖を発現する組み換え宿主細胞を培養し、該細胞により産生された二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントを単離することを含む、本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの製造方法を提供する。

【 0 1 0 0 】

組み換え宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌細胞または真核細胞、例えば哺乳動物細胞または酵母細胞であり得る。酵母細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベおよびピキア・パストリス細胞を含む。哺乳動物細胞は、VERO、HeLa、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、W138、ベビーハムスター腎臓(BHK)、COS-7、MDCK、ヒト胎児腎細胞293、正常イヌ腎臓細胞株、正常ネコ腎臓細胞株、サル腎臓細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、COS細胞および非腫瘍原性マウス筋芽細胞G8細胞、線維芽細胞株、骨髄腫細胞株、マウスNIH/3T3細胞、LMTK31細胞、マウスセルトリ細胞、ヒト子宮頸癌細胞、Buffalo系ラット肝臓細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝臓細胞、マウス乳房腫瘍細胞、TRI細胞、MRC5細胞およびFS4細胞を含む。本発明の抗体産生細胞はまた、例えば、スポドプテラ・フルギペルダ細胞のような、知られる何らかの昆虫発現細胞株を含む。好ましい態様において、細胞は哺乳動物細胞である。他の好ましい態様において、哺乳動物細胞はCHO細胞である。

【 0 1 0 1 】

抗体産生細胞は、好ましくはIL-17A、IL-17FおよびIL-23結合競合物を実質的に含まない。好ましい態様において、抗体産生細胞は、約10%未満、好ましくは約5%未満、より好ましくは約1%未満、より好ましくは約0.5%未満、より好ましくは約0.1%未満および最も好ましくは0重量%のIL-17A、IL-17FまたはIL-23結合競合物を含む。ある態様において、抗体産生細胞により産生された抗体は、実質的にIL-17A、IL-17FおよびIL-23競合物がない。好ましい態様において、抗体産生細胞により産生された抗体は、約10%未満、好ましくは約5%未満、より好ましくは約1%未満、より好ましくは約0.5%未満、より好ましくは約0.1%未満および最も好ましくは0重量%のIL-17およびIL-23結合競合物を含む。

【 0 1 0 2 】

抗体精製方法は当分野で知られる。本発明のある態様において、抗体精製方法は、濾過、親和性カラムクロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィーおよび濃縮を含む。濾過工程は、好ましくは限外濾過およびより好ましくは限外濾過およびダイアフィルトレーションを含む。濾過は、好ましくは少なくとも約5~50回、より好ましくは10~30回および最も好ましくは14~27回行う。親和性カラムクロマトグラフィーは、例えば、PROSEP(登録商標)親和性クロマトグラフィー(Millipore, Billerica, Mass.)を使用して行い得る。好ましい態様において、親和性クロマトグラフィー工程はPROSEP(登録商標)-vAカラムクロマトグラフィーを含む。溶離液を溶媒洗剤で洗浄し得る。カチオン交換クロマトグラフィーは、例えば、SP-セファロースカチオン交換クロマトグラフィーを含み得る。アニオン交換クロマトグラフィーは、例えば、Q-Sepharose Fast Flowアニオン交換を使用し得る。アニオン交換工程は好ましくは非結合であり、それによりDNAおよびBSAを含む混入物の除去を可能にする。抗体産物は、好ましくは、例えば、Pall DV 20 Nanofilterを使用して、ナノ濾過する。抗体産物を、例えば、限外濾過およびダイアフィルトレーションを使用して濃縮し得る。本方法は、さらに凝集物を除去するための分子ふるいクロマトグラフィーの工程を含み得る。

【 0 1 0 3 】

二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントはまた、当分野で知られる他の方法により、例えば抗体と抗体フラグメントの化学的カップリングによっても製造できる。

【 0 1 0 4 】

本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、例えば、IL-17A、IL-17FおよびIL-23/p19のような炎症誘発性サイトカイン類の阻害に有用である。本抗体は、IL-17Aホモ二量体、IL-17Fホモ二量体および/またはIL-17A/Fヘテロ二量体の炎症誘発作用の減少、制限、中和または遮断に使用できる。同様に、本抗体は、IL-17Aホモ二量体、IL-17Fホモ二量体またはIL-17A/Fヘテロ二量体の炎症誘発性作用の減少、制限、中和または遮断に使用できる。このような場合、抗体の抗IL-23/p19部分を、ホモ二量体およびヘテロ二量体を含むIL-17Aおよび/またはIL-17Fを産生するであろう新規T細胞の減少、制限、中和または遮断産生に使用する。ここに記載する二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、多発性硬化症(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、嚢胞性線維症、炎症性腸疾患、乾癬、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、IgA腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患(リポイドネフローゼ)、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、腎性全身性線維症(NSF)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎(シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫(丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、POEMS症候群(クロー・深瀬症候群、高槻病またはPEP症候群)、ネフローゼ症候群、移植片対宿主病(GVHD)(血液、骨髄、腎臓、脾臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、巨細胞性動脈炎および多発性骨髄腫誘発骨溶解性骨病のような炎症性障害および自己免疫疾患の処置に使用できる。ここに記載する二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントはまた血管形成を含む癌の処置に使用できる。

【0105】

本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、IL-17Aおよび/またはIL-17FおよびIL-23(p19サブユニットを介して)の活性を阻害でき、それゆえに、新規のおよび存在するIL-17AおよびIL-17FおよびIL-17産生T細胞(Th17)の産生維持および活性を阻止できる。本発明は、さらに高レベルのIL-17A、IL-17Fおよび/またはIL-23の存在により特徴付けられる炎症性疾患の処置におけるおよび高レベルのIL-17A、IL-17Fおよび/またはIL-23の存在により特徴付けられる癌の処置における、本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの使用に関する。

【0106】

本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、IL-17A、IL-17F(ホモ二量体およびヘテロ二量体のいずれも含む)およびIL-23/p19の活性を遮断、阻害、減少、拮抗または中和でき、それゆえに、これら3種のサイトカイン類の1個または2個のみを標的とする治療よりも有利である。

【0107】

本発明の抗体、すなわち、二重特異性抗体は、それゆえに
(1)癌、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群(IBS)、嚢胞性線維症、慢性大腸炎、シェーグレン症候群、脾腫、慢性腎疾患(CKD)における炎症、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎および急性相応答の誘発と関連する他の疾患のような急性炎症および慢性炎症性疾患の処置におけるIL-17AまたはIL-17FおよびIL-23を介するシグナル伝達の遮断、阻害、減少、拮抗または中和、および
(2)受容体(例えば、IL-23R、IL-12R1、IL-17RAおよびIL-17RC)を介する免疫細胞(例えば、リンパ球、単球、白血球)におけるシグナル伝達を予防または阻止するためのインスリン依存性糖尿病(IDDM)、多発性硬化症(MS)(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、全身性エリテマトーデス(SLE)、重症筋無力症、リウマチ性関節炎、シェーグレン症候群、IBSおよびIBDのような自己免疫疾患の処置におけるIL-17AまたはIL-17FまたはIL-23を介するシグナル伝達の遮断

、阻害、減少、拮抗または中和。本発明の抗体を使用した I L - 2 3 R 、 I L - 1 2 R 1、 I L - 1 7 R A および I L - 1 7 R C を介するシグナル伝達の遮断、阻害、減少または拮抗は膵臓、腎臓、下垂体および神経細胞の疾患も有利であり、 I D D M、非インスリン依存性糖尿病 (N I D D M)、膵炎および膵臓癌の処置に使用し得る。

【 0 1 0 8 】

例えば、本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、特に I L - 1 7 A、 I L - 1 7 F および I L - 2 3 / p 1 9 のアンタゴニストとして、炎症性疾患の治療的処置に、多発性硬化症 (M S) (例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、炎症性腸疾患 (I B D) および癌のような炎症性疾患の処置に有用である。これらのアンタゴニストは、アトピー性および接触性皮膚炎、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス (S L E)、抗好中球細胞質抗体 (A N C A) 関連血管炎 (A A V)、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症 (M S) (例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、大腸炎、内毒血症、関節炎、リウマチ性関節炎 (R A)、シェーグレン症候群、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患 (A R D)、敗血症性ショック、多臓器不全、特発性肺線維症のような炎症性肺傷害、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、気道過敏、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、乾癬、湿疹、潰瘍性大腸炎およびクローン病のような I B S および炎症性腸疾患 (I B D)、ヘリコバクター・ピロリ感染、ループス腎炎、I g A 腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患 (リポイドネフローゼ)、巣状分節性系球体硬化症 (F S G S)、腎性全身性線維症 (N S F)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎 (シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫 (丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、P O E M s 症候群 (クロウ・深瀬症候群、高槻病または P E P 症候群)、ネフローゼ症候群、移植片拒絶、移植片対宿主病 (G V H D) (血液、骨髄、腎臓、膵臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)、腹膜炎が原因の腹腔内癒着および / または膿瘍 (例えば、感染、傷害などが原因)、ネフローゼ症候群、嚢胞性線維症 (Tan, H.-L. et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 184(2):252-258 (2011))、溶解性骨疾患 (例えば、多発性骨髄腫誘発骨溶解性骨病) (Sotomayor, E.M., Blood, 116(18):3380-3382 (2010))、臓器同種移植片拒絶反応、連鎖球菌細胞壁 (S C W) 誘発関節炎、骨関節症、歯肉炎 / 歯周症、ヘルペス性間質性角膜炎、再狭窄、川崎病、加齢黄斑変性症 (A M D ; 例えば、滲出型 A M D および萎縮型 A M D) (Wei, L. et al., Cell Reports, 2:1151-1158 (Nov. 29, 2012)、免疫介在腎疾患、肝線維症 (Meng, F. et al., Gastroenterology, 143:765-776 (2012))、肺線維症 (Meng, F. et al., Gastroenterology, 143:765-776 (2012))、肝胆道疾患、心筋炎 (Ding, H.-S., Mol. Biol. Rep., 39(7):7473-7478 (Feb. 14, 2012); Valente, A.J. et al., Cellular Signalling, 24:560-568 (2012))、心線維症 (Valente, A.J. et al., Cellular Signalling, 24:560-568 (2012))、有害心筋リモデリング (Valente, A.J. et al., Cellular Signalling, 24:560-568 (2012))、アテローム性動脈硬化症 (Ding, H.-S., Mol. Biol. Rep., 39(7):7473-7478 (Feb. 14, 2012))、心虚血 / 再灌流傷害 (Ding, H.-S., Mol. Biol. Rep., 39(7):7473-7478 (Feb. 14, 2012))、心不全 (Ding, H.-S., Mol. Biol. Rep., 39(7):7473-7478 (Feb. 14, 2012)) および前立腺、腎臓、結腸、卵巣および子宮頸の癌および白血病を含むが、これらに限定されない I L - 1 7 および / または I L - 2 3 発現により特徴付けられる癌 / 新生物疾患 (Tartour et al., Cancer Res., 59:3698 (1999); Kato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 282:735 (2001); Steiner et al., Prostate, 56:171 (2003); Langowksi et al., Nature, May 10 [Epub ahead of print], (2006)) の処置において、I L - 1 7 A、I L - 1 7 F、それらのホモ二量体およびヘテロ二量体および I L - 2 3 (p 1 9 を介して) (個々にまたは一体となって) と結合、遮断、阻害、減少、拮抗または中和できる。

【 0 1 0 9 】

例えば、本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、炎症性疾患の治療的処置に、特に後天性免疫不全症候群(自己免疫性要素を伴うウイルス疾患であるAIDS)、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患(AIED)、自己免疫性リンパ増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、心筋症、セリアックスブルー、疱疹状皮膚炎；慢性疲労免疫機能不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経障害(CIPD)、癰痕性類天疱瘡、寒冷凝集素疾患、クレスト症候群、デゴス病、皮膚筋炎 - 若年性、円板状ループス(例えば、小児円板状エリテマトーデス、汎発性円板状エリテマトーデスおよび限局性円板状エリテマトーデス)、凍瘡エリテマトーデス、エリテマトーデス - 扁平苔癬重複症候群、エリテマトーデス脂肪組織炎、腫脹エリテマトーデス、いぼ状皮膚エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、亜急性皮膚エリテマトーデス、急性皮膚エリテマトーデス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、グレープス病、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎(スチル病)、若年性リウマチ性関節炎、リウマチ性関節炎(RA)、メニエール病、混合型結合組織疾患、多発性硬化症(MS)(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、重症筋無力症、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、湿疹、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、成人呼吸器疾患(ARD)、リウマチ熱、関節炎、サルコイドーシス、強皮症(例えば、進行性全身性硬化症(PSS)、全身性硬化症(SS)としても知られる)、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス(SLE)、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、巨細胞性動脈炎、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、内毒血症、敗血症または敗血症性ショック、毒素ショック症候群、多臓器不全、特発性肺線維症のような炎症性肺傷害、大腸炎、潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、ブドウ膜炎、白斑症、ウェゲナー肉芽腫、アルツハイマー病、アトピー性アレルギー、アレルギー、喘息、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道過敏、アレルギー性喘息、糸球体腎炎、溶血性貧血、ヘリコバクター・ピロリ感染、腹膜炎が原因の腹腔内癒着および/または膿瘍(例えば、感染、傷害などが原因)、ネフローゼ症候群、特発性脱髄性多発ニューロパシー、ギランバレー症候群、臓器同種移植片拒絶反応、ループス腎炎、IgA腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患(リポイドネフローゼ)、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、腎性全身性線維症(NSF)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎(シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫(丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、POEMS症候群(クロー・深瀬症候群、高槻病またはPEP症候群)、ネフローゼ症候群、移植片対宿主病(GVHD)(血液、骨髄、腎臓、脾臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)、溶解性骨疾患(例えば、多発性骨髄腫誘発溶解性骨疾患)、嚢胞性線維症、加齢黄斑変性(AMD；例えば、滲出型AMDおよび萎縮型AMD)、肝線維症、肺線維症、アテローム性動脈硬化症、心虚血/再灌流傷害、心不全、心筋炎、心線維症、有害心筋リモデリング、糖尿病性網膜症および人工呼吸器誘発肺傷害の処置に、有用である、例えば、IL-17A、IL-17FおよびIL-23/p19に拮抗する。

【0110】

したがって、一つの態様において、本発明は、処置を必要とする哺乳動物に二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの治療有効量を投与することを含む、処置を必要とする哺乳動物における、炎症誘発性サイトカイン類、例えば、IL-17A、IL-17FおよびIL-23の1種以上の阻害方法を提供する。好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。本方法は高レベルのIL-17A、IL-17FまたはIL-23発現を特徴とする障害の処置に使用し得る。二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメン

10

20

30

40

50

トは、他の薬物と共に、同じ製剤としてまたは別々に投与し得る。

【0111】

他の態様において、本発明は、哺乳動物にIL-17A/Fポリペチド、そのアゴニストまたはそのアンタゴニスト(例えばIL-17A/F交差反応性抗体を含むIL-17A/F結合エンティティ)の治療有効量を投与することを含む、処置を必要とする哺乳動物における免疫関連障害の処置方法を提供する。好ましい面において、免疫関連障害は全身性エリテマトーデス(SLE)、リウマチ性関節炎(RA)、骨関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性ミオパシー、シェーグレン症候群、全身性脈管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、糖尿病、免疫介在腎疾患、多発性硬化症(MS)(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギランバレー症候群および慢性炎症性脱髄性多発神経障害のような中枢および末梢神経系の脱髄性疾患、感染性、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎のような肝胆道疾患、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、潰瘍性大腸炎、グルテン感受性腸疾患およびウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む自己免疫性または免疫介在皮膚疾患、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、巨細胞性動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹のようなアレルギー性疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎のような肺の免疫性疾患、ループス腎炎、IgA腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患(リポイドネフローゼ)、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、腎性全身性線維症(NSF)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎(シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫(丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、POEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高槻病またはPEP症候群)、ネフローゼ症候群、移植片対宿主病(GVHD)(血液、骨髓、腎臓、脾臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)、溶解性骨疾患(例えば、多発性骨髄腫誘発溶解性骨疾患)、嚢胞性線維症、加齢黄斑変性(AMD;例えば、滲出型AMDおよび萎縮型AMD)、肝線維症、肺線維症、アテローム性動脈硬化症、心虚血/再灌流傷害、心不全、心筋炎、心線維症、有害心筋リモデリング、移植片拒絶および移植片対宿主病を含む移植関連疾患からなる群から選択される。

【0112】

他の態様において、本発明は、処置を必要とする哺乳動物に本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの治療有効量を投与することを含む、そのような処置を必要とする哺乳動物における炎症の阻止方法を提供する。好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。炎症は、多発性硬化症(MS)(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、慢性炎症、シェーグレン症候群、自己免疫性糖尿病、リウマチ性関節炎(RA)および他の関節炎状態、喘息、全身性硬化症、アトピー性皮膚炎、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、巨細胞性動脈炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デゴス病、皮膚筋炎 - 若年性、円板状ループス(例えば、小児円板状エリテマトーデス、汎発性円板状エリテマトーデスおよび限局性円板状エリテマトーデス)、凍瘡エリテマトーデス、エリテマトーデス - 扁平苔癬重複症候群、エリテマトーデス脂肪織炎、腫脹エリテマトーデス、いぼ状皮膚エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、亜急性皮膚エリテマトーデス、急性皮膚エリテマトーデス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、グレープス病、溶解性骨疾患(例えば、多発性骨髄腫誘発溶解性骨疾患)、嚢胞性線維症、加齢黄斑変性(AMD;例えば、滲出型AMDおよび萎縮型AMD)、肝線維症、肺線維症、アテローム性動脈硬化症、心虚血/再灌流傷害、心不全、心筋炎、心線維症、有害心筋リモデリング、ギランバレー症候群、橋本甲状腺炎、乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、ループス腎炎、IgA

腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患(リポイドネフローゼ)、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、腎性全身性線維症(NSF)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎(シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫(丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、POEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高槻病またはPEP症候群)、ネフローゼ症候群、移植片対宿主病(GVHD)(血液、骨髄、腎臓、脾臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)からなる群から選択される疾患と関連し得る。二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントは、他の薬物、例えば抗炎症剤と共に、同じ製剤としてまたは別々に投与し得る。

【0113】

他の態様において、本発明は、ここに記載する抗体、例えば、二重特異性抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を含む医薬組成物は、薬学的に有用な組成物を製造することが知られる方法に従い製剤でき、それにより治療タンパク質を、薬学的に許容される担体の混合物に合わせる。組成物は、その投与が受容患者が許容できるならば、“薬学的に許容される担体”と考えられる。無菌リン酸緩衝食塩水は、薬学的に許容される担体の一例である。他の適切な担体は当業者に周知である。例えば、Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company (1995)参照。

【0114】

医薬使用のために、本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体は、慣用方法に従い、非経腸、特に静脈内または皮下送達するために製剤される。静脈内投与はボラス注入、例えば、ミニポンプまたは他の適当なテクノロジーを使用する制御放出または典型的に1～数時間の時間にわたる注入により得る。一般に、医薬製剤は、食塩水、緩衝化食塩水、5%デキストロース水溶液などのような薬学的に許容される担体と組み合わせて、本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を含む。製剤は、さらに1種以上の添加物、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質喪失を防止するためのアルブミンなどを含み得る。このような組み合わせ治療を使用するとき、二重特異性抗体を含む抗体を、単一製剤中に組み合わせても、別々の製剤で投与してもよい。製剤方法は当分野で周知であり、例えば、引用により本明細書に包含させるGennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA (1990)に開示されている。治療的投与量は、一般に0.1～100mg/患者体重kg/日、好ましくは0.5～20mg/kg/日であり、正確な投与量は、処置する状態の性質および重症度、患者の特性などを考慮して、医師が認められている標準に従い決定する、投与量の決定は当業者の通常技術レベルの範囲内である。より一般的に、抗体を1週間かけてまたはそれより短く、しばしば1～3日間かけて投与する。一般に、投与する抗体の投与量は、患者の年齢、身長、体重、性別、一般的状態および病歴のような因子により変わる。典型的に、レシピエントに、約1pg/kg～10mg/kg(薬物重量/患者体重)の範囲である抗体を与えるのが望ましいが、状況によってはこれより低い投与量または高い投与量も投与し得る。

【0115】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体の対象への投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、局所カテーテルを介する灌流または直接病巣内注射によるものであり得る。治療的抗体を注射により投与するとき、投与は連続的注入でも1回または複数回ボラスでもよい。

【0116】

さらなる投与経路は経口、粘膜、肺および経皮を含む。経口送達は、ポリエステルマイクロスフェア、ゼインマイクロスフェア、プロテインノイドマイクロスフェア、ポリシアノアクリレートマイクロスフェアおよび脂質系が適する(例えば、DiBase et al., "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", in Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 255-288, Plenum Press (1997)参照)。鼻腔内送達の可能性は、このような方法でのインスリン投与により例証されている(例えば、Hinchcliffe et

10

20

30

40

50

al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35:199 (1999)参照)。本発明の抗体を含む乾燥または液体粒子を製造し、乾燥粉末ディスペンサー、液体エアロゾル発生装置またはネブライザーを使用して吸入投与できる(例えば、Pettit et al., *TIBTECH*, 16:343 (1998); Patton et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 35:235 (1999)参照)。この試みは、エアロゾル化インスリンを肺に送達する携帯電子吸入器であるA E R X (登録商標)糖尿病管理システムが例である。48,000 kDaほど大きいタンパク質が、低周波数超音波を利用して治療濃度で皮膚を通過して送達されることが試験で示されており、これは経皮的投与の可能性を例証する(Mitragotri et al., *Science*, 269:850 (1995))。エレクトロポレーションを使用する経皮送達は、IL-17およびIL-23/p19結合活性を有する分子を投与する他の手段を提供する(Potts et al., *Pharm. Biotechnol.*, 10:213 (1997))。

10

【0117】

治療の目的で、本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物を、治療有効量で患者に投与する。本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と薬学的に許容される担体の組み合わせは、投与される量が生理学的に意味があるならば、“治療有効量”で投与されたと見なされる。薬物は、その存在により受容患者の生理学に検出可能な変化がもたらされるならば、生理学的に意味がある。例えば、炎症の処置に使用する薬物は、その存在が炎症性応答を軽減するならば、生理学的に意味がある。有効処置は多様な方法で評価し得る。一つの態様において、有効処置は炎症の軽減により決定する。他の態様において、有効処置は炎症阻害により示される。さらに別の態様において、有効治療は、体重増加、体力回復、疼痛軽減、好調および患者からの体調良好の主観的指標のような徴候を含む、患者の健康の増加により測定する。

20

【0118】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を含む医薬組成物は、液体形態、エアロゾルまたは固形で提供できる。液体形態の例は、注射溶液および経口懸濁液である。固形の例は、カプセル剤、錠剤および徐放形態を含む。後者の形態は、ミニ浸透圧ポンプおよびインプラントにより例示される(Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.*, 10:239 (1997); Ranade, “Implants in Drug Delivery”, in Ranade et al., eds., *Drug Delivery Systems*, pp. 95-123, CRC Press (1995); Bremer et al., “Protein Delivery with Infusion Pumps”, in Sanders et al., eds., *Protein Delivery: Physical Systems*, pp. 239-254, Plenum Press (1997); Yewey et al., “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant”, in Sanders et al., eds., *Protein Delivery: Physical Systems*, pp. 93-117, Plenum Press (1997))。

30

【0119】

リポソームは、対象に静脈内、腹腔内、髄腔内、筋肉内、皮下または経口投与、吸入または鼻腔内投与により治療ポリペチドを送達する一つ的手段である。リポソームは、水性区画を囲む1個以上の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である(一般に、Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12(Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs*, 46:618 (1993), and Ranade, “Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers”, in Ranade et al., eds., *Drug Delivery Systems*, pp. 3-24, CRC Press (1995)参照)。リポソームは、細胞膜と組成が類似し、その結果、リポソームは安全に投与でき、生分解性である。製造法によって、リポソームは単層または多重膜であってよく、リポソームは、0.02 μmから10 μmを超える範囲の直径で様々なであり得る。多様な薬物をリポソームに封入でき、疎水性薬物は二重層に分配され、親水性剤は内部水性間隙に分配される(例えば、Machy et al., *Liposomes in Cell Biology and Pharmacology*, John Libbey (1987), and Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.*, 46:1576 (1989)参照)。さらに、リポソームのサイズ、二重層数、脂質組成ならびにリポソームの電荷および表面特徴を変えることにより、封入された薬物の治療利用濃度を制御することが可能である。

40

【0120】

リポソームは、実質的にあらゆるタイプの細胞により吸収され、その後封入された薬物

50

をゆっくり放出できる。あるいは、吸収されたリポソームは、食細胞である細胞に取り込まれる。エンドサイトーシの後、リポソーム脂質のリソソーム内分解および封入薬物の放出が起こる(Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 446:368 (1985))。静脈内投与後、小リポソーム(0.1 ~ 1.0 μm)は典型的に主に肝臓および脾臓に位置する網内皮系の細胞により取り込まれ、一方3.0 μmより大きいリポソームは肺に沈着する。小さいリポソームの網内皮系細胞による優先的取り込みが、マクロファージおよび肝臓の腫瘍への化学療法剤送達に使用されている。

【0121】

網内皮系は、大投与量のリポソーム粒子での飽和または薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化を含むいくつかの方法により回避できる(Claassen et al., Biochim. Biophys. Acta, 802:428 (1984))。さらに、糖脂質またはポリエチレングリコール誘導体化リン脂質のリポソーム膜への取り込みが、網内皮系による取り込みを顕著に減少させることが示されている(Allen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1068:133 (1991); Allen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1150:9 (1993))。

【0122】

リポソームはまた、リン脂質組成を変えることによりまたは受容体またはリガンドをリポソームに挿入させることにより特定の細胞または臓器を標的とするようにも製造できる。例えば、高含量の非イオン性界面活性剤を有して製造したリポソームは肝臓を標的とするために使用されている(早川らの特開平04-244018; Kato et al., Biol. Pharm. Bull., 16:960 (1993))。これらの製剤は、ダイズホスファチジルコリン、 α -トコフェロールおよびエトキシシル化水素化ヒマシ油(H共60)をメタノール中で混合し、混合物を減圧下濃縮し、混合物を水で再構成することにより製造された。ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)とダイズ由来ステリルグルコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)のリポソーム製剤も肝臓を標的とすることが示されている(Shimizu et al., Biol. Pharm. Bull., 20:881 (1997))。

【0123】

あるいは、抗体、抗体フラグメント、炭水化物、ビタミンおよび輸送タンパク質のような種々のターゲティングリガンドを、リポソーム表面に結合できる。例えば、リポソームを、分枝型ガラクトシル脂質誘導体で修飾して、肝臓細胞表面上に排他的に発現されるアシアロ糖タンパク質(ガラクトース)受容体を標的にできる(Kato et al., Crit. Rev. The r. Drug Carrier Syst., 14:287 (1997); Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull., 20:259 (1997))。同様に、Wu et al., Hepatology, 27:772 (1998)は、リポソームをアシアロフェチュインで標識することによりリポソーム血漿半減期が短くなり、肝細胞によるアシアロフェチュイン標識リポソーム取り込みが大きく増強されることを示している。他方で、分枝型ガラクトシル脂質誘導体を含むリポソームの肝臓蓄積は、アシアロフェチュインの前注射により阻害できる(Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull., 20:259 (1997))。ポリアコニチル化ヒト血清アルブミンリポソームは、リポソームを肝臓細胞にターゲティングさせる他の方法を提供する(Kamps et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94:11681 (1997))。さらに、Geho et al. 米国特許番号4,603,044は、肝臓の特定代謝細胞と関連する肝胆道受容体に特異性を有する、肝細胞指向性リポソーム小胞送達系を記載する。

【0124】

組織ターゲティングのためのより一般的な試みとして、標的細胞を、標的細胞により発現されるリガンドに特異的なビオチニル化抗体で前標識化する(Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 32:99 (1998))。遊離抗体の血漿消失後、ストレプトアビジン結合リポソームを投与する。他の試みにおいて、ターゲティング抗体を直接リポソームに結合する(Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 32:99 (1998))。

【0125】

抗体を、タンパク質マイクロカプセル化の一般的技法を使用してリポソームに封入できる(例えば、Anderson et al., Infect. Immun., 31:1099 (1981), Anderson et al., Can

10

20

30

40

50

cer Res., 50:1853 (1990), and Cohen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1063:95 (1991), Alving et al. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", in Gregoriadis, ed., Liposome Technology, 2nd Edition, Vol. III, p. 317, CRC Press (1993), Wassef et al., Meth. Enzymol., 149:124 (1987)参照)。上記のとおり、治療に有用なりポソームは多様な成分を含み得る。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含み得る(Allen et al., Biochim. Biophys. Acta, 1150:9 (1993))。

【0126】

分解性ポリマーマイクロスフェアが、治療タンパク質の高全身性レベルを維持するために設計されている。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、非生分解性エチルビニルアセテートポリマーのような分解性ポリマーから製造し、ここで、タンパク質がポリマー内に封入されている(Gombotz et al., Bioconjugate Chem., 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", in Ranade et al., eds., Drug Delivery Systems, pp. 51-93, CRC Press (1995); Roskos et al., "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", in Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 45-92, Plenum Press (1997); Bartus et al., Science, 281:1161 (1998); Putney et al., Nature Biotechnology, 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:548 (1998))。ポリエチレングリコール(PEG)被覆ナノ球体も、治療タンパク質の静脈内投与用担体を提供する(例えば、Gref et al., Pharm. Biotechnol., 10:167 (1996)参照)。

【0127】

本製剤は、処置する特定の適応症の必要に応じて、1種を超える活性化合物を含むこともでき、好ましくは互いに不利に作用しない相補的活性剤を含むものである。これとは別にまたはこれに加えて、本組成物は、例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖阻害剤のような、その機能を増強する薬物を含むことができる。このような分子は、意図する目的に有効である量で組み合わせて適切に使用される。

【0128】

一つの態様において、本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせ治療で、すなわち、自己免疫性障害および炎症性疾患のような病態または障害の処置に有用な他の薬物、例えば、治療剤と組み合わせ投与する。この文脈での用語“組み合わせ”は、複数薬物を、一緒にまたは逐次的に、実質的に同時に投与する。逐次的に投与するとき、第二の化合物の投与開始時に、2種の化合物の最初のものは好ましくは処置部位で有効濃度でなお検出可能とする。

【0129】

例えば、組み合わせ治療は、下にさらに詳述するとおり、1種以上の付加的治療剤、例えば、1種以上のサイトカインおよび増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤および/または細胞毒性または細胞増殖抑制剤と共製剤されるおよび/または併用される、1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を含み得る。さらに、1種以上のここに記載する抗体、例えば、二重特異性抗体を、ここに記載する治療剤の2種以上と組み合わせで使用できる。このような組み合わせ治療は、有利に投与する治療剤の低投与量を使用し、それゆえに、個々の単剤療法による毒性または効果の複雑化の可能性を避け得る。

【0130】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせ使用する好ましい治療剤は、炎症性応答の異なる段階を妨害する薬物である。一つの態様において、1種以上のここに記載する抗体、例えば、二重特異性抗体を、他のサイトカインまたは増殖因子アンタゴニスト(例えば、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子、リガンド融合物);または他の標的と結合する抗体またはその抗原結合フラグメント(例えば、他のサイトカイン類または増殖因子、その受容体または他の細胞表面分子に結合する抗体);および抗炎症性サイトカイン類またはそのアゴニストのような1種以上の付加的薬物と共製剤および/または併用

