(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2019-201645
(P2019-201645A)
(43)公開日　令和1年11月28日(2019.11.28)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/13 | (2006.01) | C12N | 15/13 | ZNA | 4B065 |
| C12N 15/63 | (2006.01) | C12N | 15/63 | | 4H045 |
| C07K 16/00 | (2006.01) | C07K | 16/00 | | |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | | |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | | |

審査請求 有　請求項の数 11　ＯＬ　外国語出願　（全 119 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-124337 (P2019-124337)
(22)出願日　令和1年7月3日 (2019.7.3)
(62)分割の表示　特願2015-543158 (P2015-543158)の分割
原出願日　平成25年11月21日 (2013.11.21)
(31)優先権主張番号　61/779,439
(32)優先日　平成25年3月13日 (2013.3.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/729,148
(32)優先日　平成24年11月21日 (2012.11.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．プルロニック

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(74)代理人　100169971
弁理士　菊田　尚子
(74)代理人　100170221
弁理士　小瀬村　暁子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヘテロ二量体免疫グロブリン

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ヘテロ二量体抗体の作成方法、および使用方法の提供。
【解決手段】第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、第１及び第２の重鎖は、特定の位置にアミノ酸置換を含み、第１および第２の軽鎖は、特定の位置にアミノ酸置換を含み、それらのアミノ酸置換は、前記特定の位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。更に、ヘテロ二量体抗体の第１の重鎖、第２の重鎖、第１の軽鎖、または第２の軽鎖のうちいずれか１つをコードするヌクレオチド配列を含む核酸及びベクター。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、前記抗体は、次のドメイン：第１のＣＨ$_3$ドメイン、第２のＣＨ$_3$ドメイン、ＣＨ$_1$ドメイン、およびＣ$_L$ドメインのそれぞれに置換を含み、
前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。
【請求項２】
配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、前記抗体は、１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを有する重鎖を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。
【請求項３】
前記ＣＨ３ドメイン内の負に荷電したアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸で置換される、請求項２に記載の抗体。
【請求項４】
前記負に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、またはＥ３５７位にある、請求項３に記載の抗体。
【請求項５】
前記ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、およびＥ３５７位の負に荷電したアミノ酸は、それぞれ、正に荷電したアミノ酸で置換される、請求項３に記載の抗体。
【請求項６】
前記正に荷電したアミノ酸は、リジンである、請求項３または５に記載の抗体。
【請求項７】
前記ＣＨ３ドメイン内の正に荷電したアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸で置換される、請求項３に記載の抗体。
【請求項８】
前記正に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、またはＫ４０９位にある、請求項７に記載の抗体。
【請求項９】
前記ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、およびＫ４０９位の正に荷電したアミノ酸は、それぞれ、負に荷電したアミノ酸で置換される、請求項７に記載の抗体。
【請求項１０】
前記負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸である、請求項７または９に記載の抗体。
【請求項１１】
ａ）配列番号５４、５５、および５６のＣＤＲ配列ならびに配列番号５１、５２、および５３のＣＤＲ配列、ｂ）配列番号６０、６１、および６２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５７、５８、および５９のＣＤＲ配列、ｃ）配列番号４８、４９、および５０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号４５、４６、および４７のＣＤＲ配列、ｄ）配列番号４２、４３、および４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３９、４０、および４１のＣＤＲ配列、ｅ）配列番号２７５、２７６、および２７７のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２８７、２８８、および２８９のＣＤＲ配列、ｆ）配列番号２７８、２７９、および２８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９０、２９１、および２９２のＣＤＲ配列、ｇ）配列番号７８、７９、および８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４５、２４６、および２４７のＣＤＲ配列、ｈ）配列番号８１、９９、および１００のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４８、２４９、および２５０のＣＤＲ配列、ｉ）配列番号１０１、１０２、および１０３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５１、２５２、および２５３のＣＤＲ配列、ｊ）配列番号１０４、１０５、および１０６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５４、２５５、および２５６のＣＤＲ配列、ｋ）配列番号１０７、１０８、および１０９のＣＤＲ配列、なら

びに配列番号２５７、２５８、および２５９のＣＤＲ配列、ｌ）配列番号１１０、１１１、および１１２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６０、２６１、および２６２のＣＤＲ配列、ｍ）配列番号２８１、２８２、および２８３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９３、２９４、および２９５のＣＤＲ配列、ｎ）配列番号１１３、１１４、および１１５のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６３、２６４、および２６５のＣＤＲ配列、ｏ）配列番号２８４、２８５、および２８６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９６、２９７、および２９８のＣＤＲ配列、ｐ）配列番号１１６、２３７、および２３８のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６６、２６７、および２６８のＣＤＲ配列、ｑ）配列番号２３９、２４０、および２４１のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６９、２７０、および２７１のＣＤＲ配列、）配列番号２４２、２４３、および２４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２７２、２７３、および２７４のＣＤＲ配列、ならびにｓ）配列番号３５１、３５２、および３５３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３５８、３５９、および３６０のＣＤＲ配列、からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む含む、請求項１～１０のいずれかに記載の抗体。

【請求項１２】

配列番号３６４、配列番号３７６、配列番号７５、配列番号３８４、配列番号３８８、配列番号３８０、配列番号２９９、配列番号３０３、配列番号３１４、配列番号３１１、配列番号３１５、および配列番号３６８からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項１～１１のいずれかに記載の抗体。

【請求項１３】

配列番号３６６、配列番号３７８、配列番号７７、配列番号３８６、配列番号３９０、配列番号３８２、配列番号３０１、配列番号３０５、配列番号３２７、配列番号３１３、配列番号３１７、および配列番号３７０からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項１～１２のいずれかに記載の抗体。

【請求項１４】

前記抗体は、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する、請求項１～１３のいずれかに記載の抗体。

【請求項１５】

配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、前記抗体は、

スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖、ならびにＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、前記第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

【請求項１６】

配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、前記抗体は、

スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖、ならびにＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、前記第１の重鎖は、ＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

【請求項１７】

前記スクレロスチン結合部分は、ａ）配列番号５４、５５、および５６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５１、５２、および５３のＣＤＲ配列、ｂ）配列番号６０、６１、および６２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５７、５８、および５９のＣＤＲ配列、ｃ）配列番号４８、４９、および５０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号４５、４６、および４７の

ＣＤＲ配列、ｄ）配列番号４２、４３、および４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３９、４０、および４１のＣＤＲ配列、ｅ）配列番号２７５、２７６、および２７７のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２８７、２８８、および２８９のＣＤＲ配列、ｆ）配列番号２７８、２７９、および２８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９０、２９１、および２９２のＣＤＲ配列、ｇ）配列番号７８、７９、および８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４５、２４６、および２４７のＣＤＲ配列、ｈ）配列番号８１、９９、および１００のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４８、２４９、および２５０のＣＤＲ配列、ｉ）配列番号１０１、１０２、および１０３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５１、２５２、および２５３のＣＤＲ配列、ｊ）配列番号１０４、１０５、および１０６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５４、２５５、および２５６のＣＤＲ配列、ｋ）配列番号１０７、１０８、および１０９のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５７、２５８、および２５９のＣＤＲ配列、ｌ）配列番号１１０、１１１、および１１２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６０、２６１、および２６２のＣＤＲ配列、ｍ）配列番号２８１、２８２、および２８３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９３、２９４、および２９５のＣＤＲ配列、ｎ）配列番号１１３、１１４、および１１５のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６３、２６４、および２６５のＣＤＲ配列、ｏ）配列番号２８４、２８５、および２８６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９６、２９７、および２９８のＣＤＲ配列、ｐ）配列番号１１６、２３７、および２３８のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６６、２６７、および２６８のＣＤＲ配列、ｑ）配列番号２３９、２４０、および２４１のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６９、２７０、および２７１のＣＤＲ配列、）配列番号２４２、２４３、および２４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２７２、２７３、および２７４のＣＤＲ配列、またはｓ）配列番号３５１、３５２、および３５３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３５８、３５９、および３６０のＣＤＲ配列からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、請求項１５または請求項１６に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項１８】

前記スクレロスチン結合部分は、ａ）配列番号２８４のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２８５のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号２８６のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号２９６のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２９７のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号２９８のＣＤＲ－Ｈ３、ｂ）配列番号４８のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４９のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号５０のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号４５のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４６のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ３、またはｃ）配列番号４２のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４３のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号４４のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号３９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４０のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４１のＣＤＲ－Ｈ３からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、請求項１５または請求項１６に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項１９】

前記スクレロスチン結合部分は、配列番号２６９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２７０のＣＤＲ－Ｈ２、配列番号２７１のＣＤＲ－Ｈ３、配列番号２３９のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２４０のＣＤＲ－Ｌ２、および配列番号２４１のＣＤＲ－Ｌ３を含む、重鎖および軽鎖を含む、請求項１５または請求項１６に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２０】

前記第１の軽鎖は、配列番号３６４、配列番号３７６、配列番号７５、配列番号３８４、配列番号３８８、配列番号３８０、配列番号２９９、配列番号３０３、配列番号３１４、配列番号３１１、配列番号３１５、および配列番号３６８からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、請求項１５または請求項１６に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２１】

前記第１の重鎖は、配列番号３６６、配列番号３７８、配列番号７７、配列番号３８６、配列番号３９０、配列番号３８２、配列番号３０１、配列番号３０５、配列番号３２７、配列番号３１３、配列番号３１７、および配列番号３７０からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、請求項１５または請求項１６に記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２２】

（ａ）配列番号８２０～８２５、（ｂ）配列番号８２８～８３３、（ｃ）配列番号８３６～８４１、（ｄ）配列番号８４４～８４９、（ｅ）配列番号８５２～８５７、（ｆ）配列番号８６０～８６５、（ｇ）配列番号８６８～８７３、（ｈ）配列番号８７６～８８１、（ｉ）配列番号８８４～８８９、（ｊ）配列番号８９２～８９７、（ｋ）配列番号９００～９０５、（ｌ）配列番号９０８～９１３、（ｍ）配列番号９１６～９２１、（ｎ）配列番号９２４～９２９、（ｏ）配列番号９３２～９３７、（ｐ）配列番号９４０～９４５、（ｑ）配列番号９４８～９５３、（ｒ）配列番号９５６～９６１、（ｓ）配列番号９６４～９６９、（ｔ）配列番号９７２～９７７、（ｕ）配列番号９８０～９８５、（ｖ）配列番号９８８～９９３、（ｗ）配列番号９９６～１００１、および（ｘ）配列番号１００４～１００９からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、請求項１５～２１のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２３】

前記ＤＫＫ１結合部分は、配列番号９８０～９８５および配列番号１００４～１００９からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、請求項１５～２１のいずれかに記載の抗体。

【請求項２４】

前記第２の軽鎖は、配列番号８１８、配列番号８２６、配列番号８３４、配列番号８４２、配列番号８５０、配列番号８６６、配列番号８７４、配列番号８８２、配列番号８９０、配列番号８９８、配列番号９０６、配列番号８１４、配列番号８２２、配列番号８３０、配列番号９３８、配列番号９４６、配列番号９５４、配列番号９６２、配列番号９７０、配列番号９７８、配列番号９８８、配列番号９９４、および配列番号１００２からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、請求項１５～２１のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２５】

前記第２の重鎖は、配列番号８１９、配列番号８２７、配列番号８３５、配列番号８４３、配列番号８５１、配列番号８５９、配列番号８６７、配列番号８７５、配列番号８８３、配列番号８９１、配列番号８９９、配列番号９０７、配列番号９１５、配列番号９２３、配列番号９３１、配列番号９３９、配列番号９４７、配列番号９５５、配列番号９６３、配列番号９７１、配列番号９７９、配列番号９８７、配列番号９９５、および配列番号１００３からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、請求項１５～２１のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

【請求項２６】

スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、

配列番号３７８および３６６からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む、第１の重鎖であって、前記第１の重鎖のＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含む、第１の重鎖と、

配列番号１００３および９７４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の重鎖であって、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含む、第２の重鎖と、

配列番号３７６および３６４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第１の軽鎖であって、前記第１の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、

配列番号１００２および９７８からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の軽鎖であって、前記第２の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、を含み、

前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。

【請求項２７】

スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、

（ａ）配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸

配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｂ）配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｃ）配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｄ）配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｅ）配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｆ）配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、
（ｇ）配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、または
（ｈ）配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む、前記ヘテロ二量体抗体。

【請求項２８】
スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、
（ａ）配列番号１０３８、配列番号１０４６、配列番号１０４０、および配列番号１０４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で配列番号１０３９、配列番号１０４７、配列番号１０４１、および配列番号１０４９からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含むか、または
（ｂ）配列番号１０３４、配列番号１０４２、配列番号１０３６、および配列番号１０４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で配列番号１０３５、配列番号１０４３、配列番号１０３７、および配列番号１０４５からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含む、前記ヘテロ二量体抗体。

【請求項２９】
次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、$C_L$ドメイン、$V_H$ドメイン、および$V_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、
前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項３０】
前記第１の$CH_3$ドメインまたは前記第２の$CH_3$ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項

２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３１】
前記第１のＣＨ$_3$ドメインまたは前記第２のＣＨ$_3$ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３２】
前記ＣＨ$_1$ドメインまたは前記Ｃ$_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸配列と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３３】
前記ＣＨ$_1$ドメインまたは前記Ｃ$_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸配列と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３４】
前記Ｖ$_H$ドメインまたは前記Ｖ$_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはフラグメント。
【請求項３５】
前記Ｖ$_H$ドメインまたは前記Ｖ$_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはフラグメント。
【請求項３６】
前記正に荷電したアミノ酸は、リジン、ヒスチジン、およびアルギニンからなる群から選択される、請求項２９～３５のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３７】
前記負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される、請求項２９～３５のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３８】
前記第１のＣＨ$_3$ドメインは、グルタミン酸と正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項３９】
前記グルタミン酸は、Ｇｌｕ３５６である、請求項３８に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４０】
前記第１のＣＨ$_3$ドメインは、アスパラギン酸と負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４１】
前記アスパラギン酸は、Ａｓｐ３５６およびＡｓｐ３９９である、請求項４０に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４２】
前記第２のＣＨ$_3$ドメインは、リジンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４３】

前記リジンは、Ｌｙｓ３９２、Ｌｙｓ４０９、Ｌｙｓ４３９、およびＬｙｓ３７０からなる群から選択される、請求項４２に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４４】
前記$CH_1$ドメインは、セリンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４５】
前記セリンは、Ｓｅｒ１８３である、請求項４４に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４６】
前記$C_L$ドメインは、セリンと正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４７】
前記セリンは、Ｓｅｒ１７６である、請求項４６に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４８】
前記$V_H$ドメインは、グルタミンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項４９】
前記グルタミンは、Ｇｌｎ３８（Ｋａｂａｔ３８位、ＡＨｏ４６位）である、請求項４８に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５０】
前記$V_L$ドメインは、グルタミンと正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、請求項２９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５１】
前記グルタミンは、Ｇｌｎ３９（Ｋａｂａｔ３９位、ＡＨｏ４６位）である、請求項５０に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５２】
抗体、二特異性抗体、一特異性一価抗体、二特異性マキシボディ、モノボディ、ペプチボディ、二特異性ペプチボディ、一価ペプチボディ、および受容体融合タンパク質からなる群から選択される、請求項２９～５１のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５３】
ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、
（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ａ）の荷電アミノ酸は、前記（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、
前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸とは逆の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５４】
前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵの３９９位にある、請求項５２に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項５５】
ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはグ

ルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、ＥＵ３９９位のアスパラギン酸はリジンと置き換えられる、請求項５３に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項５６】

抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、

（ａ）ＡＨｏ３５～４３位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、

（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、

（ｃ）３８８～３９８位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、

（ｄ）４０４～４１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、

前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸とは逆の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項５７】

前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ置換はＥＵ３９３位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ４０９位にある、請求項５６に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項５８】

ＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、ＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられ、ＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる、請求項５７に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項５９】

ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、軽鎖であって、

（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏに、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、

（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含む、軽鎖を含む、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項６０】

前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１７６位にある、請求項５９に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項６１】

ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１７６位のセリンはグルタミン酸と置き換えられる、請求項６０に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

【請求項６２】

抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、

（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、

（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、

（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、

（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、

前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有し、前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有する、前記抗体またはそのフラグメント。

【請求項６３】
前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ３９９位にある、請求項６２に記載の抗体。
【請求項６４】
正に荷電したアミノ酸をＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位に含む軽鎖を含む、請求項６２に記載の抗体またはそのフラグメント。
【請求項６５】
ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３８８～３９７位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）４０４～４１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有し、前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項６６】
前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵの３９２位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ４０９位にある、請求項６５に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項６７】
負に荷電したアミノ酸をＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位に含む軽鎖を含む、請求項６５に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
【請求項６８】
第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、前記第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。
【請求項６９】
前記第１の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第２の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、前記第１の軽鎖ＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、前記第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ３９９位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる、請求項６８に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項７０】
前記抗体は、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する、請求項２９～６９のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項７１】
ＩｇＧ免疫グロブリンである、請求項１～７０のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項７２】

請求項１～７１のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。
【請求項７３】
請求項７２に記載のヌクレオチド配列を含む、ベクター。
【請求項７４】
請求項７２に記載の核酸または請求項７３に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。
【請求項７５】
哺乳動物対象における骨ミネラル密度を増加させる方法であって、前記対象に、前記対象における骨ミネラル密度を増加させるのに有効な量で、請求項１～７１のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体を投与することを含む、前記方法。
【請求項７６】
請求項１～７１のいずれか１項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物。
【請求項７７】
前記組成物中、前記抗体の５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、請求項７６に記載の組成物。
【請求項７８】
前記組成物中、前記抗体の１％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、請求項７６に記載の組成物。
【請求項７９】
凝集体形態で存在する前記組成物中の抗体の量は、サイズ排除クロマトグラフィーによって判定される、請求項７７または請求項７８に記載の組成物。
【請求項８０】
ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントと、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物であって、
前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントは、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、$C_L$ドメイン、$V_H$ドメイン、および$V_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、
前記組成物中、前記抗体またはフラグメントの５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、前記組成物。
【請求項８１】
配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物であって、
前記抗体は、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、および$C_L$ドメインのそれぞれに置換を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、
前記組成物中、前記抗体の５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、前記組成物。
【請求項８２】
前記組成物中、前記抗体の１％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、請求項８０または請求項８１に記載の組成物。
【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、２０１２年１１月２１日に出願された米国仮出願第６１／７２９，１４８号

および２０１３年３月１３日に出願された米国仮出願第６１／７７９，４３９号の利益を主張し、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本発明は、概して、低骨ミネラル密度と関連する障害の治療のためのヘテロ二量体の作製および使用の方法に関する。

【０００３】

電子手段で提出された資料の参照による組み込み

本明細書と同時に提出され、２０１３年１１月１３日に作成された「４７２３３Ｂ＿ＳｅｑＬｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」と題される９６０，６６６バイトのＡＳＣＩＩ（テキスト）ファイルとして認定された、コンピュータで読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表が、参照によりその全体として組み込まれる。

【０００４】

参照による組み込み

以下の出願は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる：２０１１年８月４日に出願された米国仮特許出願第６１／５１５，１９１号の優先権を主張する、２０１２年８月２日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０４９３３１号；２００６年４月１７日に出願された米国仮特許出願第６０／７９２，６４５号、２００６年３月１３日に出願された米国仮特許出願第６０／７８２，２４４号、２００６年２月２４日に出願された米国仮特許出願第６０／７７６，８４７号、および２００５年５月３日に出願された米国仮特許出願第６０／６７７，５８３号の優先権を主張する、２００６年４月２５日に出願された米国特許出願第１１／４１０，５４０号；ならびに２００６年４月１７日に出願された米国仮特許出願第６０／７９２，６４５号、２００６年３月１３日に出願された米国仮特許出願第６０／７８２，２４４号、２００６年２月２４日に出願された米国仮特許出願第６０／７７６，８４７号、および２００５年５月３日に出願された米国仮特許出願第６０／６７７，５８３号の優先権を主張する、２００６年４月２５日に出願された米国特許出願第１１／４１１，００３号（米国特許第７，５９２，４２９号として発行）。以下の出願もまた、参照により本明細書に組み込まれる：２００７年９月１７日に出願された米国仮特許出願第６０／９７３，０２４号の優先権を主張する２００８年９月１７日に出願された米国特許出願第１２／２１２，３２７号；および２００７年１２月１４日に出願された米国仮特許出願第６１／０１３，９１７号の優先権を主張する２００８年１２月１５日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／８６８６４号の３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．§３７１に従った米国国内段階出願である、２０１０年６月２９日に出願された米国特許出願第１２／８１１，１７１号。

