

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-521103

(P2019-521103A)

(43) 公表日 令和1年7月25日(2019.7.25)

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395 (2006.01)**  
**C07K 16/28 (2006.01)**  
**C07K 16/46 (2006.01)**  
**A61P 29/00 (2006.01)**  
**A61P 1/16 (2006.01)**

F 1

A 61 K 39/395  
C 07 K 16/28  
C 07 K 16/46  
A 61 P 29/00  
A 61 P 1/16

N  
Z N A  
16/46  
29/00  
1/16

テーマコード(参考)

4 C 085  
4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-563792 (P2018-563792)  
(86) (22) 出願日 平成29年6月6日 (2017.6.6)  
(85) 翻訳文提出日 平成31年2月1日 (2019.2.1)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2017/036079  
(87) 國際公開番号 WO2017/214096  
(87) 國際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)  
(31) 優先権主張番号 62/346,717  
(32) 優先日 平成28年6月7日 (2016.6.7)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 62/432,328  
(32) 優先日 平成28年12月9日 (2016.12.9)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 504438727

マクロジェニクス、インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 20850 メリーラン  
ド州、ロックヴィル、メディカル センタ  
ー ドライブ 9704

(74) 代理人 100123858

弁理士 磯田 志郎

(72) 発明者 チェン ウェイ

アメリカ合衆国 メリーランド州 208  
78, ゲイザースバーグ, グランドストリ  
ート 404

(72) 発明者 ムーア ポール エー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 208  
78, ノース ポトマック, ターリー コ  
ート 10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】炎症性疾患及び障害の治療における CD32B × CD79B 結合分子の使用方法

(57) 【要約】

本発明は、CD32B のエピトープに対して特異的な結合部位及び CD79B のエピトープに対して特異的な結合部位を有し、従って CD32B 及び CD79B に同時に結合できる、二重特異性結合分子の使用方法を対象とする。本発明は特に、二重特異性抗体又は二重特異性ダイアボディ(及び特に Fc ドメインを更に含む上記ダイアボディ)である、上記分子に関する。本発明は、上記分子の使用、及び炎症性疾患又は状態の治療における、上記分子を含有する医薬組成物の使用を対象とする。

【選択図】 図4

Figure 4

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、炎症性疾患又は状態を治療する方法であって、前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 3 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。

**【請求項 2】**

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、免疫応答を低下させる又は阻害する方法であって、前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 3 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。

10

**【請求項 3】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 3 m g / k g の用量で投与される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 0 m g / k g の用量で投与される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 3 0 m g / k g の用量で投与される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記投薬レジメンは、2 週間に 1 用量 ( Q 2 W ) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記投薬レジメンは、3 週間に 1 用量 ( Q 3 W ) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記投薬レジメンは、4 週間に 1 用量 ( Q 4 W ) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに結合する二重特異性抗体、又は前記二重特異性抗体の C D 3 2 B 及び C D 7 9 B 結合ドメインを含む分子である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性ダイアボディである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性ダイアボディは、C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディである、請求項 10 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記炎症性疾患又は状態は自己免疫疾患である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記自己免疫疾患は：アジソン病；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；重症筋無力症；クローン病；皮膚筋炎；家族性腺腫性ポリポーラス；移植片対宿主病 ( G v H D ) ；グレーヴス病；橋本甲状腺炎；エリテマトーデス；多発性硬化症 ( M S ) ；悪性貧血；ライター症候群；関節リウマチ ( R A ) ；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス ( S L E ) ；1型糖尿病；原発性血管炎 ( 例えはリウマチ性多発筋痛症、巨細胞性動脈炎、

50

ベーチェット病) ; 天疱瘡 ; 視神經脊髄炎 ; 抗NMDA受容体脳炎 ; ギランバレー症候群 ; 慢性炎症性脱髓性多発ニューロパシー (CDP) ; グレーヴス眼症 ; IgG4関連疾患 ; 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) ; 及び潰瘍性大腸炎からなる群から選択される、請求項1～2に記載の方法。

【請求項14】

前記炎症性疾患又は状態は、GVHD、MS、RA又はSLEである、請求項1～3に記載の方法。

【請求項15】

免疫グロブリンの血清レベルは、前記CD32B×CD79B結合分子の最初の用量の投与後36日目までに低下する、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項16】

前記免疫グロブリンはIgM、IgA又はIgGである、請求項1～5に記載の方法。

【請求項17】

BCR仲介型末梢B細胞活性化は、前記CD32B×CD79B結合分子の最初の用量の投与後24時間までに低下し、前記B細胞活性化は、生体外カルシウム動員アッセイによって決定される、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記BCR仲介型B細胞活性化は少なくとも50%阻害され、前記阻害は少なくとも6日間持続する、請求項1～7に記載の方法。

【請求項19】

末梢B細胞上の前記CD32B×CD79B結合部位の少なくとも20%が、前記CD32B×CD79B結合分子の最初の用量の投与後6時間占有される、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項20】

(A) B細胞上のCD40の発現が下方制御され；及び／又は

(B) CD40仲介型IgG分泌が阻害される、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記被験者はヒトである、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項22】

前記CD32B×CD79B結合分子は：

(A) 配列番号30のアミノ酸配列を含むVL<sub>CD32B</sub>ドメイン；

(B) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVH<sub>CD32B</sub>ドメイン；

(C) 配列番号32のアミノ酸配列を含むVL<sub>CD79B</sub>ドメイン；

(D) 配列番号33のアミノ酸配列を含むVH<sub>CD79B</sub>ドメイン

を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記CD32B×CD79B結合分子は：

(A) 配列番号39のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖；

(B) 配列番号41のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；及び

(C) 配列番号44のアミノ酸配列を含む第3のポリペプチド鎖

40

を含むFcダイアボディである、請求項2～2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許出願第62/346,717号(2016年6月7日出願；係属中)及び米国特許出願第62/432,328号(2016年12月9日出願；係属中)に対する優先権を主張するものであり、各上記出願はその全体が本出願に援用される。

[配列表の参照]

50

本出願は、連邦規則法典第37巻第1.821節以下による1つ又は複数の配列表を含み、これらの配列表は、コンピュータ可読媒体（ファイル名：1301\_0145PCT\_ST25.txt、2017年5月19日作成、サイズ：59,748バイト）において開示されており、上記ファイルは、参照によりその全体が本出願に援用される。

【0002】

本発明は、CD32Bのエピトープに対して特異的な結合部位及びCD79Bのエピトープに対して特異的な結合部位を有し、従ってCD32B及びCD79Bに同時に結合できる、二重特異性結合分子の使用方法を対象とする。本発明は特に、二重特異性抗体又は二重特異性ダイアボディ（及び特にFcドメインを更に含む上記ダイアボディ）である、上記分子に関する。本発明は、上記分子の使用、及び炎症性疾患又は状態の治療における、上記分子を含有する医薬組成物の使用を対象とする。

10

【背景技術】

【0003】

I. Fc受容体及びCD32B

抗体抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、抗体依存性細胞傷害、脂肪細胞の脱顆粒及び食作用といったエフェクタ機能から、リンパ球増殖及び抗体分泌の調節といった免疫変調シグナルにまで及ぶ、幅広い応答をもたらす。全てのこれらの相互作用は、抗体又は免疫複合体のFcドメインが、造血細胞上の、特別な細胞表面受容体に結合することによって開始される。抗体及び免疫複合体によってトリガされる細胞応答の多様性は、Fc受容体の構造的異質性によるものである。Fc受容体は、構造的に関連するリガンド結合ドメインを共有し、これが恐らく、細胞内シグナリングを仲介する。

20

【0004】

Fc受容体は、タンパク質の免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーである。これらは、免疫グロブリン分子のFc部分に結合できる表面糖タンパク質である。上記ファミリーの各メンバーは、Fc受容体の鎖上の認識ドメインによって、1つ又は複数のアイソタイプの免疫グロブリンを認識する。

【0005】

Fc受容体は、免疫グロブリンサブタイプに対するその特異性によって定義される（非特許文献1～6を参照）。

30

【0006】

IgG抗体に結合できるFc受容体は「FcR」と呼ばれる。このファミリーの各メンバーは膜貫通糖タンパク質であり、これは、免疫グロブリン関連ドメインのC2セットに関連する細胞外ドメイン、単一膜貫通ドメイン、及び可変長の細胞質内ドメインを有する。FcR I (CD64)、FcR I I (CD32)及びFcR I I I (CD16)と呼ばれる、3つの公知のFcRが存在する。これら3つの受容体は、異なる遺伝子によってコードされるが、これら3つのファミリーメンバー間の幅広い相同性は、これらが共通の前駆体から、恐らく遺伝子重複によって生じたことを示唆している。

【0007】

FcR I I (CD32)タンパク質は、単量体IgG ( $10^6 M^{-1}$ )に対する低い親和性により、複合体化IgGにのみ結合する、40KDa膜貫通糖タンパク質である。この受容体は、最も幅広く発現されるFcRであり、単球、マクロファージ、B細胞、NK細胞、好中球、脂肪細胞及び血小板を含む全ての造血細胞上に存在する。FcR I Iは、その免疫グロブリン結合鎖中に2つの免疫グロブリン様領域しか有しておらず、従ってIgGに対する親和性がFcR Iよりもはるかに低い。3つのヒトFcR I I遺伝子(FcR I I A (CD32A)、FcR I I B (CD32B)、FcR I I C (CD32C))が存在し、これらは全て、凝集体又は免疫複合体中でIgGに結合する。

40

【0008】

FcR I I A及びFcR I I Bの細胞質ドメイン内の明確な差異により、受容体連結反応に対して2つの機能的に異質な応答が生じる。基本的な差異は、IgG Fc領域への結合時、FcR I I Aアイソフォームは免疫系の活性化（例えば食作用、呼吸バー

50

スト等)をもたらす細胞内シグナリングを開始するのに対して、IgG Fc領域への結合時、Fc RIIIBアイソフォームは、免疫系の弱化又は阻害(例えばB細胞活性化の阻害等)をもたらすシグナルを開始することである。

#### 【0009】

このような活性化及び抑制性シグナルはいずれも、IgG Fc領域への連結後にFc Rを介して伝達される。これらの正反対の機能は、異なる受容体アイソフォーム間の構造的差異から生じる。免疫受容体チロシン系活性化モチーフ(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif: ITAM)又は免疫受容体チロシン系阻害性モチーフ(Immuno-receptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif: ITIM)と呼ばれる、受容体の細胞質シグナリングドメイン内の2つの異なるドメインにより、上記異なる応答が説明される。これらの構造に対する異なる細胞質酵素の補充は、Fc R仲介細胞応答の結果を決定づける。ITAM含有Fc R複合体は、Fc RII、Fc RIIIA、Fc RIIIAを含み、その一方でITIM含有複合体はFc RIIIBしか含まない。

10

#### 【0010】

ヒト好中球は、Fc RIIIA遺伝子を発現する。免疫複合体又は特異性抗体架橋によるFc RIIIAのクラスタリングは、ITAMを、ITAMリン酸化を促進する受容体関連キナーゼと凝集させる役割を果たす。ITAMリン酸化は、Sykキナーゼのドッキング部位として役立ち、その活性化は、下流基質(例えばPI<sub>3</sub>K)の活性化をもたらす。細胞活性化は、炎症促進性メディエータの放出につながる。

20

#### 【0011】

Fc RIIIB遺伝子は、Bリンパ球上で発現し、その細胞外ドメインはFc RIIIAと96%同一であり、またIgG複合体に、区別できない様式で結合する。Fc RIIIBの細胞質ドメイン中のITIMの存在は、Fc Rの上述の阻害型サブクラスを定義する。この阻害の分子的基礎は確立されている。免疫複合体のIgG免疫グロブリンのFc領域によって、Fc RIIIBが活性化受容体に共連結されると、Fc RIIIB ITIMはリン酸化され、イノシトールポリリン酸5'ホスファターゼ(SHIP)のSH2ドメインを引き付け、これによって、ITAM含有Fc R仲介型チロシンキナーゼ活性化の結果として放出されたホスホイノシトールメッセンジャーが加水分解され、その結果、細胞内Ca<sup>++</sup>の流入が防止される。このようにして、Fc RIIIBと活性化受容体とのこののような架橋は、活性化受容体の活性を減衰させ、従って細胞応答性を阻害する。これにより、B細胞上では、B細胞活性化、B細胞増殖及び抗体分泌が弱化するか又は中断される。よって、抗原検出の開始時に単量体IgG抗原の結合が発生し、結合した抗体のFc領域が、活性化Fc RのITAMに結合することによって、免疫系の活性化を仲介する。宿主の応答が進行するに従って、多量体IgG抗原免疫複合体が形成され、これはFc RIIIBに結合でき(従って上記複合体を活性化受容体と共に連結でき)、これは、免疫応答の弱化及び最終的な停止につながる(例えば特許文献1~53を参照)。

30

#### 【0012】

##### I.I.B細胞受容体及びCD79B

B細胞は、抗体の產生の役割を果たす免疫系細胞である。更にB細胞は、抗原を提示し、サイトカインを分泌する。抗原に対するB細胞の応答は、正常な免疫系に必須の構成要素である。B細胞は、特別な細胞表面受容体(B細胞受容体「BCR」)を有する。B細胞が、該細胞のBCRに結合できる抗原に出会うと、B細胞は刺激されて増殖し、結合した抗原に対して特異的な抗体を產生する。抗原に対する効率的な応答を生成するために、BCR関連タンパク質及びT細胞の支援も必要となる。抗原/BCR複合体は内在化され、抗原はタンパク質分解処理される。抗原のごく一部は、B細胞の表面上の主要組織適合性複合体II(MHC II)分子と複合体化したままとなり、ここで上記複合体をT細胞によって認識できる。このような抗原提示によって活性化されたT細胞は、CD40Lと、B細胞の成熟を誘導する様々なリノホカインとを分泌する。

40

#### 【0013】

BCRを介したシグナリングは、抗体の生成、自己免疫、及び免疫寛容の確立において

50

重要な役割を果たす（非特許文献7）。まだ骨髄中にある間に自己抗原に結合する未成熟B細胞は、アポトーシスによって排除される。対照的に、成熟B細胞に対する抗原結合は、活性化、増殖、アネルギー及びアポトーシスをもたらす。観察される特定の機能的応答は、B細胞が他の表面受容体を介して共刺激シグナルを受け取るかどうか、及び活性化される特定のシグナル伝達経路に左右される。

#### 【0014】

B C Rは、非共有結合で結合したC D 7 9の 及び サブユニット（それぞれ「C D 7 9 a」及び「C D 7 9 B」）と共にB C R複合体を形成する、膜免疫グロブリンからなる。C D 7 9 a及びC D 7 9 Bは、シグナル伝達に必要な、保存された免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（「I T A M」）を含むシグナル伝達サブユニットである（非特許文献8、9）。多価抗原によるB C R複合体の凝集により、C D 7 9 a及びC D 7 9 BのI T A Mのトランスリン酸化、並びに受容体関連キナーゼの活性化が開始される（非特許文献10～12）。リン酸化されたI T A Mは、P I <sub>3</sub> K、P L C 、及びR a s / M A P K経路のメンバーといった、更なるエフェクタを補充する。これらのシグナリングイベントは、B細胞増殖、並びにその後のTヘルパー（「T<sub>h</sub>」）細胞との相互作用のためのB細胞のプライミングに必要な活性化マーカー（M H C I I及びC D 8 6等）の発現増加の両方において役割を果たす。

10

#### 【0015】

##### I I I . 炎症性疾患又は状態

炎症は、体内的白血球及び化学物質が、微生物及びウイルス等の外来物質による感染から我々の身体を保護するプロセスである。炎症は通常、患部の痛み、腫れ、発熱及び発赤を特徴とする。サイトカイン及びプロスタグランジンとして知られる化学物質はこのプロセスを制御し、規則正しくかつ自己制限的なカスケードで血液又は罹患組織中へと放出される。化学物質のこの放出は、傷害又は感染領域への血流を増加させ、発赤及び発熱をもたらす場合がある。一部の化学物質は、組織への体液の漏出を引き起こし、これは腫れをもたらす。この保護プロセスは神経を刺激し、痛みを引き起こす場合がある。これらの変化は、関連する領域において限られた期間しか発生しなければ、身体にとって有益に作用する。

20

#### 【0016】

炎症性疾患又は状態は、身体自体の細胞及び組織に対する免疫系の攻撃（即ち「自己免疫（autoimmune）」応答）を反映したものである。身体に様々な方法で影響を及ぼす、多くの異なる自己免疫障害が存在する。例えば、多発性硬化症の個体では脳が影響を受け、クローグン病の個体では腸が影響を受け、関節リウマチの個体では、様々な関節の滑膜、骨及び軟骨が影響を受ける。自己免疫障害の進行に従って、1つ又は複数のタイプの身体組織の破壊、器官の異常成長、又は器官機能の変化が発生し得る。自己免疫障害は、1つの器官若しくは組織タイプのみに影響を及ぼす場合があり、又は複数の器官及び組織に影響を及ぼす場合がある。自己免疫障害によって一般的に影響を受ける器官及び組織としては、赤血球、血管、結合組織、内分泌腺（例えば甲状腺又は脾臓）、筋肉、関節及び皮膚が挙げられる。自己免疫障害の例としては、限定するものではないが：アジソン病；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；重症筋無力症；クローグン病；皮膚筋炎；家族性腺腫性ボリポーシス；移植片対宿主病（G v H D）；グレーヴス病；橋本甲状腺炎；エリテマトーデス；多発性硬化症（M S）；悪性貧血；ライター症候群；関節リウマチ（R A）；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス（S L E）；1型糖尿病；原発性血管炎（例えばリウマチ性多発筋痛症、巨細胞性動脈炎、ベーチェット病）；天疱瘡；視神経脊髄炎；抗N M D A受容体脳炎；ギランバレー症候群；慢性炎症性脱髓性多発ニューロパシー（C I D P）；グレーヴス眼症；I g G 4関連疾患；特発性血小板減少性紫斑病（I T P）；及び潰瘍性大腸炎が挙げられる。

30

40

#### 【0017】

炎症性疾患又は状態はまた、身体の正常な保護免疫系が、その存在が身体にとって有益である外来細胞若しくは組織を攻撃することによって、損傷を引き起こした場合に（例え

50

ば移植の拒絶反応（宿主対宿主病））、又は免疫抑制された宿主の細胞が、導入された移植片の免疫適格細胞によって拒絶されることによって（移植片対宿主病）、発生し得る（非特許文献 13～18）。

【0018】

このような疾患又は状態の治療における最近の進歩にもかかわらず、炎症性疾患又は状態を治療又は予防できる組成物に対する需要は存在し続けている。

【0019】

I V . 二重特異性結合分子

A . 二重特異性抗体

未修飾天然抗体（例えば IgG）の、抗原のエピトープに結合する能力は、上記抗体のエピトープ結合部位を形成するための、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖上の可変ドメイン（即ちその軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）及びその重鎖可変ドメイン（VHドメイン））の存在及び相互作用に左右される。単一種の軽鎖及び単一種の重鎖しか存在しないと、その結果として、天然抗体は1つのエピトープ種にしか結合できない（即ち上記天然抗体は単一特異性である）が、当該種の複数の複製に結合できる（即ち2価性又は多価性を示す）。

10

【0020】

しかしながら、従来技術は例えば、非特許文献19（特許文献53）に記載されているように、異なるエピトープ特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 軽鎖ペアを共発現させた後、アフィニティクロマトグラフィを用いて所望の分子を精製することによって、二重特異性抗体の產生に成功した。異なるアプローチでは、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体抗原結合部位）を、ヒンジ、C<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン定常ドメイン配列、例えば重鎖定常ドメインに融合させた。これらの融合物をコードする核酸を、同一の又は異なる発現ベクターに挿入してよく、また上記核酸は好適な宿主生物において発現される。二重特異性抗体は例えば、非特許文献20～27によって概説されている。

20

【0021】

無傷の二重特異性抗体に加えて、従来技術は、二重特異性单鎖抗体誘導体（例えば二重特異性T細胞エンゲージャ（Bispecific T-cell Engager：BiTE））を開発しており、これは、第1の結合分子に関するVL及びVHドメイン、並びに第2の結合分子に関するVL及びVHドメインを有する、单一のポリペプチド鎖からなる（例えば特許文献55～58；非特許文献28～30）。

30

【0022】

B . 二重特異性ダイアボディ

従来技術は、2つ以上の異なるエピトープ種に結合できる（即ち2価性又は多価性に加えて二重特異性又は多重特異性を示すことができる）点で天然抗体とは異なるダイアボディを產生できる可能性について記述している。ダイアボディの設計は单鎖Fc（scFc）構造をベースとし、これは、介在リンカーによって隔てられたVLドメイン及び対応するVHドメインを有し、上記介在リンカーは、これらのドメインを互いに相互作用させることができる。VL及びVHドメインの上記相互作用が、不十分な長さ（約12アミノ酸残基未満）のリンカーの使用によって不可能となった場合、2つのこのようなscFc構造が互いに相互作用することによって、一方の鎖のVLドメインが他方の鎖のVHドメインと結合する、2価ダイアボディ分子を形成できる（非特許文献31、32；特許文献59、60；非特許文献33～35；特許文献61；非特許文献36～39に概説されている）。

40

【0023】

非単一特異性ダイアボディの提供は、異なるエピトープを発現する複数の細胞を共連結（co-ligate）して共存させることができる能力という有意な利点を提供する。従って2価ダイアボディは、療法及び免疫診断を含む広範な用途を有する。2価性は、様々な用途におけるダイアボディの設計及び加工の大幅な柔軟性を可能とし、これにより、多量体抗

50

原の結合活性の上昇、異なる複数の抗原の架橋、及び両標的抗原の存在に基づく特定の細胞タイプに対する指向性標的化を提供する。当該技術分野において公知のダイアボディ分子は、( ~ 50 kDa 以下の小さいサイズのダイアボディに関して) その高い結合価、低い解離率及び循環からの迅速な排除により、腫瘍撮像の分野での特定の使用も示している(非特許文献 40)。特に重要なのは、異なる細胞の共連結、例えば細胞毒性 T 細胞と腫瘍細胞との架橋である(非特許文献 41、42)。

【0024】

ダイアボディエピトープ結合ドメインはまた、T リンパ球、ナチュラルキラー (NK) 細胞又は他の単核細胞上に発現される、CD3、CD16、CD32 又は CD64 といつたりずれの免疫エフェクタ細胞の表面決定因子も対象としてよい。多くの研究において、エフェクタ細胞決定基(例えば Fc 受容体 (FcR))に対するダイアボディ結合は、エフェクタ細胞を活性化させることも発見された(非特許文献 42、43；特許文献 62～66)。通常、エフェクタ細胞の活性化は、抗原に結合した抗体が Fc FcR 相互作用によってエフェクタ細胞に結合することによってトリガされる。従ってこれに関して、本発明のダイアボディ分子は、(例えば当該技術分野において公知の、又は本出願において例示されるいづれのエフェクタ機能アッセイ(例えば ADC C アッセイ)において分析されるように) Fc ドメインを含むかどうかとは独立して、Ig のような機能性を呈し得る。腫瘍とエフェクタ細胞とを架橋することによって、ダイアボディはエフェクタ細胞を腫瘍細胞近傍にもたらすだけでなく、効果的な腫瘍の殺滅をもたらす(例えば非特許文献 44 を参照)。

10

20

30

40

50

【0025】

しかしながら、上述の利点は顕著なコストにつながる。このような非单一特異性ダイアボディの形成は、2つ以上の別個の異なるポリペプチドの良好な集合を必要とする(即ち上記形成は、ダイアボディが、異なるポリペプチド鎖種のヘテロ二量体形成によって形成されることを必要とする)。この事実は、同一のポリペプチド鎖のホモ二量体形成によって形成される单一特異性ダイアボディとは対照的である。非单一特異性ダイアボディを形成するために少なくとも2つの異なるポリペプチド(即ち2つのポリペプチド種)を提供しなければならないため、及びこののようなポリペプチドのホモ二量体形成は不活性分子をもたらす(非特許文献 39)ため、このようなポリペプチドの產生は、同一種のポリペプチド間での共有結合を防止するような方法で達成しなければならない(非特許文献 45)。従って本技術分野は、このようなポリペプチドの非共有結合的連結を教示している(例えば非特許文献 36、38、39、35 を参照)。

【0026】

しかしながら、従来技術は、非共有結合的に連結したポリペプチドで構成される二重特異性ダイアボディが不安定であり、非機能性モノマーへと容易に分解することを認識している(例えば非特許文献 35 を参照)。

【0027】

この課題をものとせず、従来技術は、安定した共有結合ヘテロ二量体性非单一特異性ダイアボディの開発に成功した(例えば特許文献 62～66；非特許文献 45～54 を参照)。このようなアプローチは、採用したポリペプチド鎖それぞれに1つ又は複数のシステイン残基を組み込むことを含む。例えば、このような構造の C 末端へのシステイン残基の追加は、ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を可能とすることが分かっており、これは、2価分子の結合特性に干渉することなく、得られるヘテロ二量体を安定化させる。

【0028】

このような成功に基づき、従来技術は、阻害性 Fc 受容体 IIb (CD32B) 及び B 細胞上の B 細胞受容体 (BCR) の構成要素 CD79B を共連結することによって CD32B 及び CD79B に同時に結合できる二重特異性 2 価 DART (登録商標) ダイアボディである、Mgd010 を產生した(非特許文献 55) (図 1A)。本発明は、Mgd010 と、他の CD32B × CD79B 二重特異性分子、特に Fc ドメインを含む上記二重特異性分子との、改善された使用方法及び投与方法に関する。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0 0 2 9】

- 【特許文献 1】米国特許第 8, 445, 645 号
- 【特許文献 2】米国特許第 8, 217, 147 号
- 【特許文献 3】米国特許第 8, 216, 579 号
- 【特許文献 4】米国特許第 8, 216, 574 号
- 【特許文献 5】米国特許第 8, 193, 318 号
- 【特許文献 6】米国特許第 8, 192, 737 号
- 【特許文献 7】米国特許第 8, 187, 593 号
- 【特許文献 8】米国特許第 8, 133, 982 号
- 【特許文献 9】米国特許第 8, 044, 180 号
- 【特許文献 10】米国特許第 8, 003, 774 号
- 【特許文献 11】米国特許第 7, 960, 512 号
- 【特許文献 12】米国特許第 7, 786, 270 号
- 【特許文献 13】米国特許第 7, 632, 497 号
- 【特許文献 14】米国特許第 7, 521, 542 号
- 【特許文献 15】米国特許第 7, 425, 619 号
- 【特許文献 16】米国特許第 7, 355, 008 号
- 【特許文献 17】米国特許出願公開第 2012/0276094 号
- 【特許文献 18】米国特許出願公開第 2012/0269811 号
- 【特許文献 19】米国特許出願公開第 2012/0263711 号
- 【特許文献 20】米国特許出願公開第 2012/0219551 号
- 【特許文献 21】米国特許出願公開第 2012/0213781 号
- 【特許文献 22】米国特許出願公開第 2012/0141476 号
- 【特許文献 23】米国特許出願公開第 2011/0305714 号
- 【特許文献 24】米国特許出願公開第 2011/0243941 号
- 【特許文献 25】米国特許出願公開第 2010/0322924 号
- 【特許文献 26】米国特許出願公開第 2010/0254985 号
- 【特許文献 27】米国特許出願公開第 2010/0196362 号
- 【特許文献 28】米国特許出願公開第 2010/0174053 号
- 【特許文献 29】米国特許出願公開第 2009/0202537 号
- 【特許文献 30】米国特許出願公開第 2009/0191195 号
- 【特許文献 31】米国特許出願公開第 2009/0092610 号
- 【特許文献 32】米国特許出願公開第 2009/0076251 号
- 【特許文献 33】米国特許出願公開第 2009/0074771 号
- 【特許文献 34】米国特許出願公開第 2009/0060910 号
- 【特許文献 35】米国特許出願公開第 2009/0053218 号
- 【特許文献 36】米国特許出願公開第 2009/0017027 号
- 【特許文献 37】米国特許出願公開第 2009/0017026 号
- 【特許文献 38】米国特許出願公開第 2009/0017023 号
- 【特許文献 39】米国特許出願公開第 2008/0138349 号
- 【特許文献 40】米国特許出願公開第 2008/0138344 号
- 【特許文献 41】米国特許出願公開第 2008/0131435 号
- 【特許文献 42】米国特許出願公開第 2008/0112961 号
- 【特許文献 43】米国特許出願公開第 2008/0044429 号
- 【特許文献 44】米国特許出願公開第 2008/0044417 号
- 【特許文献 45】米国特許出願公開第 2007/0077246 号
- 【特許文献 46】米国特許出願公開第 2007/0036799 号
- 【特許文献 47】米国特許出願公開第 2007/0014795 号