し得る。ここに記載する抗体と組み合わせて使用できる薬物の非限定的例は、1種以上のインターロイキン(IL)またはその受容体のアンタゴニスト、例えば、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-20、IL-21、IL-22およびIL-31のアンタゴニスト；腫瘍壊死因子(TNF)、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFのようなサイトカイン類または増殖因子またはその受容体のアンタゴニストを含むが、これらに限定されない。本発明の抗体はまた、CD2、CD3、CD4、CD8、CD20(例えば、CD20阻害剤リツキシマブ(リツキサン(登録商標)))、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90またはCD154を含むそのリガンド(gp39またはCD40L)またはLFA-1/ICAM-1およびVLA-4/VCAM-1のような細胞表面分子に対する阻害剤、例えば、抗体とも組み合わせできる(Yusuf-Makagiansar et al., Med. Res. Rev., 22: 146-167 (2002))。1種以上のここに記載する抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせて使用できる好ましいアンタゴニストは、IL-1、IL-6、IL-12、TNF-アルファ、IL-15、IL-18、IL-20、IL-22およびIL-31のアンタゴニストを含む。

【0131】

このような薬物の例は、IL-12(好ましくはヒトIL-12)に結合するキメラ、ヒト化、ヒトまたはインビトロ産生抗体(またはその抗原結合フラグメント)、例えば、WO 00/56772に開示の抗体のようなIL-12アンタゴニスト；IL-12受容体阻害剤、例えば、ヒトIL-12受容体に対する抗体；およびIL-12受容体、例えば、ヒトIL-12受容体の可溶性フラグメントを含む。IL-15アンタゴニストの例は、IL-15またはその受容体に対する抗体(またはその抗原結合フラグメント)、例えば、キメラ、ヒト化、ヒトまたはインビトロ産生抗体とヒトIL-15またはその受容体、IL-15受容体の可溶性フラグメントおよびIL-15結合タンパク質を含む。IL-18アンタゴニストの例は、ヒトIL-18に対する抗体、例えば、キメラ、ヒト化、ヒトまたはインビトロ産生抗体(またはその抗原結合フラグメント)、IL-18受容体の可溶性フラグメントおよびIL-18結合タンパク質(IL-18BP)を含む。IL-1アンタゴニストの例は、Vx740のようなインターロイキン-1-変換酵素(ICE)阻害剤、IL-1アンタゴニスト、例えば、IL-1RA(アナキンラ、KINERET(登録商標)、Amgen)、sIL1RII(Immunex)および抗IL-1受容体抗体(またはその抗原結合フラグメント)を含む。

【0132】

TNFアンタゴニストの例は、(ヒュミラ(登録商標)、D2E7、ヒトTNF-アルファ抗体)、CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356(ヒト化抗TNF-アルファ抗体；Celltech/Pharmacia)、cA2(キメラ抗TNF-アルファ抗体のようなTNF(例えば、ヒトTNF-アルファ)に対するキメラ、ヒト化、ヒトまたはインビトロ産生抗体(またはその抗原結合フラグメント)；レミケード(登録商標)、Centocor)；抗TNF抗体フラグメント(例えば、CPD870)；TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kdTNFR-IgG(75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質、エンブレル(登録商標)；Immunex)、p55kdTNFR-IgG(55kd TNF受容体-IgG融合タンパク質(レネルセプト))；酵素アンタゴニスト、例えば、TNF-アルファ変換酵素(TACE)阻害剤(例えば、アルファ-スルホニルヒドロキサム酸誘導体およびN-ヒドロキシホルムアミドTACE阻害剤GW 3333、-005または-022)；およびTNF-bp/s-TNFR(可溶性TNF結合タンパク質)を含む。好ましいTNFアンタゴニストは、TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kdTNFR-IgGおよびTNF-アルファ変換酵素(TACE)阻害剤である。

【0133】

他の態様において、1種以上のここに記載する抗体、例えば、二重特異性抗体を、IL

10

20

30

40

50

- 13 アンタゴニスト、例えば、IL-13 に対する可溶性 IL-13 受容体 (sIL-13) および / または抗体 ; IL-2 アンタゴニスト、例えば、DAB 486-IL-2 および / または DAB 389-IL-2 (IL-2 融合タンパク質、Seragen) および / または IL-2 R に対する抗体、例えば、抗 Tac (ヒト化抗 IL-2 R、Protein Design Labs) の 1 種以上と組み合わせ投与し得る。さらに別の組み合わせは、非枯渴抗 CD 4 阻害剤 (DEC-CE9.1/SB 210396 ; 非枯渴長類化抗 CD 4 抗体 ; IDEC/SmithKline) と組み合わせた 1 種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体、アンタゴニスト小分子および / または阻害抗体である。さらに他の好ましい組み合わせは、抗体、可溶性受容体またはアンタゴニストリガンドを含む同時刺激経路 CD 80 (B 7.1) または CD 86 (B 7.2) のアンタゴニスト ; ならびに p - セレクチン糖タンパク質リガンド (PSGL)、抗炎症性サイトカイン類、例えば、IL-4 (DNAX/Schering) ; IL-10 (SCH 52000 ; 組み換え IL-10 DNAX/Schering) ; IL-13 および TGF-β およびそのアゴニスト (例えば、アゴニスト抗体) を含む。

10

【0134】

他の態様において、1 種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を、1 種以上の抗炎症性薬物、免疫抑制剤または代謝または酵素阻害剤を共製剤および / または併用できる。ここに記載する抗体と組み合わせ使用できる薬物または阻害剤の非限定的例は、非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID)、例えば、イブプロフェン、テニダップ、ナプロキセン、メロキシカム、ピロキシカム、ジクロフェナクおよびインドメタシン ; スルファサラジン ; プレドニゾロンのようなコルチコステロイド ; サイトカイン抑制性抗炎症剤 (CSAID) ; ヌクレオチド生合成阻害剤、例えば、プリン生合成阻害剤、葉酸アンタゴニスト (例えば、メトトレキサート (N-[4-[[[(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]メチルアミノ]ベンゾイル]-L-グルタミン酸) ; およびピリミジン生合成阻害剤、例えば、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) 阻害剤を含むが、これらに限定されない。1 種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせ使用する好ましい治療剤は、NSAID、CSAID、(DHODH) 阻害剤 (例えば、レフルノミド) および葉酸アンタゴニスト (例えば、メトトレキサート) を含む。

20

【0135】

さらなる阻害剤の例は、1 種以上のコルチコステロイド (経口、吸入および局所注射) ; 免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、タクロリムス (FK-506) ; および mTOR 阻害剤、例えば、シロリムス (ラパマイシン - ラパミューン (登録商標) または ラパマイシン誘導体、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体 (例えば、エステルラパマイシン誘導体、例えば、CCI-779) ; TNF-α または IL-1 (例えば、IRAK、NIK、IKK、p38 または MAPキナーゼ阻害剤) のような炎症誘発性サイトカイン類のシグナル伝達を妨害する薬物 ; COX 2 阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブおよびその変異体 ; ホスホジエステラーゼ阻害剤、例えば、R973401 (ホスホジエステラー IV 型阻害剤) ; ホスホリパーゼ阻害剤、例えば、細胞質ホスホリパーゼ 2 (cPLA2) 阻害剤 (例えば、トリフルオロメチルケトンアナログ) ; 血管内皮細胞増殖因子または増殖因子受容体阻害剤、例えば、VEGF 阻害剤および / または VEGF-R 阻害剤 ; および血管形成阻害剤を含む。本発明の抗体と組み合わせ使用するために好ましい治療剤は、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、タクロリムス (FK-506) ; mTOR 阻害剤、例えば、シロリムス (ラパマイシン) または ラパマイシン誘導体、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体 (例えば、エステルラパマイシン誘導体、例えば、CCI-779) ; COX 2 阻害剤、例えば、セレコキシブおよびその変異体 ; およびホスホリパーゼ阻害剤、例えば、細胞質ホスホリパーゼ 2 (cPLA2) 阻害剤、例えば、トリフルオロメチルケトンアナログを含む。

30

40

【0136】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせ使用できるさらなる治療剤の例は、1 種以上の 6 - メルカプトプリン類 (6-MP) ; アザチオプリンスルファサラジン ; メサラジン ; オルサラジン ; クロロキン / ヒドロキシクロロキン (PLAQUENIL (登録商標)) ; ペニシラミン ; 金チオリンゴ酸 (筋肉内および経口) ; アザチオプリン ; コルヒチン ;

50

ベータ - 2 アドレナリン受容体アゴニスト(サルブタモール、テルブタリン、salmeteral) ; キサンチン類(テオフィリン、アミノフィリン) ; クロモグリケート ; ネドクロミル ; ケトチフェン ; イプラトロピウムおよびオキシトロピウム ; ミコフェノール酸モフェチル ; アデノシンアゴニスト ; 抗血栓剤 ; 補体阻害剤 ; およびアドレナリン剤を含む。

【 0 1 3 7 】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせ得る、関節炎障害(例えば、リウマチ性関節炎、炎症性関節炎、リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、骨関節症および乾癬性関節炎)の処置または予防のための薬物の非限定的例は、1種以上のここに記載するIL - 12アンタゴニスト ; NSAID ; CSAID ; TNF、例えば、ここに記載するTNF - アルファ、アンタゴニスト ;ここに記載する非枯渴抗CD4抗体 ;ここに記載するIL - 2アンタゴニスト ; 抗炎症性サイトカイン類、例えば、IL - 4、IL - 10、IL - 13およびTGF - アルファまたはそのアゴニスト ;ここに記載するIL - 1またはIL - 1受容体アンタゴニスト ;ここに記載するホスホジエステラーゼ阻害剤 ;ここに記載するCOX - 2阻害剤 ; イロprost ; メトトレキサート ; サリドマイドおよびサリドマイド関連薬物(例えば、Celgen) ; レフルノミド ; プラスミノゲン活性化阻害剤、例えば、トラネキサム酸 ; サイトカイン阻害剤、例えば、T-614 ; プロスタグランジンE1 ; アザチオプリン ; インターロイキン - 1変換酵素(ICE)阻害剤 ; zap - 70および/または1ck阻害剤(チロシンキナーゼzap - 70または1ck阻害剤) ;ここに記載する血管内皮細胞増殖因子または血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害剤 ;ここに記載する血管形成阻害剤 ; コルチコステロイド抗炎症性薬物(例えば、SB203580) ; TNF変換酵素阻害剤 ; IL - 11 ; IL - 13 ; IL - 17阻害剤 ; 金 ; ペニシラミン ; クロロキン ; ヒドロキシクロロキン ; クロラムブシル ; シクロホスファミド ; シクロスポリン ; 全身リンパ組織放射線照射 ; 抗胸腺細胞グロブリン ; CD5 - 毒素 ; 経口投与ペプチドおよびコラーゲン ; ロベンザリットニナトリウム ; サイトカイン制御剤(CRA)HP228およびHP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.) ; ICAM - 1アンチセンスホスホチオエートオリゴデオキシヌクレオチド(ISIS 2302 ; Isis Pharmaceuticals, Inc.) ; 可溶性補体受容体1(TP 10 ; T Cell Sciences, Inc.) ; プレドニゾン ; オルゴテイン ; グリコサミノグリカンポリスルフェート ; ミノサイクリン(MINOCIN(登録商標)) ; 抗IL2R抗体 ; 海洋および植物性脂質(魚および植物種子脂肪酸) ; オーラノフィン ; フェニルブタゾン ; メクロフェナム酸 ; フルフェナム酸 ; 静脈内免疫グロブリン ; ジロートン ; ミコフェノール酸(RS-61443) ; タクロリムス(FK-506) ; シロリムス(ラパマイシン) ; アミプリロース(テラフェクチン) ; クラドリピン(2 - クロロデオキシアデノシン) ; およびアザリピンを含む。好ましい組み合わせは、メトトレキサートまたはレフルノミドおよび中度および重度リウマチ性関節炎例においては、シクロスポリンと組み合わせた1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体である。

【 0 1 3 8 】

関節炎障害の処置のために1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせ使用するための阻害剤の好ましい例は、TNFアンタゴニスト(例えば、TNFに結合するキメラ、ヒト化、ヒトまたはインビトロ産生抗体またはその抗原結合フラグメント ; TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kdTNFR-IgG(75kD TNF受容体 - IgG融合タンパク質、エンブレル(登録商標))、p55kD TNF受容体 - IgG融合タンパク質 ; TNF酵素アンタゴニスト、例えば、TNF - アルファ変換酵素(TACE)阻害剤) ; IL - 12、IL - 15、IL - 18、IL - 22のアンタゴニスト ; T細胞およびB細胞枯渴剤(例えば、抗CD4または抗CD22抗体) ; 小分子阻害剤、例えば、メトトレキサートおよびレフルノミド ; シロリムス(ラパマイシン)およびそのアナログ、例えば、CCI - 779 ; COX - 2およびcPLA2阻害剤 ; NSAID ; p38阻害剤、TPL - 2、Mk - 2およびNF - B阻害剤 ; RAGEまたは可溶性RAGE ; P - セレクチンまたはPSGL - 1阻害剤(例えば、小分子阻害剤、それに対する抗体、例えば、P - セレクチンに対する抗体) ; エストロゲン受容体ベータ(ERB)アゴニストまたはERB - NF B

10

20

30

40

50

アンタゴニストを含む。1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と併用および/または共製剤できる最も好ましい付加的治療剤は、1種以上のTNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kdTNFR-IgG(75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質、エンブレル(登録商標));メトトレキサート、レフルノミドまたはシロリムス(ラパマイシン)またはそのアナログ、例えば、CCI-779を含む。

【0139】

1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体と組み合わせて多発性硬化症(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)の処置または予防するための薬物の非限定的例は、インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ1a(例えば、アボネックス(登録商標)、Biogen)およびインターフェロン-1b(ベタセロン(登録商標)、Chiron/Berlex);コポリマー1(Cop-1;コパキソン(登録商標)、Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);ジメチルフマレート(例えば、BG-12;Biogen);高圧酸素;静脈内免疫グロブリン;クラドリピン;ここに記載するTNFアンタゴニスト;コルチコステロイド;プレドニゾン;メチルプレドニゾン;アザチオプリン;シクロホスファミド;シクロスポリン;シクロスポリンA、メトトレキサート;4-アミノピリジン;およびチザニジンを含み得る。本発明の抗体と組み合わせて使用できるさらなるアンタゴニストは、他のヒトサイトカイン類または増殖因子に対する抗体またはアンタゴニスト、例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、EL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGFを含む。ここに記載する抗体を、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはそれらのリガンドのような細胞表面分子に対する抗体を含む。1種以上の本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体をまたメトトレキサート、シクロスポリン、FK-506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾンのようなコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン剤、ここに記載する炎症誘発性サイトカイン類によるシグナル伝達を妨害する薬物、IL-1b変換酵素阻害剤(例えば、Vx740)、抗P7、PSGL、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤のようなT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン類、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、ここに記載する可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体および抗炎症性サイトカイン類(例えば、IL-4、IL-10、IL-13およびTGF)を含む。

【0140】

本発明の抗体を組み合わせることができる多発性硬化症(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)治療剤の好ましい例は、ジメチルフマレート(例えば、BG-12;Biogen)、インターフェロン-ベータ、例えば、IFN-ベータ-1aおよびIFN-ベータ-1b;コパキソン(登録商標)、コルチコステロイド、IL-1阻害剤、TNF阻害剤、CD40リガンドおよびCD80に対する抗体、IL-12アンタゴニストを含む。

【0141】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせることができる炎症性腸疾患(例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎)を処置または予防するための薬物の非限定的例は、ブデソニド;上皮細胞増殖因子;コルチコステロイド;シクロスポリン;スルファサラジン;アミノサリチレート;6-メルカプトプリン;アザチオプリン;メトロニダゾール;lipオキシゲナーゼ阻害剤;メサラミン;オルサラジン;バルサラジド;抗酸化剤;トロポキサン阻害剤;IL-1受容体アンタゴニスト;抗IL-1モノクローナル抗体;抗IL-6モノクローナル抗体(例えば、抗IL-6受容体抗体および抗IL-6抗体);増殖因子;エラスターゼ阻害剤;ピリジニル-イミダゾール化合物;ここに記載するTNF

アンタゴニスト；IL-4、IL-10、IL-13および/またはTGF-β。サイトカイン類またはそのアゴニスト(例えば、アゴニスト抗体)；IL-11；プレドニゾン、デキサメサゾンまたはブデソニドのグルクロニドまたはデキストラン抱合プロドラッグ；ICAM-1アンチセンスホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド(ISIS 2302；Isis Pharmaceuticals, Inc.)；可溶性補体受容体1(TP10；T Cell Sciences, Inc.)；徐放性メサラジン；メトトレキサート；血小板活性化因子(PAF)のアンタゴニスト；シプロフロキサシン；およびリグノカインを含む。

【0142】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせることができる乾癬の処置または予防のための薬物の非限定的例は、コルチコステロイド；ビタミンD₃およびそのアナログ；レチノイド類(例えば、ソリアタン)；メトトレキサート；シクロスポリン、6-チオグアニン；アキュテイン；ハイドレア；ヒドロキシウレア；スルファサラジン；ミコフェノール酸モフェチル；アザチオプリン；タクロリムス；フマル酸エステル；アメピブ(登録商標)、エンブレル(登録商標)、ヒュミラ(登録商標)、ラプティバおよびレミケード(登録商標)、ウステキヌマブおよびXP-828Lのような生物製剤；光線療法；および光化学治療(例えば、ソラレンと紫外線光線療法の組み合わせ)を含む。

【0143】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせることができる炎症性気道/呼吸器疾患(例えば、慢性閉塞性肺障害、喘息)の処置または予防のための薬物の非限定的例は、β₂-アドレナリン受容体アゴニスト(例えば、サルブタモール(アルブテロールUSAN)、レバルブテロール、テルブタリン、ビトルテロール)；長時間作用型β₂-アドレナリン受容体アゴニスト(例えば、サルメテロール、フォルモテロール、バンブテロール)；アドレナリンアゴニスト(例えば、吸入エピネフリンおよびエフェドリン錠剤)；抗コリン剤(例えば、イプラトロピウムブロマイド)；吸入ステロイド類と長時間作用型気管支拡張剤の合剤(例えば、フルチカゾン/サルメテロール(米国ではアドベアー(登録商標)および英国ではセライド))またはブデソニド/フォルモテロール(シムビコート(登録商標)))；吸入グルココルチコイド(例えば、シクレソニド、ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、フルチカゾン、モメタゾン、トリアムシノロン)；ロイコトリエン修飾因子(例えば、モンテルカスト、ザフィルカスト、プラニルカストおよびジロートン)；肥満細胞安定化剤(例えば、クロモグリケート(クロモリン)およびネドクロミル)；抗ムスカリン/抗コリン剤(例えば、イプラトロピウム、オキシトロピウム、チオトロピウム)；メチルキサンチン(例えば、テオフィリン、アミノフィリン)；抗ヒスタミン剤；IgEブロッカー(例えば、オマリズマブ)；M.sub.3ムスカリンアンタゴニスト(抗コリン)(例えば、イプラトロピウム、チオトロピウム)；クロモン(例えば、クロモグリケート、ネドクロミル)；キサンチン(例えば、テオフィリン)；およびTNFアンタゴニスト(例えば、インフリキシマブ、アダリムマブおよびエタネルセプト)を含む。

【0144】

一つの態様において、本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を、免疫応答、例えば、移植片拒絶の制御に関与する他の標的を指向する1種以上の抗体と組み合わせて使用できる。

【0145】

本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体を組み合わせることができる免疫応答を処置または予防するための薬物の非限定的例は、CD25(インターロイキン-2受容体-a)、CD11a(LFA-1)、CD54(ICAM-1)、CD4、CD45、CD28/CTLA4(CD80(B7.1)、例えば、CTLA4Ig-アバタセプト(オレンシア(登録商標)))、ICOSL、ICOSおよび/またはCD86(B7.2)を含むが、これらに限定されない、他の細胞表面分子に対する抗体を含む。さらに別の態様において、本発明の抗体を、シクロスポリンAまたはFK-506のような1種以上の一般的免疫抑制剤と組み合わせて使用する。

【0146】

他の態様において、抗体を、自己免疫性障害、炎症性疾患などに対するワクチンアジュバントとして使用する。これらのタイプの障害の処置のためのアジュバントの組み合わせは、自己免疫に関与する標的となる自己の抗原、すなわち、自己抗原、例えば、ミエリン塩基性タンパク質；炎症性自己抗原、例えば、アミロイドペプチドタンパク質または移植片抗原、例えば、アロ抗原由来の広範な抗原と組み合わせ使用するのに適する。抗原は、糖類、タンパク質、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、自己抗原、アミロイドペプチドタンパク質、移植片抗原、アレルゲンまたは他の巨大分子成分のいずれかのタンパク質由来のペプチドまたはポリペチドならびにフラグメントを含み得る。ある例において、1個を超える抗原が抗原性組成物に含まれる。

【0147】

例えば、本発明のアジュバント組み合わせを含む、脊椎動物宿主においてアレルゲンに対する応答を緩和するための望ましいワクチンは、アレルゲンまたはそのフラグメントを含むものを含む。このようなアレルゲンの例は、引用により全体を本願明細書に包含させる米国特許番号5,830,877およびPCT公開番号WO99/51259に記載されており、花粉、昆虫毒液、動物鱗屑、真菌孢子および薬物(例えばペニシリン)を含む。ワクチンは、アレルギー性反応の既知原因であるIgE抗体産生を妨害する。他の例において、本発明のアジュバント組み合わせを含む、脊椎動物宿主におけるアミロイド沈着により特徴づけられる疾患の予防または処置に望ましいワクチンは、アミロイドペプチドタンパク質(APP)の一部を含むものを含む。この疾患は、アルツハイマー病、アミロイド症またはアミロイド形成的疾患と様々に呼ばれる。それゆえに、本発明のワクチンは、本発明のアジュバント組み合わせに加えて、AペプチドならびにAペプチドのフラグメントおよびAペプチドまたはそのフラグメントに対する抗体を含む。

【0148】

他の態様において、医薬組成物は、本発明の抗体、二重特異性抗体または抗原結合フラグメントを含む容器を含むキットとして提供され得る。本発明の抗体、例えば、二重特異性抗体は、1回または複数回投与用の注射溶液の形でまたは注射前に再構成する無菌粉末として提供できる。あるいは、このようなキットは、抗体、例えば、二重特異性抗体投与用の乾燥粉末ディスペンサー、液体エアロゾル発生装置またはネブライザーを含み得る。このようなキットは、さらに医薬組成物の適応症および使用に対する書面情報を含み得る。さらに、このような情報は、本抗体組成物がIL-17およびIL-23に過敏症であることが知られている患者に禁忌であるとの記載を含み得る。

【0149】

さらなる態様において、本発明は、(a)ここに記載する抗体、二重特異性抗体または抗原結合フラグメントを含む組成物；(b)該組成物を含む容器；および(c)該抗体の免疫関連疾患の処置における使用を記載する、該容器上に添付されたラベルまたは該容器に挿入された中入れ書を含む製品を提供する。

【0150】

他の面において、本組成物は、例えば、さらなる抗体または抗炎症性、細胞毒性または化学療法剤であり得る、さらなる活性成分を含む。好ましくは、組成物は無菌である。

【0151】

ここに記載する抗体、二重特異性抗体および抗原結合フラグメントはまた例えば、多発性硬化症(MS)(例えば、再発寛解型多発性硬化症、二次性進行型多発性硬化症、一次性進行型多発性硬化症および再発進行型多発性硬化症)、過敏性腸症候群(IBS)、潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患(IBD)、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス(SLE)、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)、巨細胞性動脈炎、多発性硬化症(MS)、大腸炎、内毒血症、関節炎、リウマチ性関節炎(RA)、骨関節症、シェーグレン症候群、乾癬、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症性ショック、多臓器不全、特発性肺線維症のような炎症性肺傷害、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道過敏、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、湿疹、ヘリコバクター・ピロリ感染、腹膜炎が原因の腹腔内癒着および/または膿瘍(

10

20

30

40

50

例えば、感染、傷害などが原因)、ネフローゼ症候群、特発性脱髄性多発ニューロパシー、ギランバレー症候群、臓器同種移植片拒絶反応、移植片対宿主病(GVHD)、ループス腎炎、IgA腎症、糖尿病性腎疾患、微小変化型疾患(リポイドネフローゼ)、巣状分節性系球体硬化症(FSGS)、腎性全身性線維症(NSF)、腎性線維化皮膚症、線維化胆汁鬱滞性肝炎、好酸球性筋膜炎(シュールマン症候群)、硬化性粘液水腫(丘疹性ムチン沈着症)、強皮症、硬化性萎縮性苔癬、POEMS症候群(クロウ・深瀬症候群、高槻病またはPEP症候群)、ネフローゼ症候群、移植片対宿主病(GVHD)(血液、骨髓、腎臓、脾臓、肝臓、同所性肝臓、肺、心臓、腸、小腸、大腸、胸腺、同種幹細胞、強度軽減同種、骨、腱、角膜、皮膚、心臓弁、静脈、動脈、血管、胃および精巣のような移植片から)、溶解性骨疾患(例えば、多発性骨髄腫誘発溶解性骨疾患)、嚢胞性線維症、加齢黄斑変性(AMD; 例えば、滲出型AMDおよび萎縮型AMD)、肝線維症、肺線維症、アテローム性動脈硬化症、心虚血/再灌流傷害、心不全、心筋炎、心線維症、有害心筋リモデリング、移植片拒絶、連鎖球菌細胞壁(SCW)誘発関節炎、歯肉炎/歯周症、ヘルペス性間質性角膜炎、グルテン感受性腸疾患再狭窄、川崎病および免疫介在腎疾患を含む、免疫関連および炎症性疾患の処置用の医薬および薬物の製造にも有用である。具体的な面において、このような医薬および薬物は、本発明の二重特異性抗体、抗体または抗原結合フラグメントの治療有効量を薬学的に許容される担体と共に含む。ある態様において、混合物は無菌である。

【0152】

ここに引用する全ての特許、特許出願および刊行物および電子化資料(例えば、GENBANK(登録商標)アミノ酸およびヌクレオチド配列寄託)の完全な開示を、引用により本明細書に包含させる。前記の詳細な記載および実施例は、理解を明りょう化するためにのみ示す。不必要な限定はそこから解釈されるべきではない。本発明は、示し、記載する正確な詳細事項に限定されず、当業者に明らかなバリエーションは、特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内に包含される。

【0153】

本発明は、さらに次の非限定的実施例により説明する。

【実施例】

【0154】

実施例 1

マウス抗ヒトIL-17A/F二重特異性抗体のヒト化

ハイブリドーマクローン選択および可変領域同定

組み換えヒトタンパク質IL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fを、Zymo Genetics Inc.、Bristol-Myers Squibb Company(Seattle, WA, USA)でHEK293一過性発現系を使用して製造した。BALB/cマウス(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)を、BSAにコンジュゲートした組み換えヒトIL-17Fで免疫化および追加免疫し、BSAにコンジュゲートした組み換えヒトIL-17Aで免疫化した。最高抗IL-17Fおよび抗IL-17A抗体結合活性を含む血清を有するマウスを、IL-17Fの最終融合前追加免疫した。4日後、脾細胞およびリンパ節細胞をAg8.653骨髄腫細胞と融合させ、抗体産生ハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマ培養上清を、プレート式ELISAによりIL-17FおよびIL-17A結合をスクリーニングし、IL-17FおよびIL-17A中和をIL-17A/F細胞アッセイでスクリーニングした。IL-17FおよびIL-17Aの両方に結合し、中和する上清サンプルに対応するハイブリドーマ細胞を、目的の中和モノクローナル抗体を産生するモノクローナルハイブリドーマである339.15.3.5(命名339.15)を単離するためにクローン化した。ハイブリドーマ339.15を、ISOSTRIP(登録商標)Mouse Monoclonal Antibody Iso typing Kit(Roche, Indianapolis, IN, USA)を使用してアイソタイプ分類し、RNAをQIAGEN(登録商標)RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)を使用して単離した。可変領域を、5'RACEテクノロジーおよびマウス定常領域配列に対して設計した遺伝子特異的3'プライマーを利用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, Mountain V

10

20

30

40

50

iew, CA, USA)を使用してクローン化した。重および軽可変領域配列を、TOPO(登録商標)TA Cloning Kit for Sequencing(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用してクローンした。遺伝子配列を、ハイブリドーマ339.15から精製した抗体で実施したN末端アミノ酸配列決定と配列を比較することにより確認した。

【0155】

可変領域配列を339.15.3.5、339.15.5.3および339.15.3.6からクローン化し、全く同じ可変領域配列を含むことが示された。339.15.3.5からの配列を後のヒト化に使用し、339.15.3.6ハイブリドーマクローンを、2006年11月7日にAmerican Type Tissue Culture Collection(ATCC、10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209)特許寄託機関に、原寄託としてブタベスト条約の下寄託し、ATCC(登録商標)特許受託番号PTA-7988が与えられた。ハイブリドーマクローン339.15.3.6(ATCC(登録商標)特許受託番号PTA-7988)および339.15.5.3(ATCC特許受託番号PTA-7987)はまた、例えば、米国特許番号7,790,163、7,910,703および8,333,968に開示されている。

【0156】

キメラおよびヒト化抗ヒトIL-17A/F可変領域配列の分子モデリング

全可変領域モデルを構築し、MOE Software Suite, Version 2008(Chemical Computing Group, Montreal, Canada)を使用して見た。

【0157】

抗ヒトIL-17A/Fヒト化抗体設計

マウス相補性決定領域(CDR)をヒト生殖系列フレームワーク配列に移植した。配列を、V-Base(MRC, Center for Protein Engineering, UK)で生殖系列アミノ酸配列と比較した。VH1-03である1個の生殖系列遺伝子を可変重領域として選択した。数個の生殖系列遺伝子を可変軽領域として選択した；VKVI A26、VKI A20、VKVI A14、VKIII L6およびVKI L14。VKVI生殖系列遺伝子ファミリーはマウス配列に最高相同性を示したが、しかしながら、ヒト抗体レパートリー中の表される生殖系列ファミリー下にあったため、高相同性を有する他の生殖系列ファミリーも考慮した。マウスKabat定義CDR領域を、重鎖および軽鎖の両者について、ヒトKabat定義フレームワーク領域に移植した。