【背景技術】

【０００５】

ヒト疾患の治療剤としての二特異性抗体の開発は、臨床的に大きな可能性を有する。二特異性抗体は、同時に２つの異なる抗原を認識し、異なる病原性メディエーターを中和し、異なる種類のエフェクター細胞を動員し、シグナル経路を調節することができる。しかしながら、二特異性抗体の産生は、非常に困難なものである。二特異性抗体の広範な適用は、有益な半減期、高い安定性、免疫原性の欠如、ならびに大規模な製造および精製の実行可能性を呈する二特異性抗体を産生するためのプラットフォームの開発が困難なことにより妨げられている。ＤＶＤ－Ｉｇ（二重可変ドメインＩｇ）（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２５，１２９０－１２９７（２００７））；交差Ｉｇ［Ｓｃｈａｅｆｅｒ Ｗ ｅｔ ａｌ（２０１１）ＰＮＡＳ １０８（２７）：１１１８７－１１１９２］；２種一体型（Ｔｗｏ－ｉｎ－Ｏｎｅ）Ｉｇ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００９，３２３，１６１０）；ＢｉＴＥ（登録商標）抗体［ＰＮＡＳ ９２（１５）：７０２１－７０２５；１９９５］といった有望な二特異性抗体形式は、二特異性抗体の産生を可能にするが、それらは別の種類の問題を有する。

【発明の概要】

【０００６】

２つの既存の抗体からヘテロ二量体抗体を生成する方法が、本明細書に開示される。

【０００７】

一態様において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、次のドメイン：第１のＣＨ$_3$ドメイン、第２のＣＨ$_3$ドメイン、ＣＨ$_1$ドメイン、Ｃ$_L$ドメイン、Ｖ$_H$ドメイン、およびＶ$_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、この１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントが、本明細書に記載される。

【０００８】

いくつかの変化形において、第１のＣＨ３ドメインまたは第２のＣＨ３ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン、ヒスチジン、およびアルギニン）が、ＣＨ３ドメイン内の対応する位置（複数可）の１つ以上の負に荷電したアミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、第１のＣＨ３ドメインまたは第２のＣＨ３ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、ＣＨ３ドメイン内の対応する位置（複数可）の１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【０００９】

いくつかの変化形において、ＣＨ１ドメインまたはＣＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、ＣＨ１ドメインまたはＣＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【００１０】

本明細書に記載さえるヘテロ二量体抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインは、いくつかの変化形において、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、ＶＨドメインまたはＶＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【００１１】

別の態様において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）３９５～４０３（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、ここで、（ａ）の荷電アミノ酸は、（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸と逆の電荷を有する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントが、本明細書に記載される。

【００１２】

いくつかの実施形態において、第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、第４のアミノ酸置換はＥＵ３９９位にある。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、ＥＵ３９９位のアスパラギン酸

はリジンと置き換えられる。

【００１３】

別の態様において、抗体またはそのフラグメントであって、（ａ）ＡＨｏ３５～４３位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）３８８～３９８位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）４０４～４１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、ここで、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸と逆の電荷を有する、抗体またはそのフラグメントが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、ＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられ、ＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる。

【００１４】

さらに別の態様において、抗体またはフラグメントであって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含む、軽鎖を含む、抗体またはフラグメントが、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１７６位のセリンはグルタミン酸と置き換えられる。

【００１５】

別の態様において、抗体であって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、ここで、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有する、抗体が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、第４のアミノ酸置換はＥＵ３９９位にある。いくつかの実施形態において、抗体は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位に正に荷電したアミノ酸を含む、軽鎖を含む。

【００１６】

なおも別の態様において、第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、第１の重鎖ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、第２の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、第１の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、第１の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸と置き換えられ、第１の重鎖のＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、第１の重鎖のＥＵ３９９位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、第２の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、第２の重鎖ＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸

と置き換えられ、第２の重鎖ＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる。
【００１７】
本明細書に記載される実施形態のうちのいくつかまたはいずれかにおいて、抗体は、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する。
【００１８】
配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、抗体は、スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖、ならびにＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体もまた、本明細書に記載される。
【００１９】
さらに別の態様において、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖を含み、ＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、第１の重鎖は、ＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、第２の重鎖は、ＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、第１および第２の軽鎖は、ＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体が、本明細書に記載される。
【００２０】
本発明の別の態様は、スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、本明細書に記載されるスクレロスチン抗体のうちのいずれか１つの重鎖可変領域アミノ酸配列を含む第１の重鎖であって、ＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含む、第１の重鎖と、本明細書に記載されるＤＫＫ－１抗体のうちのいずれか１つの重鎖可変領域アミノ酸配列を含む第２の重鎖であって、第２の重鎖のＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含む、第２の重鎖と、本明細書に記載されるスクレロスチン抗体のうちのいずれか１つの軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む第１の軽鎖であって、第１の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、本明細書に記載されるＤＫＫ－１抗体のうちのいずれかの軽鎖可変アミノ酸配列を含む第２の軽鎖であって、第２の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第２の軽鎖と、を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体に関する。
【００２１】
本発明の別の態様は、スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、配列番号３７８および３６６からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第１の重鎖であって、第１の重鎖のＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含む、第１の重鎖と、配列番号１００３および９７４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の重鎖であって、第２の重鎖のＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含む、第２の重鎖と、配列番号３７６および３６４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第１の軽鎖であって、第１の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、配列番号１００２および９７８からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の軽鎖であって、第２の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第２の軽鎖と、を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体に関する。
【００２２】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の

軽鎖を含む。
【００２３】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２４】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２５】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２６】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２７】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２８】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００２９】
いくつかの実施形態において、スクレロスチンおよびＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体抗体は、配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む。
【００３０】
本発明はまた、配列番号１０３８、配列番号１０４６、配列番号１０４０、および配列番号１０４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、ヘテロ二量体抗体を企図する。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、任意で、配列番号１０３９、配列番号１０４７、配列番号１０４１、および配列番号１０４９からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００３１】

本発明はまた、配列番号１０３４、配列番号１０４２、配列番号１０３６、および配列番号１０４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、ヘテロ二量体抗体を企図する。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、任意で、配列番号１０３５、配列番号１０４３、配列番号１０３７、および配列番号１０４５からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３２】

別の態様において、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、この抗体は、次のドメイン：第１のＣＨ３ドメイン、第２のＣＨ３ドメイン、ＣＨ１ドメイン、およびＣＬドメインのそれぞれに置換を含み、１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、抗体が、本明細書に記載される。

【００３３】

配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、この抗体は、１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを有する重鎖を含み、１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、抗体もまた、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、ＣＨ３ドメイン内の負に荷電したアミノ酸（例えば、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、またはＥ３５７位）は、正に荷電したアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態において、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、およびＥ３５７位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン）で置換される。

【００３４】

代替的な実施形態において、ＣＨ３ドメイン内の正に荷電したアミノ酸（例えば、ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、またはＫ４０９位）は、負に荷電したアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態において、ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、およびＫ４０９位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）で置換される。

【００３５】

ヘテロ二量体抗体は、いくつかの実施形態において、抗体、二特異性抗体、一特異性一価抗体、二特異性マキシボディ、モノボディ、ペプチボディ、二特異性ペプチボディ、一価ペプチボディ、または受容体融合タンパク質である。

【００３６】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体のうちのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸もまた提供され、同様に、ベクターおよび核酸（またはベクター）を含む宿主細胞も提供される。

【００３７】

本発明の別の態様は、哺乳動物対象における骨ミネラル密度を増加させる方法であって、対象に、対象における骨ミネラル密度を増加させるのに有効な量で、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体を投与することを含む、方法に関する。本発明はまた、骨ミネラル密度を増加させるための、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体の使用方法も含む。本明細書に記載される使用方法は、代替として、骨ミネラル密度を増加させるためのヘテロ二量体抗体の使用として特徴付けることができる。

【００３８】

本発明はまた、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物も含む。いくつかの実施形態において、組成物中、抗体の５％未満（または４％未満、または３％未満、または２％未満、または１％未満、またはそれよりも少ない）が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる。組成物中の抗体凝集体の量は、例えば、サイズ隔離クロマトグラフィー（ＳＥＣ）または動的光散乱（ＤＬＳ）によって、判定することができる。

【００３９】

別の態様において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントと、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む組成物であって、ヘテロ二量体抗体または

そのフラグメントは、次のドメイン：第１のＣＨ$_3$ドメイン、第２のＣＨ$_3$ドメイン、ＣＨ$_1$ドメイン、Ｃ$_L$ドメイン、Ｖ$_H$ドメイン、およびＶ$_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、この１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、組成物中、抗体またはフラグメントの５％未満が、約４℃で２週間保管した後に凝集体形態となる、組成物が、本明細書に記載される。

【００４０】

別の態様において、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物であって、抗体は、次のドメイン：第１のＣＨ$_3$ドメイン、第２のＣＨ$_3$ドメイン、ＣＨ$_1$ドメイン、およびＣ$_L$ドメインのそれぞれに置換を含み、この１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、組成物中、抗体の５％未満が、約４℃で２週間保管した後に凝集体形態となる、組成物が、本明細書に記載される。

【００４１】

本明細書に使用される節の見出しは、編成目的のものに過ぎず、記載される主題を制限すると見なされるものではない。本明細書の本文中に引用されるすべての参考文献は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

【００４２】

標準的な技法が、組み換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、組織培養および形質転換、タンパク質精製等に使用され得る。酵素反応および精製技法は、製造業者の使用に従って、または当該技術分野で一般に行われるように、または本明細書に記載されるように、行うことができる。以下の手順および技法は、概して、当該技術分野で周知の従来的な方法に従って、ならびに本明細書を通じて引用および考察される種々の一般的およびより具体的な参考文献に記載されるように、行うことができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕｅｌ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照されたく、これは、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。具体的な定義が提供されない限り、分析化学、有機化学、ならびに医化学および薬化学と関連して使用される命名法、ならびにそれらの研究室手順および技法は、当該技術分野で周知であり、広く使用されるものである。標準的な技法が、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、ならびに送達および患者の治療に使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【００４３】

【図１】次のヘテロ二量体抗体のインビボ研究デザインを図示する：（１）Ａｂ２３－Ａｂ６．１４７　ｖ２、（２）Ａｂ５－Ａｂ６．３７．５　ｖ１、および（３）Ａｂ５－Ａｂ６．１４７。

【図２】一特異性Ｉｇ（Ａｂ５）、二特異性ＤＶＤ（６．１４７－Ａｂ２３）、ならびにヘテロ二量体抗体（１、２、および３）の間で、３週目のマウスにおける腰椎および脚における骨量密度（ＢＭＤ）増加の割合を比較する。

【図３－１】４つのスクレロスチン－ＤＫＫ１ヘテロ二量体抗体（すなわち、Ａｂ２３－６．３７．５　ｖ１、Ａｂ５－６．３７．５　ｖ１、Ａｂ５－６．１４７　ｖ２、およびＡｂ２３－６．１４７　ｖ２）の薬物動態（ＰＫ）プロファイルを示す。

【図３－２】図３－１の続きである。

【図４－１】異なるアプローチを使用した二特異性抗体変異体の構成、（ａ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の荷電残基対Ｋ／Ｄと、Ｃ$_H$１／ＣＬ内の荷電残基対Ｄ／Ｋとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合する可変領域内の荷電残基対Ｄ／Ｋと、Ｃ$_H$１／ＣＬ内の荷電残基対Ｋ／Ｄとを組み合わせる。Ｃ$_H$３ドメイン内のヘテロ二量体化荷電残基もまた、

示される。（ｂ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の荷電残基対Ｄ／Ｋと、$C_H1$／ＣＬ内の２つの荷電残基対ＫＫ／ＤＤとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合するか可変領域内の荷電残基対Ｋ／Ｄと、$C_H1$／ＣＬ内の２つの荷電残基対ＤＤ／ＫＫとを組み合わせる。$C_H3$ドメイン内のヘテロ二量体化のための荷電残基もまた、示される。（ｃ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の２つの荷電残基対ＫＫ／ＤＤと、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｄ／Ｋとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合する可変領域内の２つの荷電残基対ＤＤ／ＫＫと、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｋ／Ｄとを組み合わせる。$C_H3$ドメイン内のヘテロ二量体化のための荷電残基もまた、示される。（ｄ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の２つの荷電残基対ＫＫ／ＤＤと、$C_H1$／ＣＬ内の２つの荷電残基対ＤＤ／ＫＫとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合する可変領域内の２つの荷電残基対ＤＤ／ＫＫと、$C_H1$／ＣＬ内の２つの荷電残基対ＫＫ／ＤＤとを組み合わせる。$C_H3$ドメイン内のヘテロ二量体化のための荷電残基もまた、示される。（ｅ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の１つの荷電残基対Ｋ／Ｄおよび１つのシステイン残基対と、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｄ／Ｋとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合する可変領域内の１つのシステイン残基対および１つの荷電残基対Ｄ／Ｋと、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｋ／Ｄとを組み合わせる。$C_H3$ドメイン内のヘテロ二量体化のための荷電残基もまた、示される。丸にＣの記号は、システイン残基を表し、２つのシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合が、正しいＬＣ／ＨＣ対合でＦａｂ領域を安定化させ得る。（ｆ）ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ａに結合する可変領域内の１つの荷電残基対Ｋ／Ｄおよび１つの小／大残基対と、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｄ／Ｋとを組み合わせ、ＬＣとその同種ＨＣとの対合を強化するために、抗原Ｂに結合する可変領域内の１つの荷電残基対Ｄ／Ｋおよび１つの大／小残基対と、$C_H1$／ＣＬ内の１つの荷電残基対Ｋ／Ｄとを組み合わせる。$C_H3$ドメイン内のヘテロ二量体化のための荷電残基もまた、示される。突出した三角形は大きな残基を表し、凹んだ三角形は小さな残基を示す。突起と穴の効果は、静電的操行効果と協働的に作用して、正しいＬＣ／ＨＣ対合を導き、安定化させ得る。

【図４－２】図４－１の続きである。

【図５Ａ－１】ヒト重鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図５Ａ－２】図５Ａ－１の続きである。

【図５Ａ－３】図５Ａ－２の続きである。

【図５Ｂ】ヒト重鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図６Ａ－１】ヒトκ鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図６Ａ－２】図６Ａ－１の続きである。

【図６Ａ－３】図６Ａ－２の続きである。

【図６Ｂ】ヒトκ鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図７Ａ－１】ヒトλ鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図７Ａ－２】図７Ａ－１の続きである。

【図７Ａ－３】図７Ａ－２の続きである。

【図７Ａ－４】図７Ａ－３の続きである。

【図７Ｂ】ヒトλ鎖ＶおよびＪ領域のアライメント。番号付けは、ＡＨｏシステムに基づく。接合部残基を強調表示する。

【図８】ＤＫＫ１　ｍＲＮＡ発現（ｙ軸）とカニクイザルに投与したＡｂ－５の用量（ｍｇ／ｋｇ）（ｘ軸）とを相関付けるグラフである。図示されるデータは、スクレロスチン抗体処置が、カニクイザルの腕中央幹骨および腰椎においてＤＫＫ１　ｍＲＮＡ発現を誘導することを示す。

【図９】１日目（静脈内）、１５日目（静脈内）、および４３日目（皮下）に、２５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－５、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．３７．５．ｖ．１、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５．ｖ．１、およびヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．１４７．ｖ．１を受容したカニクイザルにおける時間（ｘ軸）に対する絶対血清酒石酸塩耐性酸ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ　５ｂ）濃度の変化パーセント（ｙ軸）を示すグラフである。

【図１０】１日目（静脈内）、１５日目（静脈内）、および４３日目（皮下）に、２５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－５、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．３７．５．ｖ．１、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５．ｖ．１、およびヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．１４７．ｖ．１を受容したカニクイザルにおける、時間（ｘ軸）に対する血清オステオカルシン（ＯＣ）濃度の変化パーセント（ｙ軸）を示すグラフである。

【図１１】１日目（静脈内）、１５日目（静脈内）、および４３日目（皮下）に、２５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－５、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．３７．５．ｖ．１、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５．ｖ．１、およびヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．１４７．ｖ．１を受容したカニクイザルにおける、時間（ｘ軸）に対する血清骨アルカリホスファターゼ（ＢＡＰ）濃度の変化パーセント（ｙ軸）を示すグラフである。

【図１２】１日目（静脈内、１５日目（静脈内）、および４３日目（皮下）に、Ａｂ－５、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．３７．５．ｖ．１、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５．ｖ．１、およびヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．１４７．ｖ．１を受容したカニクイザルにおける、時間（ｘ軸）に対する血清Ｃ１ＣＰ濃度の変化パーセント（ｙ軸）を示すグラフである。

【図１３】静脈内および皮下注射後の、Ａｂ－５、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．３７．５．ｖ．１、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５．ｖ．１、およびヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．１４７．ｖ．１の、時間（時間）（ｘ軸）に対する濃度（ｎＭ）（ｙ軸）の薬物動態プロファイルを示すグラフである。

【図１４】ヘテロ二量体抗体（縦線および斜線バー）、スクレロスチン抗体単剤治療（点描のバー）、ＤＫＫ１抗体単剤治療（模様なしのバー）、または組み合わせスクレロスチン抗体およびＤＫＫ１抗体（横線のバー）を受容したマウスにおける腰椎のベースラインと比較した骨量の変化パーセントを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００４４】

本出願は、ヘテロ二量体ＩｇＧが、２つの異なる抗体の重鎖および軽鎖を、それらが他の混入種を伴うことなく排他的に会合してヘテロ二量体抗体となり得るような様式で、操作することによって産生され得るという発見に基づく。一態様において、ヘテロ二量体の対合は、２つの重鎖のＣＨ３領域を、排他的に二量体を形成することができるように、操作することによって達成される。さらに、軽鎖（ＬＣ）と重鎖（ＨＣ）との間の接合残基を操作することによって達成される静電的操行は、２つの異なる重鎖および軽鎖の対が会合して所望される４本鎖のヘテロ二量体抗体を形成するときに、軽鎖が同種でない重鎖と誤って対合することを防止する。本明細書に記載されるように、例示的な戦略は、１つ以上の負に荷電した残基（例えば、ＡｓｐまたはＧｌｕ）を第１の軽鎖（ＬＣ１）に導入し、１つ以上の正に荷電した残基（例えば、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、またはＡｒｇ）をＬＣ１／ＨＣ１接合部のもう一方の重鎖（ＨＣ１）に導入し、同時に、１つ以上の正に荷電した残基（例えば、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、またはＡｒｇ）を第２の軽鎖（ＬＣ２）に導入し、１つ以上

の負に荷電した残基（例えば、ＡｓｐまたはＧｌｕ）をＬＣ２／ＨＣ２接合部のもう一方の重鎖（ＨＣ２）に導入することを含む。静電的な操行効果は、ＬＣ１がＨＣ１と対合し、ＬＣ２がＨＣ２と対合することを導き、これは、接合部で逆に荷電した残基（極性）が引き合い、接合部で同じ種類の荷電残基（極性）が反発を引き起こし、望ましくないＨＣ／ＬＣ対合の抑制をもたらすためである。

【００４５】

操作のために選択されたＬＣ／ＨＣ接合残基は、ＶＬ／ＶＨおよびＣＬ／ＣＨ１の接合部内に埋め込まれ、空間的に近接している。標的残基は、異なる抗体ファミリー間で、良好に保存されている。軽鎖および重鎖を操作して、特異的ヘテロ二量体を形成する他の手段には、ＶＬ／ＶＨ接合部の１対の荷電残基をシステイン残基対で置き換えて、ジスルフィド結合を形成してＦａｂ領域を安定化すること、ＶＬ／ＶＨ接合部の１つ以上の親水性残基（例えば、グリシン）を疎水性残基（例えば、グルタミン）と置き換えること、または突起と穴（ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ）の効果を発揮するようにＶＬ／ＶＨ接合部の大／小残基対を操作して、正しいＬＣ／ＨＣ対合をもたらすことが挙げられる。本明細書に記載される戦略を使用して、人工的なリンカーを用いることなく２つの既存の抗体から全長ヘテロ二量体抗体を効率的に産生することができる。結果として得られるヘテロ二量体抗体は、安定しており、過剰な凝集または収率損失がなく、商業的製造に適している。ヘテロ二量体のこの新しい型は、２つの異なる抗原または同じ抗原上の２つの異なるエピトープを同時に標的とし得るため、多数の疾患を独自に治療する大きな可能性を有し得る。