10

20

30

40

50

- 【特許文献 48】米国特許出願公開第 2007 / 0004909 号  
【特許文献 49】米国特許出願公開第 2005 / 0260213 号  
【特許文献 50】米国特許出願公開第 2005 / 0215767 号  
【特許文献 51】米国特許出願公開第 2005 / 0064514 号  
【特許文献 52】米国特許出願公開第 2005 / 0037000 号  
【特許文献 53】米国特許出願公開第 2004 / 0185045 号  
【特許文献 54】国際公開第 93 / 08829 号  
【特許文献 55】米国特許第 7,112,324 号  
【特許文献 56】米国特許第 7,235,641 号  
【特許文献 57】米国特許第 7,575,923 号 10  
【特許文献 58】米国特許第 7,919,089 号  
【特許文献 59】米国特許出願公開第 2004 / 0058400 号 (Holliger et al.)  
【特許文献 60】米国特許出願公開第 2004 / 0220388 号 (Mertens et al.)  
【特許文献 61】国際公開第 02 / 02781 号 (Mertens et al.)  
【特許文献 62】国際公開第 2006 / 113665 号  
【特許文献 63】国際公開第 2008 / 157379 号  
【特許文献 64】国際公開第 2010 / 080538 号  
【特許文献 65】国際公開第 2012 / 018687 号  
【特許文献 66】国際公開第 2012 / 162068 号  
【非特許文献】 20  
【0030】  
【非特許文献 1】 Ravetch J.V. et al. (1991) "Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 9:457-92  
【非特許文献 2】 Gerber J.S. et al. (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc Receptors," Microbes and Infection, 3:131-139  
【非特許文献 3】 Billadeau D.D. et al. (2002) "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation," J. Clin. Invest. 2(109):161-1681  
【非特許文献 4】 Ravetch J.V. et al. (2000) "Immune Inhibitory Receptors," Science 290:84-89 30  
【非特許文献 5】 Ravetch J.V. et al. (2001) "IgG Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 19:275-90  
【非特許文献 6】 Ravetch J.V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux," Cell, 78(4): 553-60  
【非特許文献 7】 Gauld, S.B. et al. (2002) "B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles In Cell Development And Disease," Science 296(5573):1641-1642  
【非特許文献 8】 Dylke, J. et al. (2007) "Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR)," Immunol. Lett. 112(1):47-57  
【非特許文献 9】 Cambier, J.C. (1995) "New Nomenclature For The Reth Motif (or A RH1/TAM/ARAM/YXXL)," Immunol. Today 16:110 40  
【非特許文献 10】 DeFranco, A.L. (1997) "The Complexity Of Signaling Pathways Activated By The BCR," Curr. Opin. Immunol. 9:296-308  
【非特許文献 11】 Kurosaki, T. (1997) "Molecular Mechanisms In B-Cell Antigen Receptor Signaling," Curr. Opin. Immunol. 9:309-318  
【非特許文献 12】 Kim, K.M. et al. (1993) "Signalling Function Of The B-Cell Antigen Receptors," Immun. Rev. 132:125-146  
【非特許文献 13】 DePaoli, A.M. et al. (1992) "Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation," Ann. Intern. Med. 117:170-171  
【非特許文献 14】 Sudhindran, S. et al. (2003) "Treatment Of Graft-Versus-Host 50

Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection , " Am J Transplant. 3:1024-1029

【非特許文献 15】Pollack, M.S. et al. (2005) "Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis," Hum. Immunol. 66:28-31

【非特許文献 16】Perri, R. et al. (2007) "Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed," Liver Transpl. 13:1092-1099

【非特許文献 17】Mawad, R. et al. (2009) "Graft-Versus-Host Disease Presenting With Pancytopenia After En Bloc Multiorgan Transplantation: Case Report And Literature Review," Transplant Proc. 41:4431-4433

【非特許文献 18】Akbulut, S. et al. (2012) "Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation: A Comprehensive Literature Review," World J. Gastroenterol. 18(37): 5240-5248

【非特許文献 19】Milstein et al. (1983) "Hybrid Hybridomas And Their Use In Immunohistochemistry," Nature 305:537-39

【非特許文献 20】Traunecker et al. (1991) "Bispecific Single Chain Molecules (Janusins) Target Cytotoxic Lymphocytes On HIV Infected Cells," EMBO J. 10:3655-3659

【非特許文献 21】Zhukovsky, E.A. et al. (2016) "Bispecific Antibodies And Cars : Generalized Immunotherapy Harnessing T Cell Redirection," Curr. Opin. Immunol. 40:24-35

【非特許文献 22】Kiefer, J.D. et al. (2016) "Immunocytokines And Bispecific Antibodies: Two Complementary Strategies For The Selective Activation Of Immune Cells At The Tumor Site," Immunol. Rev. 270(1):178-192

【非特許文献 23】Solimando, A.G. et al. (2016) "Targeting B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: New And Old Tricks," Leuk. Res. 42:93-104

【非特許文献 24】Fan, G. et al. (2015) "Bispecific Antibodies And Their Applications," J. Hematol. Oncol. 8:130

【非特許文献 25】Grandjenette, C. et al. (2015) "Bispecific Antibodies: An Innovative Arsenal To Hunt, Grab And Destroy Cancer Cells," Curr. Pharm. Biotechnol. 16(8):670-683

【非特許文献 26】Nunez-Prado, N. et al. (2015) "The Coming Of Age Of Engineered Multivalent Antibodies," Drug Discov. Today 20(5):588-594

【非特許文献 27】Kontermann, R.E. et al. (2015) "Bispecific Antibodies," Drug. Discov. Today 20(7):838-847

【非特許文献 28】Wu, J. et al. (2015) "Blinatumomab: A Bispecific T Cell Engager (BiTe) Antibody Against CD19/CD3 For Refractory Acute Lymphoid Leukemia," J. Hematol. Oncol. 8:104

【非特許文献 29】Lutterbuese, R. et al. (2008) "Conversion Of Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab And Omalizumab Into T-Cell-Engaging BiTE Antibodies Creates Novel Drug Candidates Of High Potency," Proc. Am. Assoc. Cancer Res 99:Abs 2402

【非特許文献 30】Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944

【非特許文献 31】Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658,

【非特許文献 32】Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448;

【非特許文献 33】Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives," In: Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

- , The Netherlands (2001), pages 195-208;
- 【非特許文献 3 4】Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94
- 【非特許文献 3 5】Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672
- 【非特許文献 3 6】Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Protein Eng. Des. Sel.* 17(1):21-27
- 【非特許文献 3 7】Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fc Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," *Protein Engineering* 14(2):1025-1033
- 【非特許文献 3 8】Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, *J. Biocochem.* 76(8):992
- 【非特許文献 3 9】Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588
- 【非特許文献 4 0】Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*," *Protein Eng.* 10:1221
- 【非特許文献 4 1】Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," *Nature* 314:628-631
- 【非特許文献 4 2】Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," *Protein Eng.* 9:299-305
- 【非特許文献 4 3】Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," *Cancer Res.* 59:2909-2916
- 【非特許文献 4 4】Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197
- 【非特許文献 4 5】Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion," *J. Molec. Biol.* 399(3):436-449
- 【非特許文献 4 6】Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943
- 【非特許文献 4 7】Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," *Blood* 117(17):4542-4551
- 【非特許文献 4 8】Chen, X. et al. (2016) "Mechanistic Projection Of First In Human Dose For Bispecific Immuno-Modulatory P-Cadherin LP-DART - An Integrated PK/PD Modeling Approach," *Clin. Pharmacol. Ther.* doi: 10.1002/cpt.393
- 【非特許文献 4 9】Tsai, P. et al. (2016) "CD19xCD3 DART Protein Mediates Human B-Cell Depletion In Vivo In Humanized BLT Mice," *Mol. Ther. Oncolytics.* 3:15024
- 【非特許文献 5 0】Root et al. (2016) "Development of PF-06671008, a Highly Potent Anti-P-cadherin/Anti-CD3 Bispecific DART Molecule with Extended Half-Life for the Treatment of Cancer," *Antibodies* 5:6
- 【非特許文献 5 1】Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233

【非特許文献 5 2】Al-Hussaini, M. et al. (2016) "Targeting CD123 In Acute Myeloid Leukemia Using A T-Cell-Directed Dual-Affinity Retargeting Platform," *Blood* 127(1):122-131)

【非特許文献 5 3】Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82

【非特許文献 5 4】Zanin, M. et al. (2015) "An Anti-H5N1 Influenza Virus FcDART Antibody Is A Highly Efficacious Therapeutic Agent And Prophylactic Against H5N1 Influenza Virus Infection," *J. Virol.* 89(8):4549-4561

【非特許文献 5 5】Chen, W. (2014) "Development Of Human B-Lymphocyte Targeted B i-Specific DART(R) Molecules For The Treatment Of Autoimmune Disorders," *J. Immunol.* 192(1 Supp.):200.9

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0031】

本発明は、CD32Bのエピトープに対して特異的な結合部位及びCD79Bのエピトープに対して特異的な結合部位を有し、従ってCD32B及びCD79Bに同時に結合できる二重特異性結合分子の使用方法を対象とする。本発明は特に、二重特異性抗体（即ち「CD32B × CD79B抗体」）又は二重特異性ダイアボディ（即ち「CD32B × CD79Bダイアボディ」）、及び特にFcドメインを更に含む上記ダイアボディ（即ち「CD32B × CD79B Fcダイアボディ」）である、上記分子に関する。本発明は、上記分子の使用、及び炎症性疾患又は状態の治療における、上記分子を含有する医薬組成物の使用を対象とする。

【0032】

詳細には、本発明は、治療的有効量のCD32B × CD79B結合分子を、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、炎症性疾患又は状態を治療する方法を提供し、上記CD32B × CD79B結合分子は、CD32Bのエピトープ及びCD79Bのエピトープに免疫特異的に結合でき、上記CD32B × CD79B結合分子は、約3mg/kg～約30mg/kgの用量、及び1週間に1用量～8週間に1用量の投薬レジメンで投与される。

【0033】

本発明は更に、治療的有効量のCD32B × CD79B結合分子を、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、免疫応答を低下させる又は阻害する方法に関し、上記CD32B × CD79B結合分子は、CD32Bのエピトープ及びCD79Bのエピトープに免疫特異的に結合でき、上記CD32B × CD79B結合分子は、約3mg/kg～約30mg/kgの用量、及び1週間に1用量～8週間に1用量の投薬レジメンで投与される。

【0034】

本発明は更に、上記CD32B × CD79B結合分子が約3mg/kgの用量で投与される、上記CD32B × CD79B結合分子が約10mg/kgの用量で投与される、又は上記CD32B × CD79B結合分子が約30mg/kgの用量で投与される、上記方法の実施形態に関する。

【0035】

本発明は更に、上記投薬レジメンが2週間に1用量（Q2W）である、上記投薬レジメンが3週間に1用量（Q3W）である、又は上記投薬レジメンが4週間に1用量（Q4W）である、上記方法の実施形態に関する。

【0036】

本発明は更に、上記CD32B × CD79B結合分子が、CD32Bのエピトープ及びCD79Bのエピトープに結合する二重特異性抗体、又は上記二重特異性抗体のCD32B及びCD79B結合ドメインを含む分子である、上記方法の実施形態に関する。

## 【0037】

本発明は更に、上記  $CD32B \times CD79B$  結合分子が、 $CD32B$  のエピトープ及び  $CD79B$  のエピトープに結合する  $CD32B \times CD79B$  二重特異性ダイアボディであり、特に上記  $CD32B \times CD79B$  二重特異性ダイアボディが  $CD32B \times CD79B$  二重特異性  $F_c$  ダイアボディである、上記方法の実施形態に関する。

## 【0038】

本発明は更に、上記炎症性疾患又は状態が自己免疫疾患であり、特に上記自己免疫疾患が：アジソン病；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；重症筋無力症；クローン病；皮膚筋炎；家族性腺腫性ポリポーシス；移植片対宿主病（GvHD）；グレーヴス病；橋本甲状腺炎；エリテマトーデス；多発性硬化症（MS）；悪性貧血；ライター症候群；関節リウマチ（RA）；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス（SLE）；1型糖尿病；原発性血管炎（例えばリウマチ性多発筋痛症、巨細胞性動脈炎、ベーチェット病）；天疱瘡；視神経脊髄炎；抗NMDA受容体脳炎；ギランバレー症候群；慢性炎症性脱髓性多発ニューロパシー（CIDP）；グレーヴス眼症；IgG4関連疾患；特発性血小板減少性紫斑病（ITP）；及び潰瘍性大腸炎からなる群から選択される、上記方法の実施形態に関する。本発明は特に、上記炎症性疾患又は状態がGvHD、MS、RA又はSLEである、上記方法の実施形態に関する。

10

## 【0039】

本発明は更に、免疫グロブリンの血清レベルが、上記  $CD32B \times CD79B$  結合分子の最初の用量の投与後36日目までに低下する、上記方法の実施形態に関する。本発明は特に、免疫グロブリンがIgM、IgA又はIgGである、上記方法の実施形態に関する。

20

## 【0040】

本発明は更に、BCR仲介型末梢B細胞活性化が、上記  $CD32B \times CD79B$  結合分子の単一用量の投与後24時間までに低下し、上記B細胞活性化は、生体外カルシウム動員アッセイによって決定される、上記方法の実施形態に関する。本発明は特に、BCR仲介型B細胞活性化が少なくとも50%阻害され、上記阻害が少なくとも6日間持続する、上記方法の実施形態に関する。

## 【0041】

本発明は更に、末梢B細胞上の上記  $CD32B \times CD79B$  結合部位の少なくとも20%が、上記  $CD32B \times CD79B$  結合分子の最初の用量の投与後6時間占有される、上記方法の実施形態に関する。

30

## 【0042】

本発明は更に、被験者がヒトである、上記方法の実施形態に関する。

## 【0043】

本発明は特に、上記  $CD32B \times CD79B$  結合分子が：

- (A) 配列番号30のアミノ酸配列を含む  $V_L_{CD32B}$  ドメイン；
- (B) 配列番号31のアミノ酸配列を含む  $V_H_{CD32B}$  ドメイン；
- (C) 配列番号32のアミノ酸配列を含む  $V_L_{CD79B}$  ドメイン；
- (D) 配列番号33のアミノ酸配列を含む  $V_H_{CD79B}$  ドメイン

40

を含む、全ての上記方法の実施形態に関する。

## 【0044】

本発明は更に、上記  $CD32B \times CD79B$   $F_c$  ダイアボディが：

- (A) 配列番号39のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖；
- (B) 配列番号41のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；
- (C) 配列番号44のアミノ酸配列を含む第3のポリペプチド鎖

を含む、上記方法の実施形態に関する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0045】

【図1】図1は、それぞれEコイル又はKコイルヘテロ二量体促進ドメイン（選択できる

50

ヘテロ二量体促進ドメインは以下で提示する)を有する2つのポリペプチド鎖からなる2つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディの概略図である。図3A/3Bに示すように、システイン残基がリンカー中及び/又はヘテロ二量体促進ドメイン中に存在してよい。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

【図2】図2は、連結した鎖がFc領域の全体又は一部を形成するように、それぞれCH2及びCH3ドメインを有する2つのポリペプチド鎖からなる2つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディ分子の概略図である。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

【図3】図3A~3Eは、3つのポリペプチド鎖からなる2つのエピトープ結合ドメインを有する、代表的な共有結合ダイアボディ分子の概略図である。CH2~CH3ドメインの2つの配向が示されている(図3A/3B、及び図3C/3D)。上記ポリペプチド鎖のうちの2つは、連結した鎖がFc領域の全体又は一部を形成するように、CH2及びCH3ドメインを有する。VL及びVHドメインを含むポリペプチド鎖はそれぞれ、ヘテロ二量体促進ドメインを更に含み、リンカー(図3A及び3C)中又はヘテロ二量体促進ドメイン(図3D及び3B)中に存在するシステイン残基の間に形成されるジスルフィド結合を介して、互いと共有結合する。図3Eは、図3Aに示されているドメインの配向を有する例示的なCD32B×CD79B~Fcダイアボディの構造及び機能を示す。図3Eに示されているダイアボディは、図3Aのダイアボディの3つのポリペプチド鎖を含むものの、任意に存在するヘテロ二量体促進ドメインを含まない、共有結合複合体である。この複合体は、CH2及びCH3~IgG重鎖ドメインを含むFcドメインと、CD32Bに対して特異的な結合ドメイン及びCD79Bに対して特異的な結合ドメインとを含む。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

【図4】図4は、本発明のダイアボディが免疫系の阻害を仲介し得る例示的な機序を示す。この図に示されているように、本発明のダイアボディは、BCRのCD79B分子及びB細胞のCD32B分子に同時に結合することによって、これらの分子を互いに共連結させることができる。このような共連結は、CD32B分子のITIMをリン酸化された状態とするため、及びITAM仲介型チロシンキナーゼ活性化の結果として放出されるホスホイノシトールメッセンジャーを加水分解するイノシトールポリリン酸5'ホスファターゼ(SHIP)のSH2ドメインを引き付けるために役立つ。このような加水分解は、ITAM活性化シグナルを阻害することによって、B細胞活性化を減衰させるのに役立つ。

【図5】図5は、好みしいCD32B×CD79B~Fcダイアボディの、マウスモデルにおいて生体内の異種GVHDを減少させる能力を示す。

【図6】図6は、ヒト被験者への投与時の、例示的なCD32B×CD79B結合分子の生体内薬物動態を示す。

【図7】図7は、ヒト被験者への投与時の、例示的なCD32B×CD79B結合分子の末梢B細胞への生体内結合の生体外フローサイトメトリー分析を、研究過程全体にわたってまとめたものである。

【図8】図8A~8Dは、生体外フローサイトメトリー分析によって決定される、例示的なCD32B×CD79B結合分子をヒト被験者に投与した後の、末梢B及びT細胞の数を、研究過程全体にわたって示す。

【図9】図9A~9Dは、B細胞の機能に関する研究の方法及び結果を示す。図9A~9Bは、例示的なCD32B×CD79B結合分子のレシピエントのB細胞の機能を評価するために使用した生体外カルシウム動員アッセイの、生体外実験手順及びデータ分析方法を示す。図9C~9Dは、例示的なCD32B×CD79B結合分子をヒト被験者に投与した後の、ピーク応答の低減(図9C)と、曲線下面積(Area Under the Curve: AUC)によって測定される全体の応答の持続的な低減(図9D)とを、研究過程全体にわたって示す。

【図10】図10A~10Cは、CD32B×CD79B結合分子の投与により、ヒト被

10

20

30

40

50

験者の  $CD27^+$  記憶 B 細胞上での BCR 発現が下方制御されることを示す。図 10A : 膜結合 IgG (mIgG) ; 図 10B : 膜結合 IgM ; 図 10C : 膜結合 IgD (mIgD)。データは平均  $\pm$  SEM として提示されている。

【図 11】図 11A ~ 11C は、CD32B × CD79B 結合分子の投与により、ヒト被験者の  $CD27^-$  ナイーブ B 細胞上での BCR 発現が、研究過程全体にわたって下方制御されることを示す。図 11A : 膜結合 IgD (mIgD) ; 図 11B : 膜結合 IgM ; 図 11C : 膜結合 IgM (mIgM) におけるパーセント変化。膜結合免疫グロブリンレベルは、フローサイトメトリーによって決定した。データは平均  $\pm$  SEM として提示されている。

【図 12】図 12A ~ 12C は、CD32B × CD79B 結合分子の投与が、ヒト被験者の血清 Ig レベルを、研究過程全体にわたって変調させることを示す。図 12A : 血清 IgM ; 図 12B : 血清 IgA ; 図 12C : 血清 IgG。血清免疫グロブリン IgA、IgG 及び IgM レベルは、ELISA によって決定した。データは平均  $\pm$  SEM として提示されている。

【図 13】図 13 は、CD32B × CD79B 結合分子の投与が、末梢 B 細胞の表面共刺激分子の生体外フローサイトメトリー分析によって決定される共刺激分子 CD40 のレベルを低減することを示す。データは平均  $\pm$  SEM として提示されている。

【図 14】図 14A ~ 14B は、実施例 1 の例示的な CD32B × CD79B Fc ダイアボディの生体外飽和  $E_{max}$  PK / PD B 細胞結合研究に関する（2つの異なる濃度範囲での）データを示す。データは、線形 線形及び対数 線形スケールにおいてグラフで評価した。

【図 15】図 15A ~ 15F は、標的濃度が得られる用量を同定するために、ヒトにおける CD32B × CD79B 結合分子薬物動態プロファイルを重ね合わせて、前臨床標的濃度を示す。図 15A ~ 15F では、Y 軸は CD32B × CD79B 結合分子濃度 [ng/mL] であり、X 軸は時間（単位：時間）であり、上部、中央及び底部の水平な線はそれぞれ、インビトロ B 細胞結合 / 阻害研究の結合分子濃度値、本研究における EC50 B 細胞結合の結合分子濃度値、並びにヒト化マウスモデルにおける IgG 及び IgM の生体内阻害の結合分子濃度値である。

【図 16】図 16A ~ 16D は、2 週間に 1 回 (Q2W)、3 週間に 1 回 (Q3W) 及び 4 週間に 1 回 (Q4W) の投薬レジメンに関する、被験者の体重に対して 0.3 mg/kg (図 16A)、1 mg/kg (図 16B)、3 mg/kg (図 16C) 及び 10 mg/kg (図 16D) の用量の CD32B × CD79B 結合分子の平均濃度のシミュレーションを示す。実際の時間及び濃度、並びに公称用量を使用した。図 16A ~ 16D に関して、Y 軸は CD32B × CD79B 結合分子濃度 [ng/mL] であり、X 軸は時間（単位：時間）である。

【図 17】図 17A ~ 17D は、図 16A ~ 16D のモデル化されたプロファイルにおける予想変動性 (SD と共に) 示す。

【図 18】図 18 は、HAV を用いたワクチン接種後 57 日目の、健康なヒト被験者の血清中に存在する、HAV 特異性 IgG の濃度を示す。これらのデータは、CD32B × CD79B 結合分子の投与によって、HAV ワクチン接種済みのヒト被験者の HAV 特異性 IgG レベルが低下することを示す。

【図 19】図 19 は、CD40 依存性 B 細胞 IgG 分泌のインビトロ検出によって決定されるように、CD32B × CD79B 結合分子が CD40 依存性 B 細胞応答を阻害することを示す。ヒト B 細胞は、例示的な CD32B × CD79B 結合分子 (20 μg/mL) の存在下又は不在下で、希釈せずに若しくは 3 倍希釈を続けて (1、1/3、1/9 及び 1/27) 使用される刺激因子 (CD40 リガンド (500 ng/mL)、IL-4 (100 ng/mL) 及び IL-21 (20 ng/mL)) を用いて又は用いずに 5 日間培養され、分泌された IgG を ELISA アッセイで決定した。

【発明を実施するための形態】

【0046】

10

20

30

40

50

本発明は、C D 3 2 B のエピトープに対して特異的な結合部位及びC D 7 9 B のエピトープに対して特異的な結合部位を有し、従ってC D 3 2 B 及びC D 7 9 B に同時に結合できる二重特異性結合分子の使用方法を対象とする。本発明は特に、二重特異性抗体（即ち「C D 3 2 B × C D 7 9 B 抗体」）又は二重特異性ダイアボディ（即ち「C D 3 2 B × C D 7 9 B ダイアボディ」）、及び特にF c ドメインを更に含む上記ダイアボディ（即ち「C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディ」）である、上記分子に関する。本発明は、上記分子の使用、及び上記分子を含有する医薬組成物の使用を対象とする。

【0047】

上述のように、C D 7 9 B 及びC D 3 2 B ( F c R I I B ) はいずれも、抗原認識に応答して増殖しているB 細胞によって発現される。本発明の二重特異性結合分子は、これら両方の分子に免疫特異的に結合でき、従ってこれらの分子を共連結させることができる。このような共連結（例えば図4を参照）は、C D 3 2 B 分子のI T I Mをリン酸化された状態とするため、及びC D 7 9 B I T A Mのチロシンキナーゼ仲介型活性化の結果として放出されるホスホイノシトールメッセンジャーを加水分解するイノシトールポリリン酸5' ホスファターゼ（S H I P ）のS H 2 ドメインを引き付けるために役立つ。このような加水分解は、C D 7 9 B のI T A M活性化シグナルを阻害することによって、B 細胞活性化を弱化させるために役立つ。従って本発明の二重特異性結合分子は、望ましくないB 細胞活性化、B 細胞増殖及び抗体分泌に応答する宿主の免疫系を阻害又は弱化させる能力を有し、炎症性疾患及び障害、特に全身性エリテマトーデス（S L E ）、多発性硬化症（M S ）及び移植片対宿主病（G v H D ）の治療において有用である。

10

20

20

【0048】

本明細書において使用される場合、用語「抗体（antibody）」は、特定のドメイン又は部分又は形態（「エピトープ（epitope）」）がこのような分子上に存在することにより、ポリペプチド又はタンパク質若しくは非タンパク質分子に免疫特異的に結合できる、免疫グロブリン分子を指す。エピトープ含有分子は免疫原性活性を有してよく、これにより上記エピトープ含有分子は、動物の体内で抗体産生応答を誘発し、このような分子は「抗原（antigen）」と呼ばれる。エピトープ含有分子が必ずしも免疫原性でなくてよい。

【0049】

天然抗体（I g G 抗体等）は、2つの重鎖と複合体化した2つの軽鎖からなる。天然抗体（I g G 抗体等）の各軽鎖は、可変ドメイン（V L ドメイン）及び定常ドメイン（C L ドメイン）を含有する。天然抗体の各重鎖は、重鎖可変ドメイン（V H ドメイン）、3つの定常ドメイン（C H 1 、C H 2 及びC H 3 ドメイン）、並びにC H 1 ドメインとC H 2 ドメインとの間に位置する「ヒンジ（Hinge）」ドメイン（「H」）を含有する。従って、自然に発生する免疫グロブリン（例えばI g G ）の基本構造単位は、通常は約150,000Daの糖タンパク質として発現される、軽鎖及び2つの重鎖を有する三量体である。各鎖のアミノ末端（「N末端（N-terminal）」）部分は、抗原認識に主要な役割を果たす約100~110個の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシ末端（「C末端（C-terminal）」）部分は定常領域を画定し、軽鎖は単一の定常ドメインを有し、重鎖は通常3つの定常ドメイン及び1つのヒンジドメインを有する。従って、I g G 分子の軽鎖の構造はn V L C L c であり、I g G 重鎖の構造はn V H C H 1 H C H 2 C H 3