【0158】

ヒト化抗IL-17A/F抗体の構築、発現および精製

ヒト化可変領域配列は、GeneART, Inc.(GeneART, Inc. Burlingame, CA, USA)に注文して入手した。ヒト化およびマウス可変領域配列をヒトカッパ定常領域(配列番号10)またはFc 受容体I結合および補体を固定する能力の低下が生じる変異を有している野生型IgG1のエフェクター・マイナス変異体であるIgG1.1(配列番号11)(Gross et al., Immunity, 15:289-302 (2001))と、重複PCR(Horton et al., Gene, 77:61-68 (1989))および/またはpTT5、HEK293-6E一過性発現ベクターにクローニングされた制限酵素を使用して、融合させた(NCR Biotechnology Research Institute, Ottawa, ON, CAN)。全構築物をmod2610(ATGCGCGGAGAGGCTGGTCCTGGATCTTCCTGTTTCTGCTGAGCGGAA CAGCCGGCGTGCTGAGC、配列番号30)シグナル配列を使用して発現させたが、アミノ酸配列MRRRGWSWIFLLSGTAGVLS(配列番号31)をコードする任意の核酸配列を使用し得る。HEK293-6E懸濁細胞に、ポリエチレンイミン試薬を使用して発現構築物を遺伝子導入し、5mM L-グルタミンおよび25 µg/mL G418添加F17培地(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)で培養した。24時間後、20%Tryptone NI(Organotechnie SAS, La Courneuve, FR)の体積の1/40を添加した。トランスフェクション約120時間後、条件培地を回収し、0.2 µmフィルターを通した。タンパク質を、Mab Select SuRe Affinity Chromatography(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)とSUPERDEX(登録商標)Size Exclusion Chromatography(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)の組み合わせを使用して濾過条件培地から精製した。含量をUV-A280nmから概算し、品質を分析的分子ふるい高速液体クロマトグラフィー、SDS PAGEおよびウェスタンブロットにより

評価した。

【 0 1 5 9 】

抗ヒトIL - 17 A / F ヒト化パネルバイオアッセイ活性 ; N I H / 3 T 3 / K Z 1 7 0
N F - B 誘発によるヒトIL - 17 A、IL - 17 A / F およびIL - 17 F 活性を
測定するためのN F - B ルシフェラーゼレポーターアッセイ

マウス線維芽細胞株(N I H / 3 T 3、A T C C (登録商標)#CRL-1658)にK Z 1 7 0 と
命名されたN F - B ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入し、クローンアウト
した(cloned out)。N I H / 3 T 3 / K Z 1 7 0 クローン1細胞を、96 ウェル、白色不
透明、充填底ルシフェラーゼプレート(Corning Incorporated, Corning, NY)中、プレー
ティング培地(D M E M + 3 % F B S、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L - グルタ
ミン(HyClone Laboratories, South Logan, UT))に10,000細胞/ウェルで播種し、
一夜、37℃、5%CO₂でインキュベートした。翌日組み換えヒトIL - 17 A、IL
- 17 A / F またはIL - 17 F (ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Sea
ttle, WA, USA)の連続希釈を、アッセイ培地(D M E M + 0.5 % B S A、1mM ピルビン
酸ナトリウム、2mM L - グルタミン、10mM H E P E S (HyClone Laboratories, Sou
th Logan, UT))で行い、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37℃、5%CO₂で4
時間インキュベートした。さらに、本アッセイを使用して、ヒトIL - 17 A、IL - 17 A /
F およびIL - 17 F 活性の中和を測定した。ヒトIL - 17 A、IL - 17 A /
F またはIL - 17 F の最大半量濃度(EC₅₀、50%有効濃度)を、ここに記載したア
ッセイ培地中の抗ヒトIL - 17 A / F 抗体の連続希釈物と併せ、細胞を入れたプレート
に添加し、一緒に37℃、5%CO₂で4時間インキュベートした。インキュベーション
後、培地を除去し、細胞を溶解し、Berthold Centro XS³ Luminometer(Berthold Technol
ogies, Wildbad, Germany)で、フラッシュ基質(Promega Corporation, Madison, WI)を使
用して、製造業者の指示に従い読んだ。平均蛍光強度の増加(N F - B ルシフェラーゼ
レポーター活性化による)は、ヒトIL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 受容
体 - リガンド相互作用の指標であった。平均蛍光強度の減少は、ヒトIL - 17 A、IL
- 17 A / F、IL - 17 F 受容体 - リガンド相互作用の中和の指標であった。IC₅₀
(50%阻害濃度)値を、各抗ヒトIL - 17 A / F 抗体についてGraphPad Prism 4ソフト
ウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego CA)を使用して計算した。

【 0 1 6 0 】

抗ヒトIL - 17 A / F ヒト化CDR移植およびキメラパネルバイオアッセイ活性 ; N I
H / 3 T 3 / K Z 1 7 0 N F - B ルシフェラーゼレポーターアッセイ結果

IL - 17 A、IL - 17 A / F およびIL - 17 F は、用量依存的方法でN F - B
ルシフェラーゼレポーターの活性化を誘発し、EC₅₀濃度はIL - 17 A に対して0.
15nM、IL - 17 A / F に対して0.50nMおよびIL - 17 F に対して0.50nMと決
定された。表1および2は、ここに記載する抗IL - 17 A / F 抗体のIC₅₀データ例
を示す。

【表 1】

表 1

名称	VH MVC#配列 番号	VL MVC#配列 番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM
キメラ339.15	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	Ms VL VR371M VC824配列番号 34	11	0.30	0.26
339-07	VR370e3 VH1-0 3MVC840配列番 号36	Ms VLMVC824 配列番号34	>600	31	5.5
339-08	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	VR371e3 VKVI A26MVC841配 列番号38	1.5	0.96	0.81
339-02	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	VR371e2 VKI A 20MVC717配列 番号40	1.1	0.80	0.79
339-01	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	VR371e1 VKVI A14MVC716配 列番号42	9.6	0.26	0.20
339-09	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	VR371e4 VKIII L6MVC842配列 番号44	7.2	0.20	0.21
339-32	Ms VH VR370M VC823配列番号 32	VR371e10 VKI L14MVC856配 列番号46	7.0	1.5	0.35
339-33	VR370e3 VH1-0 3MVC840配列番 号36	VR371e3 VKVI A26MVC841配 列番号38	>600	9.7	1.7
339-126	VR370e3 VH1-0 3MVC840配列番 号36	VR371e2 VKI A 20MVC717配列 番号40	>600	24	1.6

10

20

30

【 0 1 6 1 】

フレームワークを移植した抗ヒトIL-17A/Fヒト化CDRの復帰変異パネルの
 バイオアッセイ活性表：NIH/3T3/KZ170 NF-Bルシフェラーゼレポ
 ーターアッセイ結果

【表 2】

表 2

名称	VH MVC#配列 番号	VL MVC#配列 番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM
339-35	VR370e4 NKSH MVC850配列番 号48	VR371e3 VKVI A26MVC841配列 番号38	>600	2.4	0.64
339-71	VR370e41 KALV MVC869配列番 号50	VR371e3 VKVI A26MVC841配列 番号38	16	0.37	0.20
339-37	VR370e6 SFMVC 852配列番号52	VR371e3 VKVI A26MVC841配列 番号38	>600	20	3.5
339-38	VR370e7NKSH K ALVMVC853配列 番号54	VR371e3 VKVI A26MVC841配列 番号38	8.2	0.27	0.27
339-39	VR370e8NKSH K ALV SFMVC854 配列番号56	VR371e3 VKVI A26MVC841配列 番号38	7.6	0.23	0.25
339-127	VR370e4 NKSH MVC850配列番 号48	VR371e2 VKI A2 0MVC717配列番 号40	190	3.4	0.50
339-128	VR370e41 KALV MVC869配列番 号50	VR371e2 VKI A2 0 MVC717配列 番号40	5.1	0.41	0.25
339-105	VR370e6 SFMVC 852配列番号52	VR371e2 VKI A2 0MVC717配列番 号40	>600	23	2.6
339-125	VR370e7NKSH K ALVMVC853配列 番号54	VR371e2 VKI A2 0 MVC717配列 番号40	1.5	0.81	0.83
339-104	VR370e8NKSH K ALV SFMVC854 配列番号56	VR371e2 VKI A2 0 MVC717配列 番号40	1.5	0.83	0.83
339-134	VR370e96NK KA LVMVC978配列 番号58	VR371e2 VKI A2 0 MVC717配列 番号40	1.4	0.26	0.24

【 0 1 6 2 】

抗ヒトIL-17A/Fヒト化パネルBiacore活性；表面プラズモン共鳴(Biacore)を介するヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fに対する結合親和性測定

ヒト化抗ヒトIL-17A/Fモノクローナル抗体を、表面プラズモン共鳴を使用してヒトIL-17A、ヒトIL-17A/FおよびヒトIL-17Fに対するそれらの結合親和性を評価した。

【 0 1 6 3 】

運動速度定数および平衡解離定数を、表面プラズモン共鳴を介してヒト化抗ヒトIL-17A/F抗体とヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fの相互作用について測定した。会合速度定数(k_a ($M^{-1} s^{-1}$))は、抗原-抗体複合体形成の速度を

10

20

30

40

50

反映する値である。解離速度定数(k_d (s^{-1}))はこの複合体の安定製を反映する値である。解離速度定数を会合速度定数で割ることにより(k_d / k_a)平衡解離定数(K_D (M))が得られる。この値は相互作用の結合親和性を表す。類似の K_D を有する抗体は広範に異なる会合および解離速度定数を有し得る。結果として、抗体の k_a および k_d 両者の測定は、抗体 - 抗原相互作用の親和性をより一意的に表す助けとなる。

【0164】

結合動態および親和性試験をBIAcore(登録商標)T100システム(GE Healthcare, Piscataway, NJ)で行った。BIAcore(登録商標)T100の方法は、BIAcore(登録商標)T100 Control Software, v 2.0を使用してプログラム化した。これらの実験のために、ヒト化抗ヒトIL-17A/F抗体をヤギ抗ヒトIgG Fc - ガンマ抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)またはヤギ抗マウスIgG Fc - ガンマ抗体(Jackson ImmunoResearch)を介してCM4センサーチップ上に捕捉した。IL-17分子での結合実験を、10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20(GE Healthcare)、1mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.4の緩衝液中、25℃で行った。

【0165】

捕捉抗体であるヤギ抗ヒトIgG Fc - ガンマを、10mM 酢酸ナトリウムpH 5.0で20μg/mL濃度まで希釈し、アミンカップリング化学(EDC:NHS)を使用して、CM4センサーチップの全4個のフローセルに共有結合により固定化した。抗体固定後、フローセル上の残った活性部位を1Mエタノールアミンでブロックした。約5000RUの捕捉抗体密度を得た。ヒト化抗ヒトIL-17A/F抗体を、60~150RUの範囲の密度でCM4チップのフローセル2、3または4に捕捉した。固定化表面への試験抗体の捕捉を10μL/分の流速で行った。BIAcore(登録商標)装置は、センサーチップ表面上に結合したタンパク質質量を測定し、それゆえに、試験抗体の補足を各サイクルで確認した。ヒトIL-17A、IL-17A/FまたはIL-17Fの連続希釈(ZymoGenetics, A Bristol-Myers, Squibb Company, Seattle, WA, USA)を、100nM~0.032nM(1:5連続希釈)で調製した。連続希釈物を表面の上に注入し、センサーチップに捕捉された試験抗体に特異的に結合させた。各抗原濃度の2回の注入を7分の会合時間および15分の解離時間で行った。動態学的結合試験を50μL/分の流速で行った。サイクルの間に、フローセルを20mM 塩酸で洗浄して、表面を再生させた。この洗浄工程により、捕捉試験抗体および結合抗原を固定化抗体表面から除去した。試験抗体は、その後次サイクルで再び捕捉された。

【0166】

データをBIAcore(登録商標)T100 Evaluationソフトウェア(version 2.0)を使用してコンパイルした。データを、対照フローセルおよびブランク注入を減算することにより処理した。ベースライン安定性を評価して、再生工程が一連の注入の間中一定の結合表面を提供することを確認した。二個の注入曲線を再現性のために確認した。二価IL-17分子の二価抗体への結合に基づき、二価検体結合相互作用モデルは、IL-17分子との相互作用に適すると決定された。二価検体モデルは以前West, A.P. et al., Biochemistry, 39:9698-9708 (2000);およびWest, A.P. et al., J. Mol. Biol., 313:385-397 (2001)により記載されている。二価検体モデル下の親和性定数(K_{D1})を、表面プラズモン共鳴により決定した速度定数の比(k_{d1} / k_{a1})から計算し得る。対照を減算した曲線を、複数Rmaxと1に設定したRIを用いる適当な結合モデルに包括的に適合させた。データは、この結合モデルによく適合し、実験結合曲線と理論的結合曲線は良好に一致した。適合に関連するカイ²および標準誤差は低かった。残余に傾向はなかった。

【0167】

抗ヒトIL-17A/Fヒト化パネルBiacore活性

ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fとの結合実験の結果を、それぞれ表3、4および5に示す。

IL-17Aに対する抗ヒトIL-17A/Fヒト化抗体結合親和性 $f o r$

【表 3】

表 3

名称	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
マウス 339.15	4.E+06	7.E-03	2.E-09
339-02 配列番号32 配列番号40	2.E+06	6.E-03	3.E-09
キメラ 339.15 配列番号32 配列番号34	3.E+06	1.E-02	4.E-09
339-38 配列番号54 配列番号38	4.E+06	5.E-03	1.E-9
339-125 配列番号54 配列番号40	2.E+06	3.E-03	1.E-9
339-134 配列番号58 配列番号40	2.E+06	3.E-03	1.E-9

10

20

【 0 1 6 8 】

I L - 1 7 A / F に対する抗 I L - 1 7 A / F ヒト化抗体結合親和性

【表 4】

表 4

名称	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
マウス 339.15	1.E+06	2.E-04	2.E-10
339-02 配列番号32 配列番号40	測定せず		
キメラ 339.15 配列番号32 配列番号33	測定せず		
339-38 配列番号54 配列番号40	1.E+06	4.E-04	4.E-10
339-125 配列番号54 配列番号40	2.E+06	6.E-04	3.E-10
339-134 配列番号58 配列番号40	2.E+06	5.E-04	2.E-10

10

20

【 0 1 6 9 】

I L - 1 7 F に対する抗 I L - 1 7 A / F ヒト化抗体結合親和性

【表 5】

表 5

名称	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
マウス 339.15	2.E+06	1.E-04	5.E-11
339-02 配列番号32 配列番号40	1.E+06	5.E-04	4E-10
キメラ 339.15 配列番号32 配列番号34	1.E+06	5.E-04	4E-10
339-38 配列番号54 配列番号40	2.E+06	6.E-04	3.E-10
339-125 配列番号54 配列番号40	2.E+06	2.E-04	1.E-10
339-134 配列番号58 配列番号40	2.E+06	2.E-04	1.E-10

10

20

【 0 1 7 0 】

実施例 2

7 B 7 抗体選択およびハイブリドーマ産生

図 1 1 に示す結合および遮断特性に基づき、抗体をグループ分けするための表面プラズモン共鳴テクノロジー(Biacoreを使用)によるエピトープピニング法。

30

抗体を、

1. IL - 2 3 の p 1 9 サブドメインにのみ特異的に結合する；
2. IL - 2 3 受容体(IL - 2 3 R)のみを特異的にブロックし、IL - 1 2 受容体(IL - 1 2 R)をブロックしない；および
3. IL - 2 3 の p 4 0 サブドメインと特異的に結合する何らかの抗体と競合しない能力に基づきグループ分けおよび選択した。

【 0 1 7 1 】

IL - 2 3 の p 1 9 または p 4 0 サブドメインおよび IL - 2 3 R または IL - 1 2 R に選択性を有することが予め知られた抗体のような物質を、BIACORE(登録商標)CM5チップ上にコートするために選択した。コーティング密度は、500 ~ 8000 共鳴単位(RU)で変化した。ピニングすべき抗体を、96 ウェル ELISA プレート中 10 ~ 100 $\mu g/mL$ の範囲の出発濃度から 8 濃度まで連続的にタイトレーションした(1 : 2 または 1 : 3)。ウェルの各々に、10 nM の IL - 2 3 抗原を添加した。プレート上の抗体を抗原と複合体を形成させ、一夜、4 で平衡に到達させた。複合体を、2 分間、20 μL / 分の流速で CM5 チップ上に注入した。2 分間の最後の結合共鳴単位(RU)としてのシグナルを記録した。抗体 - 抗原複合体は、チップ上にコートと競合できたかまたは競合しなかった。複合体中の抗体と抗原がチップ上の物質と競合できたならば、抗体濃度を挙げると、結合 RU は減少し、競合しないならば、結合 RU は増加した。この観察に基づき、全抗 IL 2 3 抗体を、その結合選択性および競合能に従いピニングした。

40

50

【 0 1 7 2 】

Milpitas, CAのMedarex coloniesからのトランスジェニックHCo12 J/K HUMAB(登録商標)マウスを、RIBIアジュバント中組み換えヒトIL-23-hisで免疫化した。

免疫化マウスからの血清を、修飾間接的デュアルELISAによりIL-23特異的抗体の発現について試験した。簡単にいうと、マイクロタイタープレート(COSTAR(登録商標)、96ウェル平底、#9018)をPBS中2.5 µg/mlのマウス抗hisタンパク質で、50 µl/ウェルでコートし、4 で一夜インキュベートし、1%BSAのPBS溶液でブロックした。2.5 µg/mlのHuIL-23またはHuIL-12を、50 µl/ウェルでの捕捉のためにプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tweenで洗浄し、血清希釈物を添加し、1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tweenで洗浄し、HRPと結合したヤギ抗ヒトガンマ重鎖(Jackson ImmunoResearch Cat. 109-036-098)と1時間インキュベートした。3回洗浄後、プレートをABTS(Moss, CAT #ABTS-1000)基質で展開し、415nmでODを分析した。データを分析し、背景の少なくとも2倍の抗原正シグナルを生じる血清の最高希釈として定義される血清力価として表した。マウス215094を、コホート中の他のマウスと比較してIL-23に対する高い力価と低いIL-12との交差反応性に基づき、ハイブリドーマ産生のために選択した(表6参照)。

【表6】

表6. 血清力価

マウスID	遺伝子型	Hu IL23-his	Hu IL12-his
215088	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215090	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215092	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215094	HCo12:01[J/K]	>109, 350	12, 150
215096	HCo12:01[J/K]	>109, 350	36, 450
215098	HCo12:01[J/K]	36, 450	1, 350
215089	HCo12:01[J/K]	>109, 350	1, 350
215091	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215093	HCo12:01[J/K]	>109, 350	4,050
215095	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215097	HCo12:01[J/K]	>109, 350	>109, 350
215099	HCo12:01[J/K]	12150	12, 150

【 0 1 7 3 】

マウス215094の遺伝子型を下記表7に示す。

【表7】

表7. マウス215094 遺伝子型

マウスID	性別	生年月日	遺伝子型
215094	M	10/11/2009	HCo12(15087) ⁺ ;JHD ⁺⁺ ;JKD ⁺⁺ ;KCo5(9272) ⁺ ;

【 0 1 7 4 】

マウス215094からの脾臓を、融合2378と名づけた方法におけるCytoPulse大チャンパー細胞融合エレクトロポレーションデバイスを使用した電場に基づく電気融合によりマウス骨髓腫細胞(ATCC CRL-1580)とのハイブリドーマ産生に使用した。

【 0 1 7 5 】

得られたハイブリドーマからの条件培地を最初に標準的自動化アッセイでヒトIgG

/ 発現についてスクリーニングし、続いて先に記載したとおり特異的クローンを同定するためにカウンスクリーン E L I S A で I L - 2 3 結合について E L I S A を行った。試験についてのハイブリドーマ選択基準は、h u I L 2 3 プレートについては 1.5 を超える O D および h u I L 1 2 について 0.15 未満の O D のサンプルであった。

【0176】

融合 2 3 7 8 により計 8 2 7 のヒト I g G 陽性ハイブリドーマが産生され、そのうち 1 2 8 が I L - 2 3 特異的であった。ハイブリドーマ 7 B 7 を、抗 p 1 9 および抗 p 4 0 陽性対照抗体と比較したとき、I L - 2 3 に対する強い結合および I L - 1 2 に対する交差反応性の欠如に基づいてさらに試験し、E L I S A により選択した 7 B 7 を含むハイブリドーマの例を図 7 に示す。サブクローン 7 B 7 . D 4 のアイソタイプは、E L I S A によりヒト I g G 1、カッパと確認された。

10

【0177】

全 I L - 2 3 p - 1 9 特異的 M A b からのハイブリドーマ条件培地を、細胞アッセイで I L - 2 3 中和活性についてスクリーニングした。T 細胞慢性リンパ性白血病患者から確立されたヒト T 細胞株である K i t 2 2 5 は、用量依存的 S T A T 3 リン酸化 (p S T A T 3) で I L - 2 3 に応答することが示されている。ハイブリドーマ条件培地または対照中和抗 p 1 9 抗体添加または非添加での E C ₅₀ のヒト I L - 2 3 を、細胞刺激のために 1 5 分使用した。細胞を溶解し、I L - 2 3 依存性 S T A T 3 リン酸化阻害を E L I S A により決定し (Cell Signaling Technology, PATHSCAN (登録商標) Cat #7300)、ここで、O . D . 減少は p S T A T 3 レベル減少の指標である。ハイブリドーマ 7 B 7 をサブクローニングのために選択し、さらに K i t 2 2 5 アッセイで観察され、図 8 に示す I L - 2 3 シグナル伝達の強力な中和に基づき特徴づけした。

20

【0178】

上記のものに準じたアッセイを使用して、I L - 2 3 の選択的結合および I L - 2 3 シグナル伝達の中和が 7 B 7 サブクローン 1 4 1 3 . 2 3 7 8 . 7 B 7 . D 4 . H 2 で証明され、これを続けて配列決定に付した (I L - 2 3 p 1 9 7 B 7 重鎖可変ドメインは配列番号 7 に示し、軽鎖可変ドメインは配列番号 9 に示す)。

【0179】

実施例 3

抗ヒト I L - 2 3 / I L - 1 7 A / F 二重特異性抗体の産生

30

哺乳動物抗ヒト I L - 2 3 / I L - 1 7 A / F 二重特異性分子の構築および発現

部分的または全遺伝子を GeneART, Inc. (GeneART, Inc. Burlingame, CA, USA) または GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, USA) で合成し、p T T 5、H E K 2 9 3 - 6 E ー 過性発現ベクター (NCR Biotechnology Research Institute, Ottawa, ON, Canada) に制限酵素クローニングを介して導入した。M V C 1 0 5 9 (配列番号 6 2) および M V C 1 0 6 1 (配列番号 6 0) は、GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, USA) から完全構築物としてオーダーされた。全構築物を m o d 2 6 1 0 (配列番号 3 0) シグナル配列を使用して発現させた。b i A b F a b L は二重特異性抗体であり、これは、リンカーを介して結合した二重特異性の第二のアームの C 末端 F a b ユニットを有する抗体全体を含み (例えば、1 0 量体 G ₄ S)、共通軽鎖を使用する (図 2 参照)。t a F a b は二重特異性抗体であり、これは、(G l y ₄ S e r ₁)_x (ここで、x は 1、2 または 3 である) および配列番号 1 2 のリンカーのようなリンカーを介して結合した二重特異性の第二のアームの N 末端 F a b ユニットを有する抗体全体を含む。重鎖部分として、(G l y ₄ S e r ₁)_x (ここで、x は 1、2 または 3 である) および配列番号 1 2 のリンカーのようなリンカーを介して結合した二重特異性の各アームについて 2 個の軽鎖が存在する (図 3 参照)。ヘテロ二量体 F c は伝統的抗体に似た二重特異性抗体であるが、しかしながら、C_H3 領域で静電的相補性会合を介して会合した 2 個の異なる重鎖を含む。ヘテロ二量体 F c は共通軽鎖を使用する (図 4 参照)。重鎖および軽鎖定常領域は、I g G 1.1 (配列番号 1 1、これは配列番号 8 2 によりコードされ得る)、C 末端リシンを欠く I g G 1.1 f (配列番号 1 2 7)、C 末端リシンを有する I g G 1.1 f (配列番号 1 2 8)、ヒトカッパ定常領域 (配列番号 1 0

40

50

、これは配列番号 83 によりコードされ得る)または IgG4.1 (配列番号 8)を含む。IgG4 重鎖定常ドメインはヒンジ領域、S228P (EU index numbering system)または S241P (Kabat numbering system)に変異を有する野生型 IgG4 の変異体であり得る。マウス/ヒトキメラ重鎖における 241 位のセリン (Kabat) のプロリン (IgG1 および IgG2 においてその位置に見られる) への変更は均一抗体の産生に至り、不均一性を無くす。さらに、変異体 IgG4 は、元のキメラ IgG4 と比較して、顕著に伸びた血清半減期を有し、組織分布の改善を示す。Angal et al., Molecular Immunology, 30(1):105-108 (1993); Schuurman et al., Molecular Immunology, 38:1-8 (2001); Lewis et al., Molecular Immunology, 46:3488-3494 (2009)。

【0180】

10

エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞 (DH10B) の形質転換を、1 µl の酵母 DNA 調製物および 20 µl の大腸菌細胞を使用して行った。細胞を、2.0 kV、25 µF および 400 オームでエレクトロパルスした。エレクトロポレーション後、600 µl SOC (2% BACTO (登録商標) トリプトン (Difco, Detroit, MI)、0.5% 酵母抽出物 (Difco)、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、20 mM グルコース) を添加し、細胞を、2 個の LB AMP プレート (LB プロス (Lennox)、1.8% BACTO (登録商標) 寒天 (Difco)、100 mg/L アンピシリン) に 50 µl および 50 µl 当量で播種した。

【0181】

20

各構築物からの 5 個のコロニーを配列分析に付した。正確な配列を含む 1 個のクローンを選択した。DNA 配列決定を、ABI PRISM (登録商標) BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して行った。シーケンシング反応物を、Edge BioSystems Preforma Centriflex ゲル濾過カートリッジ (Gaithersburg, MD) を使用して精製し、Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で流した。得られた配列データをまとめ、SEQUENCHER (登録商標) v4.6 ソフトウェア (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI) を使用して編集した。正確な配列を含む 1 個のクローンを選択し、大規模プラスミド DNA を製造業者の指示に従い市販のキット (QIAGEN (登録商標) Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) を使用して単離した。

【0182】

30

HEK293-6E 懸濁細胞にポリエチレンイミン試薬を使用して発現構築物を遺伝子導入し、5 mM L-グルタミンおよび 25 µg/mL G418 添加 F17 培地 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) で培養した。24 時間後、20% Tryptone NI (Organotechnie SAS, La Courneuve, FR) の体積の 1/40 を添加した。トランスフェクション約 120 時間後、条件培地を回収し、0.2 µm フィルターを通した。タンパク質を、Mab Select Sure Affinity Chromatography (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) と SUPERDEX (登録商標) Size Exclusion Chromatography (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) の組み合わせを使用して濾過条件培地から精製した。含量を V-A280 nm から概算し、品質を分析的分子ふるい高速液体クロマトグラフィー、SDS PAGE およびウェスタンブロットにより評価した。

40

【0183】

抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 二重特異性抗体組成物

抗体全体およびそのモジュラー要素を図 1 に記載する。biAbFabL 形態を図 2 に記載する。taFab 形態を図 3 に記載する。ヘテロ二量体 Fc 形態を図 4 に記載する。VCVFc 形態を図 5 に記載する。VCDFc 形態を図 6 に記載する。

【0184】

抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 二重特異性抗体バイオアッセイ活性; NF-B 誘発によるヒト IL-17A、IL-17A / F および IL-17F 活性を測定するための NIH/3T3 / KZ170 NF-B ルシフェラーゼレポーターアッセイ

このアッセイの材料および方法は、上の実施例 1 に記載したとおりである。

50

【0185】

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体バイオアッセイ活性；ホスホ-STAT3誘発によるヒトIL-23活性を測定するためのBaf3/huIL-23R/huIL-12R1トランスフェクタントホスホ-STAT3アッセイ

マウス骨髓由来細胞株(Baf3)にヒトIL-23RおよびヒトIL-12R1を安定的に遺伝子導入し、クローン化した。Baf3/huIL-23R/huIL-12R1クローン6細胞をアッセイ培地(10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム(HyClone Laboratories, South Logan, UT)および2μM -メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))添加RPMI 1640)で3回洗浄し、96ウェル、丸底組織培養プレートに50,000細胞/ウェルで播種した。10

組み換えヒトIL-23(ZymoGenetics, Bristol-Myers Squibb Company, Seattle WA, USA)の連続希釈をアッセイ培地中で調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37、5%CO₂で15分インキュベートした。さらに、本アッセイをまたIL-23活性の中和の測定のためにも使用した。最大半量濃度(EC₅₀、50%有効濃度)のIL-23をここに記載した抗ヒトIL-23/IL-17A/F抗体の連続希釈物と併せ、一緒に37、5%CO₂で15分、アッセイ培地中でインキュベートして、細胞を添加した。プレインキュベーション後、処置物を細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37、5%CO₂で15分インキュベートした。インキュベーション後、細胞を氷冷洗浄緩衝液で洗浄し、氷の上に置いて、製造業者の指示に従い反応を停止させた(BIO-PLEX(登録商標)Cell Lysis Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。細胞を2000rpmで4で20分遠沈させ、培地を廃棄した。50μL/ウェル溶解緩衝液を各ウェルに添加し、ライセートを氷上でピペット中を5回上下させ、プレートシェーカー上で20分、300rpmで4で撹拌した。プレートを3200rpmで、4で20分遠心分離した。上清を回収し、-80での保存のために新規マイクロタイタープレートに移した。20

【0186】

捕捉ビーズ(BIO-PLEX(登録商標)Phospho-STAT3 Assay, Bio-Rad Laboratories)を50μLの1:1希釈ライセートと併せ、製造業者の指示に従い96ウェルフィルタープレートに添加した(BIO-PLEX(登録商標)Phosphoprotein Detection Kit, Bio-Rad Laboratories)。アルミホイルで覆ったプレートを、一夜、室温で300rpmで振盪させながらインキュベートした。プレートをマイクロタイター真空装置に移し、洗浄緩衝液で3回洗浄した。3025μL/ウェル検出抗体添加後、ホイルで覆ったプレートを、室温で30分、300rpmで振盪させながらインキュベートした。プレートを濾過し、洗浄緩衝液で3回洗浄した。ストレプトアビジン-PE(50μL/ウェル)を添加し、ホイルで覆ったプレートを、室温で15分、300rpmで振盪させながらインキュベートした。プレートを濾過し、ビーズ再懸濁緩衝液で3回洗浄した。最後の洗浄後、ビーズをビーズ懸濁緩125μL/ウェルのビーズ懸濁緩衝液に再懸濁し、30秒振盪させ、製造業者の指示に従いアレイリーダーで読んだ(BIO-PLEX(登録商標)100, Bio-Rad Laboratories)。データを分析ソフトウェア(BIO-PLEX(登録商標)Manager 4.1, Bio-Rad Laboratories)を使用して分析した。ライセートに存在するリン酸化STAT3転写因子のレベル増加は、IL-23受容体-リガンド相互作用の指標であった。ライセートに存在するリン酸化STAT3転写因子のレベルの減少は、IL-23受容体-リガンド相互作用の中和の指標であった。IC₅₀(50%阻害濃度)値を、GraphPad Prism 4ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego CA)を使用して各抗ヒトIL-23/IL-17A/F抗体について計算した。30

【0187】

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体バイオアッセイ活性；NIH/3T3/KZ170 NF-BルシフェラーゼレポーターアッセイおよびBaf3/huIL-23R/huIL-12R1トランスフェクタントホスホ-STAT3アッセイ結果

ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fは、用量依存的方法でNF-Bルシフェラーゼレポーターの活性化を誘発し、EC₅₀濃度はIL-17Aに対して50