【００４６】

本明細書に使用される「接合部」という用語は、第１の抗体ドメイン内の１つ以上のアミノ酸と第２の抗体ドメイン内の１つ以上のアミノ酸との相互作用によりもたらされる、結合面を指す。例示的な接合部には、ＣＨ１／ＣＬ、ＶＨ／ＶＬ、およびＣＨ３／ＣＨ３が挙げられる。いくつかの実施形態において、接合面には、例えば、水素結合、静電的相互作用、または接合面を形成するアミノ酸の間の塩架橋が挙げられる。

【００４７】

一態様において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、$C_L$ドメイン、$V_H$ドメイン、および$V_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、この１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントが、本明細書に記載される。

【００４８】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、任意の定常領域を含み得る。軽鎖定常領域は、例えば、κまたはλ型軽鎖定常領域、例えば、ヒトκまたはλ型軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域は、例えば、α、δ、ε、γ、またはμ型重鎖定常領域、例えば、ヒトα、δ、ε、γ、またはμ型重鎖定常領域であり得る。一実施形態において、軽鎖または重鎖の定常領域は、天然に存在する定常領域のフラグメント、誘導体、変異体、または変異タンパク質であり得る。

【００４９】

いくつかの変化形において、第１のＣＨ３ドメインまたは第２のＣＨ３ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン、ヒスチジン、およびアルギニン）が、ＣＨ３ドメイン内の対応する位置（複数可）の１つ以上の負に荷電したアミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、第１のＣＨ３ドメインまたは第２のＣＨ３ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、ＣＨ３ドメイン内の対応する位置（複数可）の１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。

【００５０】
いくつかの変化形において、ＣＨ１ドメインまたはＣＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、ＣＨ１ドメインまたはＣＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。
【００５１】
本明細書に記載さえるヘテロ二量体抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインは、いくつかの変化形において、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。あるいは、ＶＨドメインまたはＶＬドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。
【００５２】
別の態様において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、（ａ）の荷電アミノ酸は、（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸とは逆の電荷を有する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントが、本明細書に記載される。
【００５３】
本明細書において、可変ドメイン（以下に記載される）のフレームワーク領域内の特定のアミノ酸の位置は、ＡＨｏ番号付けシステムを使用して記載される。抗体のＣＤＲアミノ酸配列長は、抗体によって多様であるため、線形配列に基づいて残基を（第１の残基を１位として）番号付けすることにより、フレームワーク残基は抗体間で異なる位置番号を有することになる。ＫａｂａｔまたはＥＵの番号付けスキームを使用することにより、この不一致を回避することができ、抗体間でのフレームワーク位置の比較を可能にすることができる。しかしながら、構造的に同等な位置は、異なるＫａｂａｔまたはＥＵ番号を有し得る。同様に、同じＫａｂａｔ番号を有する残基は、構造上、２つの異なる位置に存在し得る。Ａｎｎｅｍａｒｉｅ ＨｏｎｅｇｇｅｒおよびＡｎｄｒｅａｓ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎは、構造に基づく番号付けスキーム（ＡＨｏ）を開発し、これは、ＣＤＲ領域にギャップを導入して、アライメントされるドメインの平均構造からの偏差を最小限にする。（Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．，ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９，６５７－６７０）これは、２つの異なる抗体を比較する際に、構造的に同等の位置が同じ残基番号を有することをもたらす。これは、抗体間で、可変ドメインフレームワーク領域における置換の効果の比較を可能にする。図５～７は、それぞれ、ヒト重鎖、κ、およびλ可変ドメイン領域のＡＨｏ番号付けを提供する。
【００５４】
本明細書に使用される際、「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、可変領域からＣＤＲを除いた領域または配列を指す。ＣＤＲ配列の正確な定義は、様々なシステムによって決定されるため、フレームワーク配列の意味は、それに応じて様々な解釈を有する。６つのＣＤＲ（軽鎖のＣＤＲ－Ｌ１、－Ｌ２、および－Ｌ３、ならびに重鎖のＣＤＲ－Ｈ１、－Ｈ２、および－Ｈ３）はまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖の４つの副領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４）に分割し、こ

こで、ＣＤＲ１はＦＲ１とＦＲ２との間に位置し、ＣＤＲ２はＦＲ２とＦＲ３との間に位置し、ＣＤＲ３はＦＲ３とＦＲ４との間に位置する。副領域をＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、またはＦＲ４と指定しない場合、フレームワーク領域は、一本鎖の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の合わせたＦＲを表す。本明細書に使用される際、ＦＲ（１つ）は、４つの副領域のうちの１つを表し、ＦＲ（複数）は、フレームワーク領域を構築する４つの副領域のうちの２つ以上を表す。

【００５５】

アミノ酸を「置換する」またはその「置換」とは、元のアミノ酸残基を、１つ以上の他のアミノ酸残基（複数可）と置換することを指す。

【００５６】

重鎖修飾

【００５７】

特定の重鎖とその同種の軽鎖との結合効率を最大化するために、重鎖および軽鎖の両方が、称賛的（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔａｒｙ）アミノ酸置換を含有する。「称賛的アミノ酸置換」とは、重鎖における正に荷電したアミノ酸との置換が、重鎖の残基と結合する軽鎖のアミノ酸に対する負に荷電したアミノ酸の置換と対になっていることを意味する。同様に、重鎖における負に荷電したアミノ酸との置換は、重鎖の残基と結合する軽鎖のアミノ酸に対する正に荷電したアミノ酸の置換と対になっている。

【００５８】

いくつかの実施形態において、抗体重鎖可変領域は、遺伝子操作される。図５は、ヒト重鎖可変ドメインＶおよびＪ領域の生殖細胞系のアライメントである。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、ヒト生殖細胞系重鎖可変領域に少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％同一である、重鎖可変領域を含む。

【００５９】

ＶＨドメイン内のＶ領域接合残基（すなわち、ＶＨおよびＶＬドメインの会合を媒介するアミノ酸残基）には、ＡＨｏ１位（Ｋａｂａｔ１位）、３位（Ｋａｂａｔ３位）、４２位（Ｋａｂａｔ３５位）、４４位（Ｋａｂａｔ３７位）、４６位（Ｋａｂａｔ３９位）、５０位（Ｋａｂａｔ４３位）、５１位（Ｋａｂａｔ４４位）、５２位（Ｋａｂａｔ４５位）、５３位（Ｋａｂａｔ４６位）、５４位（Ｋａｂａｔ４７位）、５７位（Ｋａｂａｔ５０位）、７０（Ｋａｂａｔ５９位）、１０３位（Ｋａｂａｔ８９位）、１０５位（Ｋａｂａｔ９１位）、および１０７位（Ｋａｂａｔ９３位）が挙げられる。内のＪ領域接合残基は、ＡＨｏ１３９位（Ｋａｂａｔ１０３位）、１４０位（Ｋａｂａｔ１０４位）、１４１位（Ｋａｂａｔ１０５位）、および１４２位（Ｋａｂａｔ１０６位）が挙げられる。いくつかの実施形態において、１つ以上の接合残基は、荷電（正または負に荷電した）アミノ酸で置換される。

【００６０】

いくつかの実施形態において、ＶＨドメインのＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３９位）のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。代替的な実施形態において、ＶＨドメインのＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３９位）のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸と置き換えられる。

【００６１】

いくつかの実施形態において、ＶＨドメインのＡＨｏ５１位（Ｋａｂａｔ４４位）および／またはＡＨｏ１４１位（Ｋａｂａｔ１０５位）のアミノ酸は、荷電アミノ酸と置き換

えられる。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位およびＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジン、または負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。このような実施形態は、ＡＨｏ４６位に、正または負に荷電したアミノ酸との置換をさらに含み得る。

【００６２】

重鎖のＣＨ１領域もまた、軽鎖と複合体を形成し、この領域は、特定の重鎖と、その同種の軽鎖との対合効率を増加させるように操作することができる。会合は、システイン残基を、接合部またはその付近において重鎖および軽鎖に導入して、ジスルフィド結合の形成をもたらし、突起と穴の効果を作出するようにアミノ酸を改変させ、可変領域に関して本明細書に記載されるものに類似の電気的操作を行うことによって、促進され得る。

【００６３】

いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、ヒト生殖細胞系重鎖ＣＨ１領域に少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％同一である、重鎖ＣＨ１領域を含む。

【００６４】

いくつかの実施形態において、Ｆ１２６、Ｐ１２７、Ｌ１２８、Ａ１４１、Ｌ１４５、Ｋ１４７、Ｄ１４８、Ｈ１６８、Ｆ１７０、Ｐ１７１、Ｖ１７３、Ｑ１７５、Ｓ１７６、Ｓ１８３、Ｖ１８５、およびＫ２１３からなる群から選択されるＥＵ位置にある、ヘテロ二量体抗体のＣＨ１ドメイン内の１つ以上のアミノ酸が、荷電アミノ酸と置き換えられる。この点に関して、負または正に荷電したアミノ酸との置換に特に好ましい残基は、Ｓ１８３（ＥＵ番号付けシステム）である。いくつかの実施形態において、Ｓ１８３は、正に荷電したアミノ酸で置換される。代替的な実施形態において、Ｓ１８３は、負に荷電したアミノ酸で置換される。

【００６５】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、任意で、２つのＣＨ３ドメインをさらに含み、そのうちの少なくとも１つは、非天然の荷電アミノ酸をドメインに導入する１つ以上の置換を含有する。いくつかの実施形態において、各ＣＨ３ドメインは、ホモ二量体化に不利となり、より好ましくは、対応するＣＨ３ドメインとのヘテロ二量体化に有利となる、１つ以上のアミノ酸置換をＣＨ３ドメインに含む。国際公開第ＷＯ　２００９／０８９００４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、２つのＣＨ３ドメイン含有分子間のホモ二量体化を減少させ、ヘテロ二量体化を増加させるように、ＣＨ３ドメイン接合部を操作するための組成物および方法について記載している。いくつかの実施形態において、ＣＨ３ドメインの位置３９９、３５６、および３５７（ＥＵ番号付けシステム）からなる群から選択される１つ以上の位置にあるアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸と置き換えられる。いくつかの実施形態において、３７０、３９２、および４０９（ＥＵ番号付けシステム）からなる群から選択される１つ以上の位置にあるアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。代替的な実施形態において、ＣＨ３ドメインの３９９、３５６、および３５７（ＥＵ番号付けシステム）からなる群から選択される１つ以上の位置にあるアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。さらなる実施形態におい

て、群３７０、３９２、および４０９（ＥＵ番号付けシステム）から選択される１つ以上の位置にあるアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸と置き換えられる。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、３９９位および３５６位（例えば、Ｄ３９９ＫおよびＥ３５６Ｋ）に正に荷電したアミノ酸を含む第１の重鎖と、３９２位および４０９位（例えば、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ）に負に荷電したアミノ酸を含む第２の重鎖と、を含む。

【００６６】

一態様において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）ＥＵ１２６～２１３位からなる群から選択されるＥＵ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）ＥＵ３５２～３６０位からなる群から選択されるＥＵ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）ＥＵ３９５～４０３位からなる群から選択されるＥＵ位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含み、（ａ）の荷電アミノ酸は、（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸と逆の電荷を有する。例えば、いくつかの実施形態において、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有する。代替的な実施形態において、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有する。いくつかの実施形態において、第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、第４のアミノ酸置換はＥＵ３９９位にある。

【００６７】

別の態様において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、（ｂ）ＥＵ１２６～２１３位からなる群から選択されるＥＵ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、（ｃ）ＥＵ３８８～３９７位からなる群から選択されるＥＵ位置に、当該位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、（ｄ）ＥＵ４０４～４１３位からなる群から選択されるＥＵ位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、（ａ）の荷電アミノ酸は、（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸と逆の電荷を有する。例えば、いくつかの実施形態において、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有する。代替的な実施形態において、（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有し、（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有する。いくつかの実施形態において、第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、第３のアミノ酸置換はＥＵ３９２位にあり、第４のアミノ酸置換はＥＵ４０９位にある。

【００６８】

第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、第１の重鎖は、４６位（ＡＨｏ、Ｋａｂａｔ３９位）、１８３位（ＥＵ）、３５６位（ＥＵ）、および３９９位（ＥＵ）にアミノ酸置換を含み、第２の重鎖は、４６位（ＡＨｏ）、１８３位（ＥＵ）、３９２位（ＥＵ）、および４０９位（ＥＵ）にアミノ酸置換を含み、第１および第２の軽鎖は、４６位（ＡＨｏ、Ｋａｂａｔ３８位）および１７６位（ＥＵ）にアミノ酸置換を含み、アミノ酸置換は、当該位置に荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体もまた、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、第１の重鎖のＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３９位）のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられる、第２の重鎖のＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３９位）のグルタミンはリジンと置き換えられる、第１の軽鎖のＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３８位）のグルタミンはリジンと置き換えられる、第２の軽鎖ＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３８位）のグルタミンはグルタミン

酸と置き換えられる、第１の重鎖の１８３位（ＥＵ）のセリンはグルタミン酸と置き換えられる、第１の重鎖の３５６位（ＥＵ）のグルタミン酸はリジンと置き換えられる、第１の重鎖の３９９位（ＥＵ）のグルタミン酸はリジンと置き換えられる、第２の重鎖の１８３位（ＥＵ）のセリンはリジンと置き換えられる、第２の重鎖の３９２位（ＥＵ）のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる、および／または第２の重鎖の４０９位（ＥＵ）のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる。

【００６９】

別の態様において、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、この抗体は、１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを有する重鎖を含み、１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、抗体が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、ＣＨ３ドメイン内の負に荷電したアミノ酸（例えば、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、またはＥ３５７位）は、正に荷電したアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態において、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、およびＥ３５７位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン）で置換される。国際公開第ＷＯ　２００９／０８９００４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、２つのＣＨ３ドメイン含有分子間のホモ二量体化を減少させ、ヘテロ二量体化を増加させるように、ＣＨ３ドメイン接合部を操作するための組成物および方法について記載している。

【００７０】

軽鎖修飾

【００７１】

上述のように、特定の重鎖とその同種の軽鎖との結合を最大化するために、重鎖および軽鎖の両方が、好ましくは、鎖の会合を静電的に操行するための称賛的アミノ酸置換を含有する。したがって、種々の実施形態において、軽鎖は、上述の重鎖置換を称賛する１つ以上のアミノ酸置換を含む。

【００７２】

いくつかの実施形態において、軽鎖は、κ軽鎖である。図６は、ヒトκ軽鎖可変ドメインＶおよびＪ領域の生殖細胞系のアライメントである。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、ヒト生殖細胞系κ鎖可変領域に少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％同一である、κ鎖可変領域を含む。

【００７３】

ＶＬドメイン内のＶ領域接合残基（すなわち、ＶＨおよびＶＬドメインの会合を媒介するアミノ酸残基）には、ＡＨｏ４０位（Ｋａｂａｔ３２位）、４２位（Ｋａｂａｔ３４位）、４３位（Ｋａｂａｔ３５位）、４４位（Ｋａｂａｔ３６位）、４６位（Ｋａｂａｔ３８位）、４９位（Ｋａｂａｔ４１位）、５０位（Ｋａｂａｔ４２位）、５１位（Ｋａｂａｔ４３位）、５２位（Ｋａｂａｔ４４位）、５３位（Ｋａｂａｔ４５位）、５４位（Ｋａｂａｔ４６位）、５６位（Ｋａｂａｔ４８位）、５７位（Ｋａｂａｔ４９位）、５８位（Ｋａｂａｔ５０位）、６７位（Ｋａｂａｔ５１位）、６９位（Ｋａｂａｔ５３位）、７０位（Ｋａｂａｔ５４位）、７１位（Ｋａｂａｔ５５位）、７２位（Ｋａｂａｔ５６位）、７３位（Ｋａｂａｔ５７位）、７４位（Ｋａｂａｔ５８位）、１０３位（Ｋａｂａｔ８５位）、１０５位（Ｋａｂａｔ８７位）、１０７位（Ｋａｂａｔ８９位）、１０８位（Ｋａｂａｔ９０位）、および１０９位（Ｋａｂａｔ９１位）が挙げられる。Ｊ領域残基には、

ＡＨｏ１１６位、１１７位、および１１８位が挙げられる。いくつかの実施形態において、ＶＬドメイン内の１つ以上の接合残基は、荷電アミノ酸、好ましくは、同種の重鎖可変ドメイン（すなわち、ＶＨドメイン）に導入するものとは逆の電荷を有するもので置換される。いくつかの実施形態において、ＶＬドメインのＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３８位）のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。ＶＨドメインのＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３９位）のアミノ酸が正に荷電したアミノ酸で置き換えられる場合等、いくつかの実施形態において、ＶＬドメインのＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３８位）のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸と置き換えられる。

【００７４】

いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位（Ｋａｂａｔ４３位）および／またはＡＨｏ１４１位（Ｋａｂａｔ１００位）のアミノ酸は、正または負に荷電したアミノ酸と置換される。このような実施形態は、ＡＨｏ４６位のアミノ酸が正または負に荷電したアミノ酸と置換されることをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位およびＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジン、または負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。このような実施形態は、ＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ３８位）における正または負に荷電したアミノ酸への置換をさらに含み得る。

【００７５】

軽鎖の定常領域（すなわち、ＣＬドメイン）もまた、重鎖と複合体を形成し、この領域は、特定の軽鎖と、その同種の重鎖との対合効率を増加させるように操作することができる。会合は、システイン残基を、接合部またはその付近において重鎖および軽鎖に導入して、ジスルフィド結合の形成をもたらし、突起と穴の効果を作出するようにアミノ酸を改変させ、可変領域に関して本明細書に記載されるものに類似の静電的操作を行うことによって、促進され得る。

【００７６】

軽鎖がκ軽鎖である実施形態において、ヘテロ二量体抗体のＣＬドメイン内のＦ１１６、Ｆ１１８、Ｓ１２１、Ｄ１２２、Ｅ１２３、Ｑ１２４、Ｓ１３１、Ｖ１３３、Ｌ１３５、Ｎ１３７、Ｎ１３８、Ｑ１６０、Ｓ１６２、Ｔ１６４、Ｓ１７４、およびＳ１７６からなる群から選択される位置（κ軽鎖におけるＥＵおよびＫａｂａｔの番号付け）にある１つ以上のアミノ酸は、荷電アミノ酸と置き換えられる。いくつかの実施形態において、負または正に荷電したアミノ酸との置換のための例示的な残基は、ＣＬドメインの１７６位（ＥＵおよびＫａｂａｔの番号付けシステム）のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、ＣＬドメイン１７６位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。代替的な実施形態において、ＣＬドメインの１７６位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置き換えられる。

【００７７】

いくつかの実施形態において、軽鎖は、λ軽鎖である。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体のＣＬドメイン内のＴ１１６、Ｆ１１８、Ｓ１２１、Ｅ１２３、Ｅ１２４、Ｋ１２９、Ｔ１３１、Ｖ１３３、Ｌ１３５、Ｓ１３７、Ｅ１６０、Ｔ１６２、Ｓ１６５、Ｑ１６７、Ａ１７４、Ｓ１７６、およびＹ１７８からなる群から選択される位置（λ鎖におけるＫａｂａｔ番号付け）にある１つ以上のアミノ酸は、荷電アミノ酸と置き換えられる。いくつかの実施形態において、負または正に荷電したアミノ酸との置換のための例示的な残基は、ＣＬドメインの１７６位（ＥＵおよびＫａｂａｔの番号付けシステム）のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、ＣＬドメイン１７６位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置き換えられる。代替的な実施形態において、ＣＬドメインの１

７６位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置き換えられる。

【００７８】

図７は、ヒトλ軽鎖可変ドメインＶおよびＪ領域の生殖細胞系アライメントである。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質または抗体は、ヒト生殖細胞系λ鎖可変領域に少なくとも約７０％、少なくとも約７１％、少なくとも約７２％、少なくとも約７３％、少なくとも約７４％、少なくとも約７５％、少なくとも約７６％、少なくとも約７７％、少なくとも約７８％、少なくとも約７９％、少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％同一である、軽鎖可変領域を含む。