30

40

c である（ここでn 及びc はそれぞれ、ポリペプチドのN末端及びC末端を表す）。ある抗体の、抗原のエピトープに結合する能力は、抗体のV L 及びV H ドメインの存在並びにそのアミノ酸配列左右される。抗体軽鎖と抗体重鎖との相互作用、特にそのV L ドメインとV H ドメインとの相互作用は、天然抗体の2つのエピトープ結合部位のうちの1つを形成する。天然抗体は、1つのエピトープ種のみに結合できる（即ち天然抗体は単一特異性である）が、当該種の複数の複製に結合できる（即ち2価性又は多価性を示す）。I g G 分子の可変ドメインは、エピトープと接触した残基を含有する複数の相補性決定領域（C D R ）、及びフレームワークセグメント（F R ）と呼ばれる非C D R セグメントからなり、上記フレームワークセグメントは、一般にC D R ループの構造を維持してC D R の位置を決定することにより、このような接触を可能とする（ただし特定のフレームワーク残

50

基も抗原に接触し得る)。従って、 $V_L$  及び  $V_H$  ドメインは、構造  $n$  F R 1 C D R 1 F R 2 C D R 2 F R 3 C D R 3 F R 4 c を有する。抗体軽鎖の第1、第2及び第3のCDRである(又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る)ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ  $CDR_L$  1 ドメイン、 $CDR_L$  2 ドメイン及び $CDR_L$  3 ドメインと呼ばれる。同様に、抗体重鎖の第1、第2及び第3のCDRである(又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る)ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ  $CDR_H$  1 ドメイン、 $CDR_H$  2 ドメイン、及び $CDR_H$  3 ドメインと呼ばれる。よって、 $CDR_L$  1 ドメイン、 $CDR_L$  2 ドメイン、 $CDR_L$  3 ドメイン、 $CDR_H$  1 ドメイン、 $CDR_H$  2 ドメイン、及び $CDR_H$  3 ドメインという用語は、あるタンパク質に組み込まれた場合に、当該タンパク質が、軽鎖及び重鎖若しくはダイアボディ若しくは単鎖結合分子(例えば  $scFv$ 、 $BiTE$  等)を有する抗体であるか、又は別のタイプのタンパク質であるかにかかわらず、当該タンパク質を、特定のエピトープに結合できるようにする、ポリペプチドを対象としている。従って本明細書において使用される場合、用語「エピトープ結合ドメイン(epitope binding domain)」は、エピトープ結合分子の、このような分子があるエピトープに免疫特異的に結合する能力の原因となる部分を指す。エピトープ結合断片は、上記抗体のCDRドメインのうちの1個、2個、3個、4個、5個又は6個全てを含有でき、またこのようなエピトープに免疫特異的に結合できる一方で、上記抗体のエピトープとは異なるエピトープに対する免疫特異性、親和性又は選択性を呈してよい。しかしながら好ましくは、エピトープ結合断片は、上記抗体のCDRドメインのうちの6個全てを含有する。抗体のエピトープ結合断片は、単一のポリペプチド鎖であってよく(例えば  $scFv$ )、又はそれアミノ末端及びカルボキシル末端を有する2つ以上のポリペプチド鎖を含んでよい(例えばダイアボディ、 $F(ab)_2$  断片等)。

#### 【0050】

本明細書において使用される場合、用語「抗体(antibody)」は:モノクローナル抗体;多重特異性抗体;ヒト抗体;ヒト化抗体;合成抗体;キメラ抗体;ポリクローナル抗体;ラクダ化抗体;単鎖  $Fv$ s( $scFv$ );単鎖抗体;免疫学的に活性の抗体断片(例えば: $F(ab)$ 断片; $F(ab')$ 断片; $F(ab')_2$ 断片; $Fv$ 断片; $V_L$ 及び/若しくは $V_H$ ドメインを含有する断片、又はある抗原等に特異的に結合する $V_L$ ドメインの相補性決定領域(CDR)(即ち $CDR_L$ 1、 $CDR_L$ 2及び/若しくは $CDR_L$ 3)若しくは $V_H$ ドメインの相補性決定領域(CDR)(即ち $CDR_H$ 1、 $CDR_H$ 2及び/若しくは $CDR_H$ 3)の相補性決定領域(CDR)のうちの1つ、2つ若しくは3つを含有する断片等といったエピトープに結合できる、抗体断片);二重官能性又は多重官能性抗体;ジスルフィド結合二重特異性  $Fv$ s( $sdFv$ );細胞内抗体;及び以上のうちのいずれの、エピトープ結合断片を包含する。特に用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性の断片、即ちエピトープ結合部位を含有する分子を包含することを意図したものである。免疫グロブリン分子は、いずれのタイプ(例えば、 $IgG$ 、 $IgE$ 、 $IgM$ 、 $IgD$ 、 $IgA$ 及び $IgY$ )、クラス(例えば、 $IgG_1$ 、 $IgG_2$ 、 $IgG_3$ 、 $IgG_4$ 、 $IgA_1$ 及び $IgA_2$ )又はサブクラスのものとすることができます(例えば米国公開特許第20040185045号;米国公開特許第20050037000号;米国公開特許第20050064514号;米国公開特許第20050215767号;米国公開特許第20070004909号;米国公開特許第20070036799号;米国公開特許第20070077246号;及び米国公開特許第20070244303号参照)。この数十年、抗体の治療的潜在能力に対する関心が再び高まっており、抗体は、生命工学由来の薬剤の筆頭となるクラスの1つとなっている(Chan, C.E. et al. (2009)

“The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。200を超える抗体系薬剤が使用認可済み、又は開発中である。

#### 【0051】

用語「キメラ抗体(chimeric antigen)」は、これらが所望の生物活性を示す限りにおいて、重鎖及び/又は軽鎖の一部分がある種(例えばマウス)由来のある抗体又は抗体ク

10

20

30

40

50

ラス若しくはサブクラスと同一又は相同でありながら、残りの部分が別の種（例えばヒト）の抗体又は抗体クラス若しくはサブクラスと同一又は均質である、抗体を指す。本明細書における関心対象のキメラ抗体は、非ヒト靈長類（例えば旧世界ザル、類人猿等）由來の可変ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を含む「靈長類化（primatized）」抗体を含む。

#### 【0052】

本明細書において使用される場合、用語「モノクローナル抗体（monoclonal antibody）」は、略均質な抗体の集団のうちの1つの抗体を表し、即ち上記集団を構成する個々の抗体は、微量存在し得る自然発生的突然変異を有する抗体の可能性を除いて同一である。また本明細書において使用される場合、用語「ポリクローナル抗体（polyclonal antibody）」は、不均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。用語「モノクローナル（monoclonal）」は、抗体の略均質な集団であるという抗体の特性を示し、いずれの特定の方法によって（例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、遺伝子導入動物等によって）抗体を產生することを要求するものとして解釈してはならない。この用語は、免疫グロブリン全体、及び「抗体」の定義において上述した断片等を含む。モノクローナル抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。採用してよい1つの方法は、Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495-497の方法又はその修正例である。典型的には、モノクローナル抗体はマウス、ラット又はウサギにおいて発現する。上記抗体は、動物を、所望のエピトープを含有する免疫原性量の細胞、細胞抽出物又はタンパク製剤で免疫化することによって產生される。免疫原は、一次細胞、培養された細胞株、癌細胞、タンパク質、ペプチド、核酸又は組織とすることができますが、これらに限定されない。免疫化に使用してよい細胞は、これらを免疫原として使用するよりもある期間（例えば少なくとも24時間）だけ前に、培養してよい。細胞は単独で、又はRibi等の非変性アジュvantと組み合わせて、免疫原として使用してよい（例えばJennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125参照）。一般に細胞は、免疫原として使用される際、完全な状態、及び好ましくは生存できる状態に維持しなければならない。完全な細胞は、破裂した細胞よりも、免疫性を与えられた動物が抗原をより良好に検出できるようにすることができます。変性又は強いアジュvant、例えばフロイントアジュvantの使用は、細胞を破裂させる場合があり、従って推奨されない。免疫原は、2週間に1回若しくは1週間に1回等、周期的な間隔で複数回投与してよく、又は動物中（例えば組織組み換え中）に生存能力を維持できるように投与してよい。あるいは、所望の病原性エピトープに対する免疫特異性を有する既存のモノクローナル抗体及び他の同等の抗体は、当該技術分野で公知のいずれの手段によって、組み換え配列及び產生できる。一実施形態では、このような抗体を配列し、続いてポリヌクレオチド配列を発現又は繁殖のためのベクターにクローン化する。関心対象の抗体をエンコードする配列は、宿主細胞中のベクター中に保持され、続いて上記宿主細胞を、将来使用するために膨張させて冷凍できる。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、本発明の単一特異性又は多重特異性（例えば二重特異性、三重特異性及び四重特異性）分子、並びに親和性が最適化された抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及び/又はイヌ化抗体を生成することによって、抗体の親和性又は他の特徴を改善するための、遺伝子操作のために使用してよい。

#### 【0053】

用語「scFv」は、単鎖可変ドメイン断片を指す。scFv分子は、短い連結ペプチドを用いて軽鎖又は重鎖可変ドメインを連結することによって作製される。Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426) は、一方の可変ドメインのカルボキシ末端と他方の可変ドメインのアミノ末端との間の約3.5 nmを埋める連結ペプチドの例を記載している。他の配列のリンカーも設計及び使用されている（Bird et al. (1988), "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426）。リンカーは、薬剤又はアタッチメントを固体支持体に取り付ける等の更なる機能

10

20

30

40

50

のために修飾できる。単鎖変異型は、組み換え又は合成によって产生できる。s c F v の合成产生のために、自動合成器を使用できる。s c F v の組み換え产生のためには、s c F v をエンコードするポリヌクレオチドを含有する好適なプラスミドを、酵母、植物、昆虫又は哺乳類細胞等の真核細胞又は大腸菌等の原核細胞といった、好適な宿主細胞に導入できる。関心対象のs c F v をエンコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーションといった慣用の操作によって作製できる。得られたs c F v は、当該技術分野において公知の標準的なタンパク質精製技法を用いて単離できる。

## 【 0 0 5 4 】

用語「ヒト化 (humanized)」抗体は、キメラ分子であって、一般に組み換え技術を用いて調製され、非ヒト種からの免疫グロブリンのエピトープ結合部位と、残りの、ヒト免疫グロブリンの構造及び／又は配列に基づく分子の免疫グロブリン構造とを有する、キメラ分子を指す。エピトープ結合部位は、定常ドメインに融合した完全な可変ドメイン、又は可変ドメイン内の適切なフレームワーク領域上に移植されたCDRのみを含んでよい。エピトープ結合部位は野生型であってよく、又は1つ若しくは複数のアミノ酸置換によって修飾されてよい。これにより、ヒト個体の免疫原としての不变領域が削減されるが、外来の可変領域に対する免疫応答の可能性は残る (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。別のアプローチは、ヒト由来不变領域を提供することだけでなく、可変領域を修飾して、ヒト型に可能な限り近くなるように再成形することに焦点を当てている。重鎖及び軽鎖両方の可変領域は、問題となる抗原に応答して変化して結合能力を決定する、4つのフレームワーク領域 (FR) が隣接する3つのCDRを内包することが知られており、上記フレームワーク領域は、ある所与の種において相対的に保存され、またCDRのための足場を提供するものと推定される。ある特定の抗原に対して非ヒト抗体を調製する際、非ヒト抗体由来のCDRを、修飾されるヒト抗体内に存在するFRに移植することによって、可変領域を「再成形」又は「ヒト化」できる。様々な抗体に対するこのアプローチの適用は: Sato, K. et al. (1993) "Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth," Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 及びCo, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154によって報告されている。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は全てのCDR配列を保存する（例えば、マウス抗体からの6つのCDR全てを含むヒト化マウス抗体）。他の実施形態では、ヒト化抗体は、オリジナルの抗体に対してその1つ又は複数のアミノ酸配列が改変された1つ又は複数のCDR（1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ）を有し、これらは、オリジナルの抗体からの1つ又は複数のCDR「に由来する (derived from)」（即ち、このようなCDRに由来する、このようなCDRのアミノ酸配列の知識に由来する、等）1つ又は複数のCDRとも呼ばれる。抗体の可変ドメインをエンコードするポリヌクレオチド配列は、上記誘導体を生成するため及び

10

20

30

40

50

上記抗体の親和性又は他の特徴を改善するための遺伝子操作のために使用できる。抗体をヒト化する際の一般原理は、抗体のエピトープ結合部分の塩基配列を保持しながら、抗体の非ヒト残部をヒト抗体配列と交換するステップを伴う。モノクローナル抗体をヒト化するためには、4つの一般的なステップが存在する。上記ステップは以下の通りである：(1)開始抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインのスクレオチド及び予測されるアミノ酸配列を決定するステップ；(2)ヒト化抗体又はイヌ化抗体を設計するステップ、即ちヒト化又はイヌ化プロセス中に使用する抗体フレームワーク領域を決定するステップ；(3)実際のヒト化又はイヌ化法／技術；並びに(4)ヒト化抗体のトランسفエクション及び発現。例えば米国特許第4,816,567号；米国特許第5,807,715号；米国特許第5,866,692号；及び米国特許第6,331,415号を参照。

10

## 【0055】

上述のように、本発明の二重特異性結合分子は、少なくとも2つのエピトープ結合ドメインを有する。このようなエピトープ結合ドメインはそれぞれ、エピトープに「免疫特異的な(immunospecific)」様式で結合できる。本明細書中で使用される場合、本発明の抗体、ダイアボディ又は他の二重特異性結合分子は、別の分子のある領域(即ちエピトープ)に対して、代替的なエピトープに比べてより頻繁に、より迅速に、より長期間、及び／又はより高い親和性で反応又は連結する場合に、「免疫特異的に」結合する(又は「特異的」結合を示す)、と言い表される。例えば、CD32Bのエピトープ(又はCD79Bのエピトープ)に特異的に結合する抗体は、CD32Bの他のエピトープ(若しくはCD79Bの他のエピトープ)に又はCD32B(若しくはCD79B)以外の分子のエピトープに結合する場合よりも高い親和性で、高い結合活性で、より容易に、及び／又はより長期間、該エピトープに結合する。この定義を読めば、例えば第1の標的に免疫特異的に結合する抗体(又は部分若しくはエピトープ)は、第2の標的に特異的又は優先的に結合してもしなくてもよいことも理解される。従って「免疫特異的結合(immunospecific binding)」は、排他的結合を必ずしも必要としない(ただし含むことはできる)。一般に、ただし必ずしもそうではないが、結合に関する言及は「特異的」結合を意味する。ある抗体の、あるエピトープに免疫特異的に結合する能力は、例えばイムノアッセイによって決定できる。

20

## 【0056】

本発明のヒト化分子のエピトープ結合ドメインは、定常ドメインに融合する完全可変ドメイン、又は適切なフレームワーク領域にグラフトされたこのような可変ドメインの相補性決定領域(CDR)のみを含んでよい。エピトープ結合ドメインは野生型であってよく、又は例えば該分子のいずれの定常ドメインがヒト個体内で免疫原として作用する能力を低減するために、1つ若しくは複数のアミノ酸置換によって修飾してよい。これにより、ヒト個体の免疫原である定常領域が排除される場合があるが、外来可変ドメインの可能性は残る(LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。別のアプローチは、ヒト由来定常領域を提供することだけでなく、上記可変ドメインをヒト形態に可能な限り近くなるように変形させるために上記可変ドメインを修飾することにも、焦点を当てている。重鎖及び軽鎖両方の可変ドメインは、問題となる抗原に応答して変化して結合能力を決定する、4つのフレームワーク領域(FR)が隣接する3つの相補性決定領域(CDR)を内包することが知られており、上記フレームワーク領域は、ある所与の種において相対的に保存され、またCDRのための足場を提供するものと推定される。ある特定の抗原に対して非ヒト抗体を調製する際、非ヒト抗体由来のCDRを、修飾されるヒト抗体に存在するFRに移植することによって、可変ドメインを「再成形」又は「ヒト化」できる。様々な抗体に対するこのアプローチの適用は、Sato, K. et al. (1993) "Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth," Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 50

30

40

50

239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Mono clonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Co nformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construc tion Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antib odes Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et a l. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. ( 1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-428 9; 及びCo, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specifici ty For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154によって報告されている。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は全ての C D R 配列を保存する（例えば、マウス抗体から 10 の 6 つの C D R 全てを含有するヒト化マウス抗体）。他の実施形態では、ヒト化抗体は、オリジナルの抗体に対して配列が異なる改変された 1 つ又は複数の C D R ( 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、 5 つ又は 6 つ ) を有する。

#### 【 0 0 5 7 】

非ヒト免疫グロブリン由来のエピトープ結合部位を含む多数の「ヒト化 ( humanized ) 」抗体分子が説明されており、これらは、げっ歯類又は修飾げっ歯類可変ドメインと、ヒト定常ドメインに融合した、これらに関連する相補性決定領域 ( C D R ) とを有するキメラ抗体を含む（例えばWinter et al. (1991) "Man-made Antibodies," Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989); Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," J. Immunol. 138:4534-4538; 及びBrown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/ Human Chimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47:3577-3583を参照）。他の参照文献は、適切なヒト抗体定常ドメインと融合する前にヒト支持性フレームワーク領域 ( F R ) にグラフと重合される、げっ歯類 C D R について説明している（例えば、Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; 及びJones et al. (1986) "Replacing The C omplementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525を参照）。別の参照文献は、組み換えによってベニアリングされたげっ歯類フレームワーク領域によって支持されたげっ歯類 C D R について説明している。例えば欧州公開特許第 5 1 9 , 5 9 6 号を参照。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントのこれらの部分の治療的応用の期間及び効果を制限する、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫学的応答を最小化するよう設計される。抗体をヒト化するために利用してよい他の方法は、Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476並びに米国特許第 6 , 1 8 0 , 3 7 7 号；米国特許第 6 , 0 5 4 , 2 9 7 号；米国特許第 5 , 9 9 7 , 8 6 7 号；及び米国特許第 5 , 8 6 6 , 6 9 2 号によって開示されている。

#### 【 0 0 5 8 】

##### I I . 抗体定常領域

好みしい C L ドメインは、ヒト I g G C L ドメインである。例示的なヒト I g G C L ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 1 ) :

RTVAAPSVF1 FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG

10

20

30

40

50

NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK

SFNRGEC

である。

【 0 0 5 9 】

あるいは、例示的な C L ドメインは、ヒト Ig G C L ドメインである。例示的なヒト Ig G C L ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 2) :

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA

GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP

TECS

である。

10

【 0 0 6 0 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト Ig G 1 C H 1 ドメインである。例示的なヒト Ig G 1 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 3) :

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAPVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

である。

【 0 0 6 1 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト Ig G 2 C H 1 ドメインである。例示的なヒト Ig G 2 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 4) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAPVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

である。

20

【 0 0 6 2 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト Ig G 4 C H 1 ドメインである。例示的なヒト Ig G 4 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 5) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAPVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

である。

【 0 0 6 3 】

ある例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 1 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 1 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 6) : EPKSCDKTHTCPPCPである。

30

【 0 0 6 4 】

別の例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 2 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 2 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 7) : ERKCCVECPPCPである。

【 0 0 6 5 】

別の例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 4 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 4 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 8) : ESKYGPPCPSCPである。本明細書中に記載されているように、Ig G 4 ヒンジ領域は、S 2 2 8 P 置換等の安定化突然変異を含んでよい。例示的な安定化 Ig G 4 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 9) : ESKYGPPCPPCPである。

40

【 0 0 6 6 】

抗体重鎖の C H 2 及び C H 3 ドメインは相互作用して F c 領域を形成し、この F c 領域は、C D 3 2 B 等の F c 受容体 ( F c R ) を含むがこれに限定されない細胞 F c 受容体によって認識される F c ドメインを含有する。例示的なヒト Ig G 1 の C H 2 C H 3 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 10) :

231 240 250 260 270 280  
APELLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

290 300 310 320 330

GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380

50

PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDI AVE
390	400	410	420	430
WESNGQPENN	YKTPPPVLD	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE
440	447			
ALHNHYTQKS	LSLSPGX			

であり、これは K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付与されており、 X はリシン( K )であるか、又は不在である。

【 0 0 6 7 】

例示的なヒト IgG2 の CH2 CH3 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 11)

:

231	240	250	260	270	280
APPVA-GPSV	FLFPPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN	YKTPPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
440	447				
ALHNHYTQKS	LSLSPGX				

10

であり、これは K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付与されており、 X はリシン( K )であるか、又は不在である。

【 0 0 6 8 】

例示的なヒト IgG3 の CH2 CH3 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 12)

:

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDI AVE	
390	400	410	420	430	
WESSGQPENN	YNTTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	
440	447				
ALHNRFRTQKS	LSLSPGX				

20

であり、これは K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付与されており、 X はリシン( K )であるか、又は不在である。

【 0 0 6 9 】

例示的なヒト IgG4 の CH2 CH3 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 13)

:

231	240	250	260	270	280
APEFLGGPSV	FLFPPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	
340	350	360	370	380	
SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDI AVE	
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN	YKTPPPVLD	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	
440	447				
ALHNHYTQKS	LSLSLGX				

40

50

であり、これは Kabat に記載の EU インデックスによって番号付与されており、X はリシン (K) であるか、又は不在である。

【0070】

本明細書全体を通して、IgG 重鎖の定常領域の残基の番号付与は、Kabat et al.、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5<sup>th</sup>Ed. Public Health Service、NH1、MD (1991) (「Kabat」、これは参照により明示的に本明細書に援用される) に記載の EU インデックスの番号付与である。用語「Kabat に記載の EU インデックス (EU index as in Kabat)」は、ヒト IgG1 EU 抗体の番号付与を指す。免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変ドメインからのアミノ酸は、鎖内のアミノ酸の位置によって指定される。Kabat は、抗体に関する多数のアミノ酸配列を記載し、各サブグループに関するアミノ酸コンセンサス配列を識別し、また各アミノ酸に残基番号を割り当てており、CDR は Kabat によって定義されているように識別される (Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917) によって定義される CDR<sub>H</sub>1 は、5 残基前から始まることを理解されたい)。Kabat の番号付与スキームは、保存されたアミノ酸を参照して、問題となる抗体を、Kabat 中のコンセンサス配列のうちの 1 つと整列させることによって、Kabat の概要に含まれていない抗体にまで拡張可能である。残基番号を割り当てるための上記方法は、当該技術分野において標準的なものとなっており、キメラ又はヒト化変異体を含む異なる抗体中の同等の位置のアミノ酸を容易に識別する。例えば、ヒト抗体軽鎖の 50 位のアミノ酸は、マウス抗体軽鎖の 50 位のアミノ酸と同等の位置を占有する。

10

20

30

40

【0071】

多型は、抗体定常領域内の多数の異なる位置 (例えば Kabat に記載の EU インデックスによる番号付与で 270 位、272 位、312 位、315 位、356 位及び 358 位を含むがこれらに限定されない Fc 位置) において観察されており、従ってここで提示される配列と従来技術の配列との間にはわずかな差異が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多型形態は、十分に特性決定されている。現在、18 個の Gm アロタイプが公知である: G1m (1, 2, 3, 17) 又は G1m (a, x, f, z)、G2m (23) 又は G2m (n)、G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) 又は G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。特に、本発明の抗体が、いずれの免疫グロブリン遺伝子のいずれのアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプを組み込むことができ、本明細書中で提示される配列のアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプに限定されないと考えられる。更に、発現系によっては、CH3 ドメインの C 末端アミノ酸残基 (上記太字) は、翻訳後に除去できる。従って CH3 ドメインの C 末端残基は、本発明の Fc ドメイン含有結合分子の任意のアミノ酸残基である。本発明によって具体的に包含されるのは、CH3 ドメインの C 末端残基が欠けた本発明の結合分子である。また本発明によって具体的に包含されるのは、CH3 ドメインの C 末端リシン残基を含む構造である。

30

40

【0072】

I II. 本発明の好ましい CD32B × CD79B 結合分子

本発明は、CD32B のエピトープ及び CD79B のエピトープに結合でき、これによって、B 細胞の表面上に自然に配列された (即ち組み換えによって誘導された過剰発現なしの) これらの分子に同時に結合できる、二重特異性結合分子に関する。このような特異性結合分子は、単一のポリペプチド鎖 (例えば Biotin) からなってよく、又は好ましくは CD32B × CD79B 結合分子の個々のポリペプチド鎖間の複数のジスルフィド結合の存在によって共有結合複合体を形成する 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ若しくは 6 つ以上のポリペプチド鎖からなってよい。好ましくは、上記分子は、抗体の又は Fc ドメイン含有ダ

50

イアボディのFcドメインに結合するCD32B分子の能力に有意に干渉することなく、又は上記能力を妨害することなく、CD32Bに免疫特異的に結合できる。

【0073】

A. 二重特異性scFv及び抗体

第1の好ましい実施形態では、本発明のCD32B × CD79B結合分子は、BiTE等の单鎖分子であり、これはVL<sub>CD32B</sub>ドメイン、VL<sub>CD79B</sub>ドメイン、VH<sub>CD32B</sub>ドメイン及びVL<sub>CD79B</sub>ドメインを有し、またこれらのドメインはペプチドリンカー分子によつて隔てられており、上記ペプチドリンカー分子は、VL<sub>CD32B</sub>ドメインをVH<sub>CD32B</sub>ドメインと相互作用させてCD32Bエピトープ結合ドメインを形成し、またVL<sub>CD79B</sub>ドメインをVH<sub>CD79B</sub>ドメインと相互作用させてCD79Bエピトープ結合ドメインを形成する。

10

【0074】

第2の好ましい実施形態では、本発明のCD32B × CD79B結合分子は、二重特異性抗体又はそのエピトープ結合断片であり、これは、CD32Bエピトープ結合ドメイン及びCD79Bエピトープ結合ドメインを形成するために、VL<sub>CD32B</sub>ドメイン、VL<sub>CD79B</sub>ドメイン、VH<sub>CD32B</sub>ドメイン及びVL<sub>CD79B</sub>ドメインを有する。このような抗体は、Fcドメインを含有してよい。

【0075】

B. 二重特異性ダイアボディ

1. 非Fcドメイン含有二重特異性ダイアボディ

更なる好ましい実施形態では、本発明のCD32B × CD79B結合分子は、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ以上のポリペプチド鎖からなる二重特異性1価ダイアボディである。

20

【0076】

例えば、図1は、ジスルフィド結合を介して互いに共有結合した2つのポリペプチド鎖からなる、CD32B × CD79B二重特異性1価ダイアボディを示す。第1のポリペプチド鎖のVLドメインは、第2のポリペプチド鎖のVHドメインと相互作用して、第1の抗原（即ちCD32B又はCD79B）に対して特異的な第1の官能性抗原結合部位を形成する。同様に、第2のポリペプチド鎖のVLドメインは、第1のポリペプチド鎖のVHドメインと相互作用して、第2の抗原（即ちCD79B又はCD32B、第1の抗原の性質に左右される）に対して特異的な第2の官能性抗原結合部位を形成する。従って、第1及び第2のポリペプチド鎖のVL及びVHドメインの選択は、これら2つのポリペプチド鎖が集合として、CD32B及びCD79Bに結合できるVL及びVHドメインを含む（即ちこれらがVL<sub>CD32B</sub> / VH<sub>CD32B</sub>及びVL<sub>CD79B</sub> / VH<sub>CD79B</sub>を含む）ように整合される（図1）。このようなVL及びVHドメインそれぞれ、並びにこれらを隔てる介在リンカーをまとめて、上記分子の抗原結合ドメインと呼ぶ。

30

【0077】

上記好ましいCD32B × CD79B二重特異性1価ダイアボディの第1のポリペプチド鎖は（N末端からC末端への方向に）：アミノ末端；CD32B又はCD79Bに結合できるモノクローナル抗体VLドメイン（即ちVL<sub>CD32B</sub>又はVL<sub>CD79B</sub>）；介在スペーサペプチド（リンカー1）；（上記第1のポリペプチド鎖がVL<sub>CD32B</sub>を含有する場合は）CD79B又は（上記第1のポリペプチド鎖がVL<sub>CD79B</sub>を含有する場合は）CD32Bに結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン；介在スペーサペプチド（リンカー2）；ヘテロ二量体促進ドメイン；ヘテロ二量体促進ドメインに改善された安定性を提供するための任意の更なるドメイン；及びC末端を含む（図1）。

40

【0078】

上記好ましいCD32B × CD79B二重特異性1価ダイアボディの第2のポリペプチド鎖は（N末端からC末端への方向に）：アミノ末端；CD79B又はCD32Bに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン（即ちVL<sub>CD79B</sub>又はVL<sub>CD32B</sub>、該ダイアボディの第1のポリペプチド鎖に関して選択されるVLドメインに左右される）；介在リンカ

50

ーペプチド(リンカー1)；(上記第2のポリペプチド鎖がVL<sub>CD79B</sub>を含有する場合は)CD32B又は(上記第2のポリペプチド鎖がVL<sub>CD32B</sub>を含有する場合は)CD79Bに結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン；介在スペーサペプチド(リンカー2)、ヘテロ二量体促進ドメイン；及びC末端を含む(図1)。

## 【0079】

最も好ましくは、上述のVLドメインとVHドメインとを隔てるリンカー1の長さは、上記VL及びVHドメインが互いに対しても結合する(例えば1、2、3、4、5、6、7、8又は9個の介在リンカーアミノ酸残基からなる)のを実質的に又は完全に防止するよう選択される。従って第1のポリペプチド鎖のVL及びVHドメインは、互いに対しても結合することが実質的に又は全くできない。同様に、第2のポリペプチド鎖のVL及びVHドメインは、互いに対しても結合することが実質的に又は全くできない。好ましい介在スペーサペプチド(リンカー1)は、配列(配列番号14)：GGGSAGGGGを有する。

## 【0080】

リンカー2の目的は、ポリペプチド鎖のVHドメインを、該ポリペプチド鎖の任意に存在するヘテロ二量体促進ドメインから隔てることである。多様なリンカーのいずれをリンカー2として使用することができる。上記リンカー2の好ましい配列は、IgG CH1ドメイン由来のアミノ酸配列：ASTKG(配列番号15)、又はジスルフィド結合を介して第1及び第2のポリペプチド鎖を互いに共有結合させるために使用できるシステイン残基を有するGGCGGG(配列番号16)を有する。リンカー2であるASTKG(配列番号15)はこのようなシステインを有していないため、上記リンカー2の使用は好ましくは、配列番号23のEコイル又は配列番号24のKコイル(以下を参照)といったシステイン含有ヘテロ二量体促進ドメインの使用を伴う。従って一実施形態では、ポリペプチド鎖のリンカー2は、(第1及び第2のポリペプチド鎖を互いに共有結合させるために)システイン残基を有する。別の実施形態では、ポリペプチド鎖のリンカー2はシステインを有さず、上記ポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインがこのようなシステイン残基を有することにより、第1及び第2のポリペプチド鎖を互いに共有結合させる。

## 【0081】

第1及び第2のポリペプチド鎖のヘテロ二量体の形成は、ヘテロ二量体促進ドメインを含めることによって促進できる。このようなドメインは、一方のポリペプチド鎖上にGVEPKSC(配列番号17)又はVEPKSC(配列番号18)を、もう一方のポリペプチド鎖上にGFGEC(配列番号19)又はFNRGEC(配列番号20)を含む(米国特許出願公開第2007/0004909号)

しかしながらより好ましくは、本発明のヘテロ二量体促進ドメインは、少なくとも6つ、少なくとも7つ又は少なくとも8つの荷電アミノ酸残基を含む、反対の極の1つ、2つ、3つ又は4つのタンデム反復コイルドメインから形成される(Apostolovic, B. et al. (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil," Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain," J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils," Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions," Analytical Biochemistry 399:138-40; Cachia, P.J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding," Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag," Protein S

10

20

30

40

50

ience 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Intertwined Helical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures," Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And  $\alpha$ -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity," J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinrucker, J.D. et al. (2012) "The d - -d--d Vertical Triad is Less Discriminating Than the a - -a--a Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif," J. Amer. Chem. Soc. 134(5): 2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface," J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance," J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies," Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism," J. Gene Med. 10:355-367).