0.33 nM、IL-17A/Fに対して1 nMおよびIL-17Fに対して1 nMであり、IL-23は、用量依存的方法でSTAT3リン酸化を誘発し、EC₅₀濃度は0.02 nMであると決定された。抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体に対するIC₅₀データを下の表8に示す。

【0188】

抗ヒトIL-23/17A/F二重特異性抗体表

【表8】

表8

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM	IL-23 IC ₅₀ nM
339-134 mAb IgG1.1	MVC978 配列番号64	MVC717 配列番号66	1.3	0.27	0.24	実施せず
IL23.6 (7B7) mAb IgG1.1	MVC1003 配列番号68	MVC1002 配列番号17*	実施せず	実施せず	実施せず	0.014
23/17bAb1 IgG1.1	MVC1006 配列番号28*	MVC1002 配列番号17*	0.064	0.76	0.96	0.015
23/17bAb2 IgG1.1	MVC1007 配列番号18*	MVC1002 配列番号17*	0.052	0.43	0.44	0.041
23/17bAb3 IgG4.1	MVC1036 配列番号74	MVC1002 配列番号17*	0.022	0.20	0.23	0.012
23/17bAb4 IgG4.1	MVC1037 配列番号29*	MVC1002 配列番号17*	0.035	0.18	0.87	0.048
23/17taFab1 IgG1.1	MVC1008 配列番号76	MVC 1009 配列番号78	1.5	3.9	2.3	0.018
23/17 μ 1 IgG1.1	MVC1059 配列番号62 MVC1060 配列番号64	MVC1002 配列番号17*	0.34	0.78	0.33	0.060
23/17 μ 2 IgG1.1	MVC1061 配列番号60 MVC1062 配列番号80	MVC1002 配列番号17*	0.71	2.33	0.96	0.055

* 配列番号17のアミノ酸配列は配列番号70の配列によりコードされ得る；配列番号28のアミノ酸配列は配列番号71の配列によりコードされ得る；配列番号18のアミノ酸配列は配列番号72の配列によりコードされ得る；配列番号29のアミノ酸配列は配列番号75の配列によりコードされ得る。

【0189】

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体バイオアッセイ活性；G-CSF誘発によるヒトIL-17A、IL-17AFおよびIL-17F活性を測定するための初代ヒトSAECアッセイ

初代ヒト小気道上皮細胞(SAEC)を、96ウェル平底組織培養プレート(Corning Incorporated, Corning, NY)中8,000細胞/ウェルで気管支上皮細胞用増殖培地(SAGM)(細胞および培地：Lonza, Walkersville, MD)で播種し、および一夜、37℃、5%CO₂

O₂ でインキュベートした。翌日ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F または IL - 17 F (ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA) の連続希釈を S A G M 培地に調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37 、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。さらに、本アッセイを IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F 活性の中和の測定に使用した。最大半量濃度 (EC₅₀、50 % 有効濃度) の IL - 17 A、IL - 17 A / F または IL - 17 F を、ここに記載した抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体の連続希釈物と S A G M 培地中で併せ、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37 、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後上清を遠沈し、回収し、処理の準備ができるまで - 80 で凍結した。上清中のヒト G - C S F タンパク質レベルを、市販のビーズ利用ヒト G - C S F サイトカイン E L I S A を製造業者の指示に基づき使用して測定した (Procarta/Affymetrix, Santa Clara, CA)。上清中のヒト G - C S F レベル上昇はヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 受容体 - リガンド相互作用の指標であった。上清中のヒト G - C S F レベル減少はヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 受容体 - リガンド相互作用中和の指標であった。IC₅₀ (50 % 阻害濃度) 値を、GraphPad Prism 4 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego CA) を使用して各抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体について計算した。

【0190】

抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体 バイオアッセイ 活性 ; 初代ヒト S A E C アッセイ 結果

ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F は用量依存的方法でヒト G - C S F 産生を誘発し、EC₅₀ 濃度は IL - 17 A について 0.03 nM、IL - 17 A / F について 3 nM および IL - 17 F について 3 nM と決定された。試験した二重特異性抗体は、23 / 17 b A b 1 (配列番号 28 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 2 (配列番号 18 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 3 (配列番号 74 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 4 (配列番号 29 および配列番号 17) を含む。ヒト化抗ヒト IL - 17 A / F 抗体 339 - 134 m A b (配列番号 65 および配列番号 67) も試験した。抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体の IC₅₀ データを下を表 9 に示す。このデータは、抗 IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体が、ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 介在 IL - 6 産生を阻害し、同等に強力であったことを示す。

【0191】

抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体 バイオアッセイ 活性 ; IL - 6 誘発によるヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F 活性を測定するための初代ヒト線維芽細胞アッセイ

初代ヒト線維芽細胞株 (H F F F 2、Cat #86031405, Health Protection Agency Culture Collections, Porton Down Salisbury, UK) を、96 ウェル平底プレート (Corning Incorporated, Corning, NY) 中、アッセイ培地 (10 % F B S および 2 mM L - グルタミン (HyClone Laboratories, South Logan, UT) 添加 D M E M) 中 5,000 細胞 / ウェルで播種し、一夜、37 、5 % CO₂ でインキュベートした。翌日組み換えヒト IL - 17 A、IL - 17 A F または IL - 17 F (ZymoGenetics, Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA 98117) の連続希釈をアッセイ培地中で調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37 、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。さらに、本アッセイを使用して、ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F 活性の中和を測定した。ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F または IL - 17 F の最大半量濃度 (EC₅₀、50 % 有効濃度) を、アッセイ培地中でここに記載した抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 抗体の連続希釈物と併せ、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37 、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後上清を遠沈し、回収し、処理可能となるまで - 80 で凍結した。上清中のヒト IL - 6 タンパク質レベルを、市販のビーズ利用ヒト IL - 6 サイトカイン E L I S A を、製造業者の指示に従い使用して測定した

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。上清中のヒト IL - 6 レベル増加はヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 受容体 - リガンド相互作用の指標であった。上清中のヒト IL - 6 レベル減少は、ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 受容体 - リガンド相互作用中和の指標であった。IC₅₀ (50% 阻害濃度) 値を、GraphPad Prism 4 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego CA) を使用して各抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体について計算した。

【0192】

抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体 バイオアッセイ 活性；初代ヒト線維芽細胞アッセイ結果

ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F はヒト IL - 6 産生を用量依存的な方法で誘発し、EC₅₀ 濃度は、IL - 17 A について 0.08 nM、IL - 17 A / F について 2.5 nM および IL - 17 F について 2.5 nM と決定された。試験した二重特異性抗体は 23 / 17 b A b 1 (配列番号 28 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 2 (配列番号 18 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 3 (配列番号 74 および配列番号 17)、23 / 17 b A b 4 (配列番号 29 および配列番号 17) を含む。ヒト化抗ヒト IL - 17 A / F 抗体 339 - 134 m A b (配列番号 64 および配列番号 66) も試験した。抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体の IC₅₀ データを下の表 9 に示す。これらのデータは、抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体がヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F、IL - 17 F 介在 IL - 6 産生を阻害し、同等に強力であったことを示す。

【0193】

抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体 バイオアッセイ 活性；マウス IL - 17 A および IL - 17 F 誘発によるヒト IL - 23 活性を測定するためのマウス脾細胞アッセイ

マウス脾細胞の単一細胞懸濁液を、BALB / c マウスから回収した脾臓全体から調製した。赤血球を ACK 緩衝液 (0.010 M K H C O₃、0.0001 M E D T A、0.150 M N H₄ C l、p H 7.2) で溶解後、脾細胞を洗浄し、アッセイ培地 (10% F B S、非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM L - グルタミン、10 mM H E P E S、100 ユニット / mL P e n / S t r e p (HyClone Laboratories, South Logan, UT)、50 μM 2 - メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 50 ng / ml ヒト IL - 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 添加 R P M I 1640) に再懸濁した。脾細胞を、96 ウェル丸底プレートに 500,000 細胞 / ウェルで播種した。組み換えヒト IL - 23 (BDC 50220AN087 ヘテロ二量体材料) の連続希釈をアッセイ培地中で調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37、5% C O₂ で 24 時間インキュベートした。さらに、本アッセイを、ヒト IL - 23 活性の中和の測定にも使用した。ヒト IL - 23 の最大半量濃度 (EC₅₀、50% 有効濃度) を、ここに記載した抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体の連続希釈物と併せ、一緒に 37、5% C O₂ で 15 分、アッセイ培地中でインキュベートして、細胞を添加した。プレインキュベーション後、処置物を細胞を入れたプレートに添加し、一緒に 37、5% C O₂ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後上清を遠沈し、回収し、処理可能となるまで - 80 で凍結した。上清中のマウス IL - 17 A および IL - 17 F のタンパク質レベルを、市販のプレート式マウス IL - 17 A および IL - 17 F E L I S A を製造業者の指示に従い使用して測定した (eBiosciences, San Diego, CA)。上清中のマウス IL - 17 A および IL - 17 F レベル増加は IL - 23 受容体 - リガンド相互作用の指標であった。上清中のマウス IL - 17 A および IL - 17 F レベル減少は IL - 23 受容体 - リガンド相互作用中和の指標であった。IC₅₀ (50% 阻害濃度) 値を、GraphPad Prism 4 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., San Diego CA) を使用して各抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体について計算した。

【0194】

抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体 バイオアッセイ 活性；マウス脾細胞

アッセイ結果

ヒトIL-23はマウスIL-17AおよびIL-17Fを用量依存的方法で誘発し、 EC_{50} 濃度は0.01nMであると決定された。試験した二重特異性抗体は23/17bAb1(配列番号28および配列番号17)、23/17bAb2(配列番号18および配列番号17)、23/17bAb3(配列番号74および配列番号17)、23/17bAb4(配列番号29および配列番号17)を含む。抗ヒトIL-23.6(7B7)mAb(配列番号68および配列番号17)も試験した。抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体の IC_{50} データを下の表9に示す。このデータは抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体がIL-23誘発マウスIL-17AおよびIL-17F産生を阻害することを示す。

10

【0195】

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体バイオアッセイ活性；ホスホ-STAT3誘発によるヒトIL-23活性測定のための初代ヒトT細胞ホスホ-STAT3アッセイ

白血球フェレーシスPBMC：正常ヒトドナー(ZymoGeneticsの正常ドナープール)を無作為に選択し、FHCRC(Seattle, WA)で自発的に血液浄化した。白血球フェレーシスPBMCはZymoGeneticsに無菌採血バッグで輸送された。細胞を無菌500mLプラスチック製ビンに注加し、1mMEDTA(HyClone Laboratories, South Logan, UT)添加室温PBSで400mLに希釈し、250mL円錐管に移した。250mLチューブを1500rpmで10分遠心分離して、細胞をペレット化した。細胞上清を除去し、廃棄した。細胞ペレットを併せ、1mMEDTA添加400mLPBSに添加した。細胞懸濁液(25mL/チューブ)を50mL円錐管中のFICOLL(登録商標)(20mL/チューブ)に重層した(計16本のチューブ)。チューブを2000rpmで20分、室温で遠心分離した。白血球および残存血小板を含む界面層(“バフィーコート”)を回収し、貯留し、1mMEDTA含有PBSで血小板の大多数が除去されるまで反復洗浄した。白血球を100mLの氷凍結保存培地(70%RPMI 1640、20%FCS、10%DMSO(HyClone Laboratories))に懸濁し、無菌クライオバイアル(1mL細胞/バイアル)に分注した。クライオバイアルを-80℃冷凍庫に24時間入れ、液体窒素冷凍庫に移した。典型的アフエレーシスにより生じる白血球は $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞である。この方法で処理されたアフエレーシス細胞はT細胞、B細胞、NK細胞、単球および樹状細胞を含む。

20

30

【0196】

活性化T細胞の調製：T細胞は、IL-12受容体を発現するために活性化し、IL-12およびIL-23に応答可能でなければならない。凍結保存白血球フェレーシスPBMCを融解し、無菌50mL円錐管に移し、50mLの温アッセイ培地(10%FBS(HyClone Laboratories)含有RPMI 1640)で洗浄し、37℃水浴で1時間インキュベートして、細胞を回復させた。細胞を遠心分離し、細胞上清を廃棄した。細胞ペレットをアッセイ培地に再懸濁し、無菌162cm²組織培養フラスコに5μg/mL PHA-M(Roche, Basel, Switzerland)を含む90mLアッセイ培地中、 2×10^7 細胞/フラスコで分配した。細胞を、計5日間、37℃の加湿インキュベーター中で培養した。細胞を4日目の午後の採取まで“休息”させ、培養培地をPHA無しの新鮮アッセイ培地に置き換え、5日間の培養期間の残りのためにインキュベーターに戻した。

40

【0197】

ホスホ-STAT3アッセイ：活性化ヒトT細胞を培養5日目に採取し、新鮮アッセイ培地に再懸濁し、 2×10^5 細胞/ウェルでU底96ウェルプレートに播種した。組み換えヒトIL-23(BDC 50220AN087ヘテロ二量体材料)の連続希釈をアッセイ培地中で調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37℃、5%CO₂で15分インキュベートした。さらに、本アッセイをまたIL-23活性の中和の測定のためにも使用した。最大半量濃度(EC_{50} 、50%有効濃度)のIL-23をここに記載する抗ヒトIL-23/IL-17AF抗体と併せ、一緒に37℃、5%CO₂で15分、アッセイ培地中でインキュベートして、細胞を添加した。ブレインキュベーション後、処置物を細胞を入れたプレ

50

ートに添加し、一緒に 37℃、5% CO₂ で 15 分インキュベートした。インキュベーション後、細胞を氷洗浄緩衝液で洗浄し、氷の上に置いて、製造業者の指示に従い反応を停止させた(BIO-PLEX(登録商標)Cell Lysis Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。細胞を 2000 rpm で 4℃ で 5 分遠沈させ、培地を廃棄した。50 µL/ウェル溶解緩衝液を各ウェルに添加し、ライセートを氷上でピペット中を 5 回上下させ、プレートシェーカー上で 20 分、300 rpm で 4℃ で攪拌した。プレートを 3200 rpm で、4℃ で 20 分遠心分離した。上清を回収し、-80℃での保存のために新規マイクロタイタープレートに移した。

【0198】

捕捉ビーズ(BIO-PLEX(登録商標)Phospho-STAT3 Assay, Bio-Rad Laboratories)を 50 µL の 1:1 希釈ライセートと併せ、製造業者の指示に従い 96 ウェルフィルタープレートに添加した(BIO-PLEX(登録商標)Phosphoprotein Detection Kit, Bio-Rad Laboratories)。アルミホイルで覆ったプレートを、一夜、室温で 300 rpm で振盪させながらインキュベートした。プレートをマイクロタイター真空装置に移し、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。25 µL/ウェル検出抗体添加後、ホイルで覆ったプレートを、室温で 30 分、300 rpm で振盪させながらインキュベートした。プレートを濾過し、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。ストレプトアビジン - PE (50 µL/ウェル)を添加し、ホイルで覆ったプレートを、室温で 15 分、300 rpm で振盪させながらインキュベートした。プレートを濾過し、ビーズ再懸濁緩衝液で 3 回洗浄した。最後の洗浄後、ビーズをビーズ懸濁緩 125 µL/ウェルに再懸濁し、30 秒振盪させ、製造業者の指示に従いアレイリーダーで読んだ(BIO-PLEX(登録商標)100, Bio-Rad Laboratories)。データを分析ソフトウェア(BIO-PLEX(登録商標)Manager 4.1, Bio-Rad Laboratories)を使用して分析した。ライセートに存在するリン酸化 STAT3 転写因子のレベル増加は、IL-23 受容体 - リガンド相互作用の指標であった。ライセートに存在するリン酸化 STAT3 転写因子のレベルの減少は、IL-23 受容体 - リガンド相互作用の中和の指標であった。IC₅₀ (50% 阻害濃度)値を、GraphPad Prism 4 ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego CA)を使用して各抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 二重特異性抗体について計算した。

【0199】

抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 二重特異性抗体バイオアッセイ活性；初代ヒト T 細胞ホスホ - STAT3 アッセイ結果

ヒト IL-23 用量依存的方法で STAT3 リン酸化を誘発し、EC₅₀ 濃度は 0.02 nM であると決定された。試験した二重特異性抗体は 23 / 17 bAb1 (配列番号 28 および配列番号 17)、23 / 17 bAb2 (配列番号 18 および配列番号 17)、23 / 17 bAb3 (配列番号 74 および配列番号 17)、23 / 17 bAb4 (配列番号 29 および配列番号 17)を含む。抗ヒト IL-23.6 (7B7) mAb (配列番号 68 および配列番号 17)も試験した。抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 抗体の IC₅₀ データを下の表 9 に示す。

【0200】

抗ヒト IL-23 / IL-17A / F 二重特異性抗体バイオアッセイ活性；初代ヒト SEAEC アッセイ、初代ヒト線維芽細胞アッセイ、マウス脾細胞アッセイおよび初代ヒト T 細胞ホスホ - STAT3 アッセイ結果

【表 9】

表 9

プロフィール		23/17bAb1 IgG1.1 配列番号28 配列番号17	23/17bAb2 IgG1.1 配列番号18 配列番号17	23/17bAb3 IgG4.1 配列番号74 配列番号17	23/17bAb4 IgG4.1 配列番号29 配列番号17	339-134 mAbIgG1.1 配列番号64 配列番号66	IL23.6(7B7) mAbIgG1.1 配列番号68 配列番号17
細胞性潜在力 ヒト初代 上皮細胞 (SAEC) IC ₅₀	IL-17A EC ₅₀ = 0.03 nM	< 0.5 pM	< 0.5 pM	< 0.5 pM	≤ 0.5 pM	0.5 nM	実施せず
	IL-17AF EC ₅₀ = 3 nM	1.4 nM	1.3 nM	0.5 nM	1.4 nM	1.3 nM	実施せず
	IL-17F EC ₅₀ = 3 nM	0.8 nM	1.6 nM	1.0 nM	1.3 nM	1.1 nM	実施せず
細胞性潜在力 ヒト初代 線維芽細胞 (HFFF) IC ₅₀	IL-17A EC ₅₀ = 0.08 nM	0.07 nM	0.07 nM	0.03 nM	0.1 nM	0.9 nM	実施せず
	IL-17AF EC ₅₀ = 25 nM	17 nM	12 nM	9.4 nM	9.1 nM	13 nM	実施せず
	IL-17F EC ₅₀ = 25 nM	19 nM	15 nM	10 nM	12 nM	15 nM	実施せず
細胞性潜在力 マウス脾細胞 アッセイIC ₅₀	IL-23 EC ₅₀ = 0.01 nM	0.1 nM	0.06 nM	0.1 nM	0.08 nM	実施せず	0.09 nM
細胞性潜在力 初代T細胞 アッセイIC ₅₀	IL-23 EC ₅₀ = 0.02 nM	0.04 nM	0.05nM	0.04 nM	0.1 nM	実施せず	0.04 nM

【 0 2 0 1 】

抗ヒトIL-23 / IL-17A / F二重特異性抗体共結合活性；ヒトIL-17A、IL-17A / FまたはIL-17Fの阻害と同時のヒトIL-23への結合を測定するための、初代ヒト線維芽細胞アッセイ。ヒトIL-23の阻害と同時のヒトIL-17A、IL-17A / FまたはIL-17Fへの結合を測定するための初代ヒトT細胞ホスホ-STAT3アッセイ。

【 0 2 0 2 】

初代ヒト線維芽細胞アッセイを、過剰量のIL-23の30nM存在下で行った。初代ヒトT細胞ホスホ-STAT3アッセイを過剰量のIL-17A、IL-17A / F、IL-17Fの30nM存在下で行った。

【 0 2 0 3 】

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体バイオアッセイ共結合結果

試験した二重特異性抗体は23/17bAb1(配列番号28および配列番号17)、23/17bAb2(配列番号18および配列番号17)、23/17bAb3(配列番号74および配列番号17)、23/17bAb4(配列番号29および配列番号17)を含むおよび23/17tAFab1(配列番号76および配列番号78)。抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体は、ヒトIL-23存在下で試験したとき、ヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17F阻害を妨害しなかった。抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体は、ヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17F存在下で試験したとき、ヒトIL-23阻害を妨害しなかった。

【0204】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体のヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17FおよびヒトIL-23への結合親和性の測定

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体を、表面プラズモン共鳴を使用して、ヒトIL-17A、ヒトIL-17A/F、ヒトIL-17FおよびヒトIL-23に対する結合親和性を評価した。

【0205】

運動速度定数および平衡解離定数を、表面プラズモン共鳴を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体とヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17FおよびヒトIL-23の相互作用について測定した。会合速度定数(k_a ($M^{-1} s^{-1}$))は、抗原-抗体複合体形成の速度を反映する値である。解離速度定数(k_d (s^{-1}))はこの複合体の安定度を反映する値である。解離速度定数を会合速度定数で割ることにより(k_d/k_a)平衡解離定数(K_D (M))が得られる。この値は相互作用の結合親和性を表す。類似の K_D を有する抗体は広範に異なる会合および解離速度定数を有し得る。結果として、抗体の k_a および k_d 両者の測定は、抗体-抗原相互作用の親和性をより一意的に表す助けとなる。

【0206】

結合動態および親和性試験をBIAcore(登録商標)T100システム(GE Healthcare, Piscataway, NJ)で行った。BIAcore(登録商標)T100の方法は、BIAcore(登録商標)T100 Control Software, v 2.0を使用してプログラム化した。これらの実験のために、モノクローナルおよび二重特異性抗体を、ヤギ抗ヒトIgG Fc-ガンマ抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を介してCM4センサーチップに捕捉した。ヒトIL-17分子との結合実験を、10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20(GE Healthcare)、1mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.4の緩衝液中、25℃で実施した。IL-23/IL-12Bヘテロ二量体との結合実験を、10mM HEPES、500mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20(Biacore)、1mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.4緩衝液中、25℃で実施した。

【0207】

捕捉抗体、ヤギ抗ヒトIgG Fc-ガンマを、10mM 酢酸ナトリウムpH 5.0で20μg/mL濃度まで希釈し、アミンカップリング化学(EDC:NHS)を使用して、CM4センサーチップの全4個のフローセルに共有結合により固定化した。抗体固定後、フローセル上の残った活性部位を1Mエタノールアミンでブロックした。約5000RUの捕捉抗体密度を得た。抗ヒトIL-23/IL-17A/F抗体を、60~150RUの範囲の密度でCM4チップのフローセル2、3または4に捕捉した。固定化表面への試験抗体の捕捉を10μL/分の流速で行った。BIAcore(登録商標)装置は、センサーチップ表面上に結合したタンパク質質量を測定し、それゆえに、試験抗体の補足を各サイクルで確認した。ヒト組み換えIL-17A、IL-17A/FまたはIL-17F(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)の連続希釈を、100nM~0.032nM(1:5連続希釈)で調製し、同時にヒト組み換えIL-23(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)の連続希釈を、200nM~0.064n

10

20

30

40

50

M(1 : 5 連続希釈)で調製した。連続希釈物を表面の上に注入し、センサーチップに捕捉された試験抗体に特異的に結合させた。各抗原濃度の2回の注入を7分の会合時間および15分の解離時間で行った。動態学的結合試験を50 μ L/分の流速で行った。サイクルの間に、フローセルを20 mM 塩酸で洗浄して、表面を再生させた。この洗浄工程により、捕捉試験抗体および結合抗原を固定化抗体表面から除去した。試験抗体は、その後サイクルで再び捕捉された。

【0208】

データをBIAcore(登録商標)T100 Evaluationソフトウェア(version 2.0)を使用してコンパイルした。データを、対照フローセルおよびブランク注入を減算することにより処理した。ベースライン安定性を評価して、再生工程が一連の注入の間中一定の結合表面を提供することを確認した。二個の注入曲線を再現性のために確認した。二価IL-17分子の二価抗体への結合に基づき、二価検体結合相互作用モデルは、との相互作用に適すると決定されたIL-17分子。IL-23 / IL-12Bヘテロ二量体の二価抗体への結合に基づき、1 : 1 結合相互作用モデルは、IL-23分子との相互作用に適すると決定された。対照を減算した曲線を、複数R_{max}と1に設定したR_Iを用いる適当な結合モデルに包括的に適合させた。データは、この結合モデルによく適合し、実験結合曲線と理論的結合曲線は良好に一致した。フィットに関連するカイ²および標準誤差は低かった。残余に傾向はなかった。

10

【0209】

抗ヒトIL-23 / IL-17A / F二重特異性抗体Biacore活性

20

ヒトIL-17A、IL-17A / FおよびIL-17Fとの結合実験の結果を、それぞれ表10、11および12に示す。ヒトIL-23 / IL-12Bヘテロ二量体との結合実験の結果を表13に示す。

【0210】

IL-17Aに対する抗ヒトIL-23 / IL-17A / F二重特異性抗体結合親和性

【表 10】

表 10

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
23/17bAb1 IgG1.1 配列番号28 配列番号17	2.E+05	6.E-05	3.E-10
23/17bAb2 IgG1.1 配列番号18 配列番号17	5.E+05	4.E-04	8.E-10
23/17bAb3 IgG4.1 配列番号74 配列番号17	4.E+05	5.E-05	1.E-10
23/17bAb4 IgG4.1 配列番号29 配列番号17	5.E+05	3.E-04	6.E-10
23/17taFab1 IgG1.1 配列番号76 配列番号78	3.E+05	2.E-03	7.E-9

10

20

【0211】

IL-17A/F に対する抗ヒト IL-23/IL-17A/F 二重特異性抗体結合親和性

30

【表 1 1】

表 1 1

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
23/17bAb1 IgG1.1 配列番号28 配列番号17	2.E+05	9.E-05	4.E-10
23/17bAb2 IgG1.1 配列番号18 配列番号17	4.E+05	7.E-04	2.E-9
23/17bAb3 IgG4.1 配列番号74 配列番号17	2.E+05	2.E-04	1.E-9
23/17bAb4 IgG4.1 配列番号29 配列番号17	3.E+05	1.E-03	3.E-9
23/17taFab1 IgG1.1 配列番号76 配列番号78	1.E+05	5.E-04	5.E-9

10

20

【 0 2 1 2 】

IL - 17 F に対する抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F 二重特異性抗体結合親和性

【表 1 2】

表 1 2

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
23/17bAb1 IgG1.1 配列番号28 配列番号17	8.E+05	3.E-04	4.E-10
23/17bAb2 IgG1.1 配列番号18 配列番号17	3.E+06	7.E-04	2.E-10
23/17bAb3 IgG4.1 配列番号74 配列番号17	6.E+05	2.E-04	3.E-10
23/17bAb4 IgG4.1 配列番号29 配列番号17	2.E+06	7.E-04	4.E-10
23/17taFab1 IgG1.1 配列番号76 配列番号78	3.E+05	7.E-04	2.E-9

10

20

【 0 2 1 3 】

IL23 / IL - 12B に対する抗ヒト IL - 23 / IL - 17A / F 二重特異性抗体結合親和性

30

【表 1 3】

表 1 3

抗体または 二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)
7B7Mab 配列番号68 配列番号17	3.E+05	2.E-04	7.E-10
23/17bAb1 IgG1.1 配列番号28 配列番号17	4.E+05	2.E-04	5.E-10
23/17bAb2 IgG1.1 配列番号18 配列番号17	2.E+05	8.E-05	4.E-10
23/17bAb3 IgG4.1 配列番号74 配列番号17	4.E+05	2.E-04	5.E-10
23/17bAb4 IgG4.1 配列番号29 配列番号17	7.E+04	7.E-05	1.E-9
23/17taFab1 IgG1.1 配列番号76 配列番号78	3.E+05	2.E-04	7.E-10

10

20

30

【 0 2 1 4 】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体へのIL-17A/FおよびIL-23の同時共結合

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体を、IL-23およびIL-17A/F両者の同時共結合の能力について表面プラズモン共鳴を介して評価した。

【 0 2 1 5 】

第一配向での共結合実験について、ヒトIL-17分子を、アミンカップリング化学(EDC:NHS)を使用してCM5センサーチップのフローセル2~4に共有結合により固定化した。固定化後、フローセル上の残った活性部位を1Mエタノールアミンでブロックした。ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17F(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)をそれぞれフローセル2、3または4に固定化した。これらの分子の固定化レベルは4500~5200RUの範囲であった。フローセル1を対照表面として使用した。二重特異性抗体を続いて25µg/mLまたは50µg/mLに希釈し、表面上を流し、センサーチップのフローセル2~4に捕捉させた。二重特異性抗体の捕捉後、IL-23/IL-12Bヘテロ二量体(ZymoGenetics, Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)を500nMに希釈し、共結合を証明するために表面上を流した。結合試験を10µL/分の流速で、会合時間10分および解離時間5分で行った。

40

【 0 2 1 6 】

第二の配向での共結合実験について、マウス抗ヒトIL-12 (p40/p70)モノ

50

クローナル抗体(BD Pharmingen, San Jose, CA)を、アミンカップリング化学(EDC:NHS)を使用してCM5センサーチップのフローセル1~4に共有結合により固定化した。固定化後、フローセル上の残った活性部位を1Mエタノールアミンでブロックした。ヒトIL-23/IL-12Bヘテロ二量体(ZymoGenetics, Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)を500nMに希釈し、IL-12Bサブユニットを介してフローセル1~4に捕捉した。IL-23/IL-12Bの捕捉レベルは約4000RUであった。二重特異性抗体を続いて25µg/mLまたは50µg/mLに希釈し、表面上を流し、センサーチップのフローセル2~4にヒトIL-23サブユニットを介して捕捉した。フローセル1を対照表面として使用した。二重特異性抗体の捕捉後、ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17F(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)を500nMに希釈し、共結合を証明するために表面上を流した。結合試験を10µL/分の流速で、会合時間10分および解離時間5分で行った。

【0217】

全結合実験を、25℃で、10mM HEPES、500mM NaCl、3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20(GE Healthcare)、1mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.4緩衝液中で行った。サイクルの間、フローセルを20mM 塩酸で洗浄して、表面を再生させた。この洗浄工程は、捕捉試験抗体および何らかの結合抗原の両者をチップ表面から除去した。データをBIAcore(登録商標)T100 Evaluationソフトウェア(version 2.0)を使用してコンパイルした。データを、対照フローセルおよびブランク注入を減算することにより処理した。ベースライン安定性を評価して、再生工程が一連の注入の間中一定の結合表面を提供することを確認した。

【0218】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体VへのIL-17A/FおよびIL-23の同時共結合の結果

試験した二重特異性抗体は23/17bAb1(配列番号28および配列番号17)、23/17bAb2(配列番号18および配列番号17)、23/17bAb3(配列番号74および配列番号17)、23/17bAb4(配列番号29および配列番号17)を含むおよび23/17tAFab1(配列番号76および配列番号78)。A11二重特異性抗体はヒトIL-23およびヒトIL-17A/Fの両者に同時共結合でき、本二重特異性抗体の両アームが機能的であることが証明された。

【0219】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体のIL-17A/F特異的結合の測定

抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体を、表面プラズモン共鳴を介して、ヒトIL-17B、ヒトIL-17C、ヒトIL-17DおよびヒトIL-17E(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)に対する交差反応性の欠如を試験した。