【００７９】

ＣＬドメイン内のヒト生殖細胞系λ鎖可変領域のＶ領域接合残基には、ＡＨｏ４０位（Ｋａｂａｔ３２位）、４２位（Ｋａｂａｔ３４位）、４３位（Ｋａｂａｔ３５位）、４４位（Ｋａｂａｔ３６位）、４６位（Ｋａｂａｔ３８位）、４９位（Ｋａｂａｔ４１位）、５０位（Ｋａｂａｔ４２位）、５１位（Ｋａｂａｔ４３位）、５２位（Ｋａｂａｔ４４位）、５３位（Ｋａｂａｔ４５位）、５４位（Ｋａｂａｔ４６位）、５６位（Ｋａｂａｔ４８位）、５７位（Ｋａｂａｔ４９位）、５８位（Ｋａｂａｔ５０位）、６７位（Ｋａｂａｔ５１位）、６９位（Ｋａｂａｔ５３位）、７０位（Ｋａｂａｔ５４位）、７１位（Ｋａｂａｔ５５位）、７２位（Ｋａｂａｔ５６位）、７３位（Ｋａｂａｔ５７位）、７４位（Ｋａｂａｔ５８位）、１０３位（Ｋａｂａｔ８５位）、１０５位（Ｋａｂａｔ８７位）、１０７位（Ｋａｂａｔ８９位）、１０８位（Ｋａｂａｔ９０位）、および１０９位（Ｋａｂａｔ９１位）が挙げられる。Ｊ領域残基には、ＡＨｏ１３９位および１４０位が挙げられる。これらの位置にあるアミノ酸のうちの１つ以上を、荷電アミノ酸と置換することが、企図される。好ましい実施形態において、１つ以上のアミノ酸は、同種の重鎖可変ドメインに導入するものとは逆の電荷の正または負に荷電したアミノ酸と置換される。

【００８０】

いくつかの実施形態において、λ可変領域のＡＨｏ５１位（Ｋａｂａｔ４３位）および／またはＡＨｏ１４１位（Ｋａｂａｔ１００位）のアミノ酸は、正または負に荷電したアミノ酸と置換される。このような実施形態は、ＡＨｏ４６位のアミノ酸が正または負に荷電したアミノ酸と置換されることをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ５１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジンと置換される。代替的な実施形態において、ＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。いくつかの実施形態において、ＡＨｏ５１位およびＡＨｏ１４１位のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸、例えば、リジン、または負に荷電したアミノ酸、例えば、アスパラギン酸と置換される。このような実施形態は、ＡＨｏ４６位に、正または負に荷電したアミノ酸との置換をさらに含み得る。

【００８１】

任意選択のさらなる修飾

【００８２】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体の重鎖は、重鎖を含有する抗体と１つ以上のＦｃ受容体との結合に影響を及ぼす１つ以上の変異をさらに含み得る。抗体のＦｃ部分の機能のうちの１つは、抗体がその標的に結合するときに、免疫系に情報を伝達することである。これは、一般に「エフェクター機能」と称される。情報伝達は、抗体依存性細胞傷害

性（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、および／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）をもたらす。ＡＤＣＣおよびＡＤＣＰは、Ｆｃと免疫系細胞表面上のＦｃ受容体との結合を通じて媒介される。ＣＤＣは、Ｆｃと補体系のタンパク質、例えばＣ１ｑとの結合を通じて媒介される。

【００８３】

加えて、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、半減期もしくはクリアランス、ＡＤＣＣ、および／またはＣＤＣ活性を含む、抗体のエフェクター機能を変化させるために、定常領域にアミノ酸修飾を有し得る。このような修飾は、例えば、抗体の薬物動態を強化し得るか、またはその治療有効性を強化し得る。Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６（９）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００８４】

ＩｇＧサブクラスは、エフェクター機能を媒介するそれらの能力が多様である。例えば、ＩｇＧ１は、ＡＤＣＣおよびＣＤＣの媒介に関して、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４よりも優れている。抗体のエフェクター機能は、Ｆｃに１つ以上の変異を導入することにより、増加または減少させることができる。本発明の実施形態は、エフェクター機能を増加するように操作されたＦｃを有するヘテロ二量体抗体を含む（米国特許７，３１７，０９１号およびＳｔｒｏｈｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２０：６８５－６９１，２００９、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。増加したエフェクター機能を有する例示的なＩｇＧ１　Ｆｃ分子は、以下の置換のうちの１つ以上を有するものである［番号付けはＥＵ番号付けスキームに基づく］：

Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２３９Ｄ／Ａ３３０Ｓ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２３９Ｄ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ
Ｓ２９８Ａ／Ｄ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ
Ｐ２４７Ｉ／Ａ３３９Ｄ
Ｐ２４７Ｉ／Ａ３３９Ｑ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ／Ｓ２９８Ｄ
Ｄ２８０Ｈ／Ｋ２９０Ｓ／Ｓ２９８Ｖ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｐ３９６Ｌ
Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ
Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ
Ｋ３２６Ａ／Ｅ３３３Ａ
Ｋ３２６Ｗ／Ｅ３３３Ｓ
Ｋ２９０Ｅ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ
Ｋ２９０Ｎ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ
Ｋ２９０Ｅ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ／Ｋ３２６Ｅ
Ｋ２９０Ｎ／Ｓ２９８Ｇ／Ｔ２９９Ａ／Ｋ３２６Ｅ
Ｋ３３４Ｖ
Ｌ２３５Ｓ＋Ｓ２３９Ｄ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｑ３１１Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２３９Ｄ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｆ２４３Ｖ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｅ２９４Ｌ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２９８Ｔ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｅ２３３Ｌ＋Ｑ３１１Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｌ２３４Ｉ＋Ｑ３１１Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２９８Ｔ＋Ｋ３３４Ｖ

Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ａ３３０Ｆ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｑ３１１Ｍ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｑ３１１Ｍ＋Ａ３３０Ｆ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｆ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２３９Ｄ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｓ２３９Ｄ＋Ｓ２９８Ｔ＋Ｋ３３４Ｖ
Ｌ２３４Ｙ＋Ｋ２９０Ｙ＋Ｙ２９６Ｗ
Ｌ２３４Ｙ＋Ｆ２４３Ｖ＋Ｙ２９６Ｗ
Ｌ２３４Ｙ＋Ｅ２９４Ｌ＋Ｙ２９６Ｗ
Ｌ２３４Ｙ＋Ｙ２９６Ｗ
Ｋ２９０Ｙ＋Ｙ２９６Ｗ

【００８５】

本発明のさらなる実施形態は、エフェクター機能を減少させるように操作されたＦｃを有するヘテロ二量体抗体を含む。減少したエフェクター機能を有する例示的なＦｃ分子は、以下の置換のうちの１つ以上を有するものである［番号付けはＥＵ番号付けスキームに基づく］：

Ｎ２９７Ａ（ＩｇＧ１）
Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（ＩｇＧ１）
Ｖ２３４Ａ／Ｇ２３７Ａ（ＩｇＧ２）
Ｌ２３５Ａ／Ｇ２３７Ａ／Ｅ３１８Ａ（ＩｇＧ４）
Ｈ２６８Ｑ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ａ３３１Ｓ（ＩｇＧ２）
Ｃ２２０Ｓ／Ｃ２２６Ｓ／Ｃ２２９Ｓ／Ｐ２３８Ｓ（ＩｇＧ１）
Ｃ２２６Ｓ／Ｃ２２９Ｓ／Ｅ２３３Ｐ／Ｌ２３４Ｖ／Ｌ２３５Ａ（ＩｇＧ１）
Ｌ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｐ３３１Ｓ（ＩｇＧ１）
Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ（ＩｇＧ１）

【００８６】

ＩｇＧ　Ｆｃ含有タンパク質のエフェクター機能を増加させる別の方法は、Ｆｃのフコシル化を低減させることによるものである。Ｆｃに付着した二分岐複合型オリゴ糖から中核のフコースを除去することは、抗原結合またはＣＤＣエフェクター機能を変化させることなく、ＡＤＣＣエフェクター機能を大幅に増加させた。Ｆｃ含有分子、例えば、抗体のフコシル化を低減または消失させるためのいくつかの方法が既知である。これらには、ＦＵＴ８ノックアウト細胞系、変異ＣＨＯ系Ｌｅｃ１３、ラットハイブリドーマ細胞系ＹＢ２／０、ＦＵＴ８遺伝子に特異的に対抗する低分子緩衝ＲＮＡを含む細胞系、ならびにβ－１，４－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩおよびゴルジβ－マンノシダーゼＩＩを共発現する細胞系を含む、ある特定の哺乳動物細胞系における組み換え発現が挙げられる。あるいは、Ｆｃ含有分子は、植物細胞、酵母、または原核生物細胞、例えば、大腸菌といった、非哺乳動物細胞において発現させることもできる。したがって、ある特定の実施形態において、組成物は、低減されたフコシル化を有するか、またはフコシル化が全くない抗体を含む。

【００８７】

本質的にいずれの抗体可変ドメインも、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体形式に組み込むことができることが企図される。例示的な抗体可変ドメイン（およびそれらが特異的に結合する抗原）には、米国特許第７９４７８０９号および米国特許出願公開第２００９００４１７８４号（グルカゴン受容体）、米国特許第７９３９０７０号、米国特許第７８３３５２７号、米国特許第７７６７２０６号、および米国特許第７７８６２８４号（ＩＬ－１７受容体Ａ）、米国特許第７８７２１０６号および米国特許第７５９２４２９号（スクレロスチン）、米国特許第７８７１６１１号、米国特許第７８１５９０７号、米国特許第７０３７４９８号、米国特許第７７００７４２号、および米国特許出願公開第２０

１００２５５５３８号（ＩＧＦ－１受容体）、米国特許第７８６８１４０号（Ｂ７ＲＰ１）、米国特許第７８０７１５９号および米国特許出願公開第２０１１００９１４５５号（ミオスタチン）、米国特許第７７３６６４４号、米国特許第７６２８９８６号、米国特許第７５２４４９６号、および米国特許出願公開第２０１００１１１９７９号（上皮成長因子受容体の欠失変異体）、米国特許第７７２８１１０号（ＳＡＲＳコロナウイルス）、米国特許第７７１８７７６号および米国特許出願公開第２０１００２０９４３５号（ＯＰＧＬ）、米国特許第７６５８９２４号および米国特許第７５２１０５３号（アンジオポエチン－２）、米国特許第７６０１８１８号、米国特許第７７９５４１３号、米国特許出願公開第２００９０１５５２７４号、米国特許出願公開第２０１１００４００７６号（ＮＧＦ）、米国特許第７５７９１８６号（ＴＧＦ－β　ＩＩ型受容体）、米国特許第７５４１４３８号（結合組織成長因子）、米国特許第７４３８９１０号（ＩＬ１－Ｒ１）、米国特許第７４２３１２８号（プロパージン）、米国特許第７４１１０５７号、米国特許第７８２４６７９号、米国特許第７１０９００３号、米国特許第６６８２７３６号、米国特許第７１３２２８１号、および米国特許第７８０７７９７号（ＣＴＬＡ－４）、米国特許第７０８４２５７号、米国特許第７７９０８５９号、米国特許第７３３５７４３号、米国特許第７０８４２５７号、および米国特許出願公開第２０１１００４５５３７号（インターフェロン－γ）、米国特許第７９３２３７２号（ＭＡｄＣＡＭ）、米国特許第７９０６６２５号、米国特許出願公開第２００８０２９２６３９号、および米国特許出願公開第２０１１００４４９８６号（アミロイド）、米国特許第７８１５９０７号および米国特許第７７００７４２号（インスリン様成長因子Ｉ）、米国特許第７５６６７７２号および米国特許第７９６４１９３号（インターロイキン－１β）、米国特許第７５６３４４２号、米国特許第７２８８２５１号、米国特許第７３３８６６０号、米国特許第７６２６０１２号、米国特許第７６１８６３３号、および米国特許出願公開第２０１０００９８６９４号（ＣＤ４０）、米国特許第７４９８４２０号（ｃ－Ｍｅｔ）、米国特許第７３２６４１４号、米国特許第７５９２４３０号、および米国特許第７７２８１１３号（Ｍ－ＣＳＦ）、米国特許第６９２４３６０号、米国特許第７０６７１３１号、および米国特許第７０９０８４４号（ＭＵＣ１８）、米国特許第６２３５８８３号、米国特許第７８０７７９８号、および米国特許出願公開第２０１００３０５３０７号（上皮成長因子受容体）、米国特許第６７１６５８７号、米国特許第７８７２１１３号、米国特許第７４６５４５０号、米国特許第７１８６８０９号、米国特許第７３１７０９０号、および米国特許第７６３８６０６号（インターロイキン－４受容体）、米国特許出願公開第２０１１０１３５６５７号（ＢＥＴＡ－ＫＬＯＴＨＯ）、米国特許第７８８７７９９号、および米国特許第７８７９３２３号（線維芽細胞成長因子様ポリペプチド）、米国特許第７８６７４９４号（ＩｇＥ）号、米国特許出願公開第２０１００２５４９７５号（ＡＬＰＨＡ－４　ＢＥＴＡ－７）、米国特許出願公開第２０１００１９７００５号および米国特許第７５３７７６２号（アクチビン受容体様キナーゼ－１）、米国特許第７５８５５００号および米国特許出願公開第２０１０００４７２５３号（ＩＬ－１３）、米国特許出願公開第２００９０２６３３８３号および米国特許第７４４９５５５号（ＣＤ１４８）、米国特許出願公開第２００９０２３４１０６号（アクチビンＡ）、米国特許出願公開第２００９０２２６４４７号（アンジオポエチン－１およびアンジオポエチン－２）、米国特許出願公開第２００９０１９１２１２号（アンジオポエチン－２）、米国特許出願公開第２００９０１５５１６４号（Ｃ－ＦＭＳ）、米国特許第７５３７７６２号（アクチビン受容体様キナーゼ－１）、米国特許第７３７１３８１号（ガラニン）、米国特許出願公開第２００７０１９６３７６号（インスリン様成長因子）、米国特許第７２６７９６０号および米国特許第７７４１１１５号（ＬＤＣＡＭ）、米国特許第７２６５２１２号（ＣＤ４５ＲＢ）、米国特許第７７０９６１１号、米国特許出願公開第２００６０１２７３９３号、および米国特許出願公開第２０１０００４０６１９号（ＤＫＫ１）、米国特許第７８０７７９５号、米国特許出願公開第２００３０１０３９７８号、および米国特許第７９２３００８号（オステオプロテゲリン）、米国特許出願公開第２００９０２０８４８９号（ＯＶ０６４）、米国特許出願公開第２００８０２８６２８４号（ＰＳＭＡ）、米国特許第７８８８４８２号、米国特許出願公開第２０１

１０１６５１７１号、および米国特許出願公開第２０１１００５９０６３号（ＰＡＲ２）、米国特許出願公開第２０１１０１５０８８８号（ＨＥＰＣＩＤＩＮ）、米国特許第７９３９６４０号（Ｂ７Ｌ－１）、米国特許第７９１５３９１号（ｃ－キット）、米国特許第７８０７７９６号、米国特許第７１９３０５８号、および米国特許第７４２７６６９号（ＵＬＢＰ）、米国特許第７７８６２７１号、米国特許第７３０４１４４号、および米国特許出願公開第２００９０２３８８２３号（ＴＳＬＰ）、米国特許第７７６７７９３号（ＳＩＧＩＲＲ）、米国特許第７７０５１３０号（ＨＥＲ－３）、米国特許第７７０４５０１号（アタキシン－１様ポリペプチド）、米国特許第７６９５９４８号および米国特許第７１９９２２４号（ＴＮＦ－α変換酵素）、米国特許出願公開第２００９０２３４１０６号（アクチビンＡ）、米国特許出願公開第２００９０２１４５５９号および米国特許第７４３８９１０号（ＩＬ１－Ｒ１）、米国特許第７５７９１８６号（ＴＧＦ－β　ＩＩ型受容体）、米国特許第７５６９３８７号（ＴＮＦ受容体様分子）、米国特許第７５４１４３８号（結合組織成長因子）、米国特許第７５２１０４８号（ＴＲＡＩＬ受容体－２）、米国特許第６３１９４９９号、米国特許第７０８１５２３号、および米国特許出願公開第２００８０１８２９７６号（エリスロポエチン受容体）、米国特許出願公開第２００８０１６６３５２号および米国特許第７４３５７９６号（Ｂ７ＲＰ１）、米国特許第７４２３１２８号（プロパージン）、米国特許第７４２２７４２号および米国特許第７１４１６５３号（インターロイキン－５）、米国特許第６７４０５２２号および米国特許第７４１１０５０号（ＲＡＮＫＬ）、米国特許第７３７８０９１号（炭酸脱水酵素ＩＸ（ＣＡ　ＩＸ）腫瘍抗原）、米国特許第７３１８９２５号および米国特許第７２８８２５３号（副甲状腺ホルモン）、米国特許第７２８５２６９号（ＴＮＦ）、米国特許第６６９２７４０号および米国特許第７２７０８１７号（ＡＣＰＬ）、米国特許第７２０２３４３号（単球走化性タンパク質－１）、米国特許第７１４４７３１号（ＳＣＦ）、米国特許第６３５５７７９号および米国特許第７１３８５００号（４－１ＢＢ）、米国特許第７１３５１７４号（ＰＤＧＦＤ）、米国特許第６６３０１４３号および米国特許第７０４５１２８号（Ｆｌｔ－３リガンド）、米国特許第６８４９４５０号（メタロプロテイナーゼ阻害剤）、米国特許第６５９６８５２号（ＬＥＲＫ－５）、米国特許第６２３２４４７号（ＬＥＲＫ－６）、米国特許第６５００４２９号（脳由来神経栄養因子）、米国特許第６１８４３５９号（上皮由来Ｔ細胞因子）、米国特許第６１４３８７４号（神経栄養因子ＮＮＴ－１）、米国特許出願公開第２０１１００２７２８７号（プロタンパク質変換酵素スブチリシンケキシン９型（ＰＣＳＫ９））、米国特許出願公開第２０１１００１４２０１号（ＩＬ－１８受容体）、ならびに米国特許出願公開第２００９０１５５１６４号（Ｃ－ＦＭＳ）に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。上述の特許および公開特許出願は、それらの可変ドメインポリペプチド、可変ドメインをコードする核酸、宿主細胞、ベクター、当該可変ドメインをコードするポリペプチドを作成する方法、薬学的組成物、ならびに可変ドメイン含有抗原結合タンパク質または抗体のそれぞれの標的と関連する疾患を治療する方法の開示の目的で、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００８８】

抗体およびそのフラグメント

【００８９】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗スクレロスチンおよび抗ＤＫＫ１抗体ならびにそれらのフラグメント（例えば、スクレロスチンへの結合を媒介する重鎖および軽鎖、ならびにＤＫＫ１への結合を媒介する重鎖および軽鎖を含む、ヘテロ二量体抗体）を含む。「抗体」という用語は、インタクトな抗体、またはその結合フラグメントを指す。抗体は、完全な抗体（免疫グロブリン）分子（全長重鎖および／または軽鎖を有する、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、および／またはヒト化型を含む）を含み得るか、または抗原に結合するそのフラグメントを含み得る。抗体フラグメントは、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆｖ、Ｆｃ、およびＦｄフラグメントを含み、単一ドメイン抗体（例えば、ナノボディ）、一本鎖抗体、マキシボディ、ミニボディ、細胞内抗体、ダイアボディ、トリアボディ、

テトラボディ、ｖ－ＮＡＲ、およびビス－ｓｃＦｖに組み込まれ得る（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ａｎｄ Ｈｕｄｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２３（９）：１１２６－１１３６（２００５）を参照されたい）。フィブロネクチンポリペプチドモノボディを含む、抗体ポリペプチドもまた、米国特許第６，７０３，１９９号に開示される。他の抗体ポリペプチドは、米国特許公開第２００５０２３８６４６号に開示される。

【００９０】

抗体フラグメントは、合成または遺伝子操作されたタンパク質であり得る。例えば、抗体フラグメントには、軽鎖可変領域からなる単離フラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Ｆｖ」フラグメント、ならびに軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって接続された組み換え一本鎖ポリペプチド分子（ｓｃＦｖタンパク質）が含まれる。