10

20

30

40

50

## 【0082】

このような反復コイルドメインは、完全な反復であってよく、又は置換を有してよい。例えば、第1のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインは、8つの負荷電アミノ酸残基のシーケンスを含んでよく、第2のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインのコイルドメインは、8つの正荷電アミノ酸残基のシーケンスを含んでよい。反対の電荷のコイルを他方のポリペプチド鎖に対して使用する場合、第1又は第2のポリペプチド鎖にどちらのコイルを設けるかは重要ではない。しかしながら、本発明の好ましいC D 3 2 B × C D 7 9 B二重特異性1価ダイアボディは、負荷電コイルを有する第1のポリペプチド鎖を有する。正荷電アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン等であってよく、及び/又は負荷電アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸等であってよい。正荷電アミノ酸は好ましくはリジンであり、及び/又は負荷電アミノ酸は好ましくはグルタミン酸である。(このようなドメインはホモ二量体化を阻害し、これによってヘテロ二量体化を促進するため) 単一のヘテロ二量体促進ドメインしか採用できないが、本発明のダイアボディの第1及び第2のポリペプチド鎖両方が、ヘテロ二量体促進ドメインを含有することが好ましい。

## 【0083】

好ましい実施形態では、ヘテロ二量体促進ドメインのうちの1つは、4つのタンデム「Eコイル」螺旋ドメイン(配列番号21: EVAALEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK)を含み、そのグルタミン酸残基は、pH 7において負の電荷を形成し、またその一方で、ヘテロ二量体促進ドメインのうちのもう一方は、4つのタンデム「Kコイル」ドメイン(配列番号22: KVAALKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE)を含み、そのリジン残基は、pH 7において正の電荷を形成する。このような荷電ドメインの存在により、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の連結が促進され、従ってヘテロ二量体化が促進される。特に好ましいのは、配列番号21の上記4つのタンデム「Eコイル」螺旋ドメインのうちの1つが、システイン残基: EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK(配列番号23)を含有するように修飾されている、ヘテロ二量体促進ドメインである。同様に、特に好ましいのは、配列番号22の上記4つのタンデム「Kコイル」螺旋ドメインのうちの1つが、システイン残基: KVAACKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE(配列番号24)を含有するように修飾されている、ヘテロ二量体促進ドメインである。

## 【0084】

2. Fcドメイン含有二重特異性ダイアボディ

更なる好ましい実施形態では、本発明の  $CD32B \times CD79B$  ダイアボディは更に  $Fc$  ドメインを含む。このような本発明の  $Fc$  ドメイン含有ダイアボディの  $Fc$  ドメインは、完全  $Fc$  領域（例えば完全  $IgG Fc$  領域）であってよく、又は完全  $Fc$  領域の断片のみであってよい。本発明の二重特異性 1 値  $Fc$  ダイアボディの  $Fc$  ドメインは、1 つ又は複数の  $Fc$  受容体（例えば 1 つ又は複数の  $FcR$ ）に結合できる能力を有してよいが、より好ましくは、上記  $Fc$  ドメインは、（野生型  $Fc$  領域が呈する結合に比べて）  $FcR1A (CD64)$  、  $FcR1IA (CD32A)$  、  $FcR1IB (CD32B)$  、  $FcR1IIA (CD16a)$  若しくは  $FcR1IIB (CD16b)$  に結合する能力が大幅に低下しているか、又は上記能力を有しない。本発明の二重特異性 1 値  $Fc$  ダイアボディの  $Fc$  ドメインは、完全  $Fc$  領域の  $CH2$  ドメインのうちのある程度若しくは全体及び／若しくは  $CH3$  ドメインのうちのある程度若しくは全体を含んでよく、又は（例えば完全  $Fc$  領域の  $CH2$  若しくは  $CH3$  ドメインに対する 1 つ若しくは複数の挿入及び／若しくは 1 つ若しくは複数の欠失を含んでよい）変異型  $CH2$  及び／若しくは変異型  $CH3$  配列を含んでよい。本発明の二重特異性 1 値  $Fc$  ダイアボディの  $Fc$  ドメインは、非  $Fc$  ポリペプチド部分を含んでよく、又は自然に発生しない完全  $Fc$  領域の部分を含んでよく、又は  $CH2$  及び／若しくは  $CH3$  ドメインの自然に発生しない配向を含んでよい（例えば 2 つの  $CH2$  ドメイン若しくは 2 つの  $CH3$  ドメイン、若しくは N 末端から C 末端への方向において、 $CH3$  ドメインと、これが連結した  $CH2$  ドメイン、等）。

10

## 【0085】

このような本発明の  $Fc$  ドメイン含有ダイアボディは、2 つのポリペプチド鎖を含んでよく（例えば図 2）、又は 3 つ（例えば図 3A～3E）若しくは 4 つ以上のポリペプチド鎖を含んでよい。図 2 は、各ヘテロ二量体促進ドメインが  $CH2$   $CH3$  ドメインで置換されていることを除いて上述のものと同様の構造を有するダイアボディを示す。好ましくは、このようなポリペプチド鎖で形成された  $Fc$  ドメインは、（野生型  $Fc$  領域が呈する結合に比べて）  $FcR1A (CD64)$  、  $FcR1IA (CD32A)$  、  $FcR1IB (CD16a)$  又は  $FcR1IIB (CD16b)$  等の活性化  $FcR$  に結合する能力が大幅に低下しているか、又は上記能力を有しない。

20

## 【0086】

図 3A～3E は、3 つのポリペプチド鎖からなる代替的な  $CD32B \times CD79B Fc$  ダイアボディを示し、上記 3 つのポリペプチド鎖のうち、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は互いに共有結合している。上述のダイアボディと同様、第 1 のポリペプチド鎖の  $VL$  ドメインは、第 2 のポリペプチド鎖の  $VH$  ドメインと相互作用して、第 1 の抗原（即ち  $CD32B$  又は  $CD79B$ ）に対して特異的な第 1 の官能性抗原結合部位を形成する。同様に、第 2 のポリペプチド鎖の  $VL$  ドメインは、第 1 のポリペプチド鎖の  $VH$  ドメインと相互作用して、第 2 の抗原（即ち  $CD79B$  又は  $CD32B$ 、第 1 の抗原の性質に左右される）に対して特異的な第 2 の官能性抗原結合部位を形成する。従って、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の  $VL$  及び  $VH$  ドメインの選択は、これら 2 つのポリペプチド鎖が集合として、 $CD32B$  及び  $CD79B$  に結合できる  $VL$  及び  $VH$  ドメインを含む（即ちこれらが  $VL_{CD32B}$  /  $VH_{CD32B}$  及び  $VL_{CD79B}$  /  $VH_{CD79B}$  を含む）ように整合される。このような  $VL$  及び  $VH$  ドメインそれぞれ、並びにこれらを隔てる介在リンカーをまとめて、上記分子の抗原結合ドメインと呼ぶ。

30

## 【0087】

図 3A 及び図 3B に示す  $CD32B \times CD79B$  二重特異性  $Fc$  ダイアボディの実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は（N 末端から C 末端への方向に）：アミノ末端；システム含有ペプチド（ペプチド 1）；抗体  $Fc$  領域の  $CH2$  及び  $CH3$  ドメインの全て又は一部からなる  $IgG Fc$  ドメイン；介在リンカーペプチド（リンカー 3）； $CD32B$  又は  $CD79B$  に結合できるモノクローナル抗体の  $VL$  ドメイン（即ち  $VL_{CD32B}$  又は  $VL_{CD79B}$ ）；介在ペプチド（リンカー 1）；（上記第 1 のポリペプチド鎖が  $VL_{CD32B}$  を含有する場合は） $CD79B$  又は（上記第 1 のポリペプチド鎖が  $VL_{CD79B}$  を含有する場合は） $CD32B$  に結合できるモノクローナル抗体の  $VH$  ドメイン；介在スペーサペプチド

40

50

( リンカー 2 ) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; ヘテロ二量体促進ドメインに改善された安定性を提供するための任意の第 4 のスペーサペプチド ( リンカー 4 ) ; 並びに C 末端を含む。

【 0 0 8 8 】

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの実施形態の第 2 のポリペプチド鎖は ( N 末端から C 末端への方向に ) : アミノ末端 ; C D 7 9 B 又は C D 3 2 B に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン ( 即ち V L <sub>CD79B</sub> 又は V L <sub>CD32B</sub> 、該ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖に関して選択される V L ドメインに左右される ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 1 ) ; ( 上記第 2 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD79B</sub> を含有する場合は ) C D 3 2 B 又は ( 上記第 2 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD32B</sub> を含有する場合は ) C D 7 9 B に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン ; 介在スペーサペプチド ( リンカー 2 ) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; 及び C 末端を含む。

10

【 0 0 8 9 】

上記好ましい C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖は ( N 末端から C 末端への方向に ) : アミノ末端 ; システイン含有ペプチド ( ペプチド 1 ) ; 第 1 のポリペプチド鎖の F c ドメインと同一のアイソタイプを有する I g G F c ドメイン ( 好ましくは抗体 F c 領域の C H 2 及び C H 3 ドメイン ) ; 並びに C 末端を含む。

20

【 0 0 9 0 】

図 3 A に示されている C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの実施形態は、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の介在スペーサペプチド ( リンカー 2 ) がシステイン残基を含有せず、このようなシステイン残基がここではこれらのポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインの一部となっている点で、図 3 B に示されているものとは異なる。

20

【 0 0 9 1 】

図 3 C に示されている C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は ( N 末端から C 末端への方向に ) : アミノ末端 ; C D 3 2 B 又は C D 7 9 B に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン ( 即ち V L <sub>CD32B</sub> 又は V L <sub>CD79B</sub> ) ; 介在ペプチド ( リンカー 1 ) ; ( 上記第 1 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD32B</sub> を含有する場合は ) C D 7 9 B 又は ( 上記第 1 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD79B</sub> を含有する場合は ) C D 3 2 B に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン ; システイン含有介在スペーサペプチド ( リンカー 2 ) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; システイン含有ペプチド ( ペプチド 1 ) ; 抗体 F c 領域の C H 2 及び C H 3 ドメインの全て又は一部からなる I g G F c ドメイン ; 並びに C 末端を含む。

30

【 0 0 9 2 】

C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの実施形態の第 2 のポリペプチド鎖は ( N 末端から C 末端への方向に ) : アミノ末端 ; C D 7 9 B 又は C D 3 2 B に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン ( 即ち V L <sub>CD79B</sub> 又は V L <sub>CD32B</sub> 、該ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖に関して選択される V L ドメインに左右される ) ; 介在リンカーペプチド ( リンカー 1 ) ; ( 上記第 2 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD79B</sub> を含有する場合は ) C D 3 2 B 又は ( 上記第 2 のポリペプチド鎖が V L <sub>CD32B</sub> を含有する場合は ) C D 7 9 B に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン ; システイン含有介在スペーサペプチド ( リンカー 2 ) ; ヘテロ二量体促進ドメイン ; 及び C 末端を含む。

40

【 0 0 9 3 】

図 3 C 及び図 3 D の C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖は ( N 末端から C 末端への方向に ) : アミノ末端 ; システイン含有ペプチド ( ペプチド 1 ) ; 第 1 のポリペプチド鎖の F c ドメインと同一のアイソタイプを有する I g G F c ドメイン ( 好ましくは抗体 F c 領域の C H 2 及び C H 3 ドメイン ) ; 並びに C 末端を含む。

【 0 0 9 4 】

図 3 D に示されている C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの実施形態

50

は、第1及び第2のポリペプチド鎖の介在スペーサペプチド（リンカー2）システイン残基を含有せず、このようなシステイン残基がここではこれらのポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進ドメインの一部となっている点で、図3Cに示されているものとは異なる。

【0095】

第1及び第3のポリペプチド鎖システイン含有ペプチド（ペプチド1）は、同一のアミノ酸配列又は異なるアミノ酸配列から構成されていてよく、1つ、2つ、3つ又は4つ以上のシステイン残基を含有する。特に好ましいペプチド1は、アミノ酸配列（配列番号25）：DKTHTCPPCP又は（配列番号26）：GGGDKTHTCPPCPを有する。好ましい介在リンカーペプチド（リンカー3）は、アミノ酸配列（配列番号27）：APSSSを含み、より好ましくは、アミノ酸配列（配列番号28）：APSSSPMEを有する。好ましい第4のスペーサペプチド（リンカー4）は、配列GGGを有するか、又は配列番号29：GGGNSである。

10

【0096】

好ましくは、本発明のFc含有ダイアボディの第1及び第3のポリペプチド鎖によって形成されるFcドメインは、（野生型Fc領域が呈する結合に比べて）Fc RIIA(CD64)、Fc RIIIA(CD32A)、Fc RIIIA(CD16a)又はFc RIIB(CD16b)等の活性化Fc Rに結合する能力が大幅に低下しているか、又は上記能力を有しない。このような受容体への結合を低減させるか又は排除する突然変異を有するFcドメインは、当該技術分野において公知であり、234位及び235位のアミノ酸置換、265位の置換又は297位の置換を含む（例えば米国特許第5,624,821号を参照；この特許は参照により本出願に援用される）。ある好ましい実施形態では、CH2及びCH3ドメインは、234位におけるアラニンでの置換、及び235位におけるアラニンでの置換を含む。

20

【0097】

本発明のFc含有ダイアボディの第1及び第3のポリペプチド鎖のCH2及び/又はCH3ドメインは同一である必要はなく、有利には2つのポリペプチド間の複合体形成を促進するために修飾される。例えば、CH2又はCH3ドメインにアミノ酸置換（好ましくは「ノブ（knob）」を形成する嵩高な側鎖基、例えばトリプトファンを含むアミノ酸による置換）を導入して、立体障害により、同様に変異させたドメインとの相互作用を防止し、上記変化させたドメインを、相補的な又は適応した変異（例えばグリシンによる置換）を施されたドメイン、即ち「ホール（hole）」とペアにすることができる。このような一連の突然変異は、Fcダイアボディ分子を含むポリペプチドのいずれのペアに施すことができ、また上記ペアのポリペプチド鎖のいずれの部分に施すことができる。ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進するためのタンパク質加工の方法は、特に免疫グロブリン様分子の加工に関して当該技術分野で公知であり、本明細書に包含される（例えばRidgway et al. (1996) “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621; Atwell et al. (1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35; 及びXie et al. (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101を参照（これらはそれぞれ

30

参照によりその全体が本明細書に援用される）。好ましくは、ノブは第1のポリペプチド鎖のCH2 CH3ドメインに加工され、ホールは第3のポリペプチド鎖のCH2 CH3ドメインに加工される。従って「ノブ」は、第1のポリペプチド鎖がそのCH2及び/又はCH3ドメインを介してホモ二量体化するのを防止する役割を果たすことになる。第3のポリペプチド鎖は好ましくは「ホール」置換基を含有するため、第1のポリペプチド鎖とヘテロ二量体化し、かつそれ自体とホモ二量体化する。好ましいノブは、天然IgG Fc領域を修飾して修飾基T366Wを含有させることによって生成される。好ましいホールは、天然IgG Fc領域を修飾して修飾基T366S、L368A及びY407Vを含有させることによって生成される。第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を、第1、第2及び第3のポリペプチド鎖を含む最終的な二重特異性1価Fcダイアボディから精製

40

50

するのを補助するために、好ましくは、第3のポリペプチド鎖のホール担持C H 2及びC H 3ドメインのタンパク質A結合部位を、位置4 3 5 ( H 4 3 5 R )におけるアミノ酸置換によって突然変異させる。第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を、第1、第2及び第3のポリペプチド鎖を含む最終的な二重特異性1価F cダイアボディから精製するのを補助するために、好ましくは、第3のポリペプチド鎖のC H 2及びC H 3ドメインのタンパク質A結合部位を、アミノ酸置換によって突然変異させる。このようにして、第3のポリペプチド鎖ホモ二量体はタンパク質Aに結合せず、その一方で二重特異性1価F cダイアボディは、第1のポリペプチド鎖のタンパク質A結合部位を介してタンパク質Aに結合する能力を有したままとなる。

【0098】

10

3. 例示的なC D 3 2 B × C D 7 9 B二重特異性ダイアボディ

本発明の例示的なC D 3 2 B × C D 7 9 B二重特異性ダイアボディは、2つ以上のポリペプチド鎖を含み、また：

(1) C D 3 2 Bに結合する抗体のV Lドメイン (V L<sub>CD32B</sub>)：上記V L<sub>CD32B</sub>ドメインは、配列(配列番号30)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA  
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG  
GTKVEIK

を有する；

(2) C D 3 2 Bに結合する抗体のV Hドメイン (V H<sub>CD32B</sub>)：上記V H<sub>CD32B</sub>ドメインは、配列(配列番号31)：

EVQLVESGGG LVQPQGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE  
IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLMQNSLRA EDTAVYYCGA  
LGLDYWGQGT LTVSS

を有する；

(3) C D 7 9 Bに結合する抗体のV Lドメイン (V L<sub>CD79B</sub>)：上記V L<sub>CD79B</sub>ドメインは、配列(配列番号32)：

DVVMQTQSPPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN  
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
LTFGGGTKE IK

を有する；

(4) C D 7 9 Bに結合する抗体のV Hドメイン (V H<sub>CD79B</sub>)：上記V H<sub>CD79B</sub>ドメインは、配列(配列番号33)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGM  
IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM  
GYWGQQGTTVT VSS

を有する

を含む。

【0099】

30

本発明の第1の例示的なC D 3 2 B × C D 7 9 B二重特異性ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖を有する。このような例示的なダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：N末端；上述のV L<sub>CD32B</sub>ドメイン；リンカー1；上述のV H<sub>CD79B</sub>ドメイン；システイン含有リンカー2；Eコイルドメイン；及びC末端の構造を有する。このような好ましいポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号34)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA  
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG  
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN  
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTSTSTAYMELRS  
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAALE KEVAALEKEV  
AALEKEVAAL EK

40

50

である。

【0100】

配列番号34において、アミノ酸残基1～107は、CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>) (配列番号30)であり、アミノ酸残基108～115はリンカー-1 (配列番号14)であり、アミノ酸残基116～228は、CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>) (配列番号33)であり、アミノ酸残基229～234はシステイン含有リンカー-2 (配列番号16)であり、アミノ酸残基235～262はヘテロ二量体促進Eコイルドメイン (配列番号21)である。

【0101】

このような例示的なダイアボディの第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に、(配列番号35)：

DVVTMGTSPSLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN  
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 LTFGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS  
 LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVVSSGGCG GGKVAALKEK  
 VAALKVAA LKEKVAALKE

のアミノ酸配列を有する。

【0102】

配列番号35において、アミノ酸残基1～112は、CD79Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD79B</sub>) (配列番号32)であり、アミノ酸残基113～120はリンカー-1 (配列番号14)であり、アミノ酸残基121～236は、CD32Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD32B</sub>) (配列番号31)であり、アミノ酸残基237～242はシステイン含有リンカー-2 (配列番号16)であり、アミノ酸残基243～270はヘテロ二量体促進Kコイルドメイン (配列番号22)である。

【0103】

本発明の第2の例示的なCD32B×CD79B二重特異性ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖を有し、そのうち第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：N末端；上述のVL<sub>CD32B</sub>ドメイン；リンカー-1；上述のVH<sub>CD79B</sub>ドメイン；リンカー-2；システイン含有Eコイルドメイン；及びC末端の構造を有する。このような好ましいポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号36)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA  
 ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG  
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN  
 WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDT S TSTAYMELRS  
 LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSAS TKGEVAACEK EVAALEKEVA  
 ALEKEVAALE K

である。

【0104】

配列番号36において、アミノ酸残基1～107は、CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>) (配列番号30)であり、アミノ酸残基108～115はリンカー-1 (配列番号14)であり、アミノ酸残基116～228は、CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>) (配列番号33)であり、アミノ酸残基229～233はリンカー-2 (配列番号15)であり、アミノ酸残基234～261はシステイン含有ヘテロ二量体促進Eコイルドメイン (配列番号23)である。

【0105】

上記第2の例示的なダイアボディの第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に、(配列番号37)：

DVVTMGTSPSLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN  
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP

10

20

30

40

50

LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS  
 LYLMQNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSSASTK GKVAACKEKV  
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

のアミノ酸配列を有する。

【0106】

配列番号37において、アミノ酸残基1～112は、CD79Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD79B</sub>) (配列番号32)であり、アミノ酸残基113～120はリンカー-1 (配列番号14)であり、アミノ酸残基121～236は、CD32Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD32B</sub>) (配列番号31)であり、アミノ酸残基237～241はリンカー-2 (配列番号15)であり、アミノ酸残基242～269はシステイン含有ヘテロ二量体促進Kコイルドメイン (配列番号24)である。

10

【0107】

4. 例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディ

本発明の第1の例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディは、3つのポリペプチド鎖を有する (図3A)。第1のポリペプチド鎖は、配列 (配列番号38) :

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPVQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDI AVE  
 WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGK

20

を有する、ノブ含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメインを含む。

【0108】

従って、このような例示的なFcダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に:ペプチド1; IgG Fc領域のCH2 CH3ドメイン; リンカー-1; CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>); システイン含有リンカー-2; CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>); リンカー-3; Eコイルドメイン; リンカー-4; 及びC末端の構造を有する。このような好ましいポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号39) :

30

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPVQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK  
 GFYPSDI AVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLASAV  
 GDRVTITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS  
 ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGTKE IKGGGSGGGG  
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGM  
 IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM  
 GYWQQGTTVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA LEKEVAALEK EVAALEKGGG  
 NS

40

である。

【0109】

配列番号39、アミノ酸残基1～10はペプチド1 (配列番号25)であり、アミノ酸残基11～227は、ノブ含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメイン (配列番号38)であり、アミノ酸残基228～235はリンカー-3 (配列番号28)であり、アミノ酸残基236～342は、CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>) (配列番号30)であり、アミノ酸残基343～350はリンカー-1 (配列番号14)であり、アミノ酸残基351～463は、CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>) (配列番号33)であり、アミノ酸残基464～469はシステイン含有リンカー-

50

2 (配列番号 16) であり、アミノ酸残基 470 ~ 497 はヘテロ二量体促進 E コイルドメイン (配列番号 21) であり、アミノ酸残基 498 ~ 502 はリンカー 4 (配列番号 29) であり、

第 1 のポリペプチド鎖をコードする好ましいポリヌクレオチドは、配列 (配列番号 40) :

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggg  
 accgtcagtc ttcccttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct  
 cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggg tggacgtgag ccacgaagac  
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc  
 caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca  
 gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag  
 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccaagcc cccatcgaga aaaccatctc  
 caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat  
 cccgggagga gatgaccaag aaccaggtaa gcctgtggg cctggtaaaa  
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tggagagca atggcagcc  
 ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct  
 tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggta gcaacgggg  
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac  
 gcagaagagc ctctccctgt ctccggtaa agcccttcc agctccctta  
 tggaaagacat ccagatgacc cagtctccat cctcccttatac tgcctctgt  
 ggagatagag tcaccatcac ttgtcggca agtcaggaaa ttagtggta  
 cttaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggcccttaga cgccctgatct  
 acgcccatac cacttagat tctgggtgcc catccaggta cagttggcagt  
 gagtctggga ccgagttcac cctcaccatac agcagccctc agcctgaaga  
 ttttgcacc tattactgtc tacaatattt tagttatccg ctacgttgc  
 gaggggggac caaggtggaa ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc  
 caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc  
 agtgaaggta fcctgcaagg ctctggtaa cacccttacc agtactgg  
 tgaactgggt gcgcacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatcgaaatg  
 attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcaaagt tcaaggacag  
 agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagccatac atggagctga  
 ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg  
 ggctactggg ggcaaggagcac cacggtaacc gtctccctcg gaggatgtgg  
 cggtgagaa gtggccgcac tggagaaaga gtttgctgct ttggagaagg  
 aggtcgctgc acttgaaaag gaggtcgac ccctggagaa aggccggcggg  
 aactct