【0220】

結合試験を、BIAcore(登録商標)T100(GE Healthcare, Piscataway, NJ)で行った。本方法を、BIAcore(登録商標)T100 Control Software, v 2.0を使用してプログラム化した。ヤギ抗ヒトIgG Fc-ガンマ特異的抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を、アミンカップリング化学(EDC:NHS)を使用してCM4センサーチップのフローセル1~3に固定化した。精製二重特異性抗体を、続いて約150RUの密度でセンサーチップのフローセル2またはフローセル3に捕捉した。フローセル1を対照表面として使用した。

【0221】

ヒトIL-17B、IL-17C、IL-17DおよびIL-17E(ZymoGenetics, A Bristol-Myers Squibb Company, Seattle, WA, USA)を捕捉抗体表面(フローセル2)上に注入し、対照フローセル(フローセル1)を500nM、100nM、20nMおよび4nM濃度で注入した。この実験の組の陽性対照として、ヒトIL-23(ZymoGenetics, A Bristol-M

yers Squibb Company, Seattle, WA, USA)を100 nM、20 nM、4 nMおよび0.8 nMで注入した。結合試験を流速50 µL/分、会合時間5分および解離時間5分で行った。腸結合実験を、25で10 mM HEPES、500 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05 %界面活性剤P20 (GE Healthcare)、1 mg/mL ウシ血清アルブミン、pH 7.4 緩衝液中で行った。サイクルの間、フローセルを20 mM 塩酸で洗浄して、表面を再生させた。この洗浄工程は、捕捉試験抗体および何らかの結合抗原の両者をチップ表面から除去した。データをBIAcore(登録商標)T100 Evaluationソフトウェア(version 2.0)を使用してコンパイルした。データを、対照フローセルおよびブランク注入を減算することにより処理した。ベースライン安定性を評価して、再生工程が一連の注入の間中一定の結合表面を提供することを確認した。

10

【0222】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する抗ヒトIL-23/IL-17A/F二重特異性抗体のIL-17A/F特異的結合結果

ヒトIL-17B、IL-17C、IL-17DまたはIL-17Eの二重特異性抗体への結合は観察されなかった。試験した二重特異性抗体は23/17bAb1(配列番号28および配列番号17)、23/17bAb2(配列番号18および配列番号17)、23/17bAb3(配列番号74および配列番号17)、23/17bAb4(配列番号29および配列番号17)を含む。対照的に、IL-23陽性対照は、先の試験と一致する用量依存的結合を示した。

【0223】

実施例4

抗ヒトIL-23/17A/F bAbは、マウスにおけるマウスKC(CXCL1)のヒトIL-17A、FおよびAF介在血清濃度増加を阻止する

IL-17A、FおよびAFは、宿主防御に役割を有するが、特に異常な高レベルでまたは慢性条件下で産生されたとき、疾患病理にも貢献する多くの下流因子の産生を誘発できる。これらの下流メディエーターの一つは、重要な好中球化学誘引物質活性を有し、炎症において役割を有するケモカインであるCXCL1(ヒトにおけるGRO- またはマウスにおけるKCとしても知られる)である。抗ヒトIL-23/17A/F二重特異性抗体(bAb)がマウスにおけるGRO- のIL-17A、FおよびAF介在増加を阻害する能力を、bAbがインビオ設定でIL-17誘発活性に対して有効であり、それゆえに、bAbがIL-17A、FまたはAFが役割を有するヒト疾患の処置に有用であることを示すために、評価した。しかしながら、これらのbAbがマウスIL-17A、FまたはAF交差反応しないため、GRO- (またはマウスの場合、GRO- のマウスアナログであるKC産生を誘発)産生のためにヒト(h)IL-17A、FまたはAFのマウスへの送達が必要であり、これらは、その後抗ヒトIL-23/17A/F bAbの存在下に中和できた。

20

30

【0224】

これらの実験のために、雌BALB/cマウス(7~9週齢)を使用した。18時間目に、マウスに表14および15の左手側カラムに示すとおり媒体(PBS)または抗ヒトIL-23/17A/F bAbの1個の投与量の腹腔内(i.p.)注射を受けた。0時間目に、マウスは次の0.175 mg/kg hIL-17A、0.9 mg/kg hIL-17Fまたは0.5 mg/kg hIL-17AFの組み換えヒトタンパク質の1個の皮下(s.c.)注射を受けた。対照マウスは、hIL-17タンパク質の1個の代わりに、媒体(PBS)のs.c.注射を受けた。2時間後、マウスをイソフルランガス麻酔下眼窩後洞(retro-orbital sinus)から採血し、血清を血液の遠心分離後に回収し、血清を、製造業者(Quantikine Mouse CXCL1/KC Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)の指示に従い、市販のELISAを使用して血清KC濃度を分析するまで、80で貯蔵した。

40

【0225】

表14および15に示すとおり、bAbで処置したマウスは、hIL-17A、FまたはAF誘発血清KC(CXCL1)濃度の阻害の用量依存的増加を示し、bAbがこれらの

50

IL-17リガンドが介在する活性の減少に有効であることが示された。CXCL1はIL-17A、FまたはAFに应答した生物学的読み取りの一例に過ぎず、同様に評価項目測定として使用できるIL-17A、FまたはAFが役割を有する疾患に役割を有する多くの他の重要な下流読み取りがある。

【0226】

【表14】

表14. bAb腹腔内投与によるマウスKCのヒトIL-17AまたはF介在血清濃度増加の阻害パーセント、媒体処置マウスの濃度に対する比(n=3~4匹/群)

	IL-17A介在血清KCレベルの阻害%	IL-17F介在血清KCレベルの阻害%
媒体(PBS)	0	0
1mg/kg bAb1	81	76
5mg/kg bAb1	90	88
12mg/kg bAb1	100	97
1mg/kg bAb2	91	68
5mg/kg bAb2	93	83
12mg/kg bAb2	84	90
1mg/kg bAb3	78	95
5mg/kg bAb3	94	89
12mg/kg bAb3	93	90
1mg/kg bAb4	94	51
5mg/kg bAb4	87	89
12mg/kg bAb4	94	92

【0227】

【表15】

表15. bAb腹腔内投与によるマウスKCのヒトIL-17AF介在血清濃度増加の阻害パーセント、媒体処置マウスの濃度に対する比(n=4匹/群)

	IL-17AF介在血清KCレベルの阻害%
媒体(PBS)	0
0.3mg/kg bAb1	55
10mg/kg bAb1	100
0.3mg/kg bAb2	40
10mg/kg bAb2	90
0.3mg/kg bAb3	70
10mg/kg bAb3	96
0.3mg/kg bAb4	10
10mg/kg bAb4	72

【0228】

実施例5

抗ヒトIL-23/17A/F bAbは、マウスにおけるマウスIL-17AFおよびFの血清濃度のヒトIL-23介在増加を阻止する

IL-23はTh17細胞の分化の誘発が可能であり、当該細胞は、続いて、IL-1

10

20

30

40

50

7 A、IL - 17 FおよびIL - 17 A Fの産生を導き得る。これらのサイトカイン類は、多くの疾患と関連付けられており、IL - 23およびIL - 17 A、FおよびA Fを阻害できる治療剤がこれらの疾患の処置に有用である。抗ヒトIL 23 / 17 A / F二重特異性抗体(b A b)がマウスにおけるIL - 17 A、FおよびA FのIL - 23介在増加を減少させる能力を、b A bがインビボ設定でIL - 23誘発活性に対して有効であり、IL - 23およびTh 17細胞が役割を有するヒト疾患の処置にb A bが有用であることを示すために、評価した。しかしながら、これらのb A bがマウスIL - 23と交差反応しないため、マウスIL - 17 FおよびA Fの産生の誘発のためにヒト(h)IL - 23をマウスに送達することが必要であり、これは、その後抗ヒトIL 23 / 17 A / F b A b存在下で中和できた。マウスIL - 17 Aの濃度はマウス血清中で正確に測定するには低すぎたが、血清IL - 17 FおよびA Fで観察された傾向と比較して、傾向は類似していると予測された。

10

【0229】

これらの実験のために、雌C57BL / 6マウス(7 ~ 9週齢)を使用した。1日目の午前10 : 30に、各々5 µgのマウス(m)IL - 2を腹腔内(i . p .)注射を介して投与された。2日目の午前8 : 30に、マウスは、表16の左手側コラムに示すとおり、媒体(PBS)または抗ヒトIL - 23 / 17 A / F b A bの1個の投与量のi . p .注射を受けた。2日目の午前11時にマウスは各々5マイクログラムのmIL - 2および10マイクログラムのhIL - 23を受け、2日目の午後5 : 20に、マウスはmIL - 2およびhIL - 23の各々10マイクログラムをi . p .注射を介して受けた。3日目の午前9 : 30に、マウスの各々は、さらに5マイクログラムのmIL - 2および10マイクログラムのhIL - 23をi . p .注射により受けた。3日目の午後4 : 30に、マウスをイソフルランガス麻酔下眼窩後洞(retro-orbital sinus)から採血し、血清を血液の遠心分離後に回収し、マウスIL - 17 FおよびA Fの血清濃度を、これらの成分を特異的に測定するELISAおよびルミネックスアッセイを使用して分析するまで、血清を - 80 °Cで貯蔵した。

20

【0230】

表16に示すとおり、b A bで処置したマウスは、マウス17 FまたはA FのhIL - 23誘発血清濃度の阻害の用量依存的増加を示し、b A bがhIL - 23が介在する活性の減少に有効であることが示された。

30

【表 16】

表 16. b A b 腹腔内投与によるマウス I L - 1 7 F または A F の血清濃度のヒト I L - 2 3 介在増加の阻害パーセント、媒体処置マウスの濃度に対する比 (n = 3 匹/群)

	I L - 2 3 介在血清 m I L - 1 7 F レベルの 阻害%	I L - 2 3 介在血清 m I L - 1 7 A F レベル の阻害%
媒体 (P B S)	0	0
1 mg/kg b A b 1	4 9	2 2
5 mg/kg b A b 1	9 9	9 4
1 2 mg/kg b A b 1	9 6	9 4
1 mg/kg b A b 2	2 1	1 7
5 mg/kg b A b 2	8 2	7 1
1 2 mg/kg b A b 2	6 7	9 7
1 mg/kg b A b 3	0	4 5
5 mg/kg b A b 3	3 8	9 1
1 2 mg/kg b A b 3	6 5	9 5
1 mg/kg b A b 4	0	6 2
5 mg/kg b A b 4	2 7	7 4
1 2 mg/kg b A b 4	4 9	9 7

【 0 2 3 1 】

実施例 6

V C V F c 二重特異性抗体

哺乳動物 V C V F c 二重特異性分子の構築および発現

遺伝子全体を GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, USA) で合成し、p T T 5、H E K 2 9 3 - 6 E 一過性発現ベクター (NCR Biotechnology Research Institute, Ottawa, ON, CAN) に制限酵素クローニングを介して導入した。ほとんどの構築物は m o d 2 6 1 0 (配列番号 3 0) シグナル配列を使用して発現させた。V C V F c は二重特異性抗体であり、これは、リンカー (例えば、いずれかの鎖について 1 0 量体 G₄ S または軽鎖について R T V A A P S (配列番号 8 5) および重鎖について S S A S T K G P S (配列番号 8 6) であるが、これらに限定されない) を介して F a b 領域とヒンジの間に挿入された二重特異性の第二のアームの F v ユニットを有する抗体全体を含む。V C V F c 二重特異性抗体の図を図 5 に示す。

【 0 2 3 2 】

H E K 2 9 3 - 6 E 懸濁細胞にポリエチレンジイミン試薬を使用して発現構築物を遺伝子導入しおよび 5 mM L - グルタミンおよび 2 5 μg/mL G 4 1 8 添加 F 1 7 培地 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) で培養した。2 4 時間後、2 0 % Tryptone NI (Organotechnie SAS, La Courneuve, FR) の体積の 1 / 4 0 を添加した。トランスフェクション約 1 2 0 時間後、条件培地を回収し、0.2 μm フィルターを通した。タンパク質を、Mab Select SuRe Affinity Chromatography (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) と SUPERDEX (登録商標) Size Exclusion Chromatography (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) の組み合わせを使用して濾過条件培地から精製した。含量を V - A 2 8 0 nm から概算し、品質を分析的分子ふるい高速液体クロマトグラフィー、S D S P A G E およびウェスタンブロットにより評価した。

【 0 2 3 3 】

I L - 2 3 / I L - 1 7 A / F V C V F c 二重特異性抗体バイオアッセイ活性 ; N F - B 誘発によるヒト I L - 1 7 A、I L - 1 7 A / F および I L - 1 7 F 活性を測定する

ためのNIH/3T3/KZ170 NF-Bルシフェラーゼレポーターアッセイ
 バイオアッセイを上の実施例1に記載のとおり実施した。

【0234】

IL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体バイオアッセイ活性；ホスホ-STAT3誘発によるヒトIL-23活性を測定するためのBaf3/huIL-23R/huIL-12R 1トランスフェクタントホスホ-STAT3アッセイ

バイオアッセイを上の実施例3に記載のとおり実施した。

【0235】

PDGF-C/PDGF-D VCVFc二重特異性抗体バイオアッセイ活性；ヒトPDGF-CおよびPDGF-D分裂促進的活性を測定するための正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)増殖アッセイ

初代正常ヒト肺線維芽細胞株(NHLF、CC-2512、Lonza, Walkersville, MD)を、1,000細胞/ウェルで、増殖培地(FGM-2 BulletKit、Lonza, Walkersville, MD)に播種し、一夜、37℃、5%CO₂でインキュベートした。翌日培地を除去し、組み換えヒトPDGF-CおよびPDGF-D(ZymoGenetics)の連続希釈をアッセイ培地(0.1%BSA添加FBM、Lonza, Walkersville, MD)に調製し、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。さらに、本アッセイをPDGF-CおよびPDGF-D活性の中和の測定に使用した。最大下濃度のPDGF-CまたはPDGF-Dを、ここに記載する抗ヒトPDGF-C/Dまたは抗ヒトPDGFR/VCVFc抗体の連続希釈とアッセイ培地中で併せ、細胞を入れたプレートに添加し、一緒に37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。細胞を1μCi/ウェルのチミジン[メチル-³H](PerkinElmer, Waltham, MA)でパルスし、37℃、5%CO₂でさらに24時間インキュベートした。インキュベーション後、分裂促進的活性を、³H-チミジン取り込み量の測定により評価した。培地を除去し、細胞を10分、37℃でトリプシン処理し、FilterMate harvester(Packard Instrument Co., Meriden, CT)に回収し、製造業者の指示に従い、TOPCOUNT(登録商標)マイクロプレートシンチレーションカウンター(Packard Instrument Co., Meriden, CT)で読んだ。³H-チミジン取り込み増加がPDGF-CまたはPDGF-D受容体-リガンド相互作用の指標であった。³H-チミジン取り込み減少がPDGF-CまたはPDGF-D受容体-リガンド相互作用中和の指標であった。IC₅₀(50%阻害濃度)値を、GraphPad Prism 4ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego CA)を使用して各PDGF-C/PDGF-DまたはPDGFR/PDGFR VCVFc二重特異性抗体について計算した。

【0236】

IL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体バイオアッセイ活性；NIH/3T3/KZ170 NF-BルシフェラーゼレポーターアッセイおよびBaf3/huIL-23R/huIL-12R 1トランスフェクタントホスホ-STAT3アッセイ結果

ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fは、用量依存的方法でNF-Bルシフェラーゼレポーターの活性化を誘発し、EC₅₀濃度はIL-17Aについて0.15nM、IL-17A/Fについて0.5nMおよびIL-17Fについて0.5nMと決定され、IL-23は用量依存的方法でSTAT3リン酸化を誘発し、EC₅₀濃度は0.02nMであると決定された。抗ヒトIL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体のIC₅₀データを下の表17、18および19に示す。

【0237】

IL-23/17A/F VCVFc二重特異性抗体表

【表 17】

表 17

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM	IL-23 IC ₅₀ nM
339-134 mAb IgG1.1	MVC978 配列番号64	MVC717 配列番号66	3	0.9	0.4	実施せず
IL23.6 (7B7) mAb IgG1.1	MVC1003 配列番号68	MVC1002 配列番号17	実施せず	実施せず	実施せず	0.2
23/17VCV1 IgG1.1	MVC1020 配列番号87	MVC1021 配列番号89	20	3	3	0.008
23/17VCV2 IgG1.1	MVC1022 配列番号91	MVC1023 配列番号93	0.4	0.4	0.9	0.3

10

【 0 2 3 8 】

【表 18】

表 18

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM	IL-23 IC ₅₀ nM
339-134 mAb IgG1.1	MVC978 配列番号64	MVC717 配列番号66	1.2	0.23	0.28	実施せず
IL23.6 (7B7) mAb IgG1.1	MVC1003 配列番号68	MVC1002 配列番号17	実施せず	実施せず	実施せず	0.0030
23/17VCV3 IgG4.1	MVC1119 配列番号95	MVC1021 配列番号89	16	9.7	6.0	0.011
23/17VCV4 IgG4.1	MVC1120 配列番号97	MVC1023 配列番号93	0.20	0.34	0.20	0.47
23/17VCV5 IgG1.1	MVC1122 配列番号99	MVC1121 配列番号101	15	8.7	7.0	0.0038
23/17VCV6 IgG1.1	MVC1124 配列番号103	MVC1123 配列番号105	0.38	0.35	0.29	0.043

20

30

【 0 2 3 9 】

40

【表 19】

表 19

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	IL-17A IC ₅₀ nM	IL-17A/F IC ₅₀ nM	IL-17F IC ₅₀ nM	IL-23 IC ₅₀ nM
339.15.3.6 mAb ハイブリドーマ株ロットE10915	N/A	N/A	9.8	0.34	0.32	実施せず
IL23.4 mAb IgG4.1 - BDC ロットPC-1413-32	配列番号107	配列番号109	実施せず	実施せず	実施せず	0.029
23/17VCV7 IgG1.1	MVC1108 配列番号111	MVC1107 配列番号113	24	13	5.9	0.053
23/17VCV8 IgG1.1	MVC1110 配列番号115	MVC1109 配列番号117	2.4	0.34	0.31	2.6

10

20

【0240】

PDGFC / PDGFD および PDGFR / PDGFC VCVFc 二重特異性抗体バイオアッセイ活性；正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)増殖アッセイ結果

PDGFC および PDGFD は、NHLF 細胞増殖を用量依存的方法で誘発し、最大下濃度は PDGFC について 0.1 nM および PDGFD について 6 nM と決定された。表 20 および表 21 は、PDGFC / PDGFD またはここに記載する PDGFR / PDGFR VCVFc 二重特異性抗体の IC₅₀ データを示す。

【0241】

PDGFC / PDGFD VCVFc 二重特異性抗体表

【表 20】

表 20

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	PDGFC IC ₅₀ nM	PDGFD IC ₅₀ nM
PDGFC mAb ハイブリドーマ ロット-E2826	N/A	N/A	.083	実施せず
PDGFD mAb ハイブリドーマ ロット-E4342	N/A	N/A	実施せず	3.5
C/DVCV1 IgG1.1	MVC1112 配列番号119	MVC1111 配列番号121	0.090	20

30

40

【0242】

PDGFR / PDGFR VCVFc 二重特異性抗体表

【表 2 1】

表 2 1

名称	重鎖 MVC# 配列番号	軽鎖 MVC# 配列番号	PDGFC 阻害%	PDGFD 阻害%
PDGFR α mAb ハイブリドーマ ロット-C5161	N/A	N/A	100%	30%
PDGFR β mAb ハイブリドーマ ロット-C8938	N/A	N/A	50%	100%
α/β VCV2 IgG1.1	MVC1118 配列番号123	MVC1117 配列番号125	70%	100%

10

【 0 2 4 3 】

IL - 23 / IL - 17 A / F V C V F c 二重特異性抗体バイオアッセイ活性 ; IL - 6 誘発によるヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F 活性を測定するための初代ヒト線維芽細胞アッセイ

【 0 2 4 4 】

バイオアッセイを上の実施例 3 に記載のとおり実施した (pertextured)

IL - 23 / IL - 17 A / F V C V F c 二重特異性抗体バイオアッセイ活性 ; 初代ヒト線維芽細胞アッセイ結果

ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F および IL - 17 F はヒト IL - 6 産生を用量依存的方法で誘発し、EC₅₀ 濃度は IL - 17 A について 0.08 nM、IL - 17 A / F について 25 nM および IL - 17 F について 25 nM と決定された。抗ヒト IL - 23 / IL - 17 A / F V C V F c 二重特異性抗体 23 / 17 V C V 2 (配列番号 91 および配列番号 93)。表 2 2 は、ここに記載する IL - 23 / IL - 17 A / F V C V F c 二重特異性抗体の実施例 IC₅₀ データを示す。

【表 2 2】

表 2 2

プロフィール		23/17VCV2 IgG1.1 配列番号91 配列番号93	339-134 mAbIgG1.1 配列番号64 配列番号66	IL23.6(7B7) mAbIgG1.1 配列番号68 配列番号17
細胞性潜在力 ヒト初代 線維芽細胞 (HFFF) IC ₅₀	IL-17A EC ₅₀ = 0.08 nM	0.3 nM	2 nM	実施せず
	IL-17AF EC ₅₀ = 25 nM	26 nM	22 nM	実施せず
	IL-17F EC ₅₀ = 25 nM	25 nM	23 nM	実施せず
細胞性潜在力 初代T細胞 アッセイIC ₅₀	IL-23 EC ₅₀ = 0.02 nM	0.4 nM	実施せず	0.02 nM

20

30

40

【 0 2 4 5 】

IL - 23 / IL - 17 A / F V C V F c 二重特異性抗体共結合活性 ; ヒト IL - 17 A、IL - 17 A / F または IL - 17 F の阻害と同時にヒト IL - 23 への結合を測定するた

50

めの初代ヒト線維芽細胞アッセイ。ヒトIL-23の阻害と同時にヒトIL-17A、IL-17A/FまたはIL-17Fへの結合を測定するための初代ヒトT細胞ホスホ-STAT3アッセイ。

初代ヒト線維芽細胞アッセイを、過剰量のIL-23の30nM存在下で行った。初代ヒトT細胞ホスホ-STAT3アッセイを、過剰量のIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fの30nM存在下で行った。

【0246】

IL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体バイオアッセイ共結合結果

二重特異性抗体23/17VCV2(配列番号91および配列番号93)は、ヒトIL-23存在下で試験したとき、ヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17F阻害を妨害しなかった。二重特異性抗体23/17VCV2は、ヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17F存在下で試験したとき、ヒトIL-23阻害を妨害しなかった。

【0247】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介するヒトIL-17A、IL-17A/F、IL-17FおよびヒトIL-23に対するIL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体の結合親和性の測定

結合活性を上の実施例3に記載のとおり決定した。

【0248】

IL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体Biacore活性

ヒトIL-17A、IL-17A/FおよびIL-17Fとの結合実験の結果を、それぞれ表23、24および25に示す。ヒトIL-23/IL-12Bヘテロ二量体との結合実験の結果を表26に示す。

【0249】

IL-17Aに対するIL-23/IL-17A/F VCVFc二重特異性抗体結合親和性

【表23】

表23

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)	K_{D1} (nM)
339-134 mAb IgG1.1 配列番号64 配列番号66	2.E+06	3.E-03	1.E-9	1.0
23/17VCV2 IgG1.1 配列番号91 配列番号93	3.8E+06	3.4E-03	8.9E-10	0.9
23/17VCV4 IgG4.1 配列番号97 配列番号93	5.4E+06	5.4E+03	1.0E+09	1.0
23/17VCV6 IgG1.1 配列番号103 配列番号105	4.0E+06	4.7E+03	1.2E+09	1.2

【0250】

【表 2 4】

表 2 4

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)	K_{D1} (nM)
339-134 mAb IgG1.1 配列番号64 配列番号66	2.E+06	5.E-04	2.E-10	0.2
23/17VCV2 IgG1.1 配列番号91 配列番号93	1.8E+06	7.1E-04	3.9E-10	0.4
23/17VCV4 IgG4.1 配列番号97 配列番号93	1.5E+06	7.7E+04	5.1E+10	0.5
23/17VCV6 IgG1.1 配列番号103 配列番号105	1.2E+06	7.9E+04	6.6E+10	0.7

10

20

【 0 2 5 1】

【表 2 5】

表 2 5

二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)	K_{D1} (nM)
339-134 mAb IgG1.1 配列番号64 配列番号66	2.E+06	2.E-04	1.E-10	0.1
23/17VCV2 IgG1.1 配列番号91 配列番号93	2.4E+06	5.1E-04	2.1E-10	0.2
23/17VCV4 IgG4.1 配列番号97 配列番号93	2.2E+06	3.5E+04	1.6E+10	0.2
23/17VCV6 IgG1.1 配列番号103 配列番号105	3.4E+06	1.2E+04	3.5E+11	0.04

30

40

【 0 2 5 2】

【表 2 6】

表 2 6

抗体または 二重特異性抗体	k_{a1} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D1} (M)	K_{D1} (nM)
7B7Mab 配列番号68 配列番号17	3.E+05	2.E-04	7.E-10	0.7
23/17VCV2 IgG1.1 配列番号91 配列番号93	4.7E+04	2.1E-04	4.5E-09	4.5
23/17VCV4 IgG4.1 配列番号97 配列番号93	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし
23/17VCV6 IgG1.1 配列番号103 配列番号105	5.6E+04	1.1E+04	2.0E+09	2.0

10

20

【 0 2 5 3】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する I L - 2 3 / I L - 1 7 A / F V C V F c 二重特異性抗体への I L - 1 7 A / F および I L - 2 3 の同時共結合

このアッセイを上の実施例 3 に記載のとおり実施した。

【 0 2 5 4】

表面プラズモン共鳴(Biacore)を介する I L - 1 7 A / F および I L - 2 3 の I L - 2 3 / I L - 1 7 A / F V C V F c 二重特異性抗体への同時共結合の結果

二重特異性抗体 2 3 / 1 7 V C V 2 (配列番号 9 1 および配列番号 9 3) は、ヒト I L - 2 3 およびヒト I L - 1 7 A / F の両者に同時に共結合可能であり、本二重特異性抗体の両アームが機能的であることが証明された。

30

【 0 2 5 5】

実施例 7

I L - 2 3 p 1 9 エピトープマッピング

この実施例 7 に記載した分析は、I L - 2 3 p 1 9 抗体(7 B 7 抗体または M a b、7 B 7 F a b および b i A b 3、その全て配列番号 7 に示す重鎖可変ドメインおよび配列番号 9 に示す軽鎖可変ドメインを有する)が結合する I L - 2 3 p 1 9 上のエピトープ残基を同定することを目的とした。F a b 7 B 7、7 B 7 抗体および b i A b 3 は、I L - 2 3 p 1 9 上のそのエピトープに関する限りは互換性であるために、種々の段階で結合試験にも使用している。

40

【 0 2 5 6】

エピトープ上のタンパク分解性消化およびペプチドデータ

I L - 2 3 p 1 9 抗体のマススペクトロメトリーエピトープ配列分析は、エピトープ抽出およびエピトープ切除方法の両者に基づいた(Parker et al., "MALDI/MS-based epitope mapping of antigens bound to immobilized antibodies", Mol. Biotechnol., 20(1):49-62 (Jan. 2002))。いずれの場合も、I L - 2 3 p 1 9 抗体は、2 mg m A b / 1 ml 床体積の平均密度で表面活性化ビーズ上の抗体の 1 級アミンを介して直接固定化した。I L - 2 3 h i s - t a g 抗原からのペプチドを、還元およびアルキル化有りまたは無しで産生した。抗原 I L - 2 3 の還元は、1 時間、3 7 の 5 0 mM ジチオスレイトールの

50

PBS 溶液および 4 M グアニジン HCl とのインキュベーションにより実施した。この後、30 分、室温で 100 mM ヨードアセトアミドでアルキル化した。還元およびアルキル化した IL - 23 を、断片化前に PBS に対して一夜透析した。エピトープ抽出のために、抗原ペプチドを、エンドプロテイナーゼ群のトリプシン、キモトリプシン、lys - C、arg - C、asp - N およびまたは glu - C で、酵素対抗原比 2 % (w / w) まででタンパク分解性消化させた。インキュベーションを、37 °C で 2 時間 ~ 一夜の範囲のインキュベーション時間で実施した。得られたペプチドを、室温で 30 分抗体樹脂と混合した。この樹脂を、あらゆる非特異的結合ペプチドを除去するために 3 回洗浄した。全ての消化、インキュベーションおよび洗浄工程を PBS pH 7 中で実施した。酵素消化前にインタクトな抗原を抗体と 30 分、室温インキュベーションする以外、エピトープ切除は同じプロトコールに従った。両方法で、抗体結合ペプチドを溶出し、ESI - MS で分析した。

10

【0257】

これらのデータは、IL - 23 p19 抗体が、IL - 23 p19 に 3 ペプチド領域を含む非連続的エピトープを含むことを示す。合成ペプチドを産生して、さらにこれらの 3 ペプチド領域を分析し、その結合を ELISA およびマスマススペクトロメトリーの両方で試験し、分析した。これらの観察に基づき、次のペプチドが IL - 23 p19 抗体エピトープの配列を表すことが示される：

ペプチド 1 : WQRLLLRFKILR (配列番号 6 の残基 156 ~ 167)

ペプチド 2 : SAHPLVGHMDLR (配列番号 6 の残基 46 ~ 57)

20

ペプチド 3 : IHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLP (配列番号 6 の残基 93 ~ 117)。

【0258】

HDX - MS による IL - 23 エピトープマッピング

水素 / 重水素交換マスマススペクトロメトリー (HDX - MS) 方法は、主鎖アミド水素原子の重水素交換の速度および程度をモニタリングすることにより溶液中のタンパク質配座のおよび立体構造的動態をプローブする。HDX のレベルは、主鎖アミド水素原子の溶媒到達性およびタンパク質の配座による。HDX によるタンパク質質量増加は MS により厳密に測定できる。この技術を酵素消化と組み合わせたとき、ペプチドレベルでの構造特性を分解でき、表面に露出したペプチドを内部に折りたたまれたものと区別できる。典型的に、重水素標識および後のクエンチング実験を実施し、その後オンラインペプシン消化、ペプチド分離および MS 分析を行う。HDX - MS による IL - 23 における BMS - 986113 のエピトープマッピングの前に、非重水素化実験を実施して、IL - 23 (4.4 mg / mL) および IL - 23 / BMS - 986113 (1 : 1 モル比、4.4 mg / mL および 3.36 mg / mL) に対して一般的消化性ペプチドのリストを作成し、IL - 23 について配列包括度 97 % を達成した。この実験で、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を標識工程中使用し、続いてクエンチング緩衝液 (200 mM リン酸緩衝液と 1.5 M GdnCl および 0.5 M TCEP、pH 2.5、1 : 1、v / v) を添加した。エピトープマッピング実験のために、5 µL の各サンプル (IL - 23 または IL - 23 / BMS - 986113 (1 : 1 モル比)) を 65 µL HDX 標識緩衝液 (D₂O 中 10 mM リン酸緩衝液、pD 7.0) と混合し、室温 (~ 25 °C) で標識反応を開始させた。反応を種々の時間行った：20 秒、1 分、10 分、60 分および 240 分。各標識反応時間の最後に、クエンチング緩衝液 (1 : 1、v / v) 添加により反応を終了させ、クエンチしたサンプルを分析のために Waters HDX-MS システムに注入した。観察された一般的消化性ペプチドを、BMS - 986113 非存在下 / 存在下の重水素取り込みレベルについてモニタリングした。HDX - MS による IL - 23 中の抗 IL - 23 7B7Fab (4.91 mg / mL) のエピトープマッピングは同じプロトコールに従った。