【００９１】

抗体フラグメントの別の形態は、抗体の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むペプチドである。本明細書に使用される際、「ＣＤＲ」という用語は、抗体の可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに、３つのＣＤＲがあり、これらは、可変領域のそれぞれがＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３と示される。本明細書に使用される「ＣＤＲセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域に生じる３つ１群のＣＤＲを指す。これらのＣＤＲの正確な境界は、様々なシステムによって様々に定義されている。Ｋａｂａｔによって記載されるシステム（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７）ａｎｄ（１９９１））は、抗体の任意の可変領域に適用可能な明確な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、３つのＣＤＲを定義す正確な残基の境界もまた提供する。これらのＣＤＲは、ＫａｂａｔのＣＤＲと称され得る。Ｃｈｏｔｈｉａおよび同僚ら（Ｃｈｏｔｈｉａ＆Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）およびＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３（１９８９））は、ＫａｂａｔのＣＤＲ内のある特定のサブ部分が、アミノ酸配列のレベルに著しい多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格構成をとることを発見した。これらのサブ部分は、Ｌ１、Ｌ２、およびＬ３、またはＨ１、Ｈ２、およびＨ３と指定されており、ここで、「Ｌ」および「Ｈ」は、それぞれ、軽鎖および重鎖の領域を指す。これらの領域は、ＣｈｏｔｈｉａのＣＤＲと称され得、ＫａｂａｔのＣＤＲと重複する境界を有する。ＫａｂａｔのＣＤＲと重複する、ＣＤＲを定義する他の境界は、Ｐａｄｌａｎ（ＦＡＳＥＢ Ｊ．９：１３３－１３９（１９９５））およびＭａｃＣａｌｌｕｍ（Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６２（５）：７３２４５（１９９６））によって記載されている。さらに他のＣＤＲ境界の定義は、厳密には上述のシステムのうちの１つに従わなくてもよいが、それでもなおＫａｂａｔのＣＤＲと重複するが、それらは、特定の残基もしくは残基の群、または全ＣＤＲすら、抗原結合に有意な影響を及ぼさないという予測または実験的所見を踏まえて、短縮または延長され得る。本明細書に使用される方法は、これらのシステムのうちのいずれかに従って定義されるＣＤＲを用いるが、好ましい実施形態は、ＫａｂａｔまたはＣｈｏｔｈｉａ定義のＣＤＲを使用する。

【００９２】

ＣＤＲ（「最小認識単位」または「超可変領域」とも称される）は、例えば、目的のＣＤＲをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得られる。このようなポリヌクレオチドは、例えば、抗体産生細胞を鋳型として使用して、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて可変領域を合成することによって、調製される（例えば、Ｌａｒｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ａ Ｃｏｍｐａｎｉｏｎ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２：１０６（１９９１）、Ｃｏｕｒｔｅｎａｙ－Ｌｕｃｋ，”Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅ

s，” in Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al.（eds.），page 166, Cambridge University Press（1995）、およびWard et al.，” Genetic Manipulation and Expression of Antibodies，” in Monoclonal Antibodies：Principles and Applications, Birch et al.，（eds.），page 137, Wiley－Liss, Inc.（1995）を参照されたい）。

【００９３】

本明細書に記載される方法および抗体は、ヘテロ二量体抗体の生成に有用である。本明細書に使用される「特異的に結合する」とは、抗原結合タンパク質が、他のタンパク質よりも優先的に、抗原に結合することを意味する。いくつかの実施形態において、「特異的に結合する」とは、抗原結合タンパク質が、他のタンパク質よりも、抗原に対して高い親和性を有することを意味する。抗原に特異的に結合する抗原結合タンパク質は、抗原に対する$1\times10^{-7}$M以下、$2\times10^{-7}$M以下、$3\times10^{-7}$M以下、$4\times10^{-7}$M以下、$5\times10^{-7}$M以下、$6\times10^{-7}$M以下、$7\times10^{-7}$M以下、$8\times10^{-7}$M以下、$9\times10^{-7}$M以下、$1\times10^{-8}$M以下、$2\times10^{-8}$M以下、$3\times10^{-8}$M以下、$4\times10^{-8}$M以下、$5\times10^{-8}$M以下、$6\times10^{-8}$M以下、$7\times10^{-8}$M以下、$8\times10^{-8}$M以下、$9\times10^{-8}$M以下、$1\times10^{-9}$M以下、$2\times10^{-9}$M以下、$3\times10^{-9}$M以下、$4\times10^{-9}$M以下、$5\times10^{-9}$M以下、$6\times10^{-9}$M以下、$7\times10^{-9}$M以下、$8\times10^{-9}$M以下、$9\times10^{-9}$M以下、$1\times10^{-10}$M以下、$2\times10^{-10}$M以下、$3\times10^{-10}$M以下、$4\times10^{-10}$M以下、$5\times10^{-10}$M以下、$6\times10^{-10}$M以下、$7\times10^{-10}$M以下、$8\times10^{-10}$M以下、$9\times10^{-10}$M以下、$1\times10^{-11}$M以下、$2\times10^{-11}$M以下、$3\times10^{-11}$M以下、$4\times10^{-11}$M以下、$5\times10^{-11}$M以下、$6\times10^{-11}$M以下、$7\times10^{-11}$M以下、$8\times10^{-11}$M以下、$9\times10^{-11}$M以下、$1\times10^{-12}$M以下、$2\times10^{-12}$M以下、$3\times10^{-12}$M以下、$4\times10^{-12}$M以下、$5\times10^{-12}$M以下、$6\times10^{-12}$M以下、$7\times10^{-12}$M以下、$8\times10^{-12}$M以下、または$9\times10^{-12}$M以下の結合親和性を有し得る。

【００９４】

抗スクレロスチン抗体

【００９５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、抗スクレロスチン抗体を含む、スクレロスチン結合部分を含む。「抗スクレロスチン抗体」は、スクレロスチンまたはその部分に結合して、ヒトスクレロスチンと１つ以上のリガンドとの結合を遮断または妨害する。ＳＯＳＴ遺伝子の産物であるスクレロスチンは、骨の過剰成長および強力な高密度の骨を特徴とする骨疾患である、硬結性骨化症には存在しない。Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．，６８：５７７－５８９（２００１）、Ｂａｌｅｍａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．，１０：５３７－５４３（２００１））。ヒトスクレロスチンのアミノ酸配列は、Ｂｒｕｎｋｏｗらによって報告され、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に、配列番号１として開示される（この特許公開は、スクレロスチン結合剤および配列表の記述に関して参照によりその全体が組み込まれる）。組み換えヒトスクレロスチン／ＳＯＳＴは、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，Ｍｉｎｎ．，ＵＳＡ；２００６カタログ＃１４０６－ＳＴ－０２５）から市販入手可能である。さらに、組み換えマウススクレロスチン／ＳＯＳＴは、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，Ｍｉｎｎ．，ＵＳＡ；２００６カタログ＃１５８９－ＳＴ－０２５）から市販入手可能である。研究グレードのスクレロスチン結合モノクローナル抗体は、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，Ｍｉｎｎ．，ＵＳＡ；マウスモノクローナル：２００６カタログ＃ＭＡＢ１４０６；ラットモノクローナル：２００６カタログ＃ＭＡＢ１５８９）から市販入手可能である。米国特許第６，３９５，５１１号お

よび同第６，８０３，４５３号、ならびに米国特許公開第２００４／０００９５３５号および同第２００５／０１０６６８３号は、抗スクレロスチン抗体に広く言及する。本発明の文脈における使用に好適なスクレロスチン結合剤の例はまた、米国特許公開第２００７／０１１０７４７号および同第２００７／００７２７９７号に記載され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。スクレロスチン結合剤を生成するための材料および方法に関するさらなる情報は、米国特許公開第２００４０１５８０４５号（参照により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。

【００９６】

抗スクレロスチン抗体またはそのフラグメントは、配列番号１のスクレロスチン、またはその天然に存在する変異体に、１×１０$^{-7}$Ｍ以下、１×１０$^{-8}$Ｍ以下、１×１０$^{-9}$Ｍ以下、１×１０$^{-10}$Ｍ以下、１×１０$^{-11}$Ｍ以下、または１×１０$^{-12}$Ｍ以下の親和性（Ｋｄ）で結合し得る。親和性は、種々の技法を使用して判定され、その一例は、親和性ＥＬＩＳＡアッセイである。種々の実施形態において、親和性は、ＢＩＡｃｏｒｅアッセイによって判定される。種々の実施形態において、親和性は、動力学的方法によって判定される。種々の実施形態において、親和性は、平衡／溶液法によって判定される。米国特許公開第２００７／０１１０７４７号は、スクレロスチンに対する抗体の親和性（Ｋｄ）を判定するのに好適な親和性アッセイのさらなる記述を含む。

【００９７】

いくつかの、またはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体または抗体フラグメントは、配列番号１に記載されるアミノ酸配列を含むスクレロスチンポリペプチドに結合し、配列番号６（ＣＧＰＡＲＬＬＰＮＡＩＧＲＧＫＷＷＲＰＳＧＰＤＦＲＣ、配列番号１のアミノ酸に対応する）の配列を含むスクレロスチンの領域に結合する。この領域はまた、本明細書においてスクレロスチンの「ループ２」領域と称される。ループ２領域の外側のスクレロスチンの領域は、本明細書において「非ループ２領域」と称される。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１のアミノ酸５７～１４６を含むスクレロスチンポリペプチドに結合する。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１のアミノ酸８９～１０３および／または配列番号１のアミノ酸１３７～１５１を含む、スクレロスチンポリペプチドに結合する。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１に記載されるアミノ酸配列を含むスクレロスチンポリペプチドに結合し、配列番号１内の配列番号２（ＤＶＳＥＹＳＣＲＥＬＨＦＴＲ、配列番号１のアミノ酸５１～６４に対応する）、配列番号３（ＳＡＫＰＶＴＥＬＶＣＳＧＱＣＧＰＡＲ、配列番号１のアミノ酸７３～９０に対応する）、配列番号４（ＷＷＲＰＳＧＰＤＦＲＣＩＰＤＲＹＲ、配列番号１のアミノ酸１０１～１１７に対応する）、配列番号５（ＬＶＡＳＣＫＣＫＲＬＴＲ、配列番号１のアミノ酸１３８～１４９に対応する）、配列番号７０（ＳＡＫＰＶＴＥＬＶＣＳＧＱＣ、配列番号１のアミノ酸７３～８６に対応する）、配列番号７１（ＬＶＡＳＣＫＣ、配列番号１のアミノ酸１３８～１４４に対応する）、配列番号７２（Ｃ１ＲＥＬＨＦＴＲ、配列番号１のアミノ酸５７～６４に対応する）、または配列番号７３（ＣＩＰＤＲＹＲ、配列番号１のアミノ酸１１１～１１７に対応する）のうちの少なくとも１つの配列に結合する。例えば、一態様において、抗スクレロスチン抗体は、場合によってはその天然の三次元構造で、配列番号２～５（および／または配列番号７０～７３）を含む、配列番号１のスクレロスチンのサブ領域に結合する。任意で、抗スクレロスチン抗体は、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３のうちの１つ以上からなるペプチド（例えば、配列番号２、配列番号３、配列番号４、および配列番号５からなるペプチド、または配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、および配列番号７３からなるペプチド）に結合する。

【００９８】

いくつかまたはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１のアミノ酸８９～１０３および１３７～１５１を含むスクレロスチンポリペプチドに結合する。

【００９９】
いくつかまたはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、配列番号２、配列番号３、配列番号４、および配列番号５のアミノ酸配列を有するスクレロスチンポリペプチドに結合し、ここで、配列番号２および４は、配列番号１を参照してアミノ酸位置５７位および１１１位でジスルフィド結合によって連結され、配列番号３および５は、（ａ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８２位および１４２位におけるジスルフィド結合、ならびに（ｂ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８６位および１４４位におけるジスルフィド結合のうちの少なくとも１つによって連結され、このポリペプチドは、配列番号１のヒトスクレロスチンの対応するポリペプチド領域の三次構造を保持し得る。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、および配列番号７３のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合し、ここで、配列番号７２および７３は、配列番号１を参照してアミノ酸位置５７位および４１１１位でジスルフィド結合によって連結され、配列番号７０および７１は、（ａ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８２位および１４２位におけるジスルフィド結合、ならびに（ｂ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８６位および１４４位におけるジスルフィド結合のうちの少なくとも１つによって連結される。

【０１００】
任意で、抗スクレロスチン抗体は、配列番号２、配列番号３、配列番号４、および配列番号５のアミノ酸配列から本質的になるペプチドに結合し、ここで、配列番号２および４は、配列番号１を参照してアミノ酸位置５７位および１１１位でジスルフィド結合によって連結され、配列番号３および５は、（ａ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８２位および１４２位におけるジスルフィド結合、ならびに（ｂ）配列番号１を参照してアミノ酸位置８６位および１４４位におけるジスルフィド結合のうちの少なくとも１つによって連結される。

【０１０１】
任意で、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１の多重切断されたヒトスクレロスチンタンパク質から本質的になるポリペプチドに結合し、ここで、（ａ）配列番号１のアミノ酸１～５０、６５～７２、９１～１００、１１８～１３７、および１５０～１９０は、当該ポリペプチドに存在しないか、または（ｂ）配列番号１のアミノ酸１～５６、６５～７２、８７～１１０、１１８～１３７、および１４５～１９０は、当該ポリペプチドに存在しない。

【０１０２】
いくつかまたはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、および配列番号７３のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合し、ここで、配列番号７２および７３は、配列番号１を参照してアミノ酸５７位および１１１位でジスルフィド結合によって連結され、配列番号７０および７１は、（ａ）配列番号１を参照してアミノ酸８２位および１４２位におけるジスルフィド結合、ならびに（ｂ）配列番号１を参照してアミノ酸８６位および１４４位におけるジスルフィド結合のうちの少なくとも１つによって連結される。

【０１０３】
いくつかまたはいずれかの実施形態において、スクレロスチンポリペプチドは、配列番号１のヒトスクレロスチンの対応するポリペプチド領域の三次構造を保持する。

【０１０４】
いくつかまたはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、（ｉ）配列番号１のアミノ酸５１～６４、７３～９０、１０１～１１７、および１３８～１４９を含むヒトスクレロスチンの部分（ここで、当該部分は、（ａ）アミノ酸５７と１１１との間のジスルフィド結合、（ｂ）アミノ酸８２と１４２との間のジスルフィド結合、および（ｃ）アミノ酸８６と１４４との間のジスルフィド結合のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つすべてを有する）、または（ｉｉ）配列番号１のアミノ酸５７～６４、７３～８６、１１１～１１７、および１３８～１４４を含むヒトスクレロスチンの部分（

ここで、当該部分は、（ａ）アミノ酸５７と１１１との間のジスルフィド結合、（ｂ）アミノ酸８２と１４２との間のジスルフィド結合、および（ｃ）アミノ酸８６と１４４との間のジスルフィド結合のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つすべてを有する）に結合する。

【０１０５】

いくつかまたはいずれかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体はまた、配列番号６のエピトープに結合する。

【０１０６】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体を生成するのに使用するための抗スクレロスチン抗体は、好ましくは、米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載される細胞に基づくアッセイおよび／もしくは米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載されるインビボアッセイにおいて、スクレロスチン機能を調節する、ならびに／または米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載されるエピトープのうちの１つ以上に結合する、ならびに／または米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載される抗体のうちの１つの結合を交差遮断する、ならびに／または米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載される抗体のうちの１つによりスクレロスチンへの結合が交差遮断される（参照により、その全体および抗スクレロスチン抗体を特徴付けるためのアッセイに関するその記述が本明細書に組み込まれる）。

【０１０７】

種々の態様において、抗スクレロスチン抗体はまた、ＭＣ３Ｔ３細胞に基づくミネラル化アッセイにおいて、１ウェル当たりのスクレロスチンのモル数と比較して、１ウェル当たりのスクレロスチン結合部位のモルが６倍を下回って過剰である場合、ヒトスクレロスチンを中和することができる。初代細胞または細胞系のいずれも、培養中の骨芽細胞系列細胞によるミネラル化は、骨形成のインビトロモデルとして使用される。例示的な細胞に基づくミネラル化アッセイは、米国特許公開第２００７０１１０７４７号の例えば実施例８（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞（Ｓｕｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．，９６：１９１－１９８（１９８３））および元の細胞系のサブクローンは、分化誘導剤の存在下で成長させると培養物中にミネラルを形成し得る。このようなサブクローンにはＭＣ３Ｔ３－Ｅ１－ＢＦが挙げられる（Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７５：１９９９２－２０００１（２０００））。ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１－ＢＦサブクローンならびに元のＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞のいずれについても、スクレロスチンは、ミネラル堆積に至り、かつそれを含む、一連の事象のうちの１つ以上を阻害し得る（すなわち、スクレロスチンはミネラル化を阻害する）。スクレロスチンの阻害活性を中和することができる抗スクレロスチン抗体は、例えば、リン酸カルシウム（カルシウムとして測定される）の堆積に、スクレロスチンのみ（すなわち、抗体なし）の処置群において測定されるカルシウムの量と比較して、統計的に有意な増加がある程度に、スクレロスチンの存在下で培養物をミネラル化させる。

【０１０８】

特定の抗スクレロスチン抗体（または他のスクレロスチン阻害剤）がスクレロスチンを中和し得るかどうかを判定することを目的としたアッセイを行う際、このアッセイに使用されるスクレロスチンの量は、スクレロスチンのみの群において、リン酸カルシウム（カルシウムとして測定される）の堆積に、スクレロスチンなしの群で測定されるカルシウムの量と比較して、少なくとも７０％の統計的に有意な低減を引き起こす、最小限のスクレロスチンの量である。抗スクレロスチン中和抗体は、リン酸カルシウム（カルシウムとして測定される）の堆積に、スクレロスチンのみ（すなわち、抗体なし）の処置群において測定されるカルシウムの量と比較して、統計的に有意な増加を引き起こすものとして定義される。抗スクレロスチン抗体が中和するかどうかを判定するために、アッセイに使用される抗スクレロスチン抗体の量は、１ウェル当たりのスクレロスチンのモル数と比較して、１ウェル当たりのスクレロスチン結合部位のモルが過剰となるようなものである必要がある。抗体の効力に応じて、必要とされ得る過剰倍率は、２４、１８、１２、６、３、ま

たは１．５倍であり得、当業者は、１つを上回る濃度の結合剤（抗体）を試験する日常的な実務に精通している。例えば、非常に効力の高い抗スクレロスチン中和抗体は、１ウェル当たりのスクレロスチンのモル数と比較して、１ウェル当たりのスクレロスチン結合部位のモルが６倍を下回って過剰であるとき、スクレロスチンを中和するであろう。より効力の低い抗スクレロスチン中和抗体は、１２、１８、または２４倍の過剰でのみ、スクレロスチンを中和するであろう。

【０１０９】

抗スクレロスチン抗体は、任意で、骨特異的アルカリホスファターゼアッセイ、例えば、国際特許公開第ＷＯ　２００８／１１５７３２号および米国特許第７，７４４，８７４号（参照によりその全体ならびに細胞に基づくアッセイおよび抗スクレロスチン抗体に関するその記述が本明細書に組み込まれる）に記載される骨特異的アルカリホスファターゼアッセイといった、細胞に基づくアッセイにおけるスクレロスチンの中和について、１００ｎＭ以下、または７５ｎＭ以下、または５０ｎＭ以下、または２５ｎＭ以下のＩＣ５０を有する。骨特異的アルカリホスファターゼアッセイは、多分化能マウス細胞系Ｃ２Ｃ１２においてＢＭＰ－４およびＷｎｔ３ａ刺激アルカリホスファターゼレベルを減少させるスクレロスチンの能力を前提とする。ＷＯ　２００８／１１５７３２号によると、中和抗スクレロスチン抗体は、このアッセイにおいて、アルカリホスファターゼ活性の用量依存的増加を媒介する。

【０１１０】

代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、国際特許公開第ＷＯ　２００９／０４７３５６号（参照により抗スクレロスチン抗体および細胞に基づくアッセイに関するその考察が組み込まれる）に記載されるＳＴＦレポーター遺伝子のＷｎｔ１媒介性誘導を伴うＷｎｔアッセイといった、ＨＥＫ２９３細胞系での細胞に基づくＷｎｔシグナル伝達アッセイにおけるヒトスクレロスチンの中和について、１００ｎＭ以下（例えば、７５ｎＭ以下、または５０ｎＭ以下）のＩＣ５０を有する。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、例えば、国際特許公開第ＷＯ　２００９／０４７３５６号に記載されるミネラル化アッセイといった、ＭＣ３Ｔ３でのＢＭＰ２誘導性ミネラル化アッセイにおけるヒトスクレロスチンの中和について、５００ｎＭ以下（例えば、２５０ｎＭ以下、１５０ｎＭ以下、１００ｎＭ以下、または５０ｎＭ以下）のＩＣ５０を有する。