を有する。

#### 【 0 1 1 0 】

このような例示的な Fc ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方向に : CD79B に結合する抗体の VL ドメイン (VL<sub>CD79B</sub>) ; リンカー 1 ; CD32B に結合する抗体の VH ドメイン (VH<sub>CD32B</sub>) ; システイン含有リンカー 2 ; ヘテロ二量体促進 K コイルドメイン ; 及び C 末端の構造を有する。

#### 【 0 1 1 1 】

第 2 のポリペプチド鎖に関する好ましい配列は、(配列番号 41) :

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN  
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 LTFGGGTKE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS  
 LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSSGGCG GGKVAALKEK  
 VAALKEVAA LKEKVAALKE

10

20

30

40

50

である。

【0 1 1 2】

配列番号41において、アミノ酸残基1～112は、CD79Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD79B</sub>) (配列番号32) であり、アミノ酸残基113～120はリンカー-1 (配列番号14) であり、アミノ酸残基121～236は、CD32Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD32B</sub>) (配列番号31) であり、アミノ酸残基237～242はシステイン含有リンカー-2 (配列番号16) であり、アミノ酸残基243～270はヘテロ二量体促進Kコイルドメイン (配列番号22) である。

【0 1 1 3】

第2のポリペプチド鎖をコードする好ましいポリヌクレオチドは、配列 (配列番号42) 10) :

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgtatg
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac
cgccctaattt atctgggtgc taaactggac tctgggtcc cagacagatt
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg
aggctgagga tttgggggtt tattactgct ggcaagggtac acatttccg
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg
cggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccc cctctggatt cacttttagt
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg
gttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg
agtctgtat agggagggtc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgttatta
ctgtgggct ctggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg
tctccctccgg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa
tttgctgctt taaaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgccagc
cctgaaaagag

```

を有する。

【0 1 1 4】

このような例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディは、第3のポリペプチド鎖を有し、これは、アミノ酸配列 (配列番号43) :

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDs DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGK

```

を有するホール含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメインを含む。

【0 1 1 5】

よって、このような例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディの第3のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号44 : 40

```

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDs DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

```

である。

【0 1 1 6】

配列番号44において、アミノ酸残基1～10はペプチド1 (配列番号25) であり、アミノ酸残基11～227は、ホール含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメイン 50

(配列番号43)である。

【0117】

第3のポリペプチド鎖をコードする好ましいポリヌクレオチドは、配列(配列番号45)：

```
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctaag ccgcgggggg
accgtcagtc ttcctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgtct
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggg tggacgtgag ccacgaagac
cctgaggta agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
caagacaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggta
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaggatct ccaacaaagc cctccagcc cccatcgaga aaaccatctc
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
cccggagga gatgaccaag aaccaggta cgcgtgatcc cgcaatccaa
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tggagagca atgggcagcc
ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct
tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggta gcagcagggg
aacgtctct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac
gcagaagagc ctctccctgt ctccggtaa a
```

を有する。

【0118】

本発明の第2の例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディもまた、3つのポリペプチド鎖を有する(図3B)。第1のポリペプチド鎖は、配列番号38のアミノ酸配列を有するノブ含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメインを含む。

【0119】

よって、このような第2の例示的なFcダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：ペプチド1；ノブ含有IgG Fc領域のCH2 CH3ドメイン；リンカー1；CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>)；リンカー2；CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>)；リンカー3；システイン含有Eコイルドメイン；リンカー4；及びC末端の構造を有する。このような好ましいポリペプチドのアミノ酸配列は、(配列番号46)：