30

40

【0259】

IL - 23 との複合体および IL - 23 との biAb3 における抗 IL - 23 7B7Fab のエピトープマッピングは、biAb3 が、IL - 23 p19 に 5 ペプチド領域を含む非連続的エピトープを有することを示す。相対的重水素取り込みレベルに基づき、5

50

ペプチド領域を領域 1 > 2 > 3 > 4 > 5 と順位付けでき、領域 1 が重水素取り込みで最も顕著に変化し、領域 5 が重水素取り込みで最も顕著でない変化をする。IL-23p19 抗体について HDX-MS により決定した IL-23p19 上の 5 ペプチド領域は次のとおりである：

領域 1：PDSPVGQL(配列番号 6 の残基 117 ~ 124)；

領域 2：IFTGEPSSL(配列番号 6 の残基 108 ~ 116)；

領域 3：KILRSLQAF(配列番号 6 の残基 164 ~ 172)；

領域 4：QQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMD(配列番号 6 の残基 34 ~ 55)；および

領域 5：CLQRIHQGLIFYEKLLG(配列番号 6 の残基 89 ~ 105)。

【0260】

コンピューターによるエピトープ予測およびアラニンシェーブ変異体の設計

アラニンシェーブ変異誘発は、結合のエピトープにおけるアミノ酸側鎖を除去するための、同じ構築物における複数残基のアラニンへの変異のための戦略である(Wells, J.A., "Systemic mutational analyses of protein-protein interfaces", *Enzym.*, 202:390-411 (1991))。7B7Fab および biAb3 との潜在的エピトープにおける残基の関与に対する多くの情報源を組み合わせ、局所アラニンシェーブ変異体の標的リストを作成した。HDX(この実施例 7 中の上記参照)およびタンパク分解性消化ペプチドマッピング(この実施例 7 中の上記参照)の両者の間の重複領域に含まれる残基を、IL-23p19 ドメインの配列上にマッピングし、一般的残基の 3 個の線形領域を領域 A、B および C として同定した。領域 A は配列番号 6 のアミノ酸残基 33 ~ 59 に対応する。領域 B は配列番号 6 のアミノ酸残基 89 ~ 125 に対応する。領域 C は配列番号 6 のアミノ酸残基 144 ~ 173 に対応する。側鎖が露出している(溶媒接触面積、SASA)、そして、それゆえに、IL-23 の p19 ドメインのタンパク質表面上に位置するであろう残基を計算するために、IL-23 ヘテロ二量体の社内構造を使用した。IL-23 の p19 ドメインにおける各残基について、アミノ酸タイプの接触可能表面对標準的露出表面比を計算し、残基を瓶に分類した。残基を、次の < 30%、30 ~ 40%、40 ~ 50%、50 ~ 60%、60 ~ 70%、70 ~ 80%、> 90% 露出の到達性瓶に入れた。各アミノ酸タイプの標準的残基可触性を、伸張トリペプチド Gly-X-Gly について計算した。実施した第二の計算は ODA(最適ドッキング面積)であり、これは、起こり得るタンパク質-タンパク質相互作用表面の予測に有用である。本方法は、最低ドッキング脱溶媒和エネルギーを有する最適表面パッチを同定する。ODA を、IL-23 の p19 ドメインについて計算し、これらの結果を変異誘発のために残基の優先順位をつけるために使用した。

【0261】

これら 3 領域(A、B、C)中の残基を、ODA および SASA 計算の両者での高得点に基づき優先順位をつけ、また複合体化していない IL-23 に対する水素-重水素交換の程度に基づき加重した(ペプチド #1 > #2 > #3 > #4 > #5)。マウスと非一致である領域をアラニンシェーブ変異体の代わりにマウス交換変異体としてクローン化し、これは、小規模試験で結合に影響を示さなかった。伸長ループにおける残基の線形配列を含む M7 以外、残基を、IL-23(M5、M6、M8)の X 線結晶構造に対してそれらをマッピングして、非線形エピトープに併せた。さらなるバックアップ変異体を、優勢に線形残基(M9、M10、M11)のサブエピトープを用いて作製した。この方法で設計したアラニンシェーブ変異体を下の表 27 に示す。

【表 27】

表 27：IL-23 p19 のアラニンシェーブ変異体

名称	変異領域	アラニンに変異した IL-23 p19 (配列番号 6) 残基
M5	A および B	H53A、M54A、E112A、L116A および D118A
M6	A および C	T42A、W45A、H48A、F163A および Q170A
M7	C	W142A、E143A、T144A、Q145A および Q146A
M8	A、B および C	H53A、E112A、Q154A および W156A
M9	B	L116A、D118A および Q123A
M10	A	H53A、M54A、D55A および F163A
M11	C	W142A、T144A および Q146A

10

【0262】

IL-23 エピトープマッピングアラニン変異体のクローニング、発現および精製

非タグ付野生型 IL-23 p40 サブユニットエンターベクター構築物を PCR により作製し、PCR フラグメントのフィデリティを配列決定により確認した。一過性発現構築物を Gateway LR 組換えにより製造し、配列を確認した。His タグ付野生型 IL-23 p19 サブユニット構築物および全変異体構築物を PCR により作製し、一過性発現ベクターに直接クローン化した。全 PCR フラグメントのフィデリティを配列決定により確認した。野生型対照を作製するために、非タグ付野生型 IL-23 p40 サブユニットを、IL-23 複合体精製のために 4 L 規模で HEK293-6E 細胞に His タグ付野生型 p19 サブユニットと共に一過性にとも発現させた。簡単にいうと、 1×10^6 細胞/ml の HEK293-6E 細胞に、 $0.5(p19)/0.5(p40)/1.5(PEI)$ 比で発現プラスミド/PEI 複合体を遺伝子導入した。トリプトン N1 フィードを 24 時間後に添加し、細胞をトランスフェクション 120 時間後に採取した。条件培地を $0.2 \mu\text{M}$ フィルターで濾過した。7 個の His タグ付 IL-23 p19 変異体構築物に、上記の同じトランスフェクションプロトコルに従い、30 ml 規模で非タグ付野生型 IL-23 p40 サブユニットを共遺伝子導入した。条件培地を分析のために移動し、全変異体の発現を抗 His ウェスタンブロットにより確認した。予備的結合結果に基づき、変異体 M5、M7、M9 および M10 を選択し、同じトランスフェクションプロトコルで 2 L 規模にスケールアップした。野生型も 2 L にスケールアップした。スケールアップした 2 リットルの HEK 細胞で IL-23 の野生型および変異体を採取し、上清を濃縮し、10 kDa 膜を用いる接線流濾過により PBS に緩衝液を交換した。タンパク質を、次いで固定化ニッケル親和性クロマトグラフィーで精製した。野生型を 40 mM イミダゾールで溶出し、緩衝液をゲル濾過クロマトグラフィーを脱塩することにより PBS ($5.6 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.1 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 154 mM NaCl 、 $\text{pH } 7.4$) に交換した。野生型の純度は、SDS-PAGE で $> 95\%$ であることが決定された。変異体を 40 mM イミダゾールで洗浄し、500 mM イミダゾールで溶出した。溶出プールを、PBS ($7 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $3 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 130 mM NaCl 、 $\text{pH } 7.1$) に対して透析することにより緩衝液交換した。変異体の純度は、SDS-PAGE で $> 95\%$ であることが決定された。アラニンシェーブ変異誘発により同定された重要な残基での His タグ付 IL-23 p19 の単一アラニン変異体を、遺伝子合成により作製し、一過性トランスフェクションベクターにクローン化した。発現および精製は、親和性精製した M35A 以外、アラニンシェーブ変異体に準じた。

20

30

40

【0263】

IL-23 変異体の IL-23 p19 抗体に対する Biacore 結合分析

50

全7種のアラニン変異体(表27参照)の30mL 小規模発現の結合を、PBST(7mM Na_2HPO_4 、3mM NaH_2PO_4 、130mM NaCl 、0.05% Tween 20、pH 7.4)中、25℃でBiacore(登録商標)T100上の表面プラズモン共鳴(SPR、Biacore)により測定した。関連抗体および受容体を、CM5センサーチップ上の2000RUでのプロテインA固定化により約60RUのレベルで捕捉した。biAb3に加えて、MerckのIL-23 p19 mAb(7G10)およびSTELARA(登録商標)(IL-12/IL-23 p40 mAb)をドメイン結合の対照として使用した。さらに、IL-23の市販受容体hIL-23R-FcおよびhIL-12R 1-Fc(いずれもR&D Systemsから))を対照として使用した。上清をPBSTで1:5希釈し、30μL/分、mAb上または3分受容体表面に注入し、解離時間後、10mM グリシン、pH 2.0で再生した。分析前に、捕捉抗体がないプロテインAの対照表面に対する結合を全特異的結合曲線から減算した。図9に示す結果は注入の終了10秒前の応答を示す。

【0264】

Biacore結果は、IL-23アラニンシェーブ変異体がp40特異的抗体およびp19特異的IL-23受容体に対する結合を維持することを示す(恐らく受容体結合部位を描写するM8以外)。他のIL-23 p19 mAbおよびIL-12R 1-Fcの結合も行い、図9の結果と一致した。M5変異体は7B7 mAbへの結合の劇的な減少を示すが、M9およびM10は7B7 mAbへの結合の一部の減少を示す(図10参照)。M7は抗体または対照への結合にいかなる影響も示さない。それゆえに、これら4種の変異体をスケールアップおよび精製に選択し、IL-23 p19抗体に対する結合を喪失した3変異体(7B7抗体またはmAb、7B7 FabおよびbiAb3、その全て配列番号7に示す重鎖可変ドメインおよび配列番号9に示す軽鎖可変ドメインを有する)およびM7を対照として選択した。

【0265】

精製変異体のBiacore分析は、野生型および変異体IL-23を25nMに希釈し、1.5nMまで連続的に1:2までタイトレーションして減らした以外、上清と同じアッセイ形式を使用した。精製IL-23変異体で得られた全ての結果は、上清発現で得られたデータを確認した。データを1:1ラングミュア結合モデルに適合させ、図10および表28に示すKd値を決定した。IL-23 p19抗体(7B7抗体またはmAb、7B7 FabおよびbiAb3、その全て配列番号7に示す重鎖可変ドメインおよび配列番号9に示す軽鎖可変ドメインを有する)に対するM5結合で観察された参照の1-2RUを減算した結合を、M9およびM10の動態解析により決定した平均Rmaxを使用したBIASimulationソフトウェア2.1を使用して模倣した。親和性は330μMと概算され、表28に示すとおり野生型より1500倍弱いKdであった。

【表28】

表28：IL-23アラニン変異体結合IL-23 p19抗体のBiacore動態解析

	7B7 mAb			BiAb3	STELARA (登録商標)	Merck 7G10
変異体	Kd(nM)	Kdシフト(WTから)	$\Delta\Delta G(\text{kcal/mole})$	$\Delta\Delta G(\text{kcal/mole})$	$\Delta\Delta G(\text{kcal/mole})$	$\Delta\Delta G(\text{kcal/mole})$
WT	0.14	NA	NA	NA	NA	NA
M5	≥ 300	1500	4.6	3.8	0.1	1.9
M7	0.4	3	0.5	NM	0.1	0.2
M9	25	140	2.9	2.3	0.1	0.2
M10	43	230	3.2	2.3	0.3	0.4

【0266】

単一アラニン変異体のBiacore分析を、M 5、M 9 および M 1 0 アラニンシェーブ変異体により示された非線形エピトープを確認するために行った。3 個の線形領域 A、B および C におけるほとんどの単一アラニン変異体は、7 B 7 m A b または b i A b 3 に対する結合に変化を示さなかった。試験した 1 4 個中 3 個の I L - 2 3 の単一アラニン変異体のみが、1 kcal / mole を超える顕著な結合親和性減少を示した。アラニンシェーブ変異体 M 5、M 9 および M 1 0 で重複する重要な残基についての親和性および G 値を表 2 9 に示し、線形領域 B における 1 個の主要な残基および線形領域 A における 2 個の残基が I L - 2 3 p 1 9 抗体 - I L - 2 3 複合体の結合エネルギーに優勢に貢献することが示された。

【表 2 9】

表 2 9 : I L - 2 3 単一アラニン変異体結合 I L - 2 3 p 1 9 抗体のBiacore動態解析

	7 B 7 m a b			B i A b 3	STELARA(登録商標)	Merck 7 G 1 0
変異体	K d (nM)	K d シフト(WT から)	$\Delta \Delta G$ (kcal / mole)	$\Delta \Delta G$ (kcal / mole)	$\Delta \Delta G$ (kcal / mole)	$\Delta \Delta G$ (kcal / mole)
WT	0.14	NA	NA	NA	NA	NA
His53 (領域A)	0.2	0	0.2	0.2	0.3	0
Met 54 (領域A)	6.8	48	2.3	2.2	0.3	1.0
Asp55 (領域A)	9.6	68	2.5	2.3	0.5	0.7
Glu112 (領域B)	0.7	5	0.9	1.2	0.3	1.7
Leu116 (領域B)	46	330	3.4	3.0	0.5	0.2
Asp118 (領域B)	0.1	0	0	-0.4	-0.3	-0.3

【0267】

B a F 3 / h u I L - 2 3 R / h u I L - 1 2 R 1 トランスフェクタントにおける I L - 2 3 誘発 S T A T 3 リン酸化

マウス骨髄由来細胞株(B a F 3)にヒト I L - 2 3 R およびヒト I L - 1 2 R 1 を安定的に遺伝子導入し、完全長受容体およびクローン化した。S T A T 3 のリン酸化の I L - 2 3 誘発を、I L - 2 3 アラニンシェーブ変異体について E L I S A でモニターした。B a F 3 / h u I L - 2 3 R / h u I L - 1 2 R 1 (クローン 6) 細胞をアッセイ培地で 3 回洗浄し、96 ウェル丸底組織培養プレートに 50,000 細胞 / ウェルで播種した。B a F 3 / h u I L - 2 3 R / h u I L - 1 2 R 1 細胞は、S T A T 3 のリン酸化により I L - 2 3 に用量依存的方法で応答した。I L - 2 3 シグナル伝達の抗体阻害を評価するために、E C ₅₀ 濃度の 20 pM I L - 2 3 を 33 nM ~ 0.56 pM の各抗体の 3 倍連続希釈と前混合し、37 °C で 15 分、アッセイ培地でインキュベートし、細胞に添加した。プレインキュベーション後、処置剤を、細胞を含むプレートに 2 個ずつ添加し、37 °C で 15 分インキュベートして、S T A T 3 のリン酸化を刺激した。刺激を氷冷洗浄緩衝液添加により停止し、製造業者の指示に従い細胞を溶解した(Bio-Rad Laboratories 細胞溶解キット、Cat #171-304012)。製造業者の指示に従いリン酸化 S T A T 3 レベルを E L I S A (Bio-Rad Laboratories ホスホ - S T A T 3 (T y r 7 0 5) キット、Cat #171-V2 2552) により決定した。データを分析し、I C ₅₀ 値を GraphPad Prism 4 ソフトウェアを

使用して計算した。全 IL - 23 アラニンシェーブ変異体および全 IL - 23 アラニン単一変異体は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントでの pSTAT3 活性誘発に関して活性であり、wt IL - 23 (非タグ付およびタグ付)と同等な効力であった(表30)。IL - 23 アラニンシェーブ変異体誘発 pSTAT3 の biAb3、STELARA(登録商標)(IL - 12 / IL - 23 p40 mAb)およびMerckの IL - 23 p19 抗体(7G10)による阻害の結果を表31に示す。biAb3 は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントで、wt IL - 23 および IL - 23 M7 アラニンシェーブ変異体の生物学的活性を同等な効力で中和し、M9 および M10 を低い効力で中和するが、M5 の生物学的活性を中和しない。BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントで、STELARA(登録商標) IL - 12 p40 mAb は、wt IL - 23 および全 IL - 23 アラニンシェーブ変異体の生物学的活性を同等な効力で中和する。陽性対照Merck IL - 23 p19 mAb(7G10)は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントで、IL - 23、M7、M9 および M10 アラニンシェーブ変異体の生物学的活性を同等な効力で中和し、M5 の生物学的活性を中和しない。

【表30】

表30: BaF3 / huIL - 23R α / huIL - 12R β 1トランスフェクタントにおける IL - 23 アラニンシェーブ変異体に対する EC₅₀ 値および IL - 23 アラニンシェーブ変異体誘発 pSTAT3 の biAb3、STELARA(登録商標)(IL - 12 / IL - 23 p40 mAb)およびMerckの IL - 23 p19 抗体(7G10)阻害に対する IC₅₀ 値

抗体	wtIL-23	IL-23M5	IL-23M7	IL-23M9	IL-23M10
なし(EC ₅₀)	2.1 pM	2.6 pM	2.1 pM	3.3 pM	1.9 pM
biAb3	1.9 pM	NA	1.7 pM	240.0 pM	530.0 pM
STELARA(登録商標)	7.9 pM	6.2 pM	5.9 pM	6.7 pM	7.1 pM
Merck 7G10	38.0 pM	NA	31.0 pM	26.0 pM	35.0 pM

【0268】

単一 IL - 23 p19 変異(H53A、M54A および D55A)を構築し、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントにおける pSTAT3 を誘発する単一 IL - 23 p19 変異ポリペプチドを阻害する 7B7、STELARA(登録商標)(IL - 12 / IL - 23 p40 mAb)およびMerckの IL - 23 p19 抗体(7G10) (表31)の IC₅₀ 値を決定した。7B7 mAb は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントで、wt IL - 23 と比較して、IL - 23 アラニン単一変異体 H53A、E112A および D118A の生物学的活性を同等の効力で中和し、M54A および D55A 変異体は顕著に低い効力で中和し、L116A 変異体の生物学的活性を中和しない(表31)。STELARA(登録商標) IL - 12 p40 mAb は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントの wt IL - 23 と比較して、全 IL - 23 アラニン単一変異体の生物学的活性を同等の効力で中和する。Merck IL - 23 p19 mAb は、BaF3 / huIL - 23R / huIL - 12R 1トランスフェクタントで、中和しない IL - 23 E112A 変異体以外、全 IL - 23 アラニン単一変異体の生物学的活性を wt IL - 23 と比較して同等な効力で阻害する。

【表 3 1】

表 3 1 : B a F 3 / h u I L - 2 3 R α / h u I L - 1 2 R β 1 トランスフェクタントにおける p S T A T 3 の誘発に対して I L - 2 3 p 1 9 単一変異 (H 5 3 A、M 5 4 A および D 5 5 A) を阻害する、7 B 7、STELARA (登録商標) (I L - 1 2 / I L - 2 3 p 4 0 m A b) および Merck の I L - 2 3 p 1 9 抗体 (7 G 1 0) の I C₅₀ 値

抗体	IL-23 wt IC ₅₀ (nM)	IL-23 H 53A IC ₅₀ (nM)	IL-23 M5 4A IC ₅₀ (nM)	IL-23 D 55A IC ₅₀ (nM)	IL-23 E112A IC ₅₀ (nM)	IL-23 L 116A IC ₅₀ (nM)	IL-23 D 118A IC ₅₀ (nM)
7B7/biAb3	0.020	0.015	0.71	1.2	0.025	>3	0.012
STELARA(登録商標)p4 0	0.067	0.078	0.081	0.077	0.033	0.054	0.052
Merck 7G10	0.18	0.19	0.27	0.18	>3	0.24	0.22

10

【 0 2 6 9】

全てのこれらの結果をまとめると、I L - 2 3 の 7 B 7 m A b 阻害はアミノ酸残基 M 5 4、D 5 5 および L 1 1 6 を必要とするが、アミノ酸残基 H 5 3、E 1 1 2 または D 1 1 8 を必要としない。STELARA (登録商標) および Merck 抗体は、活性を失うことなく I L - 2 3 アラニン単一変異体 M 5 4 A、D 5 5 A および L 1 1 6 A を阻害できたため、I L - 2 3 M 5 4、D 5 5 および L 1 1 6 アラニン変異体で見られた活性喪失は 7 B 7 m A b および b i A b 3 に特異的であることが示唆される。

20

【 0 2 7 0】

I L - 2 3 変異体および 7 B 7 F a b 複合体のオリゴマー状態分析

ヘテロ二量体 I L - 2 3 変異体のオリゴマー状態および 7 B 7 F a b と複合体形成する能力を確認するために、タンパク質を、Shodex Protein KW-803 カラムで、200 mM K₂PO₄ (HCl で pH 6.8)、150 mM NaCl および 0.02 % ナトリウムアジドを含む緩衝液 (0.1 μm 濾過) 中、0.5 mL / 分の流速で、ダイオードアレイ吸光度検出器を備えた AGILENT (登録商標) 1100 シリーズ H P L C を使用して、分析的分子ふるいクロマトグラフィー (S E C - M A L S) 分離により試験した。Wyatt Technology MINIDAWNTM TREOS (登録商標) レーザー光散乱装置を H P L C の下流に、続いて Wyatt OPTILAB (登録商標) T-REXTM 示差屈折計を配管した。各 I L - 2 3 サンプル 60 μg を、10.3 μM 濃度で濾過後注入した。複合体形成について、60 μg の 7 B 7 F a b を 6 % モル濃度過剰で混合し、10.9 μM 濃度の I L - 2 3 タンパク質と、室温で 3 ~ 6 時間インキュベートし、クロマトグラフィー分離した。粒子を、スピンフィルター (NANOSEP (登録商標) MF、0.2 μm、Pall Corporation) を用いてタンパク質サンプルから除去し、注入した。データを ASTRA (登録商標) 6 (Wyatt) および Chemstation (Agilent) で分析した。全変異体は、野生型と同様、大部分単量体であった。M 5 変異体は、F a b とのプレインキュベーション後顕著な複合体形成を示さず、M 5 I L - 2 3 単独が溶出する場所に近接して溶出し、本実験の 10 μM 濃度範囲では、たとえ複合体が形成されたとしても、わずかな減少が示された。M 7 は複合体形成し、野生型と類似して溶出された。M 9 および M 10 変異体は、これらの濃度で複合体を形成したが、野生型より幾分子量が小さく、保持時間は野生型および M 7 よりわずかに遅く、7 B 7 に対するこれらの親和性が野生型および M 7 よりも弱いことが示唆された。14 種の単一アラニン変異体の S E C - M A L S 分析は、野生型に類似して、全てが大部分単量体であり、L 1 1 6 A 変異体のみが、遅くシフトされた溶出時間および複合体の予測質量のわずかな減少を示し、7 B 7 F a b に対する I L - 2 3 の親和性の減少が示唆された。これらの結果は、これらの L 1 1 6 A に対する K_d の Biacore シフトに一致する。D 5 4 A および M 5 5 A と F a b の複合体の親和性減少の影響は、このアッセイ条件下では解明できなかった。

30

40

50

【0271】

I L - 23 変異体の示差走査熱量測定

野生型および変異体 I L - 23 ヘテロ二量体の熱的安定性プロファイルを、MICROCAL(登録商標)VP-capillary DSC装置を使用して示差走査熱量測定(DSC)により測定した。PBS(7mM Na_2HPO_4 、3mM NaH_2PO_4 、130mM NaCl 、pH7.1)中の0.7mg/mlタンパク質サンプルを、10~100 で900/時間で走査し、得られたサーモグラムを緩衝液ブランク減算および当てはめ法に付した。各分子の変性は、2個のアフォールディング転移により特徴付けられ、各転移の適合させた転移中点(T_m)値は、野生型から1~4 以内であった。結果は、アラニンシェーブ変異体も、14種の単一アラニン変異体も、野生型に対して顕著な熱的不安定化を示さないことを示す。

10

【0272】

I L - 23 変異体のフーリエ変換赤外スペクトロスコピー(FT-IR)分析

I L - 23 のアラニンシェーブ変異体および野生型の二次構造比較を、路長~7 μm および632.8nmのNe-HeレーザーのCaF₂窓を用いるBiotools Prota FT-IR装置でFT-IRスペクトロスコピーを使用して行った。データを2 cm^{-1} の解像度で集め、Prota/Bomem-GRAMS/31 AIソフトウェアで分析した。各サンプルを2回ずつ測定し、方法変動性は約3%であった。二次構造内容物を、構造感受性であるためにアミドIピークを使用して計算した。ほぼ同等量の螺旋およびシートが、螺旋について1637 cm^{-1} のピークおよびシートについて1637 cm^{-1} のピークならびに1687 cm^{-1} のシヨルダーにより示されるとおり、全I L - 23 サンプルで観察された。全体として、野生型I L - 23と比較して、アラニンシェーブ変異体でFT-IRスペクトルおよび計算された二次構造結果に顕著な差は観察されなかった。

20

【0273】

I L - 23 変異体の円二色性(CD)分析

CDスペクトロスコピーを使用したI L - 23のアラニンシェーブ変異体および野生型の二次構造比較を、Jasco J-815分光光度計を使用して行った。スペクトルを、PBS pH7.1中、0.25mg/mL I L - 23 タンパク質濃度で、1mm路長セルを25 で使用して、300~190nmで0.1nmデータ間隔で、50nm/分走査速度、1nmバンド幅および2蓄積で回収した。全体的に、円二色性を使用して、野生型I L - 23と比較してアラニンシェーブ変異体で二次構造プロファイルに顕著な差は観察されなかった。

30

【0274】

I L - 23 変異体の核磁気共鳴(NMR)スペクトロスコピー分析

プロトンNMRは、原子について詳しく立体構造状態を評価することを可能にする、高度に感受性の技術である。1D ¹H NMRスペクトルが、各4種の変異体(M5、M7、M9、M10)および野生型I L 23 タンパク質が必要であった。全タンパク質を同時にNMR緩衝液(8% D₂O / 92% H₂O中PBS)に対して透析し、サンプル調製による潜在的差異を除いた。さらに、¹Hシグナル強度を、野生型スペクトルに対して規準化することによりタンパク質濃度差異について補正した。全NMRデータを、32 で600MHzで走査するBruker Avance 3スペクトロメーターで回収した。1D NMRスペクトルを、Watergate、WETおよびWaterフリップバック選択的励起パルススキームを使用して溶媒および添加物抑制について最適化した標準的ブルカー・パルス配列(ZG)を使用して獲得した。2048走査が、各スペクトルで平均したシグナルであった。コサイン2乗アポダイゼーションを、フーリエ変換前に適用し、一次多項式ベースライン補正を、ベースラインの外観の平坦化のために使用した。各タンパク質のスペクトルの各々の試験は、各変異体タンパク質が、スペクトルの高磁場(<0.5ppm)および低磁場(>6.5ppm)領域の両方で十分に分散した共鳴により証明されるとおり、適切に折りたたまれていた。高磁場メチル共鳴はインタクトな疎水性コアの存在を示し、低磁場アミドプロトンは、十分に形成された二次構造(アルファ螺旋およびベータシート)の存在を反映する。野生型I L 23のスペクトルとの比較は極めて近い適合を示し、アミノ酸置換により誘発されるタンパク質構造の大きな立体構造変化の存在を除外する。さらに、NMR結果はまたM5におけ

40

50

る活性の余分な喪失が、M5における変異部位での構造完全性の余分な大きな破壊により起こった可能性がないことも示す。M5は、M9よりも主成分分析で野生型タンパク質に相当近いという事実は、M9にない次のM5変異、すなわち、H53A、M54AおよびE112Aが、M5構造の破壊のほとんどの原因ではないことを示す。芳香族残基が除去された変異体M7およびM9で、主成分分析において、互いにもっと類似しているように見えることも観察された。全単一変異体は、D118AおよびM54A以外野生型と類似しているように見えたが、しかしながら他の対照は、これらの変異体が野生型に類似する安定性および活性を維持することを示した。

【0275】

IL-23エピトープ分析の要約

アラニンシェーブおよび単一変異誘発の方法を使用して、7B7 Fab、7B7抗体およびbiAb3に含まれる7B7 FabについてhIL-23のエピトープをマッピングした。タンパク分解性消化LCMS分析、ペプチド結合、水素/重水素交換マスペクトロメトリー、溶媒接触面積計算およびドッキングアルゴリズム計算により作成したエピトープ情報を使用して、標的変異誘発ストラテジーを行った。SPRによる小規模スクリーニングおよび選択精製変異体のスケールアップは、7B7/biAb3結合hIL-23に対する特異的エピトープを決定した。M5変異体は、7B7/biAb3への結合の劇的減少を示しながら、野生型と同等の機能的活性、p40およびp19特異的試薬への結合、単量体オリゴマー状態、熱的安定性および二次構造特性を維持した。M5変異体は、7B7/biAb3への結合の劇的減少を示したが、各々M5と同じ2個の変異残基を含むM9およびM10の各々は、7B7/biAb3への結合の部分的喪失を示した。M5 IL-23変異体の親和性は、7B7/biAb3に対して300nMであり、これは、野生型IL-23より約1,500倍弱く、M5変異体における残基が、IL-23への7B7/biAb3結合のエピトープを規定することを示す。それゆえに、データは、7B7/biAb3抗体がIL-23のp19サブユニット上の非連続的エピトープに結合することを示す。IL-23 p19上のこの非連続的エピトープは、少なくとも2個のエピトープ領域(領域A(配列番号6のアミノ酸残基33~59)および領域B(配列番号6のアミノ酸残基89~125))を含む。特異的に、IL-23 p19の第一エピトープまたは領域Aについて、配列番号6のアミノ酸残基54(Met)および55(Asp)が、7B7/biAb3がIL-23 p19に結合する能力について相当量の結合エネルギーに貢献する。IL-23 p19の第二エピトープまたは領域Bに関して、アミノ酸残基116(Leu)は、7B7/biAb3のIL-23 p19への結合能にエネルギー的に貢献する領域B内の主要残基である。

【0276】

実施例8

マーモセットEAEモデル

背景および原理

多発性硬化症(MS)は、脳および脊髄におけるミエリンの喪失により特徴付けられる、中枢神経系(CNS)の慢性自己免疫性、炎症性、神経変性疾患である。疾患開始の根底となるメカニズムは明らかには理解されていないが、多発性硬化症の臨床的進行に寄与する疾患経過は炎症、脱髄および軸索喪失または神経変性である。マクロファージおよびミクログリアがCNSの主免疫細胞である。これらの細胞ならびにT細胞、好中球、アストロサイトおよびミクログリアが、例えば、多発性硬化症の、免疫関連病理に貢献し得る。さらに、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質(MOG)および恐らく他のミエリンタンパク質を含む数個のミエリンタンパク質に対するT細胞反応性/自己免疫が、多発性硬化症の疾患状態および病理の誘発および持続化と関連付けられている。自己反応性T細胞とミエリンタンパク質のこの相互作用が、とりわけTNF-アルファ、IFN-ガンマおよびIL-17を含む炎症誘発性サイトカイン類の誘発を起こし得る。さらなる因果関係は、T細胞増殖、B細胞およびマクロファージ活性化、ケモカイン類および接着分子上方制御および血液