【０１１１】

本発明の文脈における使用に好適な抗スクレロスチン抗体の例は、米国特許公開第２００７／０１１０７４７号および同第２００７／００７２７９７号に記載され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、抗体Ａｂ－Ａ、Ａｂ－Ｂ、Ａｂ－Ｃ、Ａｂ－Ｄ、Ａｂ－１、Ａｂ－２、Ａｂ－３、Ａｂ－４、Ａｂ－５、Ａｂ－６、Ａｂ－７、Ａｂ－８、Ａｂ－９、Ａｂ－１０、Ａｂ－１１、Ａｂ－１２、Ａｂ－１３、Ａｂ－１４、Ａｂ－１５、Ａｂ－１６、Ａｂ－１７、Ａｂ－１８、Ａｂ－１９、Ａｂ－２０、Ａｂ－２１、Ａｂ－２２、Ａｂ－２３、およびＡｂ－２４（これらのすべては、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載されている）のうちの少なくとも１つと、スクレロスチンとの結合を交差遮断する。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、抗体Ａｂ－Ａ、Ａｂ－Ｂ、Ａｂ－Ｃ、Ａｂ－Ｄ、Ａｂ－１、Ａｂ－２、Ａｂ－３、Ａｂ－４、Ａｂ－５、Ａｂ－６、Ａｂ－７、Ａｂ－８、Ａｂ－９、Ａｂ－１０、Ａｂ－１１、Ａｂ－１２、Ａｂ－１３、Ａｂ－１４、Ａｂ－１５、Ａｂ－１６、Ａｂ－１７、Ａｂ－１８、Ａｂ－１９、Ａｂ－２０、Ａｂ－２１、Ａｂ－２２、Ａｂ－２３、およびＡｂ－２４（これらのすべては、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載されている）のうちの少なくとも１つによって、スクレロスチンとの結合が交差遮断される。「交差遮断」、「交差遮断される」、および「交差遮断する」という用語は、抗体が他の抗体とスクレロスチンとの結合を妨害する能力を意味して、本明細書に互換的に使用される。抗体が別の抗体とスクレロスチンとの結合を妨害することができる程度、およびしたがってそれが交差遮断すると称され得るかどうかは、競合結合アッセイを使用して判定され得る。本発明のいくつかの態様において、交差遮断抗体またはそのフ

ラグメントは、参照抗体のスクレロスチン結合を、約４０％～約１００％、例えば、約６０％～約１００％、具体的には７０％～１００％、およびより具体的には８０％～１００％低減させる。交差遮断を検出するのに特に好適な定量的アッセイは、表面プラズモン共鳴技術を用いて相互作用の程度を測定する、Ｂｉａｃｏｒｅ機器を使用する。別の好適な定量的交差遮断アッセイは、スクレロスチンへの結合に関して抗体間の競合を測定する、ＥＬＩＳＡに基づくアプローチを使用する。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンと配列番号１のスクレロスチンとの結合を交差遮断する、ならびに／または全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンによって、配列番号１のスクレロスチンとの結合が交差遮断され、ここで、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンは、本明細書に開示されるＣＤＲ配列、例えば、次の３つのＣＤＲ配列セットのうちの１つを含む：ａ）配列番号２８４のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２８５のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号２８６のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号２９６のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２９７のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号２９８のＣＤＲ－Ｈ３、ｂ）配列番号４８のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４９のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号５０のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号４５のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４６のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ３、またはｃ）配列番号４２のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４３のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号４４のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号３９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４０のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４１のＣＤＲ－Ｈ３。代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンと配列番号１のスクレロスチンとの結合を交差遮断する、ならびに／または全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンによって配列番号１のスクレロスチンとの結合が交差遮断され、ここで、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンは、次のＣＤＲを含む：配列番号２４５のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４６のＣＤＲ－Ｈ２、配列番号２４７のＣＤＲ－Ｈ３、配列番号７８のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７９のＣＤＲ－Ｌ２、および配列番号８０のＣＤＲ－Ｌ３。

【０１１３】

代替または追加として、抗スクレロスチン抗体は、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンと配列番号１のスクレロスチンとの結合を交差遮断する、ならびに／または全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンによって配列番号１のスクレロスチンとの結合が交差遮断され、ここで、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンは、次のＣＤＲを含む：配列番号２６９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２７０のＣＤＲ－Ｈ２、配列番号２７１のＣＤＲ－Ｈ３、配列番号２３９のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２４０のＣＤＲ－Ｌ２、および配列番号２４１のＣＤＲ－Ｌ３。

【０１１４】

好適な抗スクレロスチン抗体およびそのフラグメントの例には、特に本明細書に開示され、米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に開示される、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３のうちの１つ以上を有する抗体および抗体フラグメントが挙げられる。ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の領域のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つのアミノ酸置換を有し得るが、但し、抗体が非置換ＣＤＲの結合特異性を保持することを条件とする。例示的な抗スクレロスチン抗体には、米国特許公開第２００７／０１１０７４７号のＡｂ－Ａ、Ａｂ－Ｂ、Ａｂ－Ｃ、Ａｂ－Ｄ、Ａｂ－１、Ａｂ－２、Ａｂ－３、Ａｂ－４、Ａｂ－５、Ａｂ－６、Ａｂ－７、Ａｂ－８、Ａｂ－９、Ａｂ－１０、Ａｂ－１１、Ａｂ－１２、Ａｂ－１３、Ａｂ－１４、Ａｂ－１５、Ａｂ－１６、Ａｂ－１７、Ａｂ－１８、Ａｂ－１９、Ａｂ－２０、Ａｂ－２１、Ａｂ－２２、Ａｂ－２３、およびＡｂ－２４が挙げられるが、これらに限定されない。他の例示的な抗スクレロスチン抗体には、２７Ｈ６、１９Ｄ１１、および２０Ｃ３が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１５】

加えて、抗スクレロスチン抗体は、配列表に提供され、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に開示される、配列番号３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、７８、７９、８０、８１、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、３５１、３５２、３５３、３５８、３５９、および３６０から選択されるＣＤＲに少なくとも７５％の同一性（例えば、１００％の同一性）を有する少なくとも１つのＣＤＲ配列を含み得る。加えて、抗スクレロスチン抗体は、配列表に提供される配列番号４１７～４２２、４２５～４３０、および４３３～４３８から選択されるＣＤＲに少なくとも７５％の同一性（例えば、１００％の同一性）を有する少なくとも１つのＣＤＲ配列を含み得る。好ましくは、抗スクレロスチン抗体は、配列番号２４５、２４６、２４７、７８、７９、８０、２６９、２７０、２７１、２３９、２４０、および２４１から選択されるＣＤＲに少なくとも７５％の同一性を有する少なくとも１つのＣＤＲ配列を含み、これらのすべては、配列表に提供され、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載される。米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載されるように、抗スクレロスチン抗体は、ａ）配列番号５４、５５、および５６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５１、５２、および５３のＣＤＲ配列、ｂ）配列番号６０、６１、および６２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５７、５８、および５９のＣＤＲ配列、ｃ）配列番号４８、４９、および５０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号４５、４６、および４７のＣＤＲ配列、ｄ）配列番号４２、４３、および４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３９、４０、および４１のＣＤＲ配列、ｅ）配列番号２７５、２７６、および２７７のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２８７、２８８、および２８９のＣＤＲ配列、ｆ）配列番号２７８、２７９、および２８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９０、２９１、および２９２のＣＤＲ配列、ｇ）配列番号７８、７９、および８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４５、２４６、および２４７のＣＤＲ配列、ｈ）配列番号８１、９９、および１００のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４８、２４９、および２５０のＣＤＲ配列、ｉ）配列番号１０１、１０２、および１０３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５１、２５２、および２５３のＣＤＲ配列、ｊ）配列番号１０４、１０５、および１０６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５４、２５５、および２５６のＣＤＲ配列、ｋ）配列番号１０７、１０８、および１０９のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５７、２５８、および２５９のＣＤＲ配列、ｌ）配列番号１１０、１１１、および１１２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６０、２６１、および２６２のＣＤＲ配列、ｍ）配列番号２８１、２８２、および２８３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９３、２９４、および２９５のＣＤＲ配列、ｎ）配列番号１１３、１１４、および１１５のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６３、２６４、および２６５のＣＤＲ配列、ｏ）配列番号２８４、２８５、および２８６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９６、２９７、および２９８のＣＤＲ配列、ｐ）配列番号１１６、２３７、および２３８のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６６、２６７、および２６８のＣＤＲ配列、ｑ）配列番号２３９、２４０、および２４１のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６９、２７０、および２７１のＣＤＲ配列、）配列番号２４２、２４３、および２４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２７２、２７３、および２７４のＣＤＲ配列、またはｓ）配列番号３５１、３５２、および３５３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３５８、３５９、および３６０を含み得る。

【０１１６】

抗スクレロスチン抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１

、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３から選択されるＣＤＲに少なくとも７５％の同一性（例えば、１００％同一）を有する少なくとも１つのＣＤＲ配列を含み得、ここで、ＣＤＲ－Ｈ１は配列番号２４５に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｈ２は配列番号２４６に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｈ３は配列番号２４７に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ１は配列番号７８に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ２は配列番号７９に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ３は配列番号８０に提供される配列を有し、これらのすべては、配列表に提供され、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載される。抗スクレロスチン抗体は、種々の態様において、ＣＤＲのうちの２つ、またはＣＤＲのうちの６つを含む。任意で、抗スクレロスチン抗体は、配列番号３７８を含む重鎖（例えば、２つの重鎖）のすべてまたは一部と、配列番号３７６を含む軽鎖（例えば、２つの軽鎖）のすべてまたは一部と、を含む。

【０１１７】

抗スクレロスチン抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３から選択されるＣＤＲに少なくとも７５％の同一性を有する（例えば、１００％同一である）少なくとも１つのＣＤＲ配列を含み得、ここで、ＣＤＲ－Ｈ１は配列番号２６９に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｈ２は配列番号２７０に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｈ３は配列番号２７１に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ１は配列番号２３９に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ２は配列番号２４０に提供される配列を有し、ＣＤＲ－Ｌ３は配列番号２４１に提供される配列を有し、これらのすべては、配列表二提供され、米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載される。抗スクレロスチン抗体は、種々の態様において、ＣＤＲのうちの少なくとも２つ、またはＣＤＲのうちの６つを含む。任意で、抗スクレロスチン抗体は、配列番号３６６を含む重鎖（例えば、２つの重鎖）のすべてまたは一部と、配列番号３６４を含む軽鎖（例えば、２つの軽鎖）のすべてまたは一部とを含む。

【０１１８】

あるいは、抗スクレロスチン抗体は、ＣＤＲのＨ１、Ｈ２、およびＨ３を含み、配列番号１３７、１４５、もしくは３９２に提供される配列を有するポリペプチド、またはＣＤＲが、それぞれ、配列番号２４５、２４６、および２４７に少なくとも７５％同一である（例えば、１００％同一である）その変異体を含む、重鎖と、ＣＤＲのＬ１、Ｌ２、およびＬ３を含み、配列番号１３３もしくは１４１に提供される配列を有するポリペプチド、またはＣＤＲが、それぞれ、配列番号７８、７９、および８０に少なくとも７５％同一である（例えば、１００％同一である）その変異体を含む、軽鎖と、を有し得る。（米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載される）。

【０１１９】

抗スクレロスチン抗体は、ＣＤＲのＨ１、Ｈ２、およびＨ３を含み、配列番号３３５、３３１、３４５、もしくは３９６に提供される配列を有するポリペプチド、またはＣＤＲが、それぞれ、配列番号２６９、２７０、および２７１に少なくとも７５％同一である（例えば、１００％同一である）前述のもののうちのいずれかの変異体を含む、重鎖と、ＣＤＲのＬ１、Ｌ２、およびＬ３を含み、配列番号３３４もしくは３４１に提供される配列を有するポリペプチド、またはＣＤＲが、それぞれ、配列番号２３９、２４０、および２４１に少なくとも７５％同一である（例えば、１００％同一である）前述のもののうちのいずれかの変異体を含む、軽鎖と、を有し得る（米国特許公開第２００７０１１０７４７号に記載される）。重鎖および軽鎖配列のあらゆる組み合わせが企図される（例えば、配列番号３３５を含む重鎖と配列番号３３４を含む軽鎖、配列番号３３１を含む重鎖と配列番号３３４もしくは３４１を含む軽鎖、および配列番号３４５もしくは３９６を含む重鎖と配列番号３４１を含む軽鎖）。

【０１２０】

あるいは、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１３７に提供される配列を有するポリペプチドを含む重鎖および配列番号１３３に提供される配列を有するポリペプチドを含む軽鎖；配列番号１４５もしくは３９２に提供される配列を有するポリペプチドを含む重鎖お

よび配列番号１４１に提供される配列を有するポリペプチドを含む軽鎖；配列番号３３５に提供される配列を有するポリペプチドを含む重鎖および配列番号３３４に提供される配列を有するポリペプチドを含む軽鎖；配列番号３３１に提供される配列を有するポリペプチドを含む重鎖および配列番号３４１に提供される配列を有するポリペプチドを含む軽鎖；または配列番号３４５もしくは３９６に提供される配列を有するポリペプチドを含むおよび配列番号３４１に提供される配列を有するポリペプチドを含む軽鎖を有する（米国特許公開第２００７／０１１０７４７号に記載される）。あるいは、抗スクレロスチン抗体は、前述の抗体のいずれかとスクレロスチンとの結合を交差遮断する（またはそれによって交差遮断される）。

【０１２１】

いくつかの実施形態において、抗スクレロスチン抗体は、配列番号１０３８、配列番号１０４６、配列番号１０４０、および配列番号１０４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で、配列番号１０３９、配列番号１０４７、配列番号１０４１、および配列番号１０４９からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含む。

【０１２２】

抗スクレロスチン抗体の例にはまた、国際特許公開第ＷＯ　２００８／０９２８９４号、同第ＷＯ　２００８／１１５７３２号、同第ＷＯ　２００９／０５６６３４号、同第ＷＯ　２００９／０４７３５６号、同第ＷＯ　２０１０／１００２００号、同第ＷＯ　２０１０／１００１７９号、同第ＷＯ　２０１０／１１５９３２号、および同第ＷＯ　２０１０／１３０８３０号（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示される抗スクレロスチン抗体、例えば、国際特許公開第ＷＯ　２００８／１１５７３２号の配列番号２０～２５（本明細書においては配列番号４１６～４２１）のＣＤＲを含む抗スクレロスチン抗体、国際特許公開第ＷＯ　２００８／１１５７３２号の配列番号２６～３１（本明細書においては配列番号４２２～４２７）のＣＤＲを含む抗スクレロスチン抗体、国際特許公開第ＷＯ　２００８／１１５７３２号の配列番号３２～３７（本明細書においては配列番号４２８～４３３）のＣＤＲを含む抗スクレロスチン抗体、国際特許公開第ＷＯ　２００９／０４７３５６号の配列番号４、１５、２６、３７、４８、および５９（本明細書においてはそれぞれ配列番号４４３、４５４、４６５、４７６、４８７、および４９８）のＣＤＲを含む抗スクレロスチン抗体、または国際特許公開第ＷＯ　２０１０／１３０８３０号の配列番号１３５～１４３、１５３～１６１、もしくは１７１～１７９（本明細書においてはそれぞれ配列番号７４５～７５３、７６３～７７１、７８１～７８９）のうちの少なくとも１つのアミノ酸配列を含む抗スクレロスチン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２３】

抗ＤＫＫ１抗体

【０１２４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、抗ＤＫＫ１抗体を含むＤＫＫ１結合部分を含む。「抗ＤＫＫ１抗体」は、ＤＫＫ１またはその部分に結合して、ヒトＤＫＫ１と１つ以上のリガンドとの結合を遮断または妨害する。ヒトＤＫＫ１ポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号８１０および８１１に記載される。マウスおよびラットＤＫＫ１のポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列番号８１２および８１３（マウス）ならびに配列番号８１４および８１５（ラット）に記載される。本発明の文脈における使用に好適な抗ＤＫＫ１抗体は、国際公開第ＷＯ　２０１２／１１８９０３号に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、抗ＤＫＫ１抗体は、抗体１１Ｈ１０Ｈｕ、１１Ｈ１０Ｒａｔ、２．４．１、２．２０．１、２．３７．１、２．４０．１、２．４１．１、２．４７．１、５．１７．１、５．２３．１、５．２５．１、５．３１．１、５．３２．１、５．４０．１、５．６５．１、５．７６．１、５．７７．１、５．７８．１、５．８０．１、５．８５．１、６．３７．５、６．１１６．６、６．１３９．５、および６．１４７．４

（これらのすべては、国際公開第ＷＯ　２０１２／１１８９０３号に開示される）のうちの少なくとも１つとＤＫＫ１との結合を交差遮断するか、またはそれと競合する。代替または追加として、抗ＤＫＫ１抗体は、抗体１１Ｈ１０Ｈｕ、１１Ｈ１０Ｒａｔ、２．４．１、２．２０．１、２．３７．１、２．４０．１、２．４１．１、２．４７．１、５．１７．１、５．２３．１、５．２５．１、５．３１．１、５．３２．１、５．４０．１、５．６５．１、５．７６．１、５．７７．１、５．７８．１、５．８０．１、５．８５．１、６．３７．５、６．１１６．６、６．１３９．５、および６．１４７．４のうちの少なくとも１つによって、ＤＫＫ１との結合が交差遮断される。「交差遮断」、「交差遮断される」、および「交差遮断する」という用語は、抗体が他の抗体とＤＫＫ１との結合を妨害する能力を意味して、本明細書に互換的に使用される。抗体が別の抗体とＤＫＫ１との結合を妨害することができる程度、およびしたがってそれが交差遮断すると称され得るかどうかは、競合結合アッセイを使用して判定され得る。本発明のいくつかの態様において、交差遮断抗体またはそのフラグメントは、参照抗体のＤＫＫ１結合を、約４０％～約１００％、例えば、約６０％～約１００％、または７０％～１００％、または８０％～１００％低減させる。交差遮断を検出するのに特に好適な定量的アッセイは、表面プラズモン共鳴技術を用いて相互作用の程度を測定する、Ｂｉａｃｏｒｅ機器を使用する。別の好適な定量的交差遮断アッセイは、ＤＫＫ１への結合に関して抗体間の競合を測定する、ＥＬＩＳＡに基づくアプローチを使用する。

【０１２５】

いくつかの実施形態において、抗ＤＫＫ１抗体は、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンと配列番号８１１のＤＫＫ１との結合を交差遮断する、および／または全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンによって、配列番号８１１のＤＫＫ１との結合が交差遮断され、ここで、全長重鎖および軽鎖を含む免疫グロブリンは、本明細書に開示されるＣＤＲ配列、例えば、次の３つセットのＣＤＲ配列のうちの１つを含む：配列番号８２０～８２２、８２８～８３０、８３６～８３８、８４４～８４６、８５２～８５４、８６０～８６２、８６８～８６９、８７６～８７８、８８４～８８６、８９２～８９４、９００～９０２、９０８～９１０、９１６～９１８、９２４～９２６、９３２～９３４、９４０～９４２、９４８～９５０、９５６～９５８、９６４～９６６、９７２～９７４、９８０～９８２、９８８～９９０、９９６～９９８、１００４～１００６、８２３～８２５、８３１～８３３、８３９～８４１、８４７～８４９、８５５～８５７、８６３～８６５、８７１～８７３、８７９～８８１、８８７～８８９、８９７～８９７、９０３～９０５、９１１～９１３、９１９～９２１、９２７～９２９、９３５～９３７、９４３～９４５、９５１～９５３、９５９～９６１、９６７～９６９、９７５～９７７、９８３～９８５、９９１～９９３、９９９～１００１、および１００７～１００９。