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK
GFYPSDI AVE WESNGQPENN YKTPPVQLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLASAV
GDRVTITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS
ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGTKE IKGGGSGGGG
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
GYWQQGTTVT VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGN
```

S

である。

【0120】

配列番号46において、アミノ酸残基1～10はペプチド1(配列番号25)であり、アミノ酸残基11～227は、ノブ含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメイン(配列番号38)であり、アミノ酸残基228～235はリンカー3(配列番号28)であり、アミノ酸残基236～342は、CD32Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD32B</sub>)(配列番号30)であり、アミノ酸残基343～350はリンカー1(配列番号14)であり、アミノ酸残基351～463は、CD79Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD79B</sub>)(配列番号33)であり、アミノ酸残基464～468はリンカー2(配

10

20

30

40

50

列番号 15) であり、アミノ酸残基 469 ~ 496 はシステイン含有ヘテロ二量体促進 E コイルドメイン(配列番号 23) であり、アミノ酸残基 497 ~ 501 はリンカー 4(配列番号 29) である。

【0121】

上記第2の例示的なFcダイアボディの第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：CD79Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD79B</sub>)；リンカー1；CD32Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD32B</sub>)；リンカー2；システイン含有ヘテロ二量体促進Kコイルドメイン；及びC末端の構造を有する。

【0122】

第2のポリペプチド鎖に関する好ましい配列は、(配列番号47)：

DVVMQTQSPS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN  
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS  
 LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWQGQT LTVVSSASTK GKVAACKEKV  
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

である。

【0123】

配列番号47において、アミノ酸残基1~112は、CD79Bに結合する抗体のVLドメイン(VL<sub>CD79B</sub>)(配列番号32)であり、アミノ酸残基113~120はリンカー1(配列番号14)であり、アミノ酸残基121~236は、CD32Bに結合する抗体のVHドメイン(VH<sub>CD32B</sub>)(配列番号31)であり、アミノ酸残基237~241はリンカー2(配列番号15)であり、アミノ酸残基242~269はシステイン含有ヘテロ二量体促進Kコイルドメイン(配列番号24)である。

【0124】

上記第2の例示的なFcダイアボディの第3のポリペプチド鎖は、ホール含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメイン(配列番号43)を含む。

【0125】

よって、このような例示的なCD32B × CD79B二重特異性Fcダイアボディの第3のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、配列番号48：

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
 GFYPSDI AVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

である。

【0126】

配列番号48において、アミノ酸残基1~10はペプチド1(配列番号25)であり、アミノ酸残基11~227は、ホール含有IgG Fc領域のCH2及びCH3ドメイン(配列番号43)である。

【0127】

本発明の代替的なCD32B × CD79B二重特異性1価Fcダイアボディ分子を、図3Cに概略図で示す。このような代替的なCD32B × CD79B Fcダイアボディ分子は、3つのポリペプチド鎖を有し、そのうちの第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、第1及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合する。上記代替的なCD32B × CD79B二重特異性1価Fcダイアボディ分子は、そのドメインの順序が、上述の好ましいCD32B × CD79B二重特異性1価Fcダイアボディ分子中に存在する順序に対して異なる。しかしながら、上述の好ましいCD32B × CD79B Fcダイアボディの場合と同様、この代替的なCD32B × CD79B二重特異性1価Fcダイアボディの第1のポリペプチド鎖のVLドメインは、この代替的なCD32B × CD79B二

10

20

30

40

50

重特異性 1 値 Fc ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖の VH ドメインと相互作用して、第 1 の抗原（即ち CD32B 又は CD79B）に対して特異的な第 1 の官能性抗原結合部位を形成する。同様に、この代替的な CD32B × CD79B 二重特異性 1 値 Fc ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖の VL ドメインは、この代替的な CD32B × CD79B 二重特異性 1 値 Fc ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖の VH ドメインと相互作用して、第 2 の抗原（即ち CD79B 又は CD32B、第 1 の抗原の性質に左右される）に対して特異的な第 2 の官能性抗原結合部位を形成する。従って、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の VL 及び VH ドメインの選択は、これら 2 つのポリペプチド鎖が集合として、CD32B 及び CD79B に結合できる VL 及び VH ドメインを含む（即ちこれらが VL<sub>CD32B</sub> / VH<sub>CD32B</sub> 及び VL<sub>CD79B</sub> / VH<sub>CD79B</sub> を含む）ように整合される（図 3C）。このような VL 及び VH ドメインそれぞれ、並びにこれらを隔てる介在リンカーをまとめて、上記分子の抗原結合ドメインと呼ぶ。

10

## 【0128】

上記代替的な CD32B × CD79B Fc ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方向に：アミノ末端；CD32B 又は CD79B に結合できるモノクローナル抗体の VL ドメイン（即ち VL<sub>CD32B</sub> 又は VL<sub>CD79B</sub>）；介在スペーサペプチド（リンカー 1）；（上記第 1 のポリペプチド鎖が VL<sub>CD32B</sub> を含有する場合は）CD79B 又は（上記第 1 のポリペプチド鎖が VL<sub>CD79B</sub> を含有する場合は）CD32B に結合できるモノクローナル抗体の VH ドメイン；システイン含有・第 3 の介在スペーサペプチド（リンカー 2）；ヘテロ二量体促進ドメイン；ヘテロ二量体促進ドメイン（好ましくは E コイルドメイン）に改善された安定性を提供するための任意の第 4 のスペーサペプチド（リンカー 4）；システイン含有ペプチド（ペプチド 1）；IgG Fc ドメイン（好ましくはノブ含有 IgG Fc 領域の CH2 及び CH3 ドメイン）；並びに C 末端を含む。好ましくは、第 1 のポリペプチド鎖の Fc ドメインは、（野生型 Fc 領域が呈する結合に比べて）Fc RIA (CD64)、Fc RIIIA (CD32A)、Fc RIIB (CD32B)、Fc RIIIA (CD16a) 又は Fc RIIB (CD16b) に結合する能力が大幅に低下しているか、又は上記能力を有しない（図 3C）。

20

## 【0129】

上記代替的な CD32B × CD79B Fc ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方向に：アミノ末端；CD79B 又は CD32B に結合できるモノクローナル抗体の VL ドメイン（即ち VL<sub>CD79B</sub> 又は VL<sub>CD32B</sub>、該ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖に関して選択される VL ドメインに左右される）；介在リンカーペプチド（リンカー 1）；（上記第 2 のポリペプチド鎖が VL<sub>CD79B</sub> を含有する場合は）CD32B 又は（上記第 2 のポリペプチド鎖が VL<sub>CD32B</sub> を含有する場合は）CD79B に結合できるモノクローナル抗体の VH ドメイン；システイン含有スペーサペプチド（リンカー 2）；ヘテロ二量体促進ドメイン（好ましくは K コイルドメイン）；及び C 末端を含む（図 3C）。

30

## 【0130】

上記好ましい CD32B × CD79B Fc ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方向に：アミノ末端；システイン含有ペプチド（ペプチド 1）；第 1 のポリペプチド鎖の Fc ドメインと同一のアイソタイプを有する IgG Fc ドメイン（好ましくはホール含有 IgG Fc 領域の CH2 及び CH3 ドメイン）；並びに C 末端を含む。好ましくは、第 3 のポリペプチド鎖の Fc ドメインは、（野生型 Fc 領域が呈する結合に比べて）Fc RIA (CD64)、Fc RIIIA (CD32A)、Fc RIIB (CD32B)、Fc RIIIA (CD16a) 又は Fc RIIB (CD16b) に結合する能力が大幅に低下しているか、又は上記能力を有しない（図 3C）。

40

## 【0131】

図 3D は、システイン含有リンカー 2（例えば GGC GGG（配列番号 16））が非システイン含有リンカー（例えば ASTKG（配列番号 15））で置換され、各ヘテロ二量体促進ドメインがシステイン残基（例えば EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK（配列番号 23）及

50

びKVAACK KVAALKE KVAALKE KVAALKE (配列番号24) )を含有する、上述のFcダイアボディの変形例を示す。

【0132】

医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に使用できるバルク薬剤組成物（例えば不純又は非滅菌組成物）、及び単位剤形の調製に使用できる医薬組成物（即ち被験体又は患者への投与に好適な組成物）を含む。これらの組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明のCD32B×CD79B結合分子、及び特に本発明のCD32B×CD79Bダイアボディ若しくはFcダイアボディのうちのいずれ、又はこのような作用剤と薬学的に許容可能なキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明の1つ又は複数の分子と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

10

【0133】

本発明はまた、上記CD32B×CD79B結合分子、及び特に本発明のCD32B×CD79Bダイアボディ又はFcダイアボディのうちのいずれと、自己免疫又は炎症性疾患抗原に対して特異的な第2の治療用抗体（例えば自己免疫又は炎症性疾患抗原特異性モノクローナル抗体）と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む、医薬組成物を包含する。

【0134】

ある具体的実施形態では、用語「薬学的に許容可能な（pharmaceutically acceptable）」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して、連邦規制当局若しくは州政府によって承認されている、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「キャリア（carrier）」は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイントアジュバント（完全及び不完全）、賦形剤、又は治療薬の投与に用いられるビヒクルを指す。これらの薬学的キャリアは、水及び石油、動物油、植物油若しくは合成油を含む油（例えば落花生油、大豆油、鉱物油、胡麻油等）等の、無菌液体とすることができる。医薬組成物を静脈投与する場合、水が好ましいキャリアである。特に注射用溶液のための液体キャリアとして、食塩水、並びに水性デキストロース及びグリセロール溶液も採用できる。好適な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。必要な場合は、上記組成物は、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含有することもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、ピル、カプセル、粉体、徐放性製剤等の形態を取ることができる。

20

【0135】

一般に、本発明の組成物の成分は、例えば活性作用剤の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ中の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別個に、又は単位剤形にまとめて混合された状態で供給される。組成物を点滴によって投与する場合、組成物は、滅菌された薬学的グレードの水又は食塩水を内包する点滴ボトルを用いて吐出できる。組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射用無菌水又は食塩水のアンプルを提供できる。

30

【0136】

本発明の組成物は、中性又は塩形態として処方できる。薬学的に許容可能な塩としては：塩酸、リン酸、酢酸、シウ酸、酒石酸等由来の陰イオンを有して形成されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来の陽イオンを有して形成されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0137】

本発明はまた、CD32B×CD79B結合分子、及び特に本発明のCD32B×CD79Bダイアボディ又はFcダイアボディのいずれを、単独で又は上記薬学的に許容可能なキャリアと共に充填した1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供

50

する。更に、疾患の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤又は治療剤も、上記医薬パック又はキットに含めることができる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つ又は複数で充填された1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供する。任意に、このような1つ又は複数のコンテナは、医薬製品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知と関連するものとすることができます、上記通知は、ヒトへの投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映したものである。

#### 【0138】

本発明は、上述の方法に使用できるキットを提供する。一実施形態では、キットは本発明の1つ又は複数の分子を含む。別の実施形態では、キットは更に、自己免疫又は炎症性疾患の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤又は治療剤を、1つ又は複数のコンテナ内に含む。別の実施形態では、キットは更に、自己免疫又は炎症性疾患に関連する1つ又は複数の自己免疫又は炎症性疾患抗原に結合する1つ又は複数の抗体を含む。特定の実施形態では、他の予防剤又は治療剤は、化学療法剤である。他の実施形態では、予防剤又は治療剤は生物学的治療剤又はホルモン療法剤である。

10

#### 【0139】

##### 本発明の組成物の使用

本発明の  $CD32B \times CD79B$  結合分子、及び特に  $CD32B \times CD79B$  ダイアボディ又は  $Fc$  ダイアボディのうちのいずれは、 $CD79B$  の発現に関連する若しくは  $CD79B$  の発現を特徴とするいずれの疾患若しくは状態、又は該疾患に対する B 細胞成分を有するいずれの疾患若しくは状態を治療する能力を有する。従って、限定するものではないが、上記分子を含む医薬組成物を、自己免疫又は炎症性疾患又は状態の診断又は治療に使用してよい。よって本発明は、移植片拒絶反応、移植片対宿主病 (GvHD)、関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS) 及び全身性エリテマトーデス (SLE) を含む B 細胞仲介型疾患又は障害の、治療、予防、進行の遅延、及び / 又は症状の改善に使用してよい。図 5 は、好ましい  $CD32B \times CD79B$   $Fc$  ダイアボディの、マウスにおける異種 GvHD を低減する能力を示す (国際公開第 2015/021089 号を参照 ; この特許は参照により本出願に援用される)。同様に、本発明の  $CD32B \times CD79B$  結合分子を、B 細胞仲介型免疫応答 (例えば自己抗原を含む抗原に対する応答) の低減若しくは阻害、B 細胞活性化の弱化、及び / 又は B 細胞増殖の低減若しくは阻害に採用してよい。

20

#### 【0140】

##### 投与方法

本発明の組成物は、有効量の本発明の医薬組成物を被験体に投与することによる、疾患、障害又は感染症に関連する1つ又は複数の症状の治療、予防及び改善のために提供できる。好ましい態様では、上記組成物は実質的に精製される (即ち上記組成物の効果を制限する、又は望ましくない副作用を生成する物質を実質的に含まない)。ある具体的実施形態では、被験体は動物、好ましくは非靈長類 (例えばウシ属、ウマ科、ネコ科、イヌ科、げっ歯類等) 又は靈長類 (例えばカニクイザル等のサル、ヒト等) といった哺乳類である。ある好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

30

#### 【0141】

本発明の  $CD32B \times CD79B$  結合分子の投与の用量及び「投薬レジメン (dosage regimen)」(投与頻度) は、例えば脂質付加等の修飾によって上記結合分子の取り込み及び組織侵入を増強させることによって、減少させる又は変更することができる。一実施形態では、療法過程全体にわたって、単一の投薬量レベル (以下を参照) を、1回又は複数回投与してよい。第 2 の実施形態では、治療過程全体にわたって提供される投薬量は変動し、例えば漸増投薬レジメン又は漸減投薬レジメンである。投与される投薬量は更に、該療法に対する被験者の耐性、及び該療法に関連する治療の成功の度合いを反映して調整してよい。

40

#### 【0142】

50

障害に関連する 1 つ又は複数の症状の治療、予防及び改善に効果的な本発明の CD32B × CD79B 結合分子の用量は、標準的な臨床技術によって決定できる。処方において採用するべき正確な用量は、投与経路及び状態の重篤度にも左右され、施術者の判断及び各患者の状況に従って決定するべきである。効果的な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られた用量 応答曲線から外挿できる。しかしながら、本発明の CD32B × CD79B 結合分子は好ましくは、典型的には被験者の体重に対して少なくとも約 0.1 mg / kg、少なくとも約 0.2 mg / kg、少なくとも約 0.3 mg / kg、少なくとも約 0.5 mg / kg、少なくとも約 1.0 mg / kg、少なくとも約 3.0 mg / kg、少なくとも約 5.0 mg / kg、少なくとも約 7.5 mg / kg、少なくとも約 10.0 mg / kg、少なくとも約 15 mg / kg、少なくとも約 20 mg / kg 又はそれより多い投薬量で投与される。特に、本発明の CD32B × CD79B 結合分子は、約 1.0 mg / kg、約 3.0 mg / kg、約 10.0 mg / kg、約 20.0 mg / kg 又は約 30.0 mg / kg の投薬量で投与される。本発明の CD32B × CD79B 結合分子、及び特に CD32B × CD79B ダイアボディ又はFc ダイアボディのうちのいずれは好ましくは、上記分子の量を示したアンプル又はサシェといった気密性コンテナ中に梱包される。本明細書中で使用される場合、「投薬量 (dosage)」は、記載されている投薬量を記述するために使用される有効数字の範囲内として記述されている場合、「約 (about)」記載されている投薬量と表現される（例えば投薬量が 0.1 mg / kg ± 0.05 mg / kg である場合、投薬量は約 0.1 mg / kg であり、投薬量が 15 mg / kg ± 0.05 mg / kg である場合、投薬量は約 15 mg / kg である）。

#### 【 0143 】

本発明の CD32B × CD79B 結合分子の投与の頻度は、例えば患者の応答又は投与の方法に大きく左右され得る。従って本発明の組成物は、1日1回、1日2回又は1日3回、1週間に1回、1週間に2回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、6週間に1回、12週間に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、1年に2回、1年に1回等で投与してよい。治療に使用される上記分子の有効な用量設定は、特定の治療の期間全体にわたって増減させてよいことも理解されるだろう。

#### 【 0144 】

しかしながら、本発明の CD32B × CD79B 結合分子を、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、又は15週間超の治療過程中に投与することが好ましく、このような1過程の治療を 1, 2, 3, 4, 5 又は 6 回以上繰り返してよい。ある好ましい実施形態では、被験者を、2週間に1回 (Q2W)、3週間に1回 (Q3W)、4週間に1回 (Q4W)、5週間に1回 (Q5W)、6週間に1回 (Q6W)、7週間に1回 (Q7W)、8週間に1回 (Q8W)、9週間に1回 (Q9W)、10週間に1回 (Q10W)、11週間に1回 (Q11W)、又は12週間に1回 (Q12W) という本発明の分子の療法過程を用いて、治療する。本発明の CD32B × CD79B 結合分子を、2週間に1回 (Q2W)、3週間に1回 (Q3W) 又は4週間に1回 (Q4W) という治療過程で投与することが特に好ましい。いずれのこののような単一の治療過程の終了時に、療法を同一の投薬スケジュール又は異なる投薬スケジュールで再構成してよく、また療法は、同一の投薬量又は異なる投薬量の、投与される CD32B × CD79B 結合分子を含んでよい。従って、治療的又は予防的有効量の本発明の CD32B × CD79B 結合分子を用いた被験者の治療は、単一過程の治療を含むことができ、又は過去のいずれの治療経過と同一であってよい若しくは異なっていてよい複数過程の治療を含むことができる。

#### 【 0145 】

ある好ましい実施形態では、本発明の CD32B × CD79B 結合分子、及び特に CD32B × CD79B ダイアボディ又はFc ダイアボディのうちのいずれを、Q2W、Q3W 又は Q4W の治療過程において、約 3.0 mg / kg、約 10.0 mg / kg、約 20.0 mg / kg 又は約 30.0 mg / kg の投薬量で投与する。

#### 【 0146 】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディは、気密性コンテナ内の乾燥滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、例えは水又は食塩水を用いて、被験体への投与に適切な濃度へと再構成できる。好ましくは、本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子、及び特に C D 3 2 B × C D 7 9 B ダイアボディ又は F c ダイアボディのうちのいずれは、少なくとも 1 m g、より好ましくは少なくとも 2 m g、少なくとも 3 m g、少なくとも 5 m g、少なくとも 1 0 m g、少なくとも 2 0 m g、少なくとも 3 0 m g、少なくとも 5 0 m g、少なくとも 1 0 0 m g、少なくとも 2 0 0 m g、少なくとも 3 0 0 m g、少なくとも 5 0 0 m g 又は少なくとも 1 0 0 0 m g の単位投薬量で、気密性コンテナ内の乾燥滅菌凍結乾燥粉末として供給され、これにより、例えは適切な体積のキャリアを添加すると、0.1 m g / k g、0.3 m g / k g、1 m g / k g 又は 1 0 m g / k g という投与可能な投薬量を調製できる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 7 】

凍結乾燥された C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子、本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子、及び特に C D 3 2 B × C D 7 9 B ダイアボディ又は F c ダイアボディのうちのいずれは、その元々のコンテナ内において 2 ~ 8 で保管するべきであり、またこの分子は、再構成後 1 2 時間以内、好ましくは 6 時間以内、5 時間以内、3 時間以内又は 1 時間以内に投与するべきである。ある代替実施形態では、このような分子は、この分子、融合タンパク質又はコンジュゲート分子の量及び濃度を示す気密性コンテナ内に、液体形態で供給される。好ましくは、液体形態の本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、気密性コンテナに入れて供給され、上記気密性コンテナ内では、上記分子は少なくとも 1  $\mu$  g / m l、より好ましくは少なくとも 2.5 m g / m l、少なくとも 5 m g / m l、少なくとも 1 0 m g / m l、少なくとも 5 0 m g / m l、少なくとも 1 0 0 m g / m l、又は少なくとも 2 0 0 m g / m l の濃度で存在する。

20

30

40

50

## 【 0 1 4 8 】

一実施形態では、患者に投与される本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の投薬量は、単剤療法としての使用のために算出してよい。別の実施形態では、本発明の結合分子は他の治療用組成物と併用され、患者に投与される投薬量は、上記結合分子を単剤療法として使用する場合より少ない。

20

40

## 【 0 1 4 9 】

本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子、及び特に C D 3 2 B × C D 7 9 B ダイアボディ又は F c ダイアボディのうちのいずれの好ましい投与方法としては、：非経口投与（例えは皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）；硬膜外；並びに粘膜（例えは鼻腔内及び経口経路）が挙げられるがこれらに限定されない。ある具体的実施形態では、本発明の分子は、筋肉内、静脈内又は皮下投与される。組成物は、いずれの便利な経路によって、例えは点滴又はボーラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚層（例えは口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通した吸収によって投与してよく、他の生物学的活性作用剤と共に投与してよい。投与は全身性又は局所性とすることができます。

30

40

## 【 0 1 5 0 】

ある具体的実施形態では、本発明の医薬組成物を、治療が必要な領域に局所的に投与することが望ましい場合があり、これは、以下に限定されるものではないが、例えは局所的点滴によって、注射によって、又はインプラントを用いて達成してよく、上記インプラントは多孔性、非多孔性又はゼラチン材料性であり、シラスティック膜等の膜又は纖維を含む。好ましくは、本発明の分子を投与する際、この分子が吸収されない材料を使用するよう注意しなければならない。

30

40

50

## 【 0 1 5 1 】

## 本発明の実施形態

これより、本発明の特定の実施形態の非限定的な例を提供する。

30

40

50

## 【 0 1 5 2 】

## 実施形態 1

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、それを必要とする被験者に投与す

るステップを含む、炎症性疾患又は状態を治療する方法であって、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。

#### 【 0 1 5 3 】

##### 実施形態 2

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、B 細胞仲介型免疫応答を低下させる又は阻害する方法であって、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。10

#### 【 0 1 5 4 】

##### 実施形態 3

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、B 細胞活性化を弱化させる方法であって、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。

#### 【 0 1 5 5 】

##### 実施形態 4

治療的有効量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を、それを必要とする被験者に投与するステップを含む、B 細胞増殖を低下させる又は阻害する方法であって、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B のエピトープ及び C D 7 9 B のエピトープに免疫特異的に結合でき、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量、及び 1 週間に 1 用量 ~ 8 週間に 1 用量の投薬レジメンで投与される、方法。20

#### 【 0 1 5 6 】

##### 実施形態 5

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 m g / k g の用量で投与される、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。30

#### 【 0 1 5 7 】

##### 実施形態 6

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 3 m g / k g の用量で投与される、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

#### 【 0 1 5 8 】

##### 実施形態 7

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、約 1 0 m g / k g の用量で投与される、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

#### 【 0 1 5 9 】

##### 実施形態 8

上記投薬レジメンは、2 週間に 1 用量 ( Q 2 W ) である、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

#### 【 0 1 6 0 】

##### 実施形態 9

上記投薬レジメンは、3 週間に 1 用量 ( Q 3 W ) である、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

#### 【 0 1 6 1 】

##### 実施形態 10

上記投薬レジメンは、4 週間に 1 用量 ( Q 4 W ) である、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

つに記載の方法。

【0162】

実施形態11

上記CD32B×CD79B結合分子は、CD32Bのエピトープ及びCD79Bのエピトープに結合する二重特異性抗体、又は上記抗体のCD32B及びCD79B結合ドメインを含む分子である、実施形態1～10のいずれか1つに記載の方法。

【0163】

実施形態12

上記CD32B×CD79B結合分子は、CD32Bのエピトープ及びCD79Bのエピトープに結合するCD32B×CD79B二重特異性ダイアボディである、実施形態1～11のいずれか1つに記載の方法。10

【0164】

実施形態13

上記CD32B×CD79B二重特異性ダイアボディは、CD32B×CD79BFcダイアボディである、実施形態12に記載の方法。

【0165】

実施形態14

上記炎症性疾患又は状態は自己免疫疾患である、実施形態1又は5～13のいずれか1つに記載の方法。

【0166】

実施形態15