脳関門破壊である。次の病理はオリゴデンドロサイトおよび軸索の喪失および脱髄“プラーク”の形成である。プラークは、ミエリン鞘がもはや存在せず、脱髄軸索がグリア性瘢痕組織内に包埋されている病巣からなる。脱髄はまた自己抗体によるミエリン抗原の特異的認識およびオプソニン化と、続く補体および/または活性化マクロファージ介在破壊によっても起こり得る。進行性多発性硬化症において観察された不可逆性神経学機能障害を主に担うと考えられているのが、この軸索喪失および神経変性である。

【0277】

多発性硬化症(MS)は、疾患進行により特徴付けられる4タイプに分類される。

- (1)再発寛解型MS(RRMS)。RRMSは、再発(症状再燃の発作)と、続く寛解(回復の期間)により特徴付けられる。症状は軽度～重度の再発で変化し得て、寛解は数日または数ヶ月続き得る。MSを有する人の80%以上が再発寛解型サイクルで開始する。
- (2)二次性進行型MS(SPMs)。SPMsは、再発寛解型MSを有する人においてしばしば発症する。SPMsにおいて、再発および部分的回復は起こるが、身体障害はサイクルの間に消えない。その代わり、身体障害の着実な進行が発作のサイクルに取って代わるまで進行性に悪化する。
- (3)一次性進行型MS(PPMs)。PPMsは、発症時からゆっくりかつ着実に進行する。寛解期がなく、症状は一般に強度が下がることはない。MSを有する人の約15パーセントがPPMsを有する。
- (4)再発進行型MS(PRMs)。この相対的に稀なMSのタイプにおいて、寛解期の間に人は着実に悪化する症状と、発作の両方を経験する。

メイヨ・クリニック(インターネット上のサイトmayoclinic.org/multiple-sclerosis/types)。

【0278】

ヒト多発性硬化症の経過には、多くの臨床的および病理学的不均一性がある。症状はしばしば18～50歳の間に始まるが、何歳でも始まり得る。多発性硬化症の臨床症状は軽度視覚障害および頭痛から失明、重度運動失調および麻痺まで変わり得る。患者の大多数(約70～75%)は再発寛解型多発性硬化症を有し、疾患症状は、約数時間～数日間再発し、はるかに遅い回復が続き得て、寛解段階での症状の欠如は珍しくはない。再発および寛解の発生率および頻度は大きく変わり得るが、時間の経過と共に、回復期は不完全となり、発生が遅くなり得る。この場合の疾患のこの悪化は二次性進行型多発性硬化症と分類され、多発性硬化症患者の約10～15%で起こる。残りの10～15%の患者は一次性進行型多発性硬化症と診断され、疾患症状および身体的機能障害が疾患進行を通して、一定速度で進行する。

【0279】

IL-23およびIL-17のいずれも、多発性硬化症のヒトおよび、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を経験したマウスの中樞神経系で過剰発現される。EAEをミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)35-55ペプチド-またはプロテオリピドペプチド(PLP)に誘発したとき、マウスで過剰発現が観察される。さらに、IL-23/p19またはIL-17の中和は、マウスでEAE症状を改善させる(Park et al, Nat Immunol. 6:1133 (2005); and Chen et al, J Clin Invest. 116:1317 (2006))。

【0280】

方法

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)は、MSのある種の側面を再現する十分に特徴付けられ、再現性のある動物モデルである。EAEは、齧歯類およびコモンマーモセットのような非ヒト霊長類で誘発される。Genain, C. P. and Hauser, S. L., “Creation of a model for multiple sclerosis in *Callithrix jacchus* marmosets,” J. Mol. Med., 75: 187-197 (1997)。マーモセットEAEにおいて、動物を組み換えヒトミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(rHuMOG)で免疫化して、ヒト多発性硬化症と酷似した疾患の発症を誘発する。このモデルの公開された試験は、免疫原として完全フロインドアジュ

バント(CFA)に乳化したMOGを一回接種で使用している。公開された方法でマーモセットにEAEを誘発した我々の以前の試みは、MOG注射23～142日後の臨床症状の発症に至った(データは示していない)。このスケジュールは前臨床有効性試験には長すぎると考えたため、疾患を誘発するための初回刺激投与と、続く追加免疫を用いる修飾プロトコルを用いた。本実験で記載した刺激/追加免疫プロトコルを使用して、我々は、EAEのこの非ヒト霊長類モデルにおけるIL-17A/F結合エンティティおよびIL-23結合エンティティを有するサロゲート二重特異性抗体の活性を評価した。サロゲート二重特異性抗体は、biAb-1、biAb-2、biAb-3およびbiAb-4と同じIL-17A/F結合エンティティを有するが、biAb-3のIL-23結合エンティティとしてサロゲートIL-23結合エンティティを有するbiAbFabL(図2参照)であり、例えば、マーモセットIL-23p19に対して低い親和性を有する。したがって、代替IL-23結合エンティティをサロゲート二重特異性抗体に使用した。サロゲート二重特異性抗体において使用した代替IL-23結合エンティティは、図13および図14においてIL-23 mAbとして同定されたものと同じIL-23結合エンティティであった。

10

【0281】

EAE誘発のために、rHuMOG(BlueSky Biotech, Worcester, MA)を無菌PBSで0.66mg/mlに希釈し、5mg/mLの結核菌H37 RA(Difco # 231141)を含む不完全フロインドアジュバント(IFA, Sigma #F5506)の等量と乳化した。300μLの最終CFA/MOG混合物(0.33mg/mLのMOGおよび2.5mg/mLのH37 RA含有)を、各動物の剪毛した肩部分の2箇所注射した(150μL×2注射部位)。全マーモセットを、同じ日(0日目)にCFA/MOGで免疫化した。

20

【0282】

21日目に、動物に、剪毛した腰部/臀部の2注射部位に注射したIFA/MOGで追加免疫した(H37 RA無しで上記のとおり調製)。マーモセットを、刺激および追加免疫接種のためにケタミン(15mg/kg)IM注射により麻酔した。

【0283】

サロゲートIL-23/17AF bAb(IgG4.1k)を20mM コハク酸、150mMアルギニン緩衝液(pH5.6)で製剤した。投与を、CFA/MOGの刺激接種1日前に開始した。動物にプラセボ(PBS、SC、2回/週)またはIL-23/17AF bAb(7mg/kg、SC、2回/週)を与えた。他の処置群は、BMS-938790(IL-23アドネクチン; 3mg/kg、SC、2回/週)、ADX__PRD1651(IL-23/17ピネクチン(binectin)、10mg/kg、SC、2回/週)およびサロゲートIL-23 mAb IgG4.1(IL-23.15-g4P、9mg/kg、SC、2回/週)を含んだ。投与量を実験期間中、火曜日および金曜日に投与した。個々の体重を毎週記録し、動物に個々の体重に基づき投与した。全SC投与量を、側腹部にアルコールの局所塗布後投与した。投与毎に投与部位を変えた(左側または右側)。実験開始時の処置群は、8匹の動物/群から成った(雄雌混在)。動物は意識があり、薬物注射時は手で押さえた。

30

【0284】

疾患状態の視覚的評価を、12日目に開始して毎日行った。評価を行い、2名の研究者の合意により記録した。臨床スコアは、下の表32に記載するとおき、公開された疾患スコアの改変に基づいた。

40

【表 3 2】

表 3 2 : マーモセット E A E 臨床採点法
0 = 臨床徴候なし
0.5 = 覚醒減少 / 動作緩慢または食欲減退
1.0 = 体重減少 > 10 % (実験 0 日目の開始時体重)
1.5 = 一側性または両側性視覚障害、解離性注視異常
2.0 = 視力障害および / または平衡弱化、運動失調または異常歩調
2.5 = 前肢または後肢の不全単麻痺または不全対麻痺および / または感覚消失および / または脳幹症候群
3.0 = 片麻痺または対麻痺 (片側の後ろ半分の麻痺) (同時の 1 足および 1 手麻痺も含み得る)
4.0 = 四肢麻痺
5.0 = 瀕死または自然死

10

【 0 2 8 5 】

結果

群あたりの E A E 疾患の徴候 / 症状を有する動物の数は次のとおりであった。

群 A (P B S) : 7 匹中 5 匹のマーモセット (7 1 %) が E A E 様疾患および / または神経性機能不全を実験中の同じ点で示した。疾患症状は失明および麻痺から成った。

20

群 B (I L - 2 3 アドネクチン、 B M S - 9 3 8 7 9 0) : 6 匹中 1 匹のマーモセット (1 7 %) が E A E 様疾患を示した。疾患症状は進行性失明および麻痺から成った。

C 群 (I L - 2 3 / 1 7 ビネクチン、 A D X _ P R D 1 6 5 1) : 7 匹中 6 匹のマーモセット (8 6 %) が E A E 様疾患を示した。しかしながら、3 匹の動物は、E A E 徴候 / 症状の証拠が 1 日しか観察されなかった。

D 群 (I L - 2 3 m A b) : 6 匹中 3 匹のマーモセット (5 0 %) が E A E 様疾患を示した。失明が多かった。

E 群 (I L - 2 3 / 1 7 A F b A b) : 8 匹中 4 匹のマーモセット (5 0 %) が E A E 様疾患を示し、この 4 匹の動物中 3 匹は、“正”スコアが 1 日しか観察されない一過性症状であった。疾患は、ほとんど動作緩慢または動作緩慢のような軽度な症状から成った。

30

【 0 2 8 6 】

群 A (P B S) の疾患発生率と比較して、他の処置群の各々における疾患発生率の差異は統計学的に有意ではなかった ($p > 0.05$ 、フィッシャーの直接確率検定)。

【 0 2 8 7 】

本実験における動物の小サブセットは、E A E のより重度の徴候 / 症状を発症し、数匹のマーモセットは、予め決められたヒトエンドポイントに従うために安楽死が必要であった。安楽死を必要とした各群の動物数は次のとおりである：群 A (2) ; 群 B (1) ; C 群 (1) ; D 群 (0) ; E 群 (0)。

【 0 2 8 8 】

40

E A E 症状の結果、人的理由のために安楽死させた動物は、安楽死時に臨床的重症度スコア “ 4 ” を割り当て、群平均臨床的重症度スコアを計算する目的で、実験の残り期間も維持した。図 1 2 は、実験経過中の各群の平均臨床的重症度スコアを示す。群 A (P B S) は、実験の最後までにピークスコア約 1.6 に達した。他の全群は低い臨床スコアを示し、E 群 (I L - 2 3 / 1 7 A F b A b) が、E A E 疾患の何らかの徴候が明らかであった短い期間 (~ 1 週間) のみ示した。各群の限られた動物数および群内の E A E 疾患スコアの動物間可変性のために、群 A (P B S) と他の処置群の間のいずれの差も統計学的有意ではなかった (マンホイットニー U 検定)。

【 0 2 8 9 】

要約すると、この実験は評価した数種の化合物によるマーモセット E A E モデルの疾患

50

重症度の減少および疾患発生率の減少の傾向を示した。全体として、IL - 23 / 17 AF bAb (IgG4.1k) で処置した動物は、最も有益な結果を経験したと考えられるが(図12)、群間の差は統計学的有意ではなかった。IL - 23 / 17 AF bAb で処置した動物がIL - 23 mAbのみで処置した動物よりも良好に保護されるとの治験は、IL - 23 経路およびIL - 17 AF 経路両方のデュアルターゲティングが、多発性硬化症を含むが、これに限定されないこれらのサイトカイン経路が役割を有するヒト疾患の処置に大きな効果をもたらすことを示唆する。

【0290】

死後MRI

実験の最後に、生存していたマウスセットを剖検した。頭蓋冠を除去し、脳を、原位置でホルマリン中3週間固定した。白質および視索における病巣を評価するために、T2Wおよびプロトン密度MRI走査を、次のパラメータを使用して、72mm Quad RFコイルを用いるBruker Biospec 7Tシステムで行った：総走査時間 ~ 15 ~ 20分 / サンプル、23軸位像を集めた、TR / TE = 5000 / 20ms、スライス厚 = 1.2mm、FOV = 4cm、マトリクス = 256 × 256、面内解像度 = 156mm²。

【0291】

走査を審査し、半定量的解釈を、各群の動物の全MRI画像の審査後、3名の放射線科医の解釈の合意により行った。病巣採点法は、全脳を覆う白質における病巣数に基づいた。視神経採点法は、視索および神経における炎症を反映する腫脹およびシグナル強度増加に基づいた。

【0292】

全体として、媒体群と比較してIL - 23 / 17 AF bAb群で病巣負荷の有意な(p < 0.05)が観察された(図13)。視索スコアも、媒体と比較してIL - 23 / 17 AF bAb群で有意に減少した(図14)。他の処置群は、これらのMRI測定の内いずれでも媒体処置群と有意に異ならなかった。それゆえに、臨床疾患スコアに一致して、IL - 23 / 17 AF bAbで処置した動物群が、最低平均MRI値を有し、同様に、IL - 23 経路およびIL - 17 AF 経路両者のデュアルターゲティングがヒトにおける疾患の処置で大きな効果をもたらすことが示唆される。

【0293】

実施例9

IL - 17AおよびIL - 17Fエピトープマッピング

本実施例9に記載した分析は、biAb3(配列番号13に示す重鎖可変ドメインおよび配列番号9に示す軽鎖可変ドメイン)のIL - 17A / F結合エンティティが結合するIL - 17AおよびIL - 17Fのエピトープ残基の同定を目的とする。

【0294】

biAb3とマウス親(339.15.5.3)のエピトープ間の重要な差異を同定するための戦略は、変異体を分析するためのX線結晶解析、部位特異的変異誘発、インシリコ変異誘発ならびに結合および機能アッセイを利用する。biAb3のIL - 17A / F結合エンティティの重鎖可変ドメインは、クローン339.15.5.3、クローン339.15.3.6またはクローン339.15.5.3の重鎖可変ドメインのヒト化バージョンである。biAb3とクローン339.15.5.3、クローン339.15.3.6またはクローン339.15.5.3のIL - 17A / F結合エンティティの重鎖CDR残基は同一である。しかしながら、2個のmAbは、その重鎖可変ドメインフレームワーク領域が異なる。2個のmAbは異なる軽鎖を有し、それゆえに各mAbの軽鎖と接触するIL - 17の残基を本実験で焦点を当てた。

【0295】

X線結晶解析

IL17A Fab複合体およびIL17F Fab複合体の結晶解析を、エピトープ / パラトープ残基予測および埋没表面決定のための接触表面モデリングのための接触界面残基を決定するために実施した。三次元構造も、モデル化結晶構造複合体に基づくタンパ

10

20

30

40

50

ク質変異体エネルギー計算のために使用した。

【0296】

各抗体のF a bを大腸菌株B L 2 1(ヒト化339-134)またはB L 2 1 S t a r (B i A b)でクローン化し、ペリプラズムで発現させた。両者の精製は、I M A Cと続くS E Cを含んだ。I L - 17 AおよびI L - 17 Fを大腸菌株W 3 1 1 0で封入体として発現させ、再折りたたみし、その後数工程の精製を行った。

【0297】

b i A b 3(配列番号13の重鎖可変ドメインおよび配列番号15の重鎖C H 1ドメイン;および配列番号17の軽鎖)のI L - 17アーム由来のF a bおよび親のヒト化リード(ヒト化抗ヒトI L - 17 A / F抗体339-134 m A b(配列番号65および配列番号67)由来のF a bを、ヒトI L - 17 AまたはI L - 17 Fと複合体化した。I L - 17 AまたはI L - 17 FとB i A b 3およびヒト化抗ヒトI L - 17 A / F抗体339-134 m A bの複合体形成をS E Cでモニターした。

【0298】

各4種の複合体の共結晶を、広範なスクリーニングと続く結晶化条件の最適化により作製した。各サンプルのデータセットを、A P S L S - C A Tビームラインで集めた。

【表33】

表33-X線結晶解析データセット解像度の要約

複合体	解像度
I L - 17 A A 2 9 9 9 F / 親 F a b A 3 0 5 2 F	2.85 Å
I L - 17 F A 2 7 6 8 F / 親 F a b A 3 0 5 2 F	3.75 Å
I L - 17 A A 2 9 9 9 F / リード F a b A 3 1 8 5 F	3.4 Å
I L - 17 F A 2 7 6 8 F / リード F a b A 3 1 8 5 F	4.25 Å

【0299】

各構造を、CCP4 suiteのPhaser MRを使用した分子置換により決定した。I L - 17 A 検索モデルはPDB ID 2VXS由来であった。I L - 17 F 検索モデルはPDB ID 1JPYから取った。各F a bについて、検索モデルを、超可変ループを欠失させたPDB ID 3IDX由来のヒト化F a bを使用して定常ドメインおよび可変ドメインについて作製した。最終モデルを、CootにビルドしたREFMAC5および手動モデルにおける繰り返しの精密化の後に得た。さらに、Autobusterでのさらなる精密化および地図作製を、低解像度構造の全てのモデル構築および精密化のために行った。データ採取および精密化のための結晶学的な統計を、表34にヒト化親F a b構造についておよび表35にヒト化リードF a b構造について示す。各構造を、社内サーバーで起動させるためにダウンロードしていたMolProbityを使用して、配置について評価した。

【0300】

【表 3 4】

表 3 4 : I L - 1 7 A または I L - 1 7 F と複合体化したヒト化親 F a b A 3 0 5 2 F の結晶学的な統計

	IL-17A/親Fab A3052F		IL-17F/親Fab A3052F	
	全体的	最高シエル	全体的	最高シエル
結晶番号	238318e7		238699f10	
ユニーク番号	oyg0-1		apa7-6	
採取日	2012年11月1日		2012年12月8日	
$\Delta \phi$	0.5°		1.0°	
画像	71-260(95°)		1-180(180°)	
波長	0.97856 Å		0.97856 Å	
間隙群	P3 ₂ 21		C2	
単位セル	a=b=141.9 Å, c=91.2 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$		a=226.1 Å, b=62.3 Å, c=117.3 Å $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 104.4^\circ$	
溶媒含量	70%		60%	
V _m	4.1 Å ³ /Da		3.1 Å ³ /Da	
解像度	50-2.85 Å	2.91-2.85	50-3.75 Å	3.84-3.75
I/σ	18.2	2.3	16.7	2.0
完全性	99.1%	99.3%	97.4%	97.2%
R _{merge}	0.062	0.538	0.066	0.709
多重度	5.9	6.0	3.4	3.5
反射	24,828	1821	16,223	1198
収縮性	0.4		0.3-0.8	
精密化				
R	0.269		0.251	
R _{free}	0.309		0.300	
バリデーション				
ラマチャンドラン有利	91.9%		86.8%	
ラマチャンドラン外れ値	1.0%		3.6%	
回転異性体外れ値	3.2%		10.3%	
衝突スコア	3.78(100 th)		10.08(97 th)	
Molprobitryスコア	2.04(99 th)		2.92(91 st)	

【 0 3 0 1】

【表 3 5 - 1】

表 3 5 : 単独または IL-17A もしくは IL-17F と複合体化したヒト化リード Fab A3185F の結晶学的な統計

	リード Fab A3185F		IL-17A/リ ード Fab A3 185F		IL-17F/リ ード Fab A3 185F	
	全体的	最高シエル	全体的	最高シエル	全体的	最高シエル
結晶番号	243072a6		240719f6		238860g7	
ユニーク 番号	koc5-3		jsm6-5		cum1-2	
ビームライン	APS 21 I D-D		APS 21 I D-D		APS 21 I D-G	
採取日	2013年4月 18日		2013年4月 18日		2012年11 月30日	
$\Delta \phi$	1.0°		1.0°		0.5°	
画像	1-257(257 °)		1-180(180 °)		1-180(180 °)	
波長	0.93005 Å		0.93005 Å		0.97856 Å	
間隙群	C2		C22 ₁		P2 ₁	
単位セル	a=92.1 Å, b=60.1 Å, c=73.0 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 94.9^\circ$		a=54.6 Å, b=83.6 Å, c=248.9 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$		a=115.0 Å, b=61.8 Å, c=124.9 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 92.3^\circ$	
溶媒含量	39%		51%		64%	
V_m	2.0 Å ³ /Da		2.5 Å ³ /Da		3.4 Å ³ /Da	

10

20

30

【表 3 5 - 2】

解像度	50-2.1 Å	2.14-2.10 Å	50-3.4 Å	3.48-3.40 Å	50-4.25 Å	4.35-4.25 Å
I/σ	13.2	3.9	18.6	3.1	13.7	2.8
完全性	99.6%	99.4%	98.1%	97.5%	98.2%	98.9%
R _{merge}	0.108	0.450	0.090	0.583	0.066	0.556
多重度	5.2	5.3	4.5	4.9	3.6	3.7
反射	23,262	1708	9200	653	12,522	931
ゆがみ	0.3		0.5		0.3	
精密化						
R	0.175		0.243		0.285	
R _{free}	0.227		0.313		0.347	
バリデーション						
リマウントラン 有利	97.3%		94.1%		92.5%	
リマウントラン 外れ値	0.0%		0.8%		1.4%	
回転異性 体外れ値	0.8%		5.3%		4.4%	
衝突スコア	2.91(99 th)		3.40(100 th)		3.98(100 th)	
Molprobit スコア	1.22(100 th)		2.08(100 th)		2.14(100 th)	

10

20

【 0 3 0 2 】

各 F a b は、主に I L - 1 7 ホモ二量体の主に一半部位に、主にその重鎖を介しておよび程度は少ないが軽鎖を介して結合した。ヒト化親およびヒト化リード F a b の結合の差異は、ヒト化リード F a b の高い親和性と一致するように見える。

30

【 0 3 0 3 】

全体的に、I L - 1 7 / B M S F a b 複合体の各々は同じ全体的構造を示し、1 個の F a b が主に I L - 1 7 ホモ二量体の一半部位を認識した(図 1 5)。それゆえに、結合化学量論は、結晶学上 2 個の F a b 対 1 個の I L - 1 7 ホモ二量体(または 2 個の F a b 対 2 個の I L - 1 7 プロトマー)であることが示される。インターロイキンとの相互作用の大部分は、重鎖と、抗体 - 抗原相互作用の心臓部を形成する超可変ループ 3 (または相補性決定領域 C D R 3)との間で形成される。さらに、重鎖の C R D 2 の数個の残基がインターロイキンと相互作用する。重鎖の C D R 1 は、インターロイキンと意味のある相互作用はしないように見える。軽鎖について、C D R 3 は、I L - 1 7 の認識に参与する。軽鎖の C D R 1 も弱い、長距離の結合相互作用を提供するように見える。

40

【 0 3 0 4 】

結晶構造配位を使用して、先に記載されたとおり接触界面を定義し(S. Sheriff., "Some Methods for Examining the Interaction between Two Molecules," Immunomethods, 3:191-196 (1993))、そこでは、接触残基を規定する最小の定義は、CONTACSYM のプログラムから導いた(Sheriff, S., Hendrickson, W.A., and Smith, J.L. (1987). Structure of Myohemerythrin in the Azidomet State at 1.7/1.3 Resolution. J. Mol. Biol. 197, 273-296)。相互作用により少なくとも一部埋没している残基を規定する接触面の定義は、プログラム MS から導いた(Connolly, M.L. (1983). Analytical Molecular Surface Calculation. J. Appl. Crystallogr. 16, 548-558)。

50

【表 3 6】

表 3 6 : 複合体の接触および埋没接触面残基

IL17タイプ	IL17A(配列番号2)		IL17F(配列番号4)			
mAbタイプ	ヒト化親	ヒト化リド	ヒト化親		ヒト化リド	
解像度	2.85 Å	3.4 Å	3.75 Å		4.2 Å	
鎖			A	B	A	B
		Asn 75	Asn 83		Asn 83	Asn 83
	Ala 92	Ala 92	Ala 100	Ala 100	Ala 100	Ala 100
	*Lys 93	*Lys 93	*Gln 101	*Gln 101	*Gln 101	*Gln 101
	*Cys 94	*Cys 94	*Cys 102	*Cys 102	*Cys 102	*Cys 102
	*Arg 95	*Arg 95	*Arg 103	*Arg 103	*Arg 103	*Arg 103
	*His 96	*His 96	*Asn 104	*Asn 104	*Asn 104	*Asn 104
	*Leu 97	*Leu 97	*Leu 105	*Leu 105	*Leu 105	*Leu 105
	*Gly 98					Gly 106
	Asp 103					
				Lys 113	Lys 113	
	*Val 106	Val 106	*Glu 114	*Glu 114	*Glu 114	Glu 114
	Asp 107	Asp 107	Asp 115	Asp 115	Asp 115	Asp 115
	*Tyr 108	*Tyr 108	*Ile 116	*Ile 116	*Ile 116	*Ile 116
	*His 109	*His 109	Ser 117	*Ser 117	*Ser 117	*Ser 117
					Met 118	Met 118
	*Asn 111	*Asn 111	*Asn 119	*Asn 119	*Asn 119	*Asn 119
	*Ser 112	*Ser 112	*Ser 120	*Ser 120	*Ser 120	*Ser 120
	*Val 113	*Val 113	*Val 121	*Val 121	*Val 121	*Val 121
	*Pro 114	*Pro 114	Pro 122	Pro 122	*Pro 122	*Pro 122
			*Gln 124	Gln 124		*Gln 124
	Ser 141	Ser 141	Thr 149	Thr 149	Thr 149	Thr 149
	Val 147	*Val 147	Val 155	Val 155	Val 155	
		Thr 148	Thr 156	Thr 156	Thr 156	Thr 156
	*Pro 149	*Pro 149	*Pro 157	*Pro 157	*Pro 157	*Pro 157
	*Ile 150	*Ile 150	*Val 158	*Val 158		Val 158
	*Val 151	*Val 151				
	His 152	*His 152				
	His 153	His 153				

アスタリスク(*)を付した残基は、複合体接触面で接触する。

アスタリスクのない残基は、複合体接触界面で完全に埋没する。

【 0 3 0 5 】

F a bとIL - 1 7 A(配列番号2)の主相互作用は、残基L 9 7およびH 1 0 9 ~ N 1 1 1の残基のストレッチであるように見える(図15)。I 1 0 0、G 9 8、N 1 1 1、S 1 1 2、V 1 1 3およびP 1 1 4は、IL - 1 7 AおよびIL - 1 7 Fで保存されている(配列番号2またはIL - 1 7 Aのアミノ酸残基I 1 0 0、G 9 8、N 1 1 1、S 1 1 2、V 1 1 3およびP 1 1 4は、配列番号4またはIL - 1 7 Fのアミノ酸残基I 1 0 8、G 1 0 6、N 1 1 9、S 1 2 0、V 1 2 1およびP 1 2 2に対応する)。それゆえに、この初期構造を得た後、ヒト化親F a b A 3 0 5 2 Fが、IL - 1 7 Aで見られたものと本質的に同じ方法でIL - 1 7 Fに結合すると予測した。しかしながら、これらの残基付近に、IL - 1 7 AのK 9 3(1 7 FのQ 1 0 1)、IL - 1 7 AのH 9 5(1 7 FのN 1

10

20

30

40

50

04)、IL-17AのY108(17FのI116)およびIL-17AのH109(17FのS117)のようなIL-17A(配列番号2)とIL-17F(配列番号4)で異なる数残基がある。IL-17A(配列番号2)のC末端もまた残基P149およびI150を介してFabと結合するように見え、これらの残基はIL-17F(配列番号4)の残基P157およびV158に対応する。しかしながら、IL-17AとIL-17Fの差異は、全体的抗体-抗原相互作用を顕著に変えるとは予測されなかった。

【0306】

2.85 解像度のヒト化親Fabとの比較において、3.4 解像度のヒト化リードFabは、同じ重鎖配列により予測されるとおり、重鎖とインターロイキンの間の極めて類似した相互作用を示した。対照的に、これら2種のFabの軽鎖は完全に異なり、予想どおり、これらの残基は、異なる方法でインターロイキンと統合した。biAb Fabは、CDR3の残基が1個少なく、それにより、ループがインターロイキン上を伸びることが可能となり、biAb FabのG93の主鎖酸素(配列番号9のG93または配列番号27のG4)が、配列番号2(IL-17A)のY108の主鎖窒素と直接水素結合を形成することが可能となる。同じ原子(ヒト化親Fabにおける配列番号67のN91の主鎖酸素)は、親Fabにおける位置から2.3 離れ、インターロイキンと水素結合することが不可能であった。さらに、WNからYGへの変化は、CDR1のY33(配列番号9のY33)が、低親和性親Fabにおけるその位置に対して5.1 近くインターロイキンに接近でき、それによりIL-17A(配列番号2)のH109とさらなるパッキング相互作用を得る。最終的に、biAb FabのY96(配列番号9のY96)は、重鎖のN106(配列番号13のN106)と水素結合を形成でき、インターロイキン(IL-17A)のY108(配列番号2のY108)主鎖酸素との水素結合での整列を可能とする。全体として、biAb FabのCDR3の接触面におけるこれらの変化はその高親和性と一致し、下に示すとおり部位特異的変異誘発により試験している。

【0307】

不運なことに、結晶構造は、マウス親FabとIL-17AまたはIL-17Fからなる複合体で得られなかった。これは、これらの複合体の相互作用の最適化の条件が、ヒト化親およびリードFabの好結果の結晶化に使用したものと異なることを示唆する。

【0308】

個々の残基接触の解釈に加えて、インターロイキンに結合するヒト化親FabとbiAbの差異の他の指標を、IL17/Fab複合体の相互作用領域により埋没した総表面積の計算によりキャプチャーできる。この分析は、最高解像度であり、最も信頼性のある比較ができるはずであるため、IL-17A Fab複合体のMSアルゴリズムを使用して、実施した。IL-17Fを伴う2個の構造は3.5 を超え、この分析で信頼性があるとは見なされなかった。親Fabは、IL-17A上で720²埋没し、一方biAb Fabは820²埋没した(表37参照)。表面積のこの差異(100²)は、IL-17Aに対するリードAbの増加した測定結合親和性により支持される。興味深いことに、多くのアミノ酸について伸長側鎖配座による表面積は100²未満である(A、N、D、C、G、L、P、S、T、V)(Atlas of Protein Side-Chain Interactions V1. Singh and Thornton 1992, 6-11参照)。したがって、この測定全体で、リードと親構造のIL-17A上の結合エピトープ差異は、約1残基当量というべきである。

【表37】

表37：表面積

	複合体	
	IL-17A/親	IL-17A/リード
解像度	2.85 Å	3.4 Å
IL-17A上の埋没	720	820
FAB上の埋没	740	830

10

20

30

40

50

【 0 3 0 9 】

アラニンシェーブ変異体のコンピューターによるエピトープ予測および設計

親およびリード F a b の結合動態に対する I L - 1 7 A および I L - 1 7 F エピトープ残基の異なる貢献を詳細に特徴付けるために、X 線結晶解析により同定した結合接触面における残基を、ヒト親 m A b および b i A b の結合差異をさらに区別化するために部位特異的変異のために選択した。

【 0 3 1 0 】

一分子上の個々のおよび複数変異の選択のために多様な基準を用いて、試験用の代表的および情報的変異体の組を選択した。上に記載した I L - 1 7 A / 親 F a b、I L - 1 7 F / リード F a b の結晶構造を、変異すべき残基の選択の情報のために使用した。リガンド - F a b 相互作用接触面の残基を選択したが、F a b 軽鎖残基と接触している残基に焦点を当てた。1 個の F a b では結晶構造の定義が不十分であるが、他では十分である領域も、親対 b i A b との複合体内の残基移動度における差異を示唆し得るために、選択した。さらに、相同 I L - 1 7 A / F 残基が異なる残基位置も、F a b 結合の変化に対する耐容性を示し得るためまたは親および b i A b F a b に対する異なる結合親和性に貢献し得るために選択した。接触面を、親対 b i A b F a b との複合体におけるエネルギー差異を探すために、提案された変異体を用いてモデル化した。接触残基群(アラニンシェーブ変異体)を併せて、結合親和性に相加的または相乗的变化を有する変異体を作製した。実験的分析のために製造した各インターロイキンの変異体を表 3 8 および 3 9 に示す。