【０１２６】

好適な抗ＤＫＫ１抗体およびそのフラグメントの例には、特に本明細書に開示され、国際公開第ＷＯ　２０１２／１１８９０３号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示される、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３のうちの１つ以上を有する抗体および抗体フラグメントが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３、ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、およびＣＤＲ－Ｌ３の領域のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つのアミノ酸置換を有し得るが、但し、抗体が非置換ＣＤＲの結合特異性を保持することを条件とする。例示的な抗ＤＫＫ１抗体には、抗体１１Ｈ１０Ｈｕ、１１Ｈ１０Ｒａｔ、２．４．１、２．２０．１、２．３７．１、２．４０．１、２．４１．１、２．４７．１、５．１７．１、５．２３．１、５．２５．１、５．３１．１、５．３２．１、５．４０．１、５．６５．１、５．７６．１、５．７７．１、５．７８．１、５．８０．１、５．８５．１、６．３７．５、６．１１６．６、６．１３９．５、および６．１４７．４（これらのすべては、国際公開第ＷＯ　２０１２／１１８９０３号に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、抗ＤＫＫ１抗体は、８２０～８２２（Ａｂ１１Ｈ１０ＨｕのＣＤＲＬ１～Ｌ３）、８２８～８３０（Ａｂ１１Ｈ１０ＲａｔのＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８３６～８３８（Ａｂ２．４．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８４４～８４６（Ａｂ２．２０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８５２～８５４（Ａｂ２．３７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８６０～８６２（Ａｂ２．４０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８６８～８６９（Ａｂ２．４１．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８７６～８７８（Ａｂ２．４７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８８４～８８６（Ａｂ５．１７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８９２～８９４（Ａｂ５．２３．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９００～９０２（Ａｂ５．２５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９０８～９１０（Ａｂ５．３１．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９１６～９１８（Ａｂ５．３２．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９２５～９２７（Ａｂ５．４０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９３２～９３４（Ａｂ５．６５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９４０～９４２（Ａｂ５．７６．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９４８～９５０（Ａｂ５．７７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９５６～９５８（Ａｂ５．７８．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９６４～９６６（Ａｂ５．８０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９７２～９７４（Ａｂ５．８５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９８０～９８２（Ａｂ６．３７．５のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９８８～９９０（Ａｂ６．１１６．６のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９９６～９９８（Ａｂ６．１３９．５のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、１００４～１００６（Ａｂ６．１４７．４のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８２３～８２５（Ａｂ１１Ｈ１０ＨｕのＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８３１～８３３（Ａｂ１１Ｈ１０ＲａｔのＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８３９～８４１（Ａｂ２．４．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８４７～８４９（Ａｂ２．２０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８５５～８５７（Ａｂ２．３７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８６３～８６５（Ａｂ２．４０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８７１～８７３（Ａｂ２．４１．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８７９～８８１（Ａｂ２．４７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８８７～８８９（Ａｂ５．１７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８９５～８９７（Ａｂ５．２３．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９０３～９０５（Ａｂ５．２５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９１１～９１３（Ａｂ５３１．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９１９～９２１（Ａｂ５．３２．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９２７～９２９（Ａｂ５．４０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９３５～９３７（Ａｂ５．６５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９４３～９４５（Ａｂ５．７６．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９５１～９５３（Ａｂ５．７７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９５９～９６１（Ａｂ５．７８．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９６７～９６９（Ａｂ５．８０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９７５～９７７（Ａｂ５．８５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９８３～９８５（Ａｂ６．３７．５のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９９１～９９３（Ａｂ６．１１６．６のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９９９～１００１（Ａｂ６．１３９．５のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、および１００７～１００９（Ａｂ６．１４７．４のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）からなる群から選択されるＣＤＲに、少なくとも７５％の同一性（例えば、少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも１００％の同一性）を有する少なくとも１つのＣＤＲを含む。

【０１２８】

抗ＤＫＫ１抗体は、いくつかの実施形態において、配列番号８１９、８２７、８３５、８４３、８５１、８５９、８６７、８７５、８８３、８９１、８９９、９０７、９１５、９２３、９３１、９３９、９４７、９５５、９６３、９７１、９７９、９８７、９９５、および１００３からなる群から選択される抗ＤＫＫ１重鎖可変ドメインアミノ酸配列に少なくとも７５％の同一性（例えば、少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも１００％の同一性）を有する重鎖可変ドメインアミノ酸配列を有することを含む。いくつかの実施形態において、配列番号８１８、８２６、８３４、８４２、８５０、８６６、８７４、８８２、８９０、８９８、９０６、８１４、８２２、８３０、９３８、９４６、９５４、９６２、９７０、

９７８、９８８、９９４、および１００２からなる群から選択される抗ＤＫＫ１軽鎖可変ドメインアミノ酸配列に少なくとも７５％の同一性（例えば、少なくとも８０％、または少なくとも８５％、または少なくとも９０％、または少なくとも９５％、または少なくとも１００％の同一性）を有する軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗ＤＫＫ１抗体。

【０１２９】

ヘテロ二量体抗体のＤＫＫ１結合要素（複数可）は、いくつかの実施形態において、８２０～８２２（Ａｂ１１Ｈ１０ＨｕのＣＤＲＬ１～Ｌ３）、８２８～８３０（Ａｂ１１Ｈ１０ＲａｔのＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８３６～８３８（Ａｂ２．４．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８４４～８４６（Ａｂ２．２０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８５２～８５４（Ａｂ２．３７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８６０～８６２（Ａｂ２．４０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８６８～８６９（Ａｂ２．４１．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８７６～８７８（Ａｂ２．４７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８８４～８８６（Ａｂ５．１７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８９２～８９４（Ａｂ５．２３．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９００～９０２（Ａｂ５．２５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９０８～９１０（Ａｂ５．３１．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９１６～９１８（Ａｂ５．３２．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９２５～９２７（Ａｂ５．４０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９３２～９３４（Ａｂ５．６５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９４０～９４２（Ａｂ５．７６．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９４８～９５０（Ａｂ５．７７．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９５６～９５８（Ａｂ５．７８．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９６４～９６６（Ａｂ５．８０．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９７２～９７４（Ａｂ５．８５．１のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９８０～９８２（Ａｂ６．３７．５のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９８８～９９０（Ａｂ６．１１６．６のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、９９６～９９８（Ａｂ６．１３９．５のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、１００４～１００６（Ａｂ６．１４７．４のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３）、８２３～８２５（Ａｂ１１Ｈ１０ＨｕのＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８３１～８３３（Ａｂ１１Ｈ１０ＲａｔのＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８３９～８４１（Ａｂ２．４．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８４７～８４９（Ａｂ２．２０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８５５～８５７（Ａｂ２．３７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８６３～８６５（Ａｂ２．４０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８７１～８７３（Ａｂ２．４１．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８７９～８８１（Ａｂ２．４７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８８７～８８９（Ａｂ５．１７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、８９５～８９７（Ａｂ５．２３．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９０３～９０５（Ａｂ５．２５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９１１～９１３（Ａｂ５３１．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９１９～９２１（Ａｂ５．３２．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９２７～９２９（Ａｂ５．４０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９３５～９３７（Ａｂ５．６５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９４３～９４５（Ａｂ５．７６．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９５１～９５３（Ａｂ５．７７．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９５９～９６１（Ａｂ５．７８．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９６７～９６９（Ａｂ５．８０．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９７５～９７７（Ａｂ５．８５．１のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９８３～９８５（Ａｂ６．３７．５のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９９１～９９３（Ａｂ６．１１６．６のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、９９９～１００１（Ａｂ６．１３９．５のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）、および１００７～１００９（Ａｂ６．１４７．４のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）の配列番号に記載されるＣＤＲのうちの１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つを含む。ヘテロ二量体抗体が、単一の抗体由来の２つ以上のＣＤＲ、または本明細書に記載されるＤＫＫ１抗体の任意の組み合わせに由来する２つ以上のＣＤＲを含み得ることが、企図される。いくつかのＤＫＫ１結合要素は、軽鎖ＣＤＲ３および重鎖ＣＤＲ３の両方を含む。ある特定のＤＫＫ１結合要素は、ＣＤＲのうちの１つ以上（すなわち、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つ）が、それぞれ、配列番号８２０～８２２、８２８～８３０、８３６～８３８、８４４～８４６、８５２～８５４、８６０～８６２、８６８～８６９、８７６～８７８、８８４～８８６、８９２～８９４、９００～９

０２、９０８～９１０、９１６～９１８、９２５～９２７、９３２～９３４、９４０～９４２、９４８～９５０、９５６～９５８、９６４～９６６、９７２～９７４、９８０～９８２、９８８～９９０、９９６～９９８、１００４～１００６、８２３～８２５、８３１～８３３、８３９～８４１、８４７～８４９、８５５～８５７、８６３～８６５、８７１～８７３、８７９～８８１、８８７～８８９、８９７～８９７、９０３～９０５、９１１～９１３、９１９～９２１、９２７～９２９、９３５～９３７、９４３～９４５、９５１～９５３、９５９～９６１、９６７～９６９、９７５～９７７、９８３～９８５、９９１～９９３、９９９～１００１、および１００７～１００９に記載されるＣＤＲ配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％の配列同一性を有する、配列番号８２０～８２２、８２８～８３０、８３６～８３８、８４４～８４６、８５２～８５４、８６０～８６２、８６８～８６９、８７６～８７８、８８４～８８６、８９２～８９４、９００～９０２、９０８～９１０、９１６～９１８、９２５～９２７、９３２～９３４、９４０～９４２、９４８～９５０、９５６～９５８、９６４～９６６、９７２～９７４、９８０～９８２、９８８～９９０、９９６～９９８、１００４～１００６、８２３～８２５、８３１～８３３、８３９～８４１、８４７～８４９、８５５～８５７、８６３～８６５、８７１～８７３、８７９～８８１、８８７～８８９、８９７～８９７、９０３～９０５、９１１～９１３、９１９～９２１、９２７～９２９、９３５～９３７、９４３～９４５、９５１～９５３、９５９～９６１、９６７～９６９、９７５～９７７、９８３～９８５、９９１～９９３、９９９～１００１、および１００７～１００９に記載されるＣＤＲの変異体形態を有する。例えば、ヘテロ二量体抗体のＤＫＫ１結合要素は、それぞれが、配列番号８２２、８３０、８３８、８４６、８５４、８６２、８７０、８７８、８８６、８９４、９０２、９１０、９１８、９２６、９３４、９４２、９５０、９５８、９６６、９７４、９８２、９９０、９９８、および１００６からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％の配列同一性を有し、８２５、８３３、８４１、８４９、８５７、８６５、８７３、８８１、８８９、８９７、９０５、９１３、９２１、９２９、９３７、９４５、９５３、９６１、９６９、９７７、９８５、９９３、１００１、および１００９からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％の配列同一性を有する、軽鎖ＣＤＲ３および重鎖ＣＤＲ３の両方を含み得る。

【０１３０】

提供されるＤＫＫ１結合要素のうちの一部のもののＣＤＲ配列はまた、任意の所与のＣＤＲのアミノ酸配列が、１、２、３、４、または５つ以下のアミノ酸残基だけ異なるように、配列番号８２０～８２２、８２８～８３０、８３６～８３８、８４４～８４６、８５２～８５４、８６０～８６２、８６８～８６９、８７６～８７８、８８４～８８６、８９２～８９４、９００～９０２、９０８～９１０、９１６～９１８、９２５～９２７、９３２～９３４、９４０～９４２、９４８～９５０、９５６～９５８、９６４～９６６、９７２～９７４、９８０～９８２、９８８～９９０、９９６～９９８、１００４～１００６、８２３～８２５、８３１～８３３、８３９～８４１、８４７～８４９、８５５～８５７、８６３～８６５、８７１～８７３、８７９～８８１、８８７～８８９、８９７～８９７、９０３～９０５、９１１～９１３、９１９～９２１、９２７～９２９、９３５～９３７、９４３～９４５、９５１～９５３、９５９～９６１、９６７～９６９、９７５～９７７、９８３～９８５、９９１～９９３、９９９～１００１、および１００７～１００９に記載されるＣＤＲ配列と異なってもよい。列挙される配列との差は、典型的には保存的置換であるが、これに限定されない。

【０１３１】

いくつかの実施形態において、抗ＤＫＫ１抗体は、配列番号１０３４、配列番号１０４２、配列番号１０３６、および配列番号１０４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で、配列番号１０３５、配列番号１０４３、配列番号１０３７、および配列番号１０４５からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含む。

【０１３２】

他の実施形態において、ＤＫＫ１に結合するヘテロ二量体分子の部分は、米国特許第号７，７０９，６１１号、米国特許公開第２００８／０１９３４４９号、米国特許第号７，６４２，２３８号、米国特許第号７，７００，１０１号、およびＷＯ ２００７／０８４３４４号に開示されるＤＫＫ１結合分子から選択され、これらのすべての開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１３３】

組み換え重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチド

【０１３４】

本明細書に記載される重鎖および／または軽鎖の定常および／または可変ドメインをコードする核酸が、本明細書に包含される。本発明の核酸分子には、一本鎖および二本鎖の両方の形態のＤＮＡおよびＲＮＡ、ならびに対応する相補的配列が含まれる。ＤＮＡには、例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、化学合成されたＤＮＡ、ＰＣＲにより増幅されたＤＮＡ、およびこれらの組み合わせが含まれる。本発明の核酸分子には、全長遺伝子またはｃＤＮＡ分子、ならびにそれらのフラグメントの組み合わせが含まれる。本発明の核酸は、優先的にはヒト源に由来するが、本発明は、非ヒト種に由来するものも同様に含む。

【０１３５】

「単離核酸」は、天然に存在する源から単離された核酸の場合には、核酸が単離された生物のゲノムに存在する隣接する遺伝子配列から分離されている、核酸である。例えば、鋳型から酵素的または化学的に合成された核酸、例えばＰＣＲ産物、ｃＤＮＡ分子、またはオリゴヌクレオチドの場合には、このようなプロセスから得られた核酸は、単離核酸であることが理解される。単離核酸分子は、別個のフラグメントの形態にあるか、またはより大きな核酸構築物の構成要素としての、核酸分子を指す。１つの好ましい実施形態において、核酸は、外因性混入物質を実質的に含まない。核酸分子は、好ましくは、標準的な生化学的方法（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）に概説されるもの等）によって、実質的に純粋な形態かつその構成要素のヌクレオチド配列の特定、操作、および回収を可能にする量または濃度で、少なくとも１回単離されたＤＮＡまたはＲＮＡから導出されたものである。このような配列は、好ましくは、典型的には真核生物遺伝子に存在する内部非翻訳配列またはイントロンによって中断されないオープンリーディングフレームの形態で提供および／または構築される。翻訳されないＤＮＡの配列が、それがコード領域の操作または発現を妨害することのない、オープンリーディングフレームから５’または３’に存在し得る。

【０１３６】

本発明はまた、中等度にストリンジェントな条件下で、およびより好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする核酸を含む。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本的なパラメータおよび好適な条件を考案するための案内は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（１９８９，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，ｃｈａｐｔｅｒｓ ９ ａｎｄ １１、およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５，Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ｓｅｃｔｉｏｎｓ ２．１０ ａｎｄ ６．３－６．４）に記載され、例えば、ＤＮＡの長さおよび／または基本組成に基づいて、当業者によって容易に決定することができる。中等度にストリンジェントな条件を達成する１つの手段は、５×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、１．０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を含有する予備洗浄溶液、約５０％ホルムアミド、６×ＳＳＣ、約５５℃のハイブリダイゼーション温度のハイブリダイゼーション緩衝液（または他の類似のハイブリダイゼーション溶液、例えば、約５０％ホルムアミドを含有し、約４２℃のハイブリダイゼー

ション温度）、ならびに約６０℃、０．５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの洗浄条件の使用を伴う。一般に、高度にストリンジェントな条件は、上述のハイブリダイゼーション条件として定義されるが、おおよそ６８℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの洗浄を伴う。ＳＳＰＥ（１×ＳＳＰＥは、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ／ＮａＨ．ｓｕｂ．２ＰＯ．ｓｕｂ．４、および１．２５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液中、ＳＳＣ（１×ＳＳＣは、０．１５Ｍ　ＮａＣｌおよび１５ｍＭクエン酸ナトリウム）と置換され得、洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後に１５分間行われる。洗浄温度および洗浄塩濃度は、当業者に既知であり、以下にさらに記載されるように、ハイブリダイゼーション反応および二重鎖の安定性を左右する基本原理を適用することによって、所望される程度のストリンジェンシーを達成するように必要に応じて調節することができることを理解されたい（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９を参照されたい）。ある核酸を、配列が未知の標的核酸にハイブリダイズする場合、ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズする核酸のものとなることが想定される。配列が既知の核酸をハイブリダイズする場合、ハイブリッドの長さは、核酸の配列をアライメントし、最適な配列相補性の領域（複数可）を決定することによって決定される。長さが５０塩基対未満となることが予想されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの溶融温度（Ｔｍ）よりも５～１０℃低く、ここで、Ｔｍは、以下の等式に従って決定される。長さが１８塩基対未満のハイブリッドについては、Ｔｍ（℃）＝２（Ａ＋Ｔ塩基の数）＋４（Ｇ＋Ｃ塩基の数）。長さが１８塩基対を上回るハイブリッドについては、Ｔｍ（℃）＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ１０［Ｎａ＋］）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－（６００／Ｎ）であり、ここで、Ｎは、ハイブリッド中の塩基の数であり、［Ｎａ＋］は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である（１×ＳＳＣの［Ｎａ＋］＝０．１６５Ｍ）。好ましくは、それぞれのこのようなハイブリダイズ核酸は、少なくとも１５ヌクレオチド（または好ましくは少なくとも１８ヌクレオチド、もしくは少なくとも２０ヌクレオチド、もしくは少なくとも２５ヌクレオチド、もしくは少なくとも３０ヌクレオチド、もしくは少なくとも４０ヌクレオチド、または最も好ましくは少なくとも５０ヌクレオチド）、またはそれがハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも２５％（より好ましくは少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、および最も好ましくは少なくとも８０％）の長さを有し、それがハイブリダイズする本発明の核酸に少なくとも６０％（より好ましくは少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％、および最も好ましくは少なくとも９９．５％）の配列同一性を有し、ここで、配列同一性は、上により詳細に説明されるように、重複および同一性を最大化し、配列ギャップを最小化するようにアライメントしたとき、ハイブリダイズする核酸の配列を比較することによって判定される。

【０１３７】

変異体は、通常、カセットもしくはＰＣＲ変異生成または当業者に周知の他の技法を使用して、ポリペプチドをコードするＤＮＡにおけるヌクレオチドの部位特異的変異生成を行って、その変異体をコードするＤＮＡを生成した後、本明細書に概説される細胞培養物中で組み換えＤＮＡを発現させることによって、調製される。しかしながら、最大で約１００～１５０個の残基を有する変異体ＣＤＲを含む抗体または抗体フラグメントは、確立された技法を使用してインビトロ合成によって調製されてもよい。変異体は、典型的に、天然に存在する類似体と同じ定性的生物学的活性、例えば、抗原への結合を呈するが、本明細書により詳細に概説されるように、修正された特徴を有する変異体もまた選択され得る。

【０１３８】

当業者には理解されるように、遺伝コードの縮重に起因して、極めて多数の核酸が作製され得、それらのすべては、本発明のＣＤＲ（および本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体の重鎖および軽鎖または他の構成要素）をコードする。したがって、特定のアミノ酸配列を特定した後、当業者であれば、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させない様式で１つ以上のコドンの配列を単純に修飾することによって、任意の数の異なる核酸を作製することができる。

【０１３９】

本発明はまた、少なくとも１つの上述のポリヌクレオチドを含む、プラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態で、発現系および構築物を提供する。加えて、本発明は、このような発現系または構築物を含む宿主細胞を提供する。

【０１４０】

典型的に、宿主細胞において使用される発現ベクターは、プラスミド維持のため、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含有するであろう。このような配列は、集合的に「フランキング配列」と称され、ある特定の実施形態では、典型的に、次のヌクレオチド配列のうちの１つ以上を含む：プロモーター、１つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライシング部位を含有する完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能なマーカー要素を含むであろう。これらの配列のそれぞれは、以下に考察される。

【０１４１】

任意で、ベクターは、「タグ」コード配列、すなわち、ポリペプチドコード配列の５’または３’末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含有し得、オリゴヌクレオチド配列は、ポリＨｉｓ（ヘキサＨｉｓ）、またはＦＬＡＧ、ＨＡ（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）、またはｍｙｃ（これらには市販入手可能な抗体が存在する）といった別の「タグ」をコードする。このタグは、典型的に、ポリペプチドの発現時にそのポリペプチドに融合され、宿主細胞からのポリペプチドの親和性精製または検出のための手段として機能し得る。親和性精製は、例えば、そのタグに対する抗体を親和性マトリックスとして使用してカラムクロマトグラフィーによって達成することができる。任意で、そのタグは、続いて、開裂にある特定のペプチダーゼを使用する等、種々の手段によって精製されたポリペプチドから除去され得る。