上記自己免疫疾患は：アジソン病；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；重症筋無力症；クローン病；皮膚筋炎；家族性腺腫性ポリポーラス；移植片対宿主病（GVHD）；グレーヴス病；橋本甲状腺炎；エリテマトーデス；多発性硬化症（MS）；悪性貧血；ライター症候群；関節リウマチ（RA）；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス（SLE）；1型糖尿病；原発性血管炎（例えばリウマチ性多発筋痛症、巨細胞性動脈炎、ベーチェット病）；天疱瘡；視神経脊髄炎；抗NMDA受容体脳炎；ギランバレー症候群；慢性炎症性脱髓性多発ニューロパチー（CIDP）；グレーヴス眼症；IgG4関連疾患；特発性血小板減少性紫斑病（ITP）；及び潰瘍性大腸炎からなる群から選択される、実施形態14に記載の方法。30

【0167】

実施形態16

上記炎症性疾患又は状態は、GVHD、MS、RA又はSLEである、実施形態15に記載の方法。

【0168】

実施形態17

免疫グロブリンの血清レベルは、上記CD32B×CD79B結合分子の最初の用量の投与後36日目までに低下する、実施形態1～16のいずれか1つに記載の方法。

【0169】

実施形態18

上記免疫グロブリンはIgM、IgA又はIgGである、実施形態17に記載の方法。40

【0170】

実施形態19

上記免疫グロブリンはIgMである、実施形態18に記載の方法。

【0171】

実施形態20

BCR仲介型末梢B細胞活性化は、上記CD32B×CD79B結合分子の最初の用量の投与後24時間までに低下し、上記B細胞活性化は、生体外カルシウム動員アッセイによって決定される、実施形態1～19のいずれか1つに記載の方法。

【0172】

10

20

30

40

50

## 実施形態 2 1

上記 B C R 仲介型 B 細胞活性化は少なくとも 50 % 阻害され、上記阻害は少なくとも 6 日間持続する、実施形態 2 0 に記載の方法。

## 【 0 1 7 3 】

## 実施形態 2 2

末梢 B 細胞上の上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合部位の少なくとも 20 % が、上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の最初の用量の投与後 6 時間占有される、実施形態 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 4 】

## 実施形態 2 3

10

( A ) B 細胞上の C D 4 0 の発現が下方制御され；及び / 又は

( B ) C D 4 0 仲介型 I g G 分泌が阻害される、実施形態 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 5 】

## 実施形態 2 4

上記被験者はヒトである、実施形態 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 6 】

## 実施形態 2 5

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は：

20

( A ) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V L<sub>CD32B</sub> ドメイン；及び

( B ) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H<sub>CD32B</sub> ドメイン

を含む、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 7 】

## 実施形態 2 6

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は：

( A ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む V L<sub>CD79B</sub> ドメイン；及び

( B ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H<sub>CD79B</sub> ドメイン

を含む、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 8 】

## 実施形態 2 7

30

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は：

( A ) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V L<sub>CD32B</sub> ドメイン；

( B ) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H<sub>CD32B</sub> ドメイン；

( C ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む V L<sub>CD79B</sub> ドメイン；及び

( D ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H<sub>CD79B</sub> ドメイン

を含む、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 7 9 】

## 実施形態 2 8

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、二重特異性抗体又はその二重特異性抗原結合断片である、実施形態 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

## 【 0 1 8 0 】

## 実施形態 2 9

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性ダイアボディである、実施形態 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【 0 1 8 1 】

## 実施形態 3 0

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性ダイアボディは、C D 3 2 B × C D 7 9 B Fc ダイアボディである、実施形態 2 9 に記載の方法。

## 【 0 1 8 2 】

## 実施形態 3 1

50

上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディは：

- ( A ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖；  
 ( B ) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；及び  
 ( C ) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む第 3 のポリペプチド鎖  
 を含む、実施形態 3 0 に記載の方法。

【 0 1 8 3 】

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施例を参照することにより、本発明は更に容易に理解されるだろう。これらの実施例は例示として提供されており、そうでないことが明記されていない限り本発明を制限することを意図したものではない。

【 実施例 】

【 0 1 8 4 】

実施例 1

C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 1 値 F c ダイアボディ及び対照ダイアボディの構築  
 C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディを調製し、本発明の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子として採用した。上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディは、表 1 に示すアミノ酸配列を有する 3 つのポリペプチド鎖を含んでいた。

【 0 1 8 5 】

【 表 1 】

表 1	
好ましい C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディ	置換ポリペプチド (N 末端から C 末端への方向に)
第 1 のポリペプチド鎖 (配列番号 3 9)	配列番号 2 5 配列番号 3 8 配列番号 2 8 配列番号 3 0 配列番号 1 4 配列番号 3 3 配列番号 1 6 配列番号 2 1 配列番号 2 9
第 2 のポリペプチド鎖 (配列番号 4 1)	配列番号 3 2 配列番号 1 4 配列番号 3 1 配列番号 1 6 配列番号 2 2
第 3 のポリペプチド鎖 (配列番号 4 4)	配列番号 2 5 配列番号 4 3

上述の C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディは、C D 3 2 B 及び C D 7 9 B に同時に結合できることが分かった。二重特異性 1 値ダイアボディを形成するための方法は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 3 6 6 5 号、国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 7 3 7 9 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 0 5 3 8 号、国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 6 8 7 号、国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 8 号、及び国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 7 号において提供されている。

【 0 1 8 6 】

実施例 2

C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの生体内投与の評価

本発明の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の安全性及び耐容性を評価するために、実施例 1 の C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディを、年齢 1 8 ~ 5 0 歳、B M I 1 8 ~ 3 0 k g / m<sup>2</sup> の健康なヒト被験者に投与した。被験者は、妊婦又は出産の可能性がある

10

20

30

40

50

女性を含まなかった。更に被験者は：重大な急性若しくは慢性の医学的疾患を有する個体；投薬の4週間以内にいずれの処方薬を使用した、若しくは投薬の1週間以内に市販薬を使用した個体；1日10本超喫煙する個体；結核、B型肝炎感染症、C型肝炎感染症若しくはHIV感染症を有する個体；自己免疫障害若しくは血管障害の既往歴を有する個体；又は薬物検査結果が陽性の個体を含まなかった。被験者は更に、450msc超の補正済み(QT)、45bpm未満若しくは120bpm超の心拍数、140mmHg超の収縮期血圧(SBP)、又は90mmHg超の拡張期血圧(DBP)を有する個体を含まなかった。本研究に関与した被験者のベースライン統計を表2に提示する。

【0187】

【表2】

表2	
属性	値
人数	49
平均年齢(歳)	33.4±7.4
性別(M:F)	48:1
人種	
白色人種	12
黒色人種	35
その他	2
平均体重(kg)	78.0±12.1
平均身長(cm)	177.5±7.8

評価は、6つの投薬コホート(それぞれ8人の被験者からなり、この8人の被験者のうち、被験者1～6はCD32B×CD79B Fcダイアボディを投与され、被験者7～8はプラセボで治療された)の使用を含んでいた。各コホート内において、被験者2が被験者1の24時間後に治療を受け、被験者3～5が被験者2の24時間後に治療を受け、被験者7～8が被験者3～5の24時間後に治療を受けるように、CD32B×CD79B Fcダイアボディの投与をずらした。投薬コホートを表3に記載する。

【0188】

【表3】

表3	
投薬コホート	CD32B×CD79B Fcダイアボディの投薬量
1	0.01mg/kg
2	0.1mg/kg
3	0.3mg/kg
4	1.0mg/kg
5	3.0mg/kg
6	10.0mg/kg

投与を受けた被験者を、CD32B×CD79B Fcダイアボディ関連副作用：第2度若しくは第3度房室ブロック、心室性不整脈(トルサード・ド・ポワントを含む)、又はGuidance of Toxicity Grading Scale for healthy adult and adolescent volunteers enrolled in preventive vaccine clinical trialに従って3級以上の有害事象に関して監視した。カバーされていない問題(例えば注入関連応答)に関しては、NCI CTCAE v4.03を用いた。15の有害事象が記録され、そのうちの4つはCD32B×CD79B Fcダイアボディの投与に関連すると思われた。表4は、観察された有害事象をまとめたものである。

【0189】

10

20

30

40

【表4】

有害事象 (MedRa 推奨用語)	表4		関連	
	全て	$\geq$ Gr 3	全て	$\geq$ Gr 3
結膜出血	1	-	-	-
眼の充血	1	-	-	-
両瞳孔の不均等	1	-	-	-
吐き気	1	-	1	-
寒気	1	-	-	-
血管穿刺部位のあざ	1	-	-	-
潰瘍炎	1	-	1	-
上気道感染症	2	-	2	-
ウイルス性上気道感染症	2	-	-	-
挫傷	1	-	-	-
靭帯捻挫	1	-	-	-
四肢の傷害	1	-	-	-
筋肉の緊張	1	-	-	-
眼窩周囲挫傷	1	-	-	-
筋肉の痙攣	1	-	-	-
頭痛	3	-	3	-
眠気	1	-	1	-
末期不眠症	1	-	-	-
鼻づまり	1	-	-	-
鼻漏	1	-	1	-
乾燥肌	1	-	-	-
寝汗	1	-	1	-
搔痒	1	-	-	-
発疹	1	-	1	-
高血圧	1	1	-	-

10

20

30

## A. 体液性免疫応答に対するFcダイアボディの薬力学的效果

図6は、ヒト被験者への投与時の、例示的なCD32B×CD79B結合分子の薬物動態を示す。結合分子の濃度は、検証済みのELISAアッセイで測定し、PKパラメータはノンコンパートメント分析によって算出した。図示されているように、被験者はCD32B×CD79B Fcダイアボディを0.01mg/kg体重、0.1mg/kg体重、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重又は10mg/kg体重の投薬量で投与され、投与後最大57日間にわたって、血清ダイアボディ濃度を測定された。ダイアボディの血清濃度、最大血清濃度( $C_{max}$ )及びAUC(曲線下面積)は全て、投薬濃度の上昇と共に上昇したことが分かった。ダイアボディの半減期は4~8日であった。ダイアボディの迅速な排出が、最低用量(0.01mg/kg)で観察された。平均クリアランス時間(CL)は、1.426mL/h/kg(0.01mg/kg用量)~0.350mL/h/kg(10mg/kg用量)であり、CLと用量との間の関係は非線形であり、用量の増大と共にCLは低下した。血液体積内のダイアボディの分布の指標である定常状態分布体積( $V_{ss}$ )は、用量とは無関係であることが分かった。血清半減期( $T_{1/2}$ )は、0.03mg/kg用量で投与されたダイアボディに関する92時間(~4日)から、10mg/kg用量で投与されたダイアボディに関する191時間(~8日)までであり、用量の増大と共に増大し、これはCLの用量依存性低下と一致していた。PKプロファイルの崩壊が記録され、これは抗薬物抗体(anti-drug-antibody: ADA)の存在を示唆していた。薬物動態データを表5にまとめる。

40

【表5】

表5					
用量 (mg/kg)	C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/mL)	AUC (h* $\mu$ g/mL)	CL (mL/h/kg)	V <sub>ss</sub> (mL/kg)	T <sub>1/2</sub> (Hr)
0.01	0.192	7.423	1.426	154	156
0.1	1.928	113.861	0.917	87	140
0.3	5.903	423.948	0.722	65	92
1.0	23.701	2255.786	0.461	56	143
3.0	58.825	7919.163	0.387	63	172
10.0	197.633	29206.316	0.350	68	191

## B. 末梢B細胞上のCD32B及びCD79Bに結合する能力

投与されたCD32B × CD79B結合分子は、末梢B細胞に結合できることが分かり、これは比較的高い用量レベルにおいて 1 mg / kg 体重の最大占有度と、継続的な 50 % B細胞占有率とを示した。継続的な 20 % B細胞占有率が、0.3 mg / kg において観察された。図7は、研究過程全体にわたる、末梢B細胞に対する結合の生体外フローサイトメトリー分析をまとめたものである。

## 【0191】

## C. 末梢B細胞及びB細胞サブセットの活性化状態の評価

フローサイトメトリー分析を実施して、ダイアボディの投与がB細胞計数(図8A)、T細胞計数(図8B)、B細胞とT細胞との比率(図8C)、及びCD4+T細胞とCD8+T細胞との比率(図8D)の継続的な変化に関連するかどうかを評価した。図8A～8Bに示すように、末梢T細胞の個数には継続的な変化が観察されず、本研究の比較的高い用量では、B細胞の個数の一時的な減少が観察された。図8C～8Dに示すように、末梢B細胞の個数と末梢T細胞の個数との比率には、継続的な変化が観察されなかった。

## 【0192】

## D. 生体外BCR刺激に対する末梢B細胞の応答の評価

生体外カルシウム動員アッセイを実施して、例示的なCD32B × CD79B結合分子のレシピエントのB細胞機能を評価した。簡潔に述べると、投薬前及び投薬後の様々な時点で回収した血液試料からPBM Cを新たに単離し、BCR連結によってCa<sup>++</sup>フラックスを誘導した。イオノマイシンを導入することによって、最大Ca<sup>++</sup>フラックスを誘導した。AUC又はピークの値を、イオノマイシンによって生成された値で正規化することにより、比(AUC) = AUC(イオノマイシン) / AUC(イオノマイシン)とした。図9A～9Bは、本研究で採用した実験手順及びデータ分析方法を示す。

## 【0193】

例示的なCD32B × CD79B結合分子を用いた治療は、抗IgM抗体によるBCR連結に応答してカルシウムフラックスを低減させることができた。これは、本発明のCD32B × CD79B結合分子の、末梢B細胞に対する阻害活性を実証している(図9C～9D)。

## 【0194】

E. CD32B × CD79B結合分子は、CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞上でのBCR発現を下方制御する

例示的なCD32B × CD79B結合分子の投与の効果を更に評価するために、フローサイトメトリーを用いて、膜結合免疫グロブリンレベルを決定した。図10A～10Cは、CD32B × CD79B結合分子の投与が、膜結合IgG(mIgG)(図10A)、膜結合IgM(mIgM)(図10B)、及び膜結合IgD(mIgD)(図10C)の

10

20

30

40

50

発現によって決定されるように、CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞上でのBCR発現を下方制御することを示している。

【0195】

同様の研究により、CD32B × CD79B結合分子の投与が、CD27ナイープメモリーB細胞上でのBCR発現を下方制御することが確認された（図11A：膜結合IgD（mIgD）；図11B：膜結合IgM；図11C：膜結合IgM（mIgM）におけるパーセント変化）。

【0196】

F. CD32B × CD79B結合分子は血清Igレベルを変調する

CD32B × CD79B結合分子の投与の、IgM、IgA及びIgG免疫グロブリンの血清レベルに対する影響を評価した。上記結合分子は、これらの免疫グロブリンの血清レベルを変調することが分かり、IgMレベルが最も大きな低下を示し、IgGレベルは概ね維持された（それぞれ図12A～12C）。IgGは割愛することが望ましい。血清IgMレベルの低下は、形質芽細胞への影響を示唆している。これらの結果は、形質細胞上では発現されないCD79Bの発現と一致している。

【0197】

G. CD32B × CD79B結合分子は共刺激分子CD40のレベルを低下させる

CD32B × CD79B結合分子の投与は、末梢B細胞の表面共刺激分子のフローサイトメトリー分析によって決定されるように、B細胞上でのCD40表面発現レベル（図13A）を低下させることができた。

【0198】

例示的な結合分子（実施例1のCD32B × CD79B Fcダイアボディ）の単回静脈内投薬は、末梢B細胞計数を略減少させず、これは、本発明の結合分子がB細胞を枯渇させないことを示している。フローサイトメトリー分析により、本発明の結合分子が末梢B細胞に結合できることが実証された。末梢B細胞上のこのような結合部位の完全な飽和は、1mg/kgの用量レベルにおいて観察された。上記結合の持続時間は、採用する用量レベルに関連することが分かった。

【0199】

本発明の結合分子は、以下を含む複数の薬力学の用量依存性効果を仲介した：

1. 生体外BCR誘導型Ca<sup>++</sup>動員の低減；
2. CD27<sup>+</sup>メモリーB細胞サブセット上での表面IgG BCR発現の下方制御；
3. IgM<sup>+</sup>ナイープB細胞の個数の低減
4. ナイープB細胞上での表面IgD BCR発現の下方制御；及び
5. B細胞上でのCD40発現の下方制御。

【0200】

本発明の結合分子は、臨床投薬に好適な、複数の好ましい薬力学的特性を仲介した。末梢B細胞は、1mg/kg用量レベルの実施例1の例示的なCD32B × CD79B Fcダイアボディによって完全に飽和され、結合の持続時間は、投薬量の増加に相関し、継続的な20%占有率が0.3mg/kg用量レベルで観察される。本発明の結合分子は末梢B細胞を枯渇させず、B細胞活性を用量依存的に下方制御することが分かった：

1. BCR仲介型Ca<sup>2+</sup>流入の低減；
2. 表面免疫グロブリン発現の下方制御；
3. 血清IgMレベルの低減；及び
4. CD40発現の下方制御。

【0201】

上記データは、炎症性疾患、状態及び障害の治療、特に自己免疫疾患の治療における本発明の有用性を支持するものである。

【0202】

実施例3

CD32B × CD79B結合分子の薬物動態及び薬力学的特性の調査

10

20

30

40

50

$E_{max}$  (最大効果) PK / PD モデルを用いて、本発明の CD32B × CD79B 結合分子の薬物動態 (PK) 及び薬力学 (PD) 的特性をより十分に調査した。簡潔に述べると、B 細胞を様々な濃度の上記結合分子の存在下でインキュベートし、 $E_{max}$  の 50%、60%、80% 及び 90% の阻害をもたらす結合分子の濃度を決定した。

【0203】

レシピエント被験者は、6.3% ~ 15.6% (平均 = 9.4%) のベースライン値を示した。最大応答の 50% を生成する濃度 ( $EC_{50}$ ) は、1677 ng / mL であった。投与される結合分子の濃度が上昇するに従って、パーセント B 細胞結合は、73.1% の % B 細胞結合に関する最大応答 ( $E_{max}$ ) を示す平坦域に達した。このデータを表 6 に示す。生体内ヒト化マウスモデルに基づき、IgG 及び IgM の完全な阻害を示す予想標的濃度は 1,500 ng / mL である。本研究の PK / PD の関係は、 $EC_{50}$  の濃度が、治療用の使用に関して可能性を有する標的濃度となり得ることを示唆している。

10

【0204】

【表 6】

表 6	
% $E_{max}$	濃度 (ng/ml)
50	1677
60	2658
70	4392
80	8103
90	20364

20

図 14A ~ 14B は、(2つの異なる濃度範囲における) 上記データを示す。図 15A ~ 15F は、標的濃度が得られる用量を同定するために、ヒトにおける CD32B × CD79B 結合分子薬物動態プロファイルを重ね合わせて、前臨床標的濃度を示す (投薬量 0.01 mg / kg (図 15A) ; 投薬量 0.1 mg / kg (図 15B) ; 投薬量 0.3 mg / kg (図 15C) ; 投薬量 1 mg / kg (図 15D) ; 投薬量 3 mg / kg (図 15E) ; 投薬量 10 mg / kg (図 15F) での標的濃度の達成)。

【0205】

個々の被験者の薬物動態データをモデル化し、最良のモデルパラメータ推定値を用いて、2週間に1回 (Q2W) 、3週間に1回 (Q3W) 及び4週間に1回 (Q4W) の投薬レジメンでの投与で、複数回の投薬に関するプロファイルを予測した。調査した用量は、1、3 及び 10 mg / kg であった。曝露パラメータ ( $C_{max}$ 、 $C_{min}$ 、及び AUC) の比較を実施し、1 及び 2 コンパートメント IV 注入モデルを調査した。このようなモデル化の結果を、被験者の体重に対して 0.3 mg / kg (図 16A)、被験者の体重に対して 1 mg / kg (図 16B)、被験者の体重に対して 3 mg / kg (図 16C) 及び被験者の体重に対して 10 mg / kg (図 16D) の用量に関して、2週間に1用量 (Q2W) 、3週間に1用量 (Q3W) 及び4週間に1用量 (Q4W) の投薬レジメンについて示す。上記モデル化プロファイルの予測される変動性は、図 17A ~ 17D に (SDと共に) 示されている。

30

【0206】

最初の投薬後の曝露パラメータ ( $C_{max1}$ 、 $C_{min1}$ 、及び  $AUC_1$ ) 並びに定常状態の曝露パラメータ ( $C_{maxss}$ 、 $C_{minss}$ 、及び  $AUC_{ss}$ ) に関する要約した統計を、1、3 及び 10 mg / kg の用量に関して、それぞれ表 7、8 及び 9 に示す。これら 3 つの用量は全て、Q2W、Q3W 及び Q4W レジメンで投与した。表 7、8、9 及び 10 では、AUC は、Q2W、Q3W 及び Q4W レジメンに関して、それぞれ 14、21 及び 28 の投薬間隔にわたって決定した。

40

【0207】

【表7】

表7 0. 3mg/kgの用量に関する、シミュレーションされた曝露パラメータ							
レジメン	属性	最初の投薬			定常状態		
		C <sub>max1</sub> (ng/mL)	C <sub>min1</sub> (ng/mL)	AUC <sub>1</sub> (h*ng/mL)	C <sub>maxss</sub> (ng/mL)	C <sub>minss</sub> (ng/mL)	AUC <sub>ss</sub> (h*ng/mL)
<b>0.3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q2W</b>	幾何平均	18468	399	1294521	18961	446	1359230
	%CV	21	45	14	20	51	14
	平均	18793	429	1305069	19272	487	1369843
	SD	3718	162	182553	3698	208	189344
	中央値	19759	475	1304448	20303	514	1358376
	最小値	13706	219	1066584	14440	237	1127219
	最大値	22482	603	1584875	23045	747	1683169
<b>0.3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q3W</b>	幾何平均	18468	107	1336474	18615	112	1359400
	%CV	21	92	14	21	98	14
	平均	18793	134	1346858	18933	142	1370019
	SD	3718	85	184933	3698	95	189411
	中央値	19759	128	1337058	19937	131	1358688
	最小値	13706	33	1107607	13979	33	1127267
	最大値	22482	252	1642310	22605	278	1683546
<b>0.3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q4W</b>	幾何平均	18468	31	1350494	18520	31	1359230
	%CV	21	182	14	21	187	14
	平均	18793	49	1360943	18842	51	1369843
	SD	3718	43	186955	3706	45	189344
	中央値	19759	36	1345334	19824	36	1358376
	最小値	13706	4	1120902	13819	4	1127219
	最大値	22482	114	1665734	22509	119	1683169

【0208】

10

20

30

【表8】

表8 1 mg / kg の用量に関する、シミュレーションされた曝露パラメータ							
レジメン	属性	最初の投薬			定常状態		
		C <sub>max1</sub> (ng/mL)	C <sub>min1</sub> (ng/mL)	AUC <sub>1</sub> (h*ng/mL)	C <sub>maxss</sub> (ng/mL)	C <sub>minss</sub> (ng/mL)	AUC <sub>ss</sub> (h*ng/mL)
<b>1mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q2W</b>	幾何平均	22538	1099	1941942	23987	1292	2148025
	%CV	22	64	18	22	64	21
	平均	23013	1236	1966948	24454	1467	2185411
	SD	5291	560	341430	5389	749	437841
	中央値	21172	1307	1967100	23043	1503	2175560
	最小値	17327	368	1547998	18798	461	1613971
	最大値	31526	2079	2373060	33025	2744	2714620
<b>1mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q3W</b>	幾何平均	22538	379	2066652	23044	413	2148987
	%CV	22	83	19	22	78	21
	平均	23013	461	2098097	23504	501	2186425
	SD	5291	306	392549	5258	351	438369
	中央値	21172	421	2098349	21884	434	2175963
	最小値	17327	113	1582285	17862	143	1615276
	最大値	31526	1019	2509219	31956	1160	2718422
<b>1mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q4W</b>	幾何平均	22538	144	2114117	22732	150	2148025
	%CV	22	87	20	22	85	21
	平均	23013	186	2148803	23197	195	2185411
	SD	5291	165	416875	5253	176	437841
	中央値	21172	129	2147170	21465	130	2175560
	最小値	17327	59	1595946	17534	69	1613971
	最大値	31526	507	2599666	31654	538	2714620

【0209】

10

20

30

【表9】

表9 3 mg/kgの用量に関する、シミュレーションされた曝露パラメータ							
レジメン	属性	最初の投薬			定常状態		
		C <sub>max1</sub> (ng/mL)	C <sub>min1</sub> (ng/mL)	AUC <sub>1</sub> (h*ng/mL)	C <sub>maxss</sub> (ng/mL)	C <sub>minss</sub> (ng/mL)	AUC <sub>ss</sub> (h*ng/mL)
<b>3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q2W</b>	幾何平均	54486	5472	6488327	61116	6731	7566598
	%CV	18	13	10	18	16	10
	平均	55202	5510	6515372	61868	6799	7599760
	SD	9342	706	649746	10185	1034	771685
	中央値	57786	5467	6374280	64553	6923	7614517
	最小値	40276	4847	5569784	46074	5383	6483798
	最大値	64467	6320	7469875	71898	8065	8583898
<b>3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q3W</b>	幾何平均	54486	2216	7096298	56916	2461	7574231
	%CV	18	24	10	18	27	10
	平均	55202	2268	7125716	57674	2529	7607408
	SD	9342	522	706806	9848	609	772412
	中央値	57786	2292	7015300	60333	2618	7623535
	最小値	40276	1529	6091270	42319	1579	6494141
	最大値	64467	2950	8113876	67381	3282	8594913
<b>3mg/kg</b>	N	6	6	6	6	6	6
<b>Q4W</b>	幾何平均	54486	946	7353730	55451	1002	7566598
	%CV	18	40	10	18	41	10
	平均	55202	1000	7384883	56193	1061	7599760
	SD	9342	328	738474	9608	346	771685
	中央値	57786	1065	7330484	58842	1149	7614517
	最小値	40276	482	6299207	41059	487	6483798
	最大値	64467	1379	8365442	65674	1444	8583898

【0 2 1 0】

10

20

30

【表10】

表10 10 mg/kgの用量に関する、シミュレーションされた曝露パラメータ							
レジメン	属性	最初の投薬			定常状態		