【 0 3 1 1 】

【表 3 8】

表 3 8 : I L - 1 7 A 変異体

I L 1 7 A - W T	配列番号 2 の残基 2 4 ~ 1 5 5
I L 1 7 A - M 1	N 1 0 5 A、Y 1 0 8 A、H 1 0 9 A
I L 1 7 A - M 2	L 9 7 A、Y 1 0 8 A、N 1 1 1 A
I L 1 7 A - M 3	K 6 1 A
I L 1 7 A - M 4	K 6 1 A、S 6 4 A、R 6 9 A
I L 1 7 A - M 5	N 1 0 5 A
I L 1 7 A - M 6	Y 1 0 8 A
I L 1 7 A - M 7	H 1 0 9 A
I L 1 7 A - M 8	V 1 0 6 A、D 1 0 7 A
I L 1 7 A - M 9	I 1 5 0 A、V 1 5 1 A
I L 1 7 A - M 1 0	Y 1 0 8 A、H 1 0 9 A、V 1 5 1 A、H 1 5 2 A
I L 1 7 A - M 1 1	Y 1 0 8 A、V 1 5 1 A
I L 1 7 A - M 1 2	H 1 0 9 A、I 1 5 0 A、H 1 5 2 A

【 0 3 1 2 】

【表 3 9】

表 3 9 : I L - 1 7 F 変異体

I L 1 7 F - W T	配列番号 4 の残基 3 1 - 1 6 3
I L 1 7 F - M 1	L 1 0 5 A、I 1 1 6 A、N 1 1 9 A
I L 1 7 F - M 2	K 1 1 3 A、E 1 1 4 A、I 1 1 6 A
I L 1 7 F - M 3	S 6 9 A、R 7 2 A、R 7 7 A
I L 1 7 F - M 4	S 6 9 A
I L 1 7 F - M 5	R 7 2 A
I L 1 7 F - M 6	K 1 1 3 A
I L 1 7 F - M 7	E 1 1 4 A
I L 1 7 F - M 8	I 1 1 6 A
I L 1 7 F - M 9	D 1 1 5 A、S 1 1 7 A
I L 1 7 F - M 1 0	V 1 5 8 A、I 1 5 9 A

10

【 0 3 1 3】

I L - 1 7 A および F エピトープマッピングアラニン変異体のクローニングおよび発現

I L - 1 7 A および I L - 1 7 F の変異体構築物を遺伝子合成により製造し、H E K 2 9 3 - 6 E 細胞での発現のために一過性トランスフェクションベクターにクローン化した。 1×10^6 細胞 / ml の 3 0 mL 培養物の H E K 2 9 3 - 6 E 細胞に、発現プラスミド / P E I 複合体を遺伝子導入し、細胞をトランスフェクション 1 2 0 時間後に採取した。

20

【 0 3 1 4】

I L - 1 7 A および F 変異体のBiacore濃度分析

H E K 採取上清における I L - 1 7 A および I L - 1 7 F の各アラニン変異体の濃度を、抗 h i s F a b Biacoreセンサー表面上の捕捉レベルにより定量した。プロテイン A および h u I g G 表面も、上清の非特異的結合を評価するための対照として固定化した (非特異的結合は観察されなかった)。各上清の濃度を、 $80 \mu\text{g/mL}$ ~ $0.039 \mu\text{g/mL}$ の範囲の精製 I L - 1 7 A - h i s または I L - 1 7 F - h i s の標準曲線を使用して定量した。検量線を、 $0.3125 \sim 0.0039 \mu\text{g/mL}$ のデータについて線形曲線に適合させた。上清を 1 : 2 0、1 : 6 0 および 1 : 1 8 0 希釈で流し、標準曲線の線形範囲での複数測定を可能とした。

30

【 0 3 1 5】

I L - 1 7 A 変異体 8 の発現は有意に減少した (野生型の発現レベルのわずか約 1 0 %) 。 I L - 1 7 F 変異体 M 2、M 3、M 7 および M 9 の発現は有意に減少していた。 I L - 1 7 F の M 9 変異体は実質的に検出不可能であり、 I L - 1 7 F M 2 および M 7 変異体は、野生型発現レベルの 5 % 未満であった。

【表 40】

表 40：HEK上清における IL-17A および IL-17F 構築物の発現レベル

IL-17 変異体	$\mu\text{g}/\text{mL}$ HEK 上清における発現レベル
IL17A-WT	7.2
IL17A-M1	6.3
IL17A-M2	13.0
IL17A-M3	15.3
IL17A-M4	18.6
IL17A-M5	10.3
IL17A-M6	11.7
IL17A-M7	12.4
IL17A-M8	0.6
IL17A-M9	13.6
IL17A-M10	14.8
IL17A-M11	13.2
IL17A-M12	12.1
IL17F-WT	13.6
IL17F-M1	16.2
IL17F-M2	0.3
IL17F-M3	1.4
IL17F-M4	12.2
IL17F-M5	6.8
IL17F-M6	7.1
IL17F-M7	0.3
IL17F-M8	10.3
IL17F-M9	<0.1
IL17F-M10	15.0

【0316】

IL-17 バイオアッセイ (NIH / 3T3 / KZ170 NF - B ルシフェラーゼレポーターアッセイ)

マウス線維芽細胞株 (NIH / 3T3、ATCC# CRL-1658) に KZ170 と命名された NF - B ルシフェラーゼレポーターを安定に遺伝子導入し、クローンアウトした (cloned out)。NIH / 3T3 / KZ170 クローン 1 細胞を、10,000 細胞 / ウェルで、96 ウェル白色不透明ルシフェラーゼプレートに添加し、一夜、37 でインキュベートした。翌日、Biacore 決定濃度を使用した、組み換えヒト IL-17A、IL-17F、IL-17A アラニン変異体および IL-17F アラニン変異体の連続希釈をアッセイ培地中に調製し、細胞を入れたプレートに添加し、37 で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解し、Berthold Centro XS³ Luminometer で、製造業者の指示に従いフラッシュ基質を使用して測定した。平均蛍光強度の増加 (NF - B ルシフェラーゼレポーター活性化による) は IL-17A または IL-17F 受容体 - リガンド相互作用の指標であった。EC₅₀ (50% 有効濃度) 値を、IL-17A および IL-17F アラニン変異体について各 GraphPad Prism^(登録商標) 4 ソフトウェアで計算した。

【0317】

IL-17A 変異体の全て細胞機能的活性を示したが、幾つかは、野生型に対して活性が数倍喪失した (図 16)。M3 以外の全 IL-17F 変異体は、細胞機能的活性を示した

が、変異体中3種(M2、M5、M10)は活性の有意な減少を示した(図17)。

【0318】

B i A b 3 および他の関連抗体への結合についての I L - 1 7 A および F 変異体のBiacore結合分析

Biacore結合アッセイで使用した抗体は、b i A b 3 (配列番号7に示す重鎖可変ドメインおよび配列番号9に示す軽鎖可変ドメイン)およびマウス親抗体339.15.5.3(339.15.3.5および339.15.3.6と同じ可変領域配列を含む)であった。ISOSTRIP Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit(Roche, Indianapolis, IN, USA)を使用したアイソタイピングは、339.15.5.3抗体がヒト化に使用した339.15.3.5と同様 I g G 2 a / カッパであることを証明した。配列またはアイソタイプ差異は、339.15.3.5および339.15.5.3の間で測定されなかった。

10

【0319】

全12種の I L - 1 7 A および10種の I L - 1 7 F アラニン変異体の30mL発現からの上清およびそれぞれの野生型対照上清の結合(表41および表42参照)を、H B S - E P (10mM H E P E S、3mM E D T A、150mM N a C l、0.05% T w e e n 20、pH7.4)中、Biacore T100で25の表面プラズモン共鳴(SPR、Biacore))により測定した。関連抗体および受容体は、C M 5 センサーチップ上に3000RUで固定化されたプロテインAにより約150~250RUレベルで捕捉された。b i A b 3 および親 m A b (339.15.3.5)に加えて、他の抗 I L - 1 7 m A b をドメイン結合の対照として使用した。さらに、I L - 1 7 A の市販受容体を対照として使用した。h I L - 1 7 R A - F c (R&D Systemsから)、しかし、適切な I L - 1 7 R C 試薬はこのアッセイについて同定されなかった。上清を抗 h i s 定量決定濃度に基づき、9nM濃度に H B S - E P で希釈し、1:3連続希釈し、30μL/分でm A b 上または受容体表面に90秒注入し、解離時間後、10mM グリシン、pH1.5で再生した。I L - 1 7 A M 2 および I L - 1 7 F M 1 も、b i A b 捕捉表面で結合シグナルがわずかししか観察されなかったかまたはまったく観察されなかったため、高濃度(上清の発現レベルで400~500nM範囲)で流した。分析前に、捕捉抗体がないプロテインAの対照表面に対する結合を全特異的結合曲線から減算した。全滴定曲線を1:1ラングミュア結合モデルに適合させ、図18および表41および42に示すKD値を決定した。

20

【0320】

Biacore結果は、I L - 1 7 A 変異体M1、M2、M6、M10およびM11がB i A b に対する結合親和性の減少を示し、親抗体と比較して結合エピトープ差異に寄与する残基を含むことを証明した。これらの変異体のほとんどは、恐らく、受容体結合部位が変えられているために、I L - 1 7 R A - F c に対する結合で3~15倍の減少(M1では45倍)を示した。しかしながら、細胞性潜在力は、B i A b 3 相互作用に影響を受けた全変異体で数倍以内で維持され、これらの受容体破壊が機能のために重要ではないことを示唆した。

30

【0321】

I L - 1 7 F 変異体M1、M2、M7およびM8は、b i A b に対する結合親和性の減少を示したが、しかしながらこれらの同じ変異体は、親抗体に対する結合親和性の同等な減少を示し、I L - 1 7 A における親とb i A b の間のエピトープ変化がI L - 1 7 F に翻訳されないことを示す。これらの4種の変異体は、細胞機能アッセイにおいて野生型 I L - 1 7 F と同様の能力を維持したが、しかしながら他の変異体の多くはそうではなく、これは我々の I L - 1 7 F 変異誘発の解明を制限した。

40

【0322】

【表 4 1】

表 4 1: I L - 1 7 A アラニン変異体結合 b i A b 3 およびマウス親抗体のBiacore動態解析

変異体	b i A b 3			マウス親		
	Kd(nM)	Kdシフト(WTから)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mole)	Kd(nM)	Kdシフト(WTから)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mole)
WT	0.05	なし	0	0.03	なし	0
M1	0.23	4.5	0.9	0.02	なし	-0.3
M2	>1uM	>20,000	>5.9	>1uM	>35,000	>6.2
M3	0.05	なし	0	0.02	なし	-0.4
M4	0.09	2	0.4	0.02	なし	-0.3
M5	0.04	なし	-0.2	0.01	なし	-0.9
M6	0.11	2.2	0.5	0.02	なし	-0.3
M7	0.04	なし	-0.2	0.01	なし	-0.4
M8	0.05	なし	0	0.03	なし	0.1
M9	0.04	なし	-0.1	0.01	なし	-0.4
M10	0.3	5.7	1.0	0.02	なし	-0.3
M11	0.11	2.2	0.5	0.01	なし	-0.4
M12	0.06	なし	0.1	0.02	なし	-0.3

【 0 3 2 3 】

【表 4 2】

表 4 2: I L - 1 7 F アラニン変異体結合 b i A b 3 およびマウス親抗体のBiacore動態解析

変異体	b i A b 3			マウス親		
	Kd(nM)	Kdシフト(WTから)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mole)	Kd(nM)	Kdシフト(WTから)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mole)
WT	0.08	なし	0	0.005	なし	0
M1	>1uM	>12,000	>5.6	>1uM	>100,000	>7.3
M2	0.7	9.0	1.3	0.01	2	0.5
M3	0.15	2.0	0.4	<0.001	なし	-1.3
M4	0.08	なし	0	<0.001	なし	-0.8
M5	0.11	なし	0.2	<0.001	なし	-2.1
M6	0.08	なし	0	<0.001	なし	-1.6
M7	0.55	7.0	1.2	0.03	5.9	1.1
M8	0.2	2.5	0.6	0.02	3.7	0.8
M9	NM	NM	NM	NM	NM	NM
M10	0.09	なし	0	<0.001	なし	-1.6

N M - 変異体が検出可能レベルで発現されなかったため測定せず。

【 0 3 2 4 】

インシリコ変異誘発

エネルギー分析を I L - 1 7 A - 親 F a b、I L - 1 7 A - リード F a b および I L - 1 7 F - リード F a b で行った。複合体の X 線構造が不完全であったため、タンパク質モデリングを使用して、標準的のプロトコルを使用した欠損アミノ酸側鎖において構築することにより構造モデルを完全にした(Maestro protein preparation wizard and Prime side

chain modeling)。構造モデルを使用して、野生型タンパク質(I L - 1 7 AまたはI L - 1 7 F)または変異体I L - 1 7 分子とF a bの相互作用エネルギーを計算した。相互作用エネルギーは、計算されたF a bのI L - 1 7 (リガンドとして処理)への親和性の指標である。変異体タンパク質の安定性およびデルタ安定性を計算するために、ソフトウェアMOE(ver. 2012.10, Chemical Computing Group)を使用した。コンピューターによる部位特異的変異誘発のために残基スキニングプロトコルを使用して変異を作製し、親和性および安定性計算を行った。

【 0 3 2 5 】

コンピューターによる予測結合エネルギーと、I L - 1 7 A変異体に対するBiacore親和性から決定された計算された G 値の比較を図 1 9 に示す。図 1 9 に同定するI L - 1 7 A変異体のラベルは誤っている。図 1 9 に同定したI L - 1 7 A変異体の配列番号 2 ナンバリングは、本来より少ない。変異体は、表 3 8 に同定したとおりである。例えば、図中、N 1 0 4 A、Y 1 0 7 AおよびH 1 0 8 AはN 1 0 5 A、Y 1 0 8 AおよびH 1 0 9 Aであるべきである等である。この比較は、一団の変異体のBiacoreエネルギーの傾向が、結合接触面のコンピューターによるエネルギー予測と一致することを示す。マウス親へのI L - 1 7 A結合の分析は、該複合体が結晶化に失敗し、許容されるモデルが作製できなかったために不可能であった。I L - 1 7 F変異体のB i A b 3への結合の結果を作成する試みにおいて、恐らく、これらに使用した構造の解像度が低く、必要な残基情報が欠損していたため、不一致な結果が生じた。

【 0 3 2 6 】

I L - 1 7 A & F エピトープマッピングの要約

B i A b 3およびマウス親(3 3 9 . 1 5 . 5 . 3)のエピトープの間の重要な差異を同定する戦略は、X線結晶解析、部位特異的変異誘発、インシリコ変異誘発ならびに変異体を分析するための結合および機能アッセイを利用した。2個のm A bは軽鎖が異なり、それゆえに各m A bの軽鎖と接触している残基を実験の焦点とした。

【 0 3 2 7 】

I L - 1 7 A変異誘発は、良好な発現および合理的細胞性潜在力を有する変異体をもたらした。b i A b 3への結合について G の有意な変化が、Y 1 0 8 Aを含む全変異体で測定され、0.5 kcal / mole変化がY 1 0 8 単一点変異体で測定された。 G におけるこれらの変化はマウス親抗体への結合では観察されず、Y 1 0 8 がマウス親m A bと比較してb i A b 3のI L - 1 7 Aのエピトープにおける新規残基であることが示唆される。エネルギーデータは、結晶構造の接触面分析と一致し、この残基がマウス親と比較してb i A b 3で異なる軽鎖と相互作用し、Y 1 0 8 Aがマウス親と比較してb i A b 3軽鎖のC D R 3の差異によりb i A b 3により近くなることを示す。マウス親抗体の結合への影響があることが示された唯一のI L - 1 7 A変異体は、重鎖残基と相互作用するものであり、軽鎖がマウス親抗体のI L - 1 7 Aへの結合にあまり役割を果たしていないことを示す。

【 0 3 2 8 】

I L - 1 7 F変異誘発は、はるかに可変であり、発現レベルが低く、効力が有意に喪失した変異体の一団をもたらした。I L - 1 7 Fで得た結晶構造もI L - 1 7 A構造よりも解像度が悪かった。これは、I L - 1 7 Fが変異誘発を受け入れる余地がなく、潜在的により動的な性質であることを示唆する。しかしながら、b i A b 3への結合が減少した変異体はまたマウス親m A bへの結合も減少した。そして、m A b結合が減少したこれら全変異体は合理的な効力のものであり、低い、分析に十分な、発現レベルであった。

【 0 3 2 9 】

前記から、本発明の具体的態様を説明の目的でここに記載しているが、種々の修飾を本発明の精神および範囲から逸脱することなくし得ることは認識される。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外に限定されない。

【 図 1 】

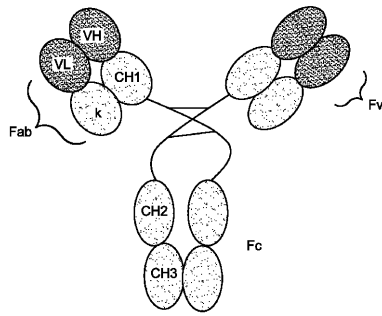


FIG. 1

【 図 2 】

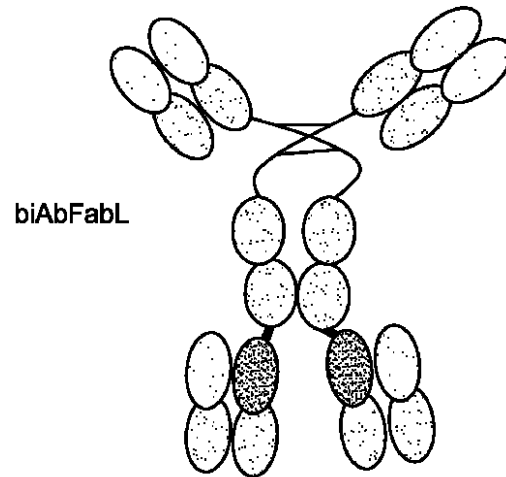


FIG. 2

【 図 3 】

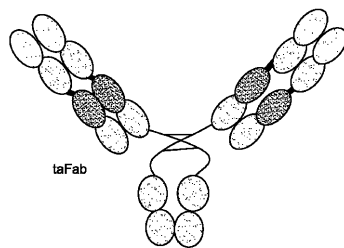


FIG. 3

【 図 5 】

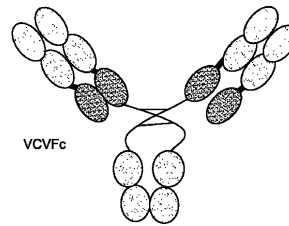


FIG. 5

【 図 4 】

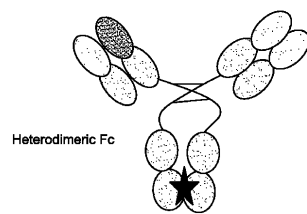


FIG. 4

【 図 6 】

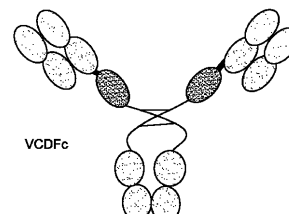


FIG. 6

【図 7】

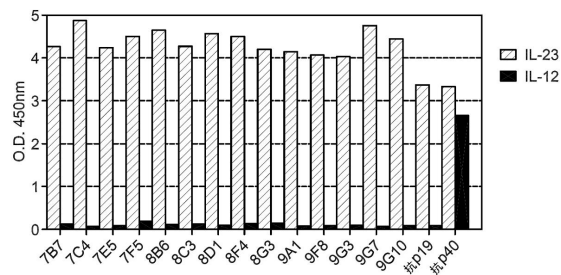


FIG. 7

【図 8】

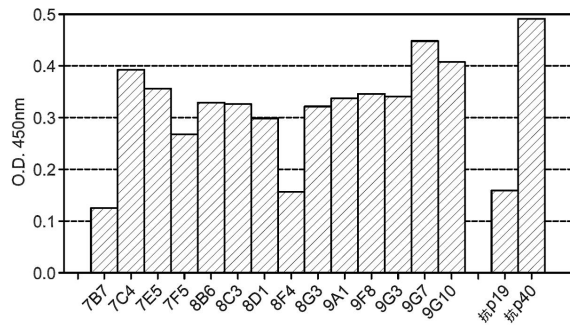


FIG. 8

【図 9】

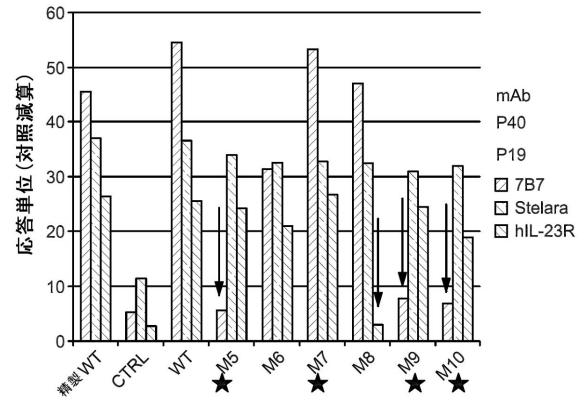


FIG. 9

【図 10】

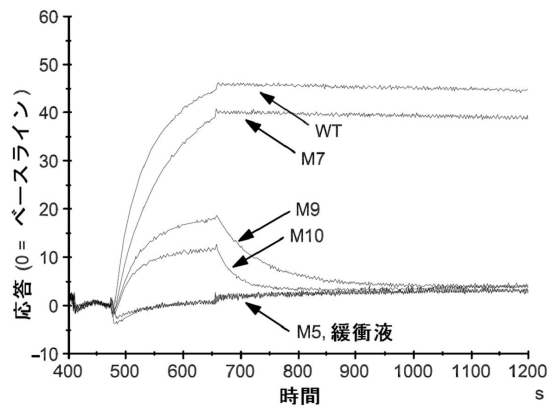


FIG. 10

【図 11】

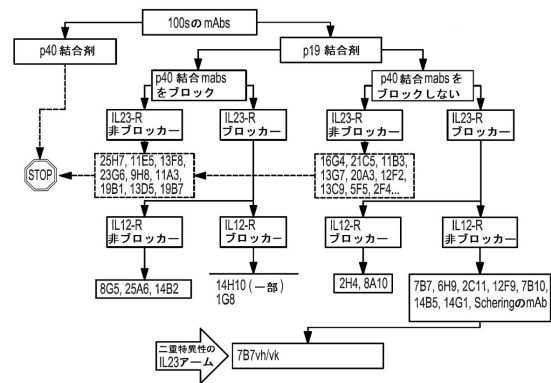


FIG. 11

【 図 1 2 】

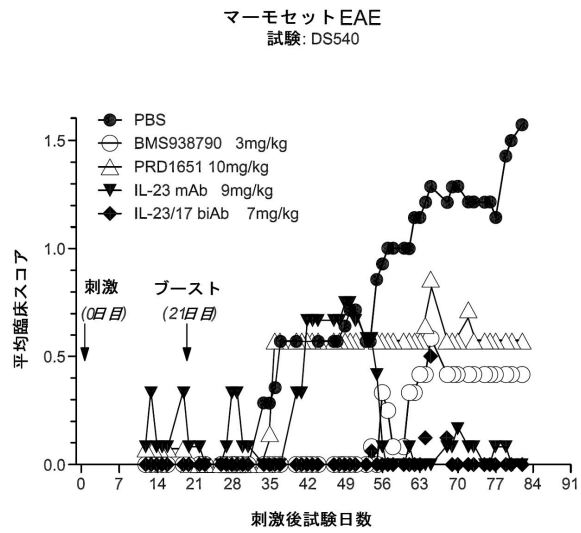


FIG. 12

【 図 1 3 】

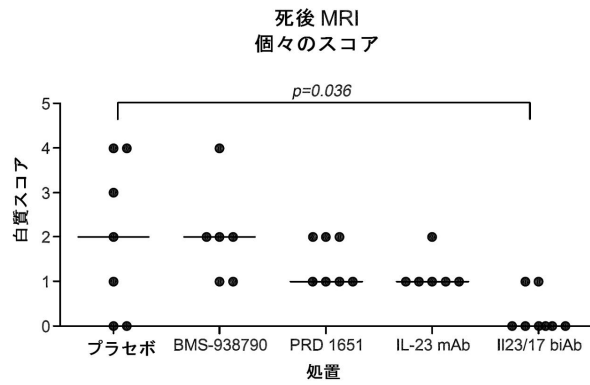


FIG. 13

【 図 1 4 】

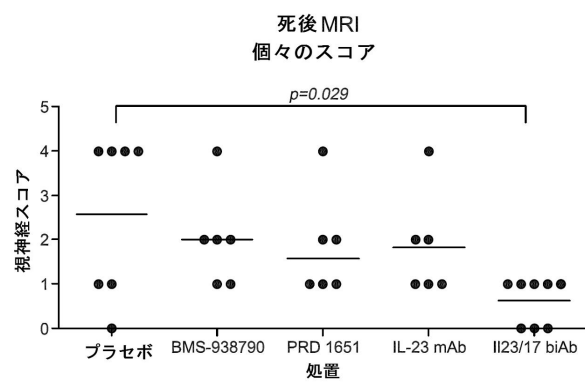


FIG. 14

【 図 1 5 】



FIG. 15

【図 16】

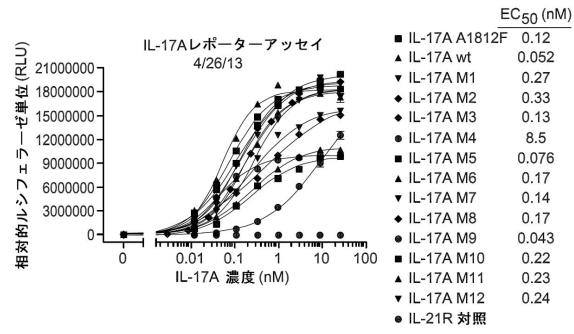


FIG. 16

【図 17】

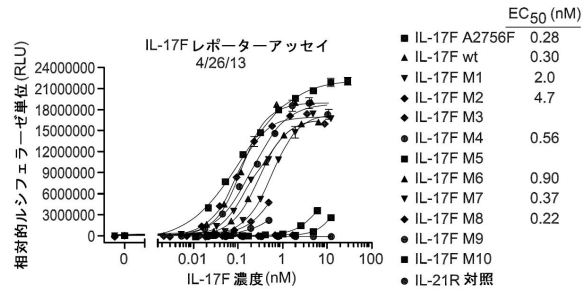


FIG. 17

【図 18】

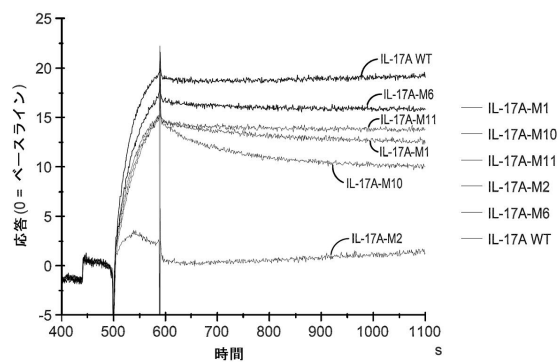


FIG. 18

【図 19】

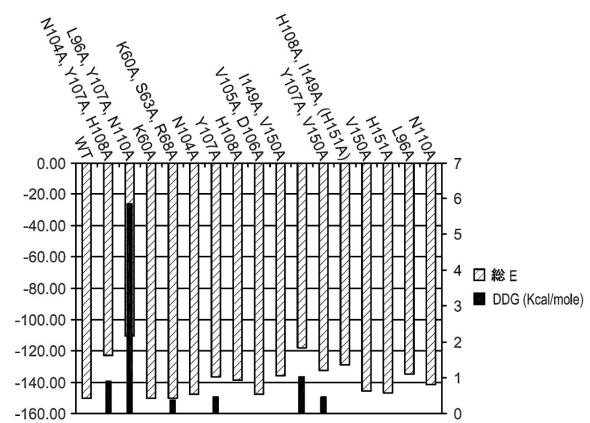


FIG. 19

【配列表】

0006362587000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
			A 6 1 P	27/02	
			A 6 1 P	37/00	

(31)優先権主張番号 61/787,890

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ブレンダ・エル・スティーブンス

アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0 1 番

(72)発明者 アリソン・ウィット

アメリカ合衆国 9 7 5 3 7 オレゴン州ローグ・リバー、イースト・エバンス・クリーク・ロード 6 3 2 5 番

(72)発明者 マーク・ダブリュー・リクソン

アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0 1 番

(72)発明者 ジョセフィン・エム・カルダレッリ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番

(72)発明者 トーマス・ディ・ケンプ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番

(72)発明者 スコット・アール・プレスネル

アメリカ合衆国 9 8 4 0 7 ワシントン州タコマ、ノース・プロジェクト・サウンド・アベニュー 2 9 0 2 番

(72)発明者 モハン・スリニバサン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番

(72)発明者 スーザン・シー・ウォン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番

(72)発明者 グオドン・チェン

- アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ホイ・ウェイ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 スタンリー・アール・クリステック
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ルメル・エイ・シュネーヴァイス
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ボール・オー・シェパード
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0 1 番
- (72)発明者 インドラニ・チャクラボर्टィ
アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番
- (72)発明者 ミエン・ガオ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ステイブン・シェリフ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ノア・ディトー
アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州ローレンスビル、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ネルス・ビー・ハマチャー
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0 1 番
- (72)発明者 トーマス・エドワーズ
アメリカ合衆国 9 8 1 1 0 ワシントン州ベインブリッジ・アイランド、ノースイースト・デイ・ロード・ウエスト 7 8 6 9 番
- (72)発明者 カテリ・アトキンス
アメリカ合衆国 9 8 1 1 0 ワシントン州ベインブリッジ・アイランド、ノースイースト・デイ・ロード・ウエスト 7 8 6 9 番
- (72)発明者 トレイシー・アラカキ
アメリカ合衆国 9 8 1 1 0 ワシントン州ベインブリッジ・アイランド、ノースイースト・デイ・ロード・ウエスト 7 8 6 9 番

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 3 7 7 0 3 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 4 4 9 6 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 8 / 1 3 4 6 5 9 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 9 7 6 0 (W O , A 1)
特表 2 0 0 9 - 5 1 9 3 4 8 (J P , A)
特表 2 0 0 9 - 5 3 4 2 9 7 (J P , A)
特表 2 0 1 0 - 5 3 0 3 5 7 (J P , A)
特表 2 0 1 0 - 5 3 9 9 2 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 2 6 2 4 (W O , A 1)
特表 2 0 1 1 - 5 2 3 8 5 3 (J P , A)

特表2003-531588(JP,A)

特表2014-533249(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

UniProt/SwissProt/GeneSeq