		C <sub>max1</sub> (ng/mL)	C <sub>min1</sub> (ng/mL)	AUC <sub>1</sub> (h*ng/mL)	C <sub>maxss</sub> (ng/mL)	C <sub>minss</sub> (ng/mL)	AUC <sub>ss</sub> (h*ng/mL)
10mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q2W	幾何平均	187747	23684	22895439	218961	30796	28470994
	%CV	10	32	14	12	38	17
	平均	188552	24638	23068595	220351	32493	28803009
	SD	19555	7243	3101087	27625	10968	4747240
	中央値	184731	25253	23091722	216792	33549	28899625
	最小値	167970	14286	19424051	184962	17285	22095139
	最大値	223199	34575	27270524	268285	46008	35558762
10mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q3W	幾何平均	187747	10983	25764809	200795	12486	28519275
	%CV	10	47	15	11	50	17
	平均	188552	11863	25996110	201839	13614	28854051
	SD	19555	4719	3795674	22994	5715	4769110
	中央値	184731	12454	25932750	198684	14095	28970836
	最小値	167970	5649	20974439	174036	6172	22106333
	最大値	223199	17340	31468974	242566	19802	35625556
10mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q4W	幾何平均	187747	5283	27155195	193509	5621	28470994
	%CV	10	58	16	10	60	17
	平均	188552	5907	27429401	194411	6320	28803009
	SD	19555	2789	4233452	21004	3058	4747240
	中央値	184731	6087	27365849	191314	6443	28899625
	最小値	167970	2423	21612851	170370	2520	22095139
	最大値	223199	8864	33574511	231824	9756	35558762

表7、8、9及び10に示されているように、最初の投薬に関するデータに関して、平均C<sub>max1</sub>値は、Q2W、Q3W及びQ4Wレジメンに関して（即ち1mg/kgの投薬レジメン、およそ2.2μg/mL；3mg/kgの投薬レジメン、およそ5.4μg/mL；及び10mg/kgの投薬レジメン、およそ18.7μg/mLに関して）同様であった。これら3つのレジメンの間に、平均AUC<sub>1</sub>値のわずかな差異が観察された。平均C<sub>min1</sub>（トラフ濃度）は、より長い28日の投薬間隔を有するQ4Wレジメン（即ち1mg/kgの投薬レジメン、およそ0.14μg/mL；3mg/kgの投薬レジメン、およそ0.95μg/mL；およそ10mg/kgの投薬レジメン、およそ5μg/mL）に比べて短い投薬間隔（14日）を有するQ2Wレジメンに関して（即ち1mg/kgの投薬レジメン、およそ1.1μg/mL；3mg/kgの投薬レジメン、およそ5μg/mL；及び10mg/kgの投薬レジメン、およそ2.4μg/mLに関して）、比較的高いことが観察された。Q3Wレジメンに関する平均C<sub>min1</sub>は、Q2Wレジメン及びQ4Wレジメン（即ち1mg/kgの投薬レジメン、およそ0.38μg/mL；3mg/kgの投薬レジメン、およそ2.2μg/mL；及び10mg/kgの投薬レジメン、およそ5μg/mL）の平均C<sub>min1</sub>の中間であることが観察された。

## 【0211】

表7、8、9及び10に示されているように、定常状態に関して、平均C<sub>maxss</sub>、C<sub>minss</sub>、及びAUC<sub>ss</sub>は、最初の投薬の値に比べて数値的に高いことが観察され、また最初の投薬に関するデータと同様、Q2W、Q3W及びQ4Wレジメンの平均C<sub>maxss</sub>は同様で

10

20

30

40

50

ある（<13%の差異）ことが観察された。更に、最初の投薬に関するデータと同様、これら3つのレジメンの間に、平均AUC<sub>ss</sub>値のわずかな差異が観察された。しかしながら、Q4Wレジメンの投薬間隔は28日であり、同一の間隔では、Q2Wレジメンで投与された用量の数は、Q4Wレジメンの2倍である。従って、28日の投薬間隔において、Q2Wレジメンに関するAUC<sub>ss</sub>はQ4Wレジメンのおよそ2倍になると予測される。投与されるレジメンにかかわらず、定常状態の曝露パラメータは、最初の投薬に関するデータと比較した場合に、CD32B×CD79B結合分子の蓄積が最小となることを示唆している。

#### 【0212】

要約すると、本発明の結合分子は、最大10mg/kgの投薬量でヒト被験者に投与され、0.3mg/kg～10mg/kgの臨床用量範囲を示した。しかしながら、投薬速度が速いほうが更に効果的となり得る。Q2Wレジメンに関しては、1mg/kgの用量が標的濃度を達成することになる。Q3Wレジメンに関しては、3mg/kgの用量が標的濃度を達成することになる。しかしながら、より小さい用量（例えば0.3mg/kg）が、所望の生物活性を達成するにあたって効果的となり得る。この投与は、ヒトの健康な被験者において安全であること、及び免疫変調活性を示すことが分かった。本発明の結合分子の投与は、望ましくないサイトカイン放出が後に続くことがなく、又は望ましくないサイトカイン放出と関連しなかった。投与される用量にかかわらず、薬物動態/薬力学（PK/PD）及びモデル化＆シミュレーション（M&S）分析は、最初の投薬時の又は定常状態のC<sub>max</sub>値が、Q2W、Q3W及びQ4Wレジメンに関して同様であることを示す。定常状態では、28日間隔（Q2Wレジメンに関する投薬間隔）でのAUC<sub>ss</sub>は、Q4Wレジメンに比べておよそ2倍高くなると予測される。投薬間隔がより短い（14及び21日）Q2Wレジメン及びQ3Wレジメンに関する最初の投薬時の又は定常状態のC<sub>min</sub>値は、より長い28日の投薬間隔（より長い流失期間）を有するQ4Wレジメンに比べて高くなる。

#### 【0213】

本発明のCD32B×CD79B結合分子の血清半減期（T<sub>1/2</sub>）はおよそ4～8日であったが、最初の半減期の経過後でさえ、投与されたCD32B×CD79B結合分子のうちの相当な割合が末梢B細胞に結合したままであることが観察された。例えば実施例1のCD32B×CD79BFcダイアボディに関して、0.3mg/kgの投薬レジメンにおいて少なくとも8日間、並びに3mg/kg及び10mg/kgの投薬レジメンにおいて30～略50日間にもわたって、20%を超える占有率が観察された。

#### 【0214】

（特にAUC測定値に反映されるものとしての）末梢B細胞活性化の阻害は、約30日目にはベースラインに戻る。CD32B×CD79B結合分子はまた、メモリーB細胞（図10A～10C）及びナイーブB細胞（図11A～11C）上のBCR標的を下方制御し、この下方制御は、約27日以上持続する。同様に、血清Igレベルの変調（図12A～12C）は、最低投薬量においてさえ、少なくとも57日間持続する。これらの結果は、単一用量投与によるものである。従って好ましい投薬スケジュールは、CD32B×CD79B結合分子の半減期、長期にわたって作用する生物活性、又は半減期と、このような長期にわたって作用する生物活性との両方に基づくものとすることができます。

#### 【0215】

##### 実施例4

体液性免疫応答に対するCD32B×CD79B二重特異性Fcダイアボディの生体内投与の評価

本明細書中に記載されているように、本発明のCD32B×CD79B結合分子、特に二重特異性Fcダイアボディは、活性化阻害カップリングに基づく生理学的ネガティブフィードバックループをトリガすることによって、活性化されたB細胞を阻害するよう設計される。キーホールリンペットヘモシアン（Keyhole Limpet Hemocyanin: KLH）等の免疫原によるワクチン接種に応答した体液性免疫応答に対するCD32B×CD79

10

20

30

40

50

B 結合分子の阻害効果を調査した。特に非ヒト靈長類からの P K データの外挿に基づくと、0.3 mg / kg で投与した場合、循環する C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディは、末梢血 B 細胞上の C D 3 2 B × C D 7 9 B F c ダイアボディ結合部位の 20 % の占有率を 6 日間持続させるようなレベルより高く維持される。インビトロ研究に基づくと、上述の占有率レベルは、B C R 仲介型 B 細胞活性化の最低 50 % の阻害を少なくとも 6 日間持続させると予測される。ヒトにおける K L H ワクチン接種に対する免疫応答によおそ 4 ~ 6 日かかることを考慮すると、0.3 mg / ml の用量で C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子を被験者に投与した場合の K L H ワクチン接種の実施は、K L H 抗原によるワクチン接種に対する B 細胞応答の阻害によって証明されるように、検出可能な薬力学的活性をもたらす。従って K L H は、0.3 mg / kg 以上の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の用量を投与された全ての被験者に対して、2 日目に 1.0 mg の皮下 ( S C ) 用量で投与してよい。更にワクチン接種前に各被験者に関して上記 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の安全性及び耐容性を確立するために、K L H ワクチン接種を、C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の注入から 24 時間以上後に行ってよい。

10

## 【 0 2 1 6 】

抗 K L H I g G 、並びに I g M 力価及びその阻害のベースラインからのパーセント変化、並びに免疫化後に定量化可能な抗 K L H 、 I g G 及び I g M 応答を示した被験者の割合を、用量パネル及び時間によって作表及び要約する。 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子治療とプラセボとの間の免疫応答の差異を、記述統計を用いて評価する。適切であると判断された場合には、更なる分析 ( 例えば曝露 応答分析 ) を実施してよい。

20

## 【 0 2 1 7 】

## 実施例 5

体液性免疫応答に対する C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの生体内投与の評価

上述のように、体液性免疫応答に対する C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の阻害活性を、ワクチン接種に応答して評価できる。不活性化 A 型肝炎ワクチン ( H A V ) は、B 細胞枯渇療法 ( Van Der Kolk LE, et al. (2002) "Rituximab Treatment Results In Impaired Secondary Humoral Immune Responsiveness," Blood 100:2257-9 ) を使用する患者間で、免疫不全状態における免疫応答を評価するために使用される、確立された新抗原である ( Valdez H, et al. (2000) "Response To Immunization With Recall And Neoantigens After Prolonged Administration Of An Hiv-1 Protease Inhibitor-Containing Regimen," ACTG 375 team. AIDS clinical trials group. AIDS 14:11-21 ) 。この研究では、上述の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の阻害効果を、陰性血清 A 型肝炎力価を有する正常な健康な志願者における H A V 投与に応答して評価する。簡潔に述べると、単一用量の C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子又はプラセボを、3 mg / kg 又は 10 mg / kg で I V 注入によって投与し、被験者は 2 日目に、単一用量の H A V ( V A Q T A ( 登録商標 ) ( A 型肝炎ワクチン、不活性化、Merck 、 50 U / 1 mL ) も筋肉内投与される。単一用量の H A V に対する免疫応答に対する、 C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の投与の影響を、ワクチン接種された被験者における血清 I g G 特異的抗 H A V 特異性抗体の出現を監視することによって評価する。 A R C H I T E C T H A V A b I g G アッセイ ( Abbott Laboratories ) を用いて、 H A V 特異性 I g G の存在を検出した。 A R C H I T E C T H A V A b I g G アッセイは、ヒト血清又は血漿中の H A V に対する I g G 抗体の定性的検出のための、化学発光微粒子イムノアッセイ ( chemiluminescent microparticle immunoassay : C M I A ) である。修正された A b b o t t のシステムを用いた定量的アッセイも採用した。

30

## 【 0 2 1 8 】

表 1 1 は、3 mg / kg 又は 10 mg / kg のプラセボ又は例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子で治療された 10 人の被験者からの初期結果をまとめたものである。表 1 2 は、本研究における全ての被験者からのワクチン接種後 56 日目の結果をまとめたものである。各ワクチン接種グループの血清中に存在する H A V 特異性 I g G ( 抗 H A V I

40

50

g G) の平均濃度は、表 1 3 にまとめられている。ワクチン接種された被験者それぞれの血清中に存在する抗 H A V I g G の濃度は、図 1 8 にプロットされている。本研究の結果は、C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の投与が、活性化 B 細胞及びワクチン接種に応答した体液性免疫応答を阻害することを示している。

【0 2 1 9】

【表 1 1】

表 1 1			
グループ	陽性(n)	陰性(n)	抗体陽転率(%)
プラセボ(n=4)	4	0	100
3mg/kg (n=3)	1	2	33.3
10mg/kg (n=3)	1	2	33.3

10

【0 2 2 0】

【表 1 2】

表 1 2			
グループ	陽性(n)	陰性(n)	抗体陽転率(%)
Placebo (n=8)	6	2	75
3mg/kg (n=8)	3	5	37.5
10mg/kg (n=8)	3	5	37.5

20

【0 2 2 1】

【表 1 3】

表 1 3		
	H A V - I g G 濃度(平均 ± SC、mIU/mL)	
グループ	29日目	57日目
プラセボ	34.3 ± 19.8	172.8 ± 108.3
3mg/kg	40.8 ± 1.9	74.5 ± 70.9
10mg/kg	16.2 ± 1.9	61.5 ± 49.7

30

実施例 6

C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は、C D 4 0 依存性 B 細胞応答をブロックする

上述のように、C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の投与は、共刺激分子 C D 4 0 のレベルを低下させる。C D 4 0 依存性応答に対する例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子の活性を、インビトロで評価した。これらの研究は、二次又は三次リンパ系器官の胚中心に発生する濾胞 C D 4 ヘルパー細胞によって提供される刺激シグナルの存在下での抗体(例えば I g G ) 分泌細胞への B 細胞分化のプロセスを模倣するアッセイシステムを使用する。簡潔に述べると、ヒト B 細胞を、陰性選択キットを用いて健康なドナーの末梢全血から精製した。精製されたヒト B 細胞を、5 % C O<sub>2</sub> 3 7 インキュベーター内において、上述の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子(2 0 μg / mL) の存在下又は不在下で、希釈せずに若しくは3倍希釈を続けて(1、1 / 3、1 / 9 及び 1 / 2 7) 使用される刺激因子(C D 4 0 リガンド(5 0 0 n g / mL)、I L 4 (1 0 0 n g / mL) 及び I L 2 1 (2 0 n g / mL))を用いて又は用いずに、完全 R P M I 1 6 4 0 培地中で5日間培養した。培養物上清を回収し、分泌されたヒト I g G を E L I S A で決定した。本研究の結果は、図 1 9 にプロットされている。

40

【0 2 2 2】

図 1 9 に示すように、C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子は I g G 分泌を低減させることができ、これは、C D 3 2 B × C D 7 9 B 結合分子が、I g G 産生に関連する C D 4 0 仲介型経路を阻害できることを示している。

【0 2 2 3】

本明細書において言及されている全ての公刊物及び特許は、個々の公刊物又は特許出願

50

それぞれの全体が参照により本明細書に援用されていることが具体的かつ独立に指示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用されている。本発明をその具体的実施形態に関して説明したが、更なる修正形態が可能であり、本出願は、本発明が属する分野の公知の方法又は慣例の範囲内であるような、及びこれまでに挙げた必須の特徴に適用できるような、本開示からの逸脱を含む、本発明の原理に概ね従う本発明のいずれの変形、使用又は改変を包含することを意図していることを理解されたい。

【配列表フリーテキスト】

【0 2 2 4】

配列表の数字見出し < 2 2 3 > の記載は以下のとおりである。

【0 2 2 5】

10

配列番号 1 : ヒト Ig G CL ドメイン

配列番号 2 : ヒト Ig G CL ドメイン

配列番号 3 : ヒト Ig G 1 CH 1 ドメイン

配列番号 4 : ヒト Ig G 2 CH 1 ドメイン

配列番号 5 : ヒト Ig G 4 CH 1 ドメイン

配列番号 6 : ヒト Ig G 1 ヒンジ領域

配列番号 7 : ヒト Ig G 2 ヒンジ領域

配列番号 8 : ヒト Ig G 4 ヒンジ領域

配列番号 9 : S 2 2 8 P 置換ヒト Ig G 4 ヒンジ領域

20

配列番号 10 : ヒト Ig G 1 の CH 2 CH 3 ドメイン、XAA はリシン (K) 又は不存在である

配列番号 11 : ヒト Ig G 2 の CH 2 CH 3 ドメイン、XAA はリシン (K) 又は不存在である

配列番号 12 : ヒト Ig G 3 の CH 2 CH 3 ドメイン、XAA はリシン (K) 又は不存在である

配列番号 13 : ヒト Ig G 4 の CH 2 CH 3 ドメイン、XAA はリシン (K) 又は不存在である

配列番号 14 : 好ましい介在スペーサペプチド (リンカー 1)

配列番号 15、16 : リンカー 2

30

配列番号 17 ~ 20 : ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 21 : 「Eコイル」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 22 : 「Kコイル」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 23 : システイン含有「Eコイル」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 24 : システイン含有「Kコイル」ヘテロ二量体促進ドメイン

配列番号 25、26 : システイン含有ペプチド (ペプチド 1)

配列番号 27、28 : 介在リンカーペプチド (リンカー 3)

配列番号 29 : スペーサペプチド (リンカー 4)

配列番号 30 : 抗ヒト CD 32 B 抗体の VL ドメイン

配列番号 31 : 抗ヒト CD 32 B 抗体の VH ドメイン

40

配列番号 32 : 抗ヒト CD 79 B 抗体の VL ドメイン

配列番号 33 : 抗ヒト CD 79 B 抗体の VH ドメイン

配列番号 34 : 第 1 の例示的な CD 32 B × CD 79 B 二重特異性ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖

配列番号 35 : 第 1 の例示的な CD 32 B × CD 79 B 二重特異性ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖

配列番号 36 : 第 2 の例示的な CD 32 B × CD 79 B 二重特異性ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖

配列番号 37 : 第 2 の例示的な CD 32 B × CD 79 B 二重特異性ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖

配列番号 38 : ノブ含有 Ig G Fc 領域の CH 2 - CH 3 ドメイン

50

配列番号 39：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖

配列番号 40：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号 41：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖

配列番号 42：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号 43：ホール含有 Ig G F c 領域の C H 2 - C H 3 ドメイン

配列番号 44：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖

配列番号 45：第 1 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチド

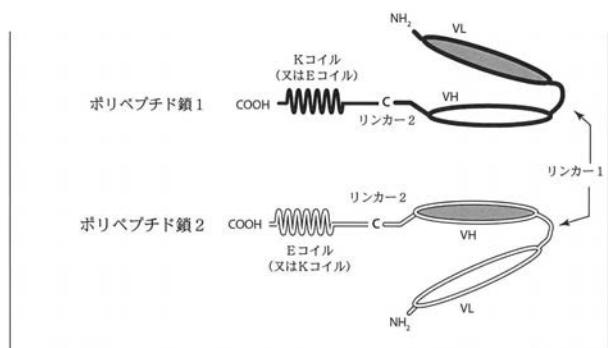
配列番号 46：第 2 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖

配列番号 47：第 2 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖

配列番号 48：第 2 の例示的な C D 3 2 B × C D 7 9 B 二重特異性 F c ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖

10

【図 1】



集合したダイアボディ

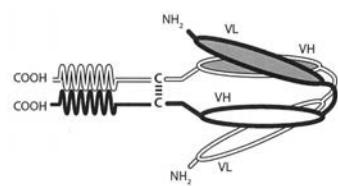
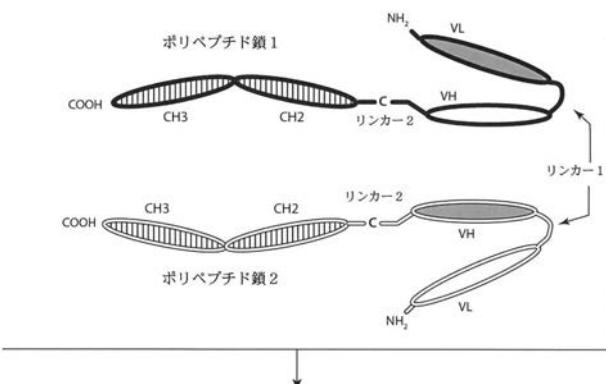


Figure 1

【図 2】



集合したダイアボディ

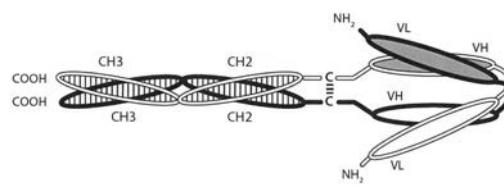


Figure 2

【図3A】

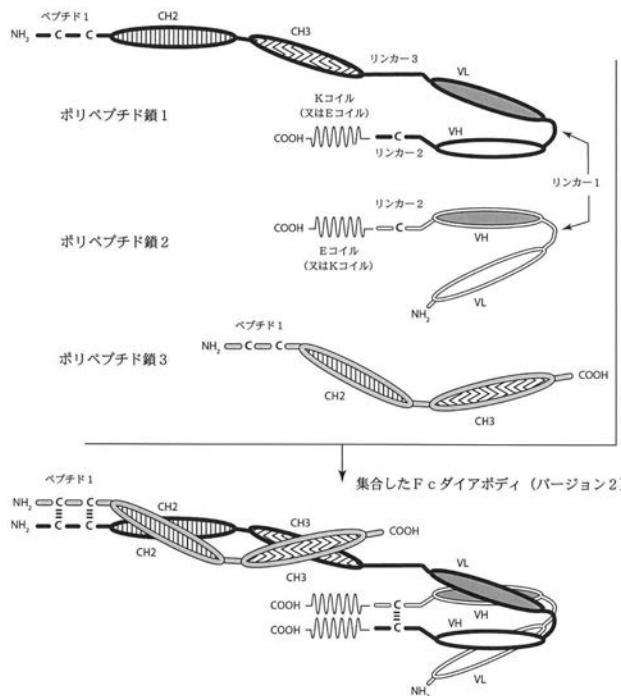
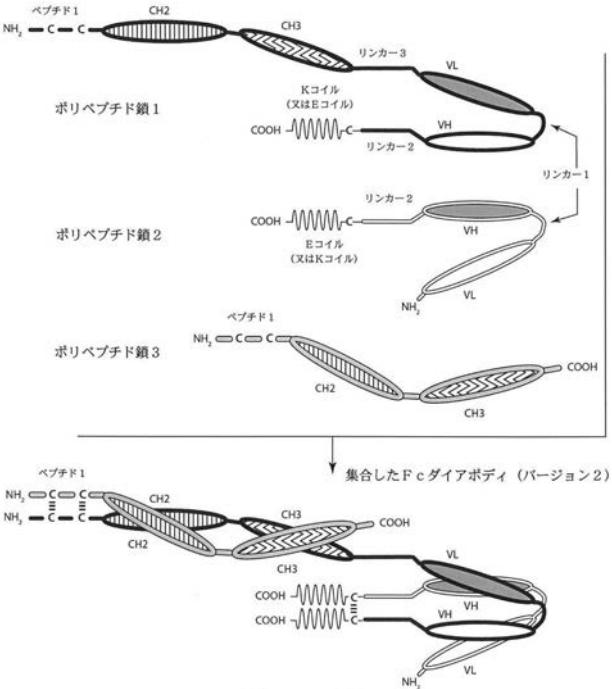


Figure 3A

【 図 3 B 】



**Figure 3B**

【図3C】

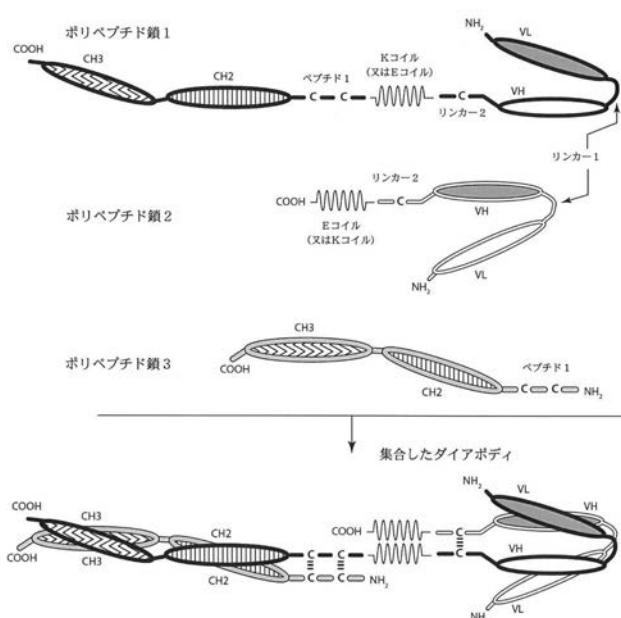
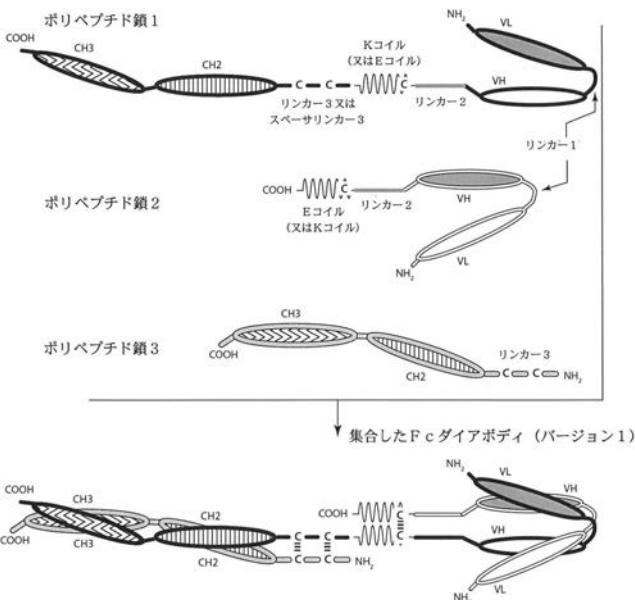


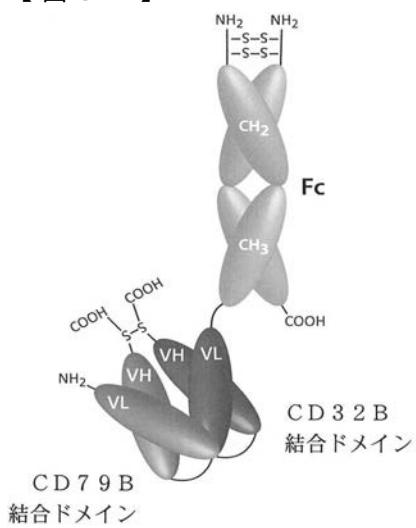
Figure 3C

【 図 3 D 】



**Figure 3D**

【図 3 E】



CD 32 B × CD 79 B Fc ダイアボディ

Figure 3E

【図 4】

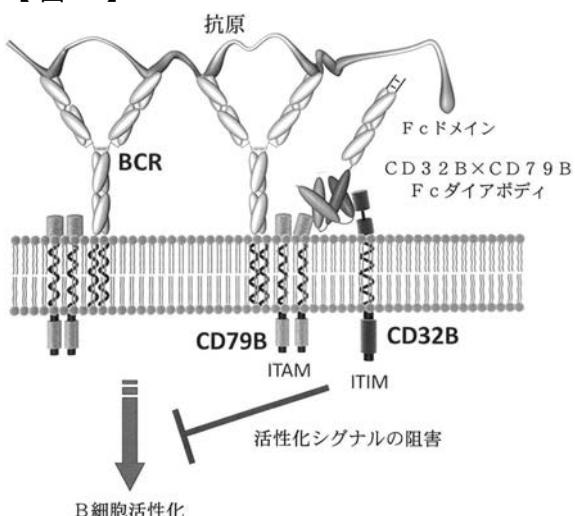


Figure 4

【図 5】

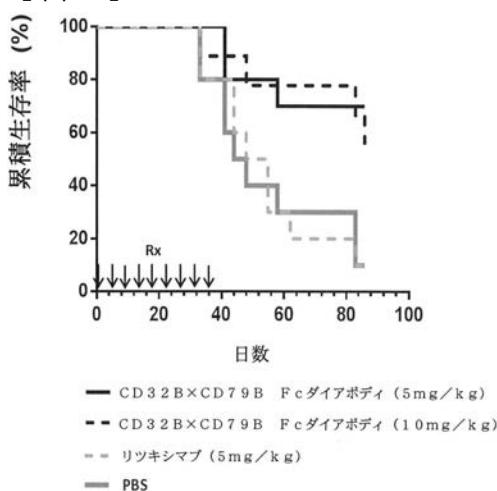


Figure 5

【図 6】

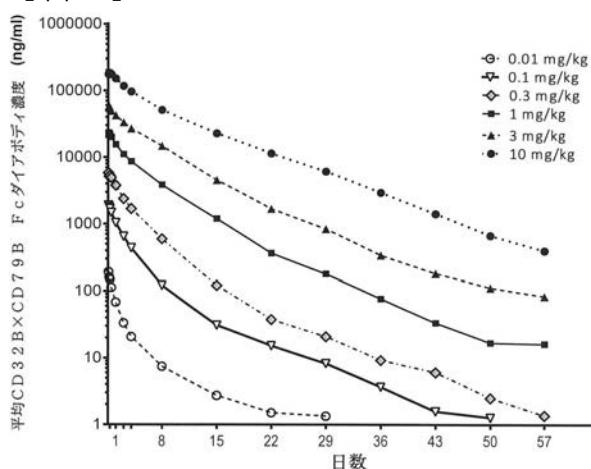


Figure 6

【図7】

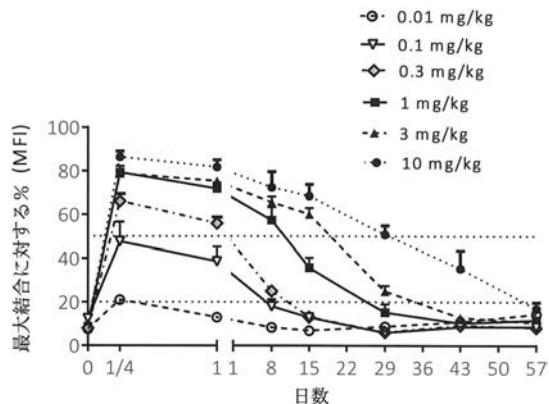


Figure 7

【図8B】

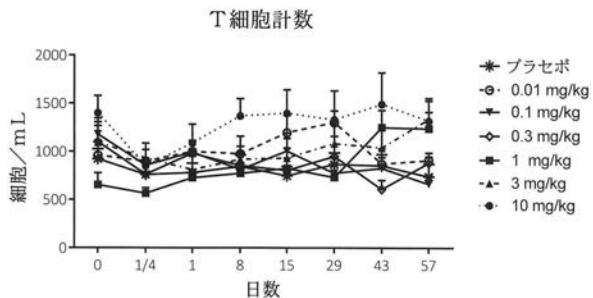


Figure 8B

【図8C】

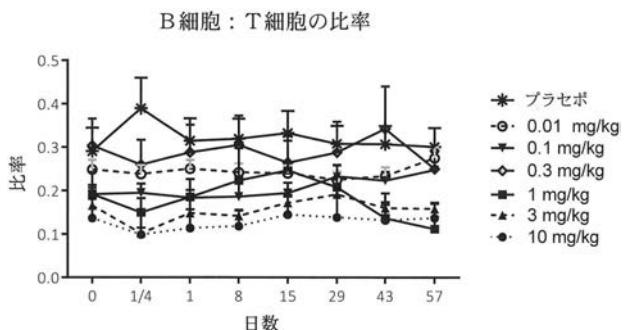


Figure 8C

【図8A】

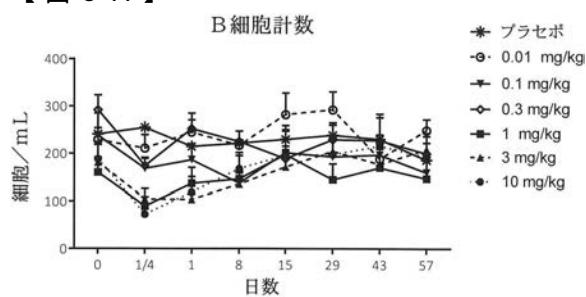


Figure 8A

【図8D】

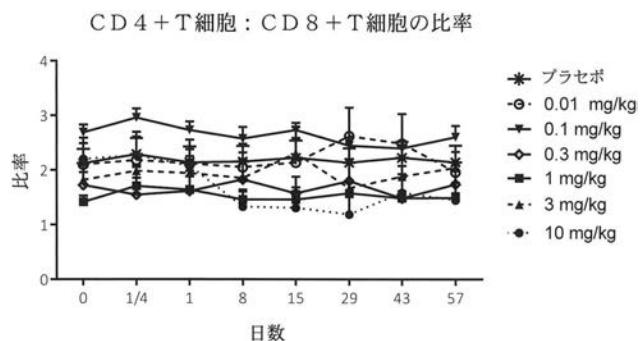


Figure 8D

【図9B】

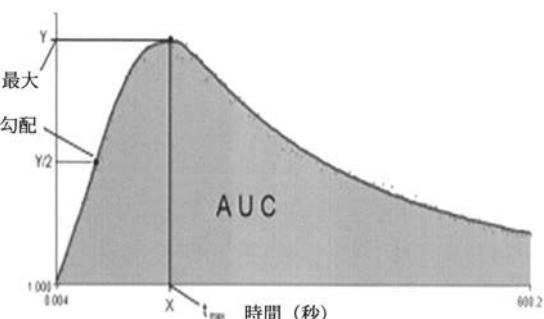


Figure 9B

【図9A】

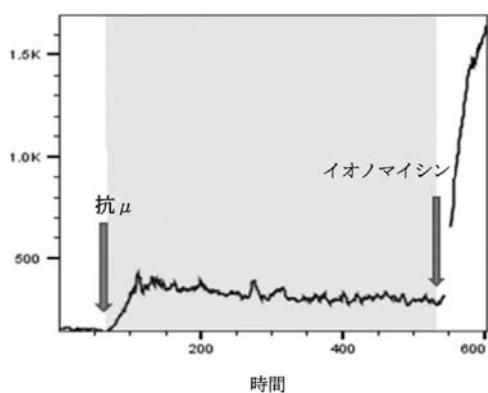


Figure 9A

【図9C】

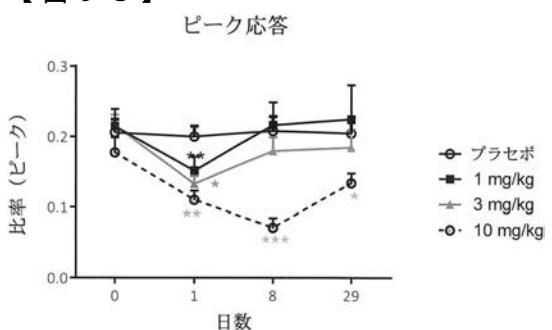


Figure 9C

【図 9 D】

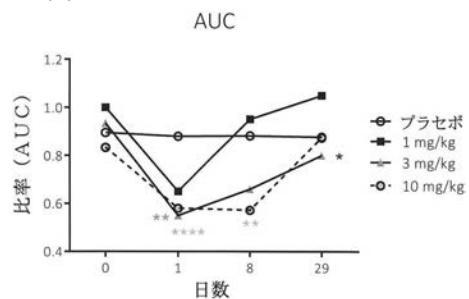


Figure 9D

【図 10 B】

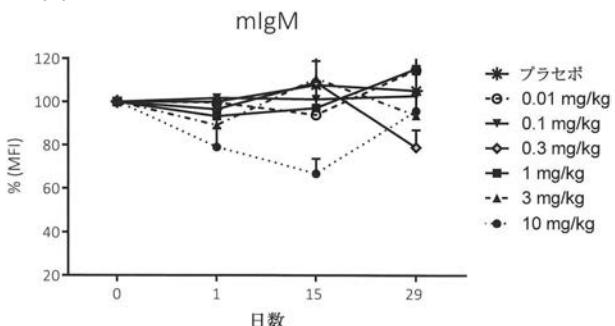


Figure 10B

【図 10 A】

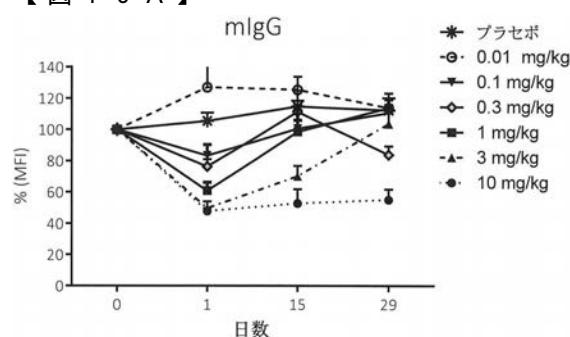


Figure 10A

【図 10 C】

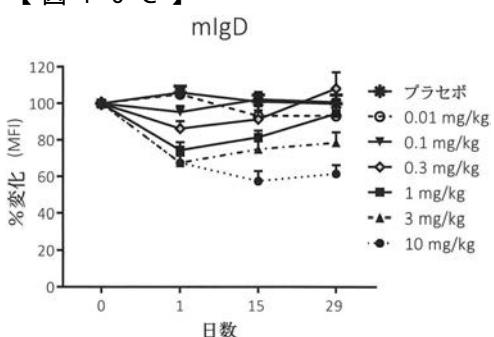


Figure 10C

【図 11 A】

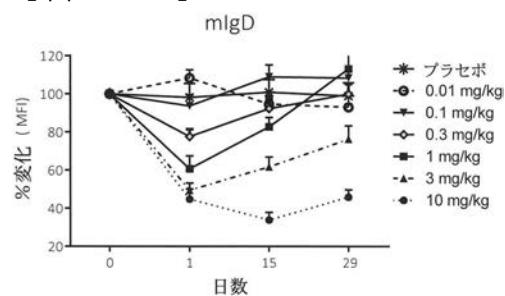


Figure 11A

【図 11 B】

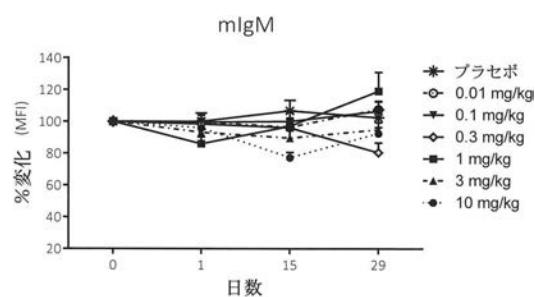


Figure 11B

【図 11 C】

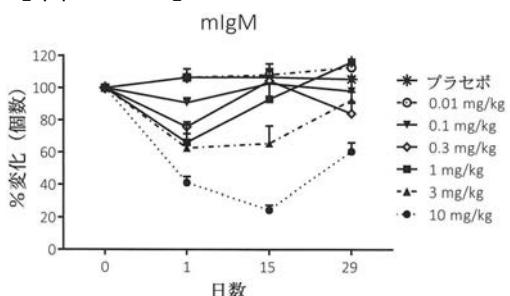


Figure 11C

【図 12 A】

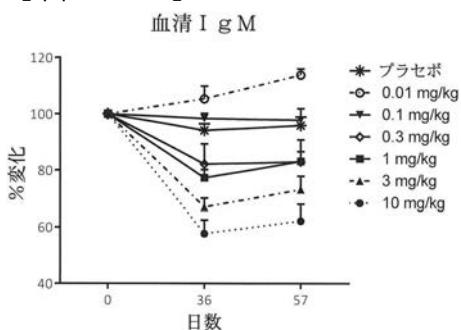


Figure 12A

【図 12B】

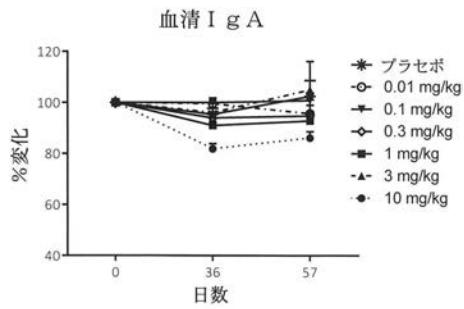


Figure 12B

【図 12C】

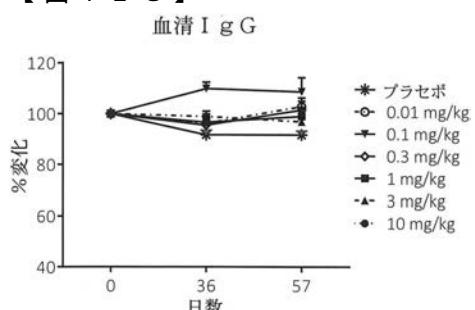


Figure 12C

【図 13】

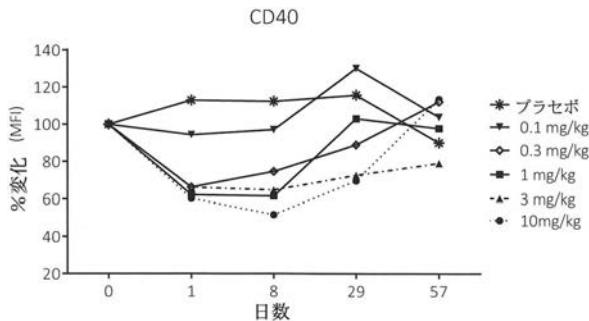


Figure 13

【図 14A】

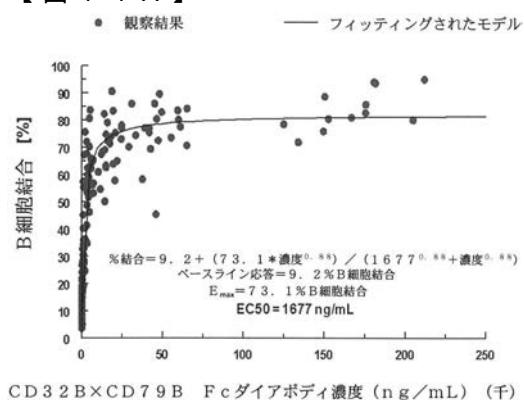


Figure 14A

【図 14B】

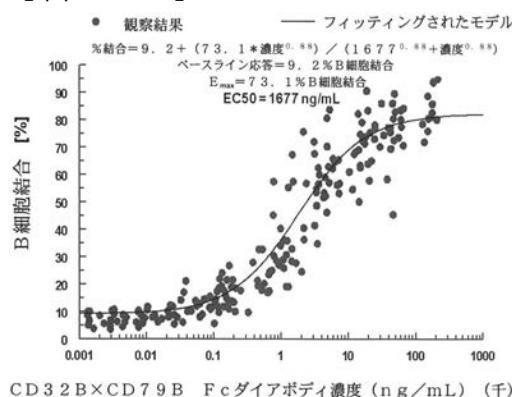


Figure 14B

【図 15A】

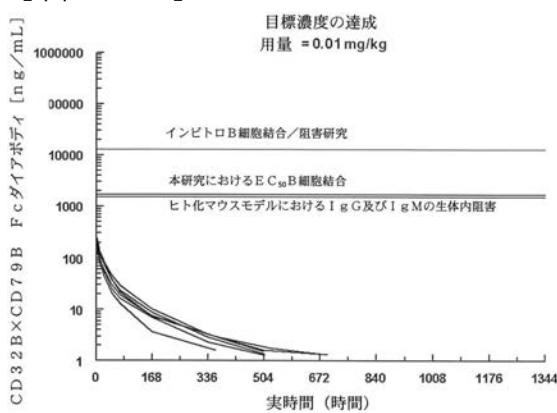


Figure 15A

【図 15B】

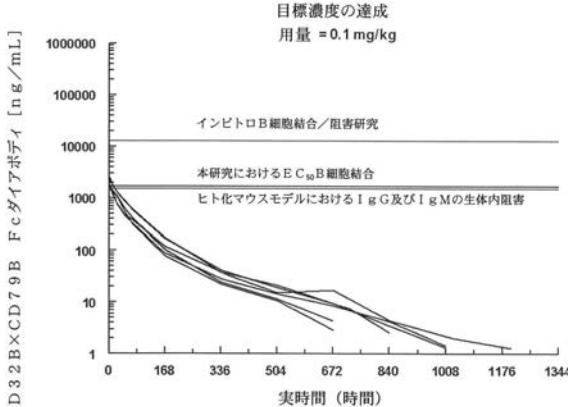


Figure 15B

【図 15C】

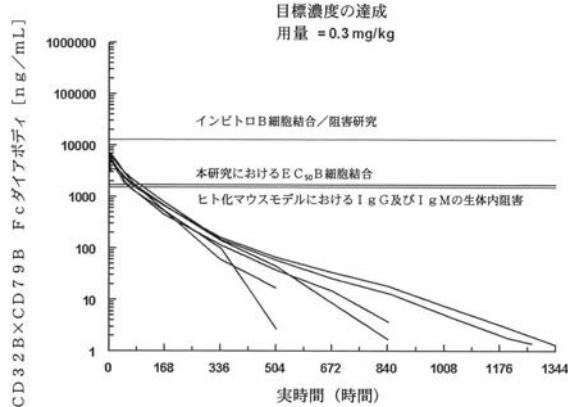


Figure 15C

【図 15D】

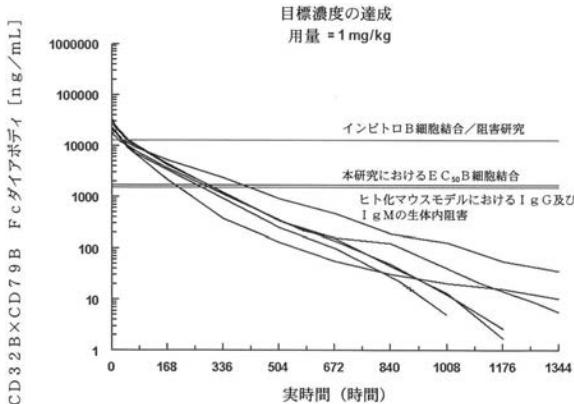


Figure 15D

【図 15E】

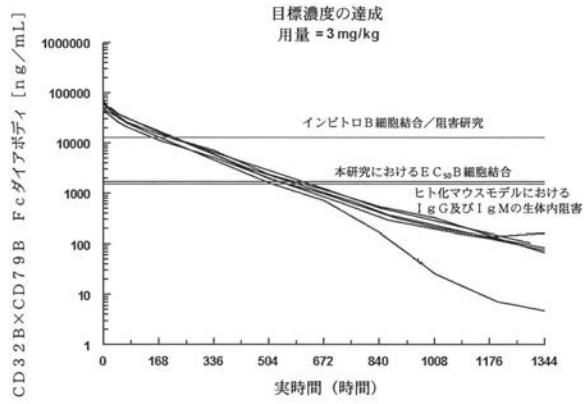


Figure 15E

【図 15 F】

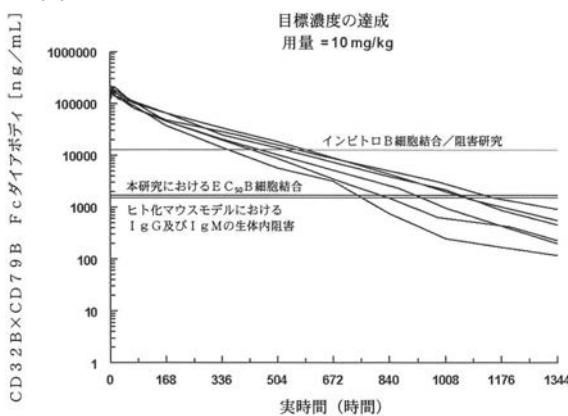


Figure 15F

【図 16 A】

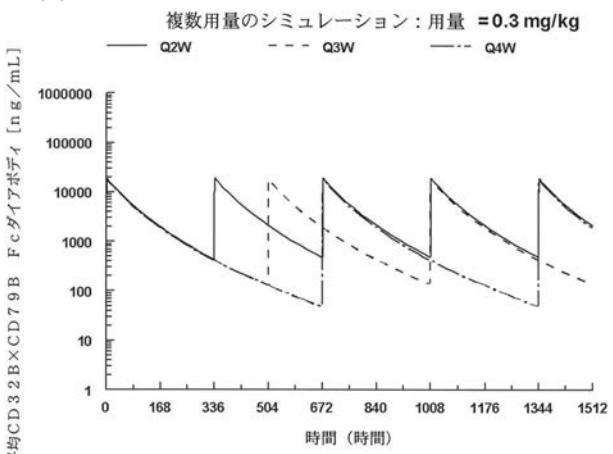


Figure 16A

【図 16 B】

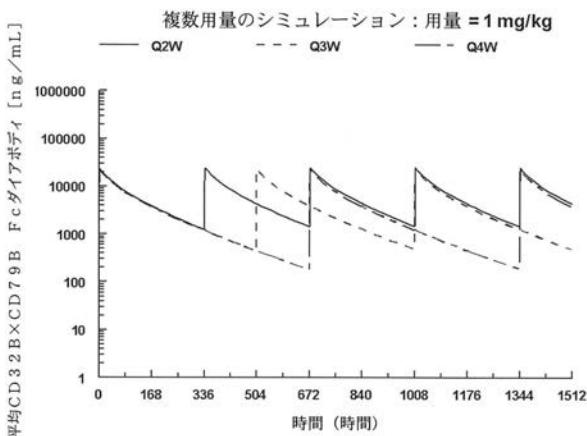


Figure 16B

【図 16 C】

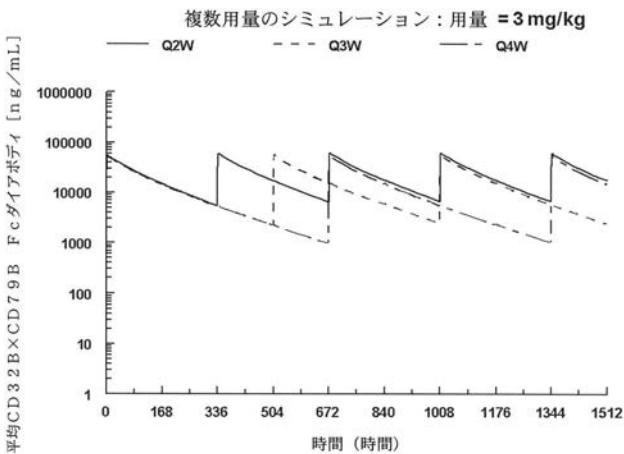


Figure 16C

【図 16D】

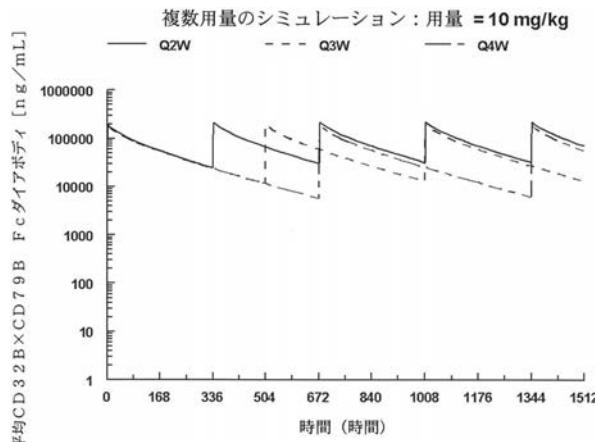


Figure 16D

【図 17A】

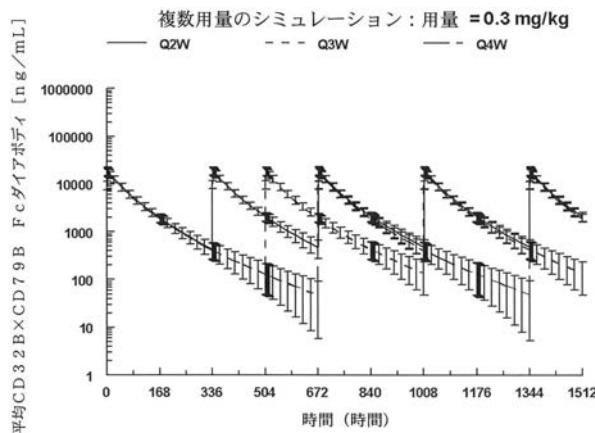


Figure 17A

【図 17B】

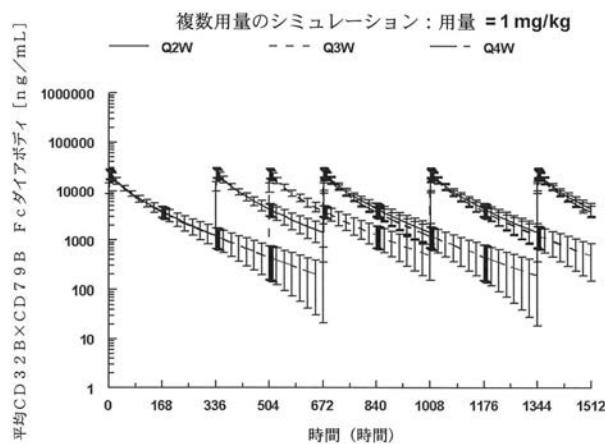


Figure 17B

【図 17C】

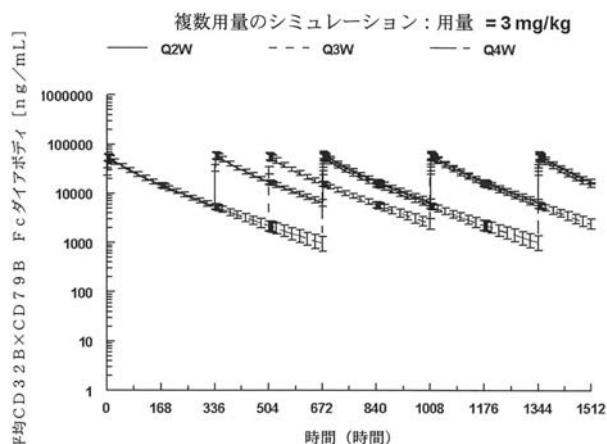


Figure 17C

【図 17D】

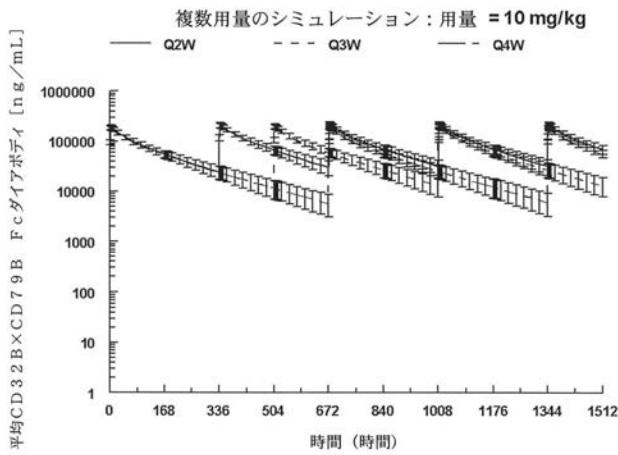


Figure 17D

【図 18】

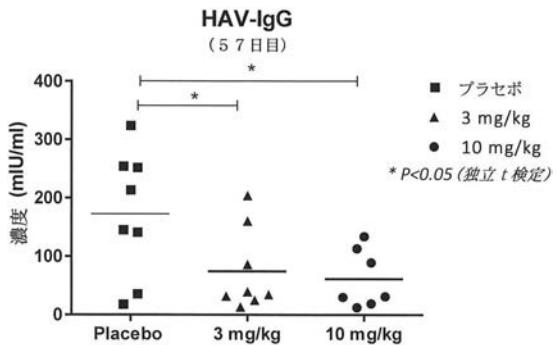


Figure 18

【図 19】

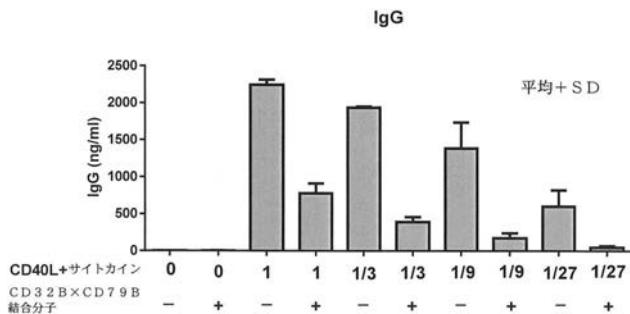


Figure 19

【配列表】

[2019521103000001.app](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7000001/)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/36079
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/28, C07K 16/46 (2017.01) CPC - C07K 16/2803, C07K 16/283, A61K 2039/505		
<b>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</b>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/021089 A1 (MACROGENETICS INC.) 02 December 2015 (02.12.2015) para [0003]; [0049]-[0050]; [0089]-[0091]; [0097]; [0105].	1-5
A	US 2010/0174053 A1 (JOHNSON et al.) 08 July 2010 (08.07.2010) para [0014]; [0015]; [0031]; [0054]; [0569]-[0570].	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2017	Date of mailing of the international search report <b>30 AUG 2017</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/36079						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:								
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p>								
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p>								
<p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6-23 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>								
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:								
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p>								
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p>								
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>								
<p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>								
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/16
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 9/14	(2006.01)	A 6 1 P 9/14
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 パーンデヤ ナイミス バラット

アメリカ合衆国 メリーランド州 21029, クラークスヴィル, ホーリー グリーク レーン  
5107

(72)発明者 ボンビニ エツィオ

アメリカ合衆国 メリーランド州 20854, ポトマック, パウダー ホーン ドライブ 11  
136

(72)発明者 ウィギントン ジョン マーク

アメリカ合衆国 メリーランド州 20850, ロックヴィル, メディカル センター ドライブ  
9704, マクロジエニクス, インコーポレーテッド内

F ターム(参考) 4C085 AA14 BB12 DD62

4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20