【０１４２】

フランキング配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または株に由来する）、異種（すなわち、宿主細胞の種もしくは株以外の種に由来する）、ハイブリッド（すなわち、１つを上回る源に由来するフランキング配列の組み合わせ）、合成、または天然であり得る。このように、フランキング配列の源は、任意の原核生物もしくは真核生物、任意の脊椎動物もしくは無脊椎動物、または任意の植物であり得るが、但し、フランキング配列が、宿主細胞機構において機能性であり、それによって活性化され得ることを条件とする。

【０１４３】

本発明のベクターに有用なフランキング配列は、当該技術分野で周知のいくつかの方法のうちのいずれかによって得ることができる。典型的には、本明細書において有用なフランキング配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって既に特定されているものであり、したがって、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して適正な組織から単離され得る。いくつかの場合において、フランキング配列の全ヌクレオチド配列が既知である。ここでは、フランキング配列は、核酸合成またはクローニングに関して本明細書に記載される方法を使用して、合成することができる。

【０１４４】

すべてまたは一部分にかかわらずフランキング配列がわかっている場合、それは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、ならびに／または同じかもしくは別の種に由来

するオリゴヌクレオチドおよび／もしくはフランキング配列フラグメントといった好適なプローブを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、得ることができる。フランキング配列がわかっていない場合、フランキング配列を含有するＤＮＡのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子（複数可）さえも含有し得るＤＮＡのより大きな断片から単離することができる。単離は、制限エンドヌクレアーゼ消化により適切なＤＮＡフラグメントを産生した後、アガロースゲル精製、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）、または当業者に記載の他の方法を使用して単離することによって、達成され得る。この目的を達成するための好適な酵素の選択は、当業者には容易に明らかであろう。

【０１４５】

複製起点は、典型的に、市販購入される原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を助ける。選択したベクターが複製起点部位を含有しない場合は、既知の配列に基づいて化学合成され、ベクターにライゲーションされ得る。例えば、プラスミドｐＢＲ３２２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性菌に好適であり、種々のウイルス起源（例えば、ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（ｖｅｓｉｃｕｌａｒ　ｓｔｏｍａｔｉｔｕｓ　ｖｉｒｕｓ）（ＶＳＶ）、またはＨＰＶもしくはＢＰＶ等のパピローマウイルス）が、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングに有用である。一般に、複製起点要素は、哺乳動物発現ベクターには必要ない（例えば、ＳＶ４０起点は、ウイルス初期プロモーターも含有するという理由でのみ使用されることが多い）。

【０１４６】

転写終結配列は、典型的に、ポリペプチドコード領域の末端に対して３’に位置し、転写を終結させるように機能する。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、Ｇ－Ｃリッチフラグメントの後にポリＴ配列が続く。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされ、さらにはベクターの一部として市販購入されるが、本明細書に記載されるもの等、核酸合成のための方法を使用して容易に合成することもできる。

【０１４７】

選択可能なマーカー遺伝子は、選択培養培地において成長する宿主細胞の生存および成長に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、（ａ）抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、もしくはカナマイシンに対する耐性を原核生物宿主細胞に付与する、（ｂ）細胞の栄養要求不足を補完する、または（ｃ）複合培地もしくは限定培地からは利用可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。具体的な選択可能なマーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利なことに、ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物および真核生物両方の宿主細胞における選択に使用することができる。

【０１４８】

他の選択可能なマーカーを使用して、発現される遺伝子を増幅させてもよい。増幅は、成長または細胞生存に重要なタンパク質の産生に必要とされる遺伝子が組み換え細胞の後継代の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に好適な選択可能なマーカーの例には、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）およびプロモーターを持たないチミジン（ｔｈｙｒｎｉｄｉｎｅ）キナーゼ遺伝子が含まれる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、ベクターに存在する選択可能な遺伝子のために、形質転換体のみが生存するように独自に適合される。選択圧は、形質転換した細胞を、培地中の選択剤の濃度が継続的に増加する条件下で培養することによって課され、それによって、選択可能な遺伝子と、抗体の軽鎖または重鎖等、別の遺伝子コードするＤＮＡの両方の増幅がもたらされる。結果として、増加した量のポリペプチドが、増幅したＤＮＡから合成される。

【０１４９】

リボソーム結合部位は、通常、ｒｎＲＮＡの翻訳開始に必要であり、シャイン・ダルガーノ配列（原核生物）またはコザック配列（真核生物）によって特徴付けられる。この要素は、典型的に、プロモーターに対して３’に位置し、発現されるポリペプチドのコード配列に対して５’に位置する。ある特定の実施形態において、１つ以上のコード領域が、内部リボソーム結合部位（ＩＲＥＳ）に動作可能に連結され得、単一のＲＮＡ転写産物から２つのオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする。

【０１５０】

グリコシル化が真核生物の宿主細胞発現系において望ましい場合等、いくつかの場合において、種々のプレまたはプロ配列を操作して、グリコシル化または収率を改善することができる。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ開裂部位を改変するか、またはプロ配列を付加することができ、これらもまたグリコシル化に影響を及ぼし得る。最終的なタンパク質産物は、発現に付随する１つ以上の追加のアミノ酸を－１位（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）に有し得、これは、完全に除去されていない場合がある。例えば、最終的なタンパク質産物は、アミノ末端に付加される、ペプチダーゼ開裂部位に見出される１または２つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素開裂部位の使用は、酵素が、成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望されるポリペプチドのわずかに切断された形態をもたらし得る。

【０１５１】

本発明の発現およびクローニングベクターは、典型的に、宿主生物によって認識され、ポリペプチドをコードする分子に動作可能に連結される、プロモーターを含有する。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般に約１００～１０００ｂｐ内）の開始コドンに対して上流（すなわち、５’）に位置する非翻訳配列である。プロモーターは、従来的には、誘導性プロモーターおよび構成性プロモーターという２つのクラスのうちの１つに分類される。誘導性プロモーターは、栄養物の存在または不在といった培養条件における何らかの変化、または温度の変化に応答して、それらの制御下で、ＤＮＡからの増加したレベルの転写を開始する。構成性プロモーターは、一方で、それらが動作可能に連結される遺伝子を一様に転写する、すなわち、遺伝子発現に対する制御をほとんど有さないか、または有さない。種々の可能性のある宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが、周知である。好適なプロモーターは、制限酵素消化によって源ＤＮＡからプロモーターを除去し、所望されるプロモーター配列をベクターに挿入することによって、例えば、重鎖または軽鎖をコードするＤＮＡに動作可能に連結される。

【０１５２】

酵母宿主での使用に好適なプロモーターもまた、当該技術分野で周知である。酵母エンハンサーが、酵母プロモーターとともに有利に使用される。哺乳動物細胞での使用に好適なプロモーターが周知であり、これらには、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス２等）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、および最も好ましくはシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）といったウイルスのゲノムから得られるものが含まれるが、これらに限定されない。他の好適な哺乳動物プロモーターには、異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターが含まれる。

【０１５３】

目的とされ得るさらなるプロモーターには、ＳＶ４０初期プロモーター（Ｂｅｎｏｉｓｔ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：３０４－３１０）、ＣＭＶプロモーター（Ｔｈｏｒｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｕ．Ｓ．Ａ．ＵＳＡ ８１：６５９－６６３）、ラウス肉腫ウイルスの３’長末端反復に含有されるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏ，ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２：７８７－７９７）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４４－１４４５）、メタロチオニン遺伝子に由来するプロモーターおよび制御性配列Ｐｒｉｎｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８２，Ｎａｔｕｒｅ ２９６：３９－４２）、

ならびにβ－ラクタマーゼプロモーター等の原核生物プロモーター（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，１９７８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７５：３７２７－３７３１）、またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８０：２１－２５）が挙げられるが、これらに限定されない。組織特異性を示し、トランスジェニック動物に用いられている、以下の動物転写制御領域もまた興味深い：膵腺房細胞において活性なエラスターゼＩ遺伝子制御領域（Ｓｗｉｆｔ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ３８：６３９－６４６、Ｏｒｎｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５０：３９９－４０９、ＭａｃＤｏｎａｌｄ，１９８７，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：４２５－５１５）、膵β細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Ｈａｎａｈａｎ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：１１５－１２２）、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６４７－６５８、Ａｄａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１８：５３３－５３８、Ａｌｅｘａｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．７：１４３６－１４４４）、精巣、乳房、リンパ系、および肥満細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域（Ｌｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４５：４８５－４９５）、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：２６８－２７６）、肝臓において活性なα－フェトータンパク質遺伝子制御領域（Ｋｒｕｍｌａｕｆ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：１６３９－１６４８、Ｈａｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５３：５３－５８）、肝臓において活性なα１－アンチトリプシン遺伝子制御領域（Ｋｅｌｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：１６１－１７１）、骨髄腫細胞において活性なβグロビン遺伝子制御領域（Ｍｏｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：３３８－３４０、Ｋｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｃｅｌｌ ４６：８９－９４）、脳内の乏突起膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Ｒｅａｄｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｃｅｌｌ ４８：７０３－７１２）、骨格筋において活性なミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Ｓａｎｉ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２８３－２８６）、ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：１３７２－１３７８）。

【０１５４】

より高度な真核生物による本発明の軽鎖または重鎖をコードするＤＮＡの転写を増加させるために、エンハンサー配列がベクターに挿入され得る。エンハンサーは、通常約１０～３００ｂｐであり、転写を増加させるようにプロモーターに作用する、ＤＮＡのシス作用要素である。エンハンサーは、比較的配向および位置に依存せず、転写単位に対して５’および３’の両方の位置に見出されている。哺乳動物遺伝子から得ることができるいくつかのエンハンサー配列が、既知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトータンパク質、およびインスリン）。典型的には、しかしながら、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。当該技術分野で既知であるＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイスル初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強要素である。エンハンサーは、コード配列に対して５’または３’のいずれかのベクターに位置し得るが、典型的には、プロモーターから５’の部位に位置する。適切な天然または異種シグナル配列（リーダー配列またはシグナルペプチド）をコードする配列が、抗体の細胞外分泌を促進するために、発現ベクターに組み込まれ得る。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、抗体が産生される宿主細胞の種類に依存し、異種シグナル配列は、天然のシグナル配列に置き換えることができる。哺乳動物宿主細胞において機能性であるシグナルペプチドの例には、次のものが含まれる：米国特許第４，９６５，１９５号に記載されるインターロイキン－７（ＩＬ－７）のシグナル配列；Ｃｏｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，

１９８４，Ｎａｔｕｒｅ　３１２：７６８に記載されるインターロイキン－２受容体のシグナル配列；欧州特許第０３６７　５６６号に記載されるインターロイキン－４受容体シグナル配列；米国特許第号４，９６８，６０７号に記載されるＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチド；欧州特許第０　４６０　８４６号に記載されるＩＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチド。

【０１５５】

ベクターは、ベクターが宿主細胞ゲノムに組み込まれると発現を促進する、１つ以上の要素を含有し得る。例には、ＥＡＳＥ要素（Ａｌｄｒｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．２００３　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｐｒｏｇ．１９：１４３３－３８）およびマトリックス付着領域（ＭＡＲ）が挙げられる。ＭＡＲは、クロマチンの構造的組織化を媒介し、組み込まれたベクターを「位置」効果から防御し得る。したがって、ＭＡＲは、ベクターを使用して安定なトランスフェクタントを作製する際に特に有用である。多数の天然および合成のＭＡＲ含有核酸が、当該技術分野、例えば、米国特許第６，２３９，３２８号、同第７，３２６，５６７号、同第６，１７７，６１２号、同第６，３８８，０６６号、同第６，２４５，９７４号、同第７，２５９，０１０号、同第６，０３７，５２５号、同第７，４２２，８７４号、および同第７，１２９，０６２において既知である。

【０１５６】

本発明の発現ベクターは、市販入手可能なベクター等の開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、所望されるフランキング配列のすべてを含有し得るか、または含有しない場合もある。本明細書に記載されるフランキング配列のうちの１つ以上が、ベクター内に既に存在しない場合、それらを個別に得てベクターにライゲーションさせてもよい。フランキング配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【０１５７】

ベクターが構築され、軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の配列をコードする核酸分子が、ベクターの適切な部位に挿入された後、完成したベクターを、増幅および／またはポリペプチド発現のために好適な宿主細胞に挿入することができる。選択した宿主細胞への発現ベクターの形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈降、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性トランスフェクション、または他の既知の技法を含む、周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、部分的に、使用される宿主細胞の種類の機能であろう。これらの方法および他の好適な方法は、当業者に周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１（上記）に記載される。

【０１５８】

宿主細胞は、適切な条件下で培養されると、ヘテロ二量体抗体を合成し、これは、続いて培養培地から（宿主細胞がそれを培地中に分泌する場合）、またはそれを産生する宿主細胞から直接に（分泌されない場合）、回収することができる。適切な宿主細胞の選択は、所望される発現レベル、活性（グリコシル化またはリン酸化等）に望ましいかまたは必要であるポリペプチド修飾、ならびに生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さといった、種々の要因に依存することになる。宿主細胞は、真核生物または原核生物のものであり得る。

【０１５９】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該技術分野で周知であり、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手可能な不死化細胞株および本発明の組み換えポリペプチドを作製するのに使用することができる等が技術分野で既知の発現系に使用される任意の細胞系が含まれるが、これらに限定されない。一般には、宿主細胞を、所望されるヘテロ二量体抗体をコードするＤＮＡを含む組み換え発現ベクターを用いて形質転換する。用いられ得る宿主細胞の中には、原核生物、酵母、またはより高度な真核生物の細胞がある。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌またはバチルス属が含まれる。より高度な真核生物細

胞には、昆虫細胞および哺乳動物起源の樹立細胞株が含まれる。好適な哺乳動物宿主細胞株の例には、サル腎臓細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）（Ｇｌｕｚｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８１，Ｃｅｌｌ　２３：１７５）、Ｌ細胞、２９３細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはＶｅｇｇｉｅ　ＣＨＯおよび血清不含培地で成長させた関連細胞といったそれらの誘導体（Ｒａｓｍｕｓｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２８：３１）、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１０）細胞株、ならびにＭｃＭａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，ＥＭＢＯ　Ｊ．１０：２８２１に記載されるアフリカミドリザル腎臓細胞株ＣＶＩに由来するＣＶＩ／ＥＢＮＡ細胞株（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）、２９３、２９３　ＥＢＮＡ、もしくはＭＳＲ　２９３等のヒト胎児腎臓細胞、ヒト表皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、正常２倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から導出される細胞株、一次外植片、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫ、またはＪｕｒｋａｔ細胞が挙げられる。任意で、ＨｅｐＧ２／３Ｂ、ＫＢ、ＮＩＨ　３Ｔ３、またはＳ４９等の哺乳動物細胞株は、例えば、種々のシグナル伝達またはレポーターアッセイにおいてポリペプチドを使用することが望ましい場合、ポリペプチドの発現に使用されてもよい。あるいは、ポリペプチドを、より下等な真核生物、例えば酵母、または原核生物、例えば細菌において使用することもが可能である。好適な酵母には、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ、クリベロマイセス株、カンジダ、または異種ポリペプチドを発現することができる任意の酵母株が挙げられる、好適な細菌株には、大腸菌、バチルス・スブチリス、サルモネラ・チフィムリウム、または異種ポリペプチドを発現することができる任意の細菌株が挙げられる。

【０１６０】

抗体またはフラグメントが酵母または細菌中で作製される場合、機能的産物を得るために、例えば、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化によって、そこで産生される産物を修飾することが望ましい場合がある。このような共有結合は、既知の化学的または酵素的方法を使用して達成することができる。ポリペプチドはまた、１つ以上の昆虫発現ベクターにおいて、本発明の単離核酸と好適な制御配列とを動作可能に連結させ、昆虫発現系を用いることによって、産生され得る。バキュロウイルス／昆虫細胞の発現系のための材料および方法は、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．（ＭａｘＢａｃキット）からキットの形態で市販入手可能であり、このような方法は、Ｓｕｍｍｅｒｓ　ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ，Ｔｅｘａｓ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ　Ｓｔａｔｉｏｎ　Ｂｕｌｌｅｔｉｎ　Ｎｏ．１５５５（１９８７）およびＬｕｃｋｏｗ　ａｎｄ　Ｓｕｍｍｅｒｓ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：４７（１９８８）に記載されるように、当該技術分野で周知である。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示される核酸に由来するＲＮＡを使用して、抗体またはフラグメント等のポリペプチドを産生するために利用することができる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞の宿主とともに使用するのに適切なクローニングおよび発現ベクターは、Ｐｏｕｗｅｌｓら（Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８５）によって記載されている。好ましくは、少なくとも１つの発現制御配列に動作可能に連結される、本発明の単離核酸を含む宿主細胞は、「組み換え宿主細胞」である。

【０１６１】

ある特定の実施形態において、細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、所望される結合特性を有する抗原結合タンパク質を構成的に産生するかを判定することを通じて、選択され得る。別の実施形態において、それ自体の抗体を作製しないが、異種抗体を作製および分泌する能力のある、Ｂ細胞系統に由来する細胞株細胞が、選択され得る。

【０１６２】

治療方法

【０１６３】

本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、骨関連障害、例えば、異常な骨芽細胞または破骨細胞活性と関連する骨関連障害の治療または防止に有用である。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、軟骨形成不全、鎖骨頭蓋骨形成不全、内軟骨腫症、線維性骨異形成、ゴーシェ病、低リン酸血症性くる病、マルファン症候群、遺伝性多発性外骨腫（ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ ｅｘｏｔｏｓｅｓ）、神経線維腫症、骨形成不全症、大理石骨病、骨斑紋症、硬化性病変、偽関節、化膿性骨髄炎、歯周病、抗癲癇薬誘導型骨喪失、原発性および続発性副甲状腺機能亢進症、家族性副甲状腺機能亢進症、無重力状態誘発型骨喪失、男性の骨粗鬆症、閉経後骨喪失、骨関節炎、腎性骨ジストロフィー、骨の浸潤性障害、口腔骨喪失、顎の骨壊死、若年性ページェット病、メロレオストーシス、代謝性骨疾患、肥満細胞症、鎌状赤血球貧血／疾患、器官移植関連の骨喪失、腎臓移植関連の骨喪失、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、癲癇、若年性関節炎、サラセミア、ムコ多糖症、ファブリー病、ターナー症候群、ダウン症候群、クラインフェルター症候群、癩病、ペルテス病、青年期特発性側弯症、幼児期発症型多系統炎症性疾患、ウインチェスター症候群、メンケス病、ウィルソン病、虚血性骨疾患（レッグ・カルベ・ペルテス病および局所性移動性骨粗鬆症等）、貧血状態、ステロイドによって引き起こされる状態、グルココルチコイド誘導性骨喪失、ヘパリン誘導性骨喪失、骨髄障害、壊血病、栄養失調、カルシウム欠乏症、骨粗鬆症、骨減少症、アルコール中毒、慢性肝疾患、閉経後状態、慢性炎症性状態、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸炎、クローン病、希発月経、無月経、妊娠関連骨喪失、真性糖尿病、甲状腺機能亢進症、甲状腺障害、副甲状腺障害、クッシング病、先端巨大症、性腺機能低下症、不動化または活動停止、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、局所性骨粗鬆症、骨軟化症、関節置換術関連の骨喪失、ＨＩＶ関連の骨喪失、成長ホルモンの喪失と関連する骨喪失、嚢胞性線維症と関連する骨喪失、化学療法関連の骨喪失、腫瘍誘導性骨喪失、癌関連の骨喪失、ホルモン除去性骨喪失、多発性骨髄腫、薬物誘導性骨喪失、神経性食欲不振症、疾患関連の顔面骨喪失、疾患関連の頭蓋骨喪失（ｄｉｓｅａｓｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｃｒａｎｉａｌ ｂｏｎｅ ｌｏｓｓ）、疾患関連の顎骨喪失、疾患関連の頭蓋の骨喪失（ｄｉｓｅａｓｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｂｏｎｅ ｌｏｓｓ ｏｆ ｔｈｅ ｓｋｕｌｌ）、加齢関連の骨喪失、加齢関連の顔面骨喪失、加齢関連の頭蓋骨喪失（ｃｒａｎｉａｌ ｂｏｎｅ ｌｏｓｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ａｇｉｎｇ）、加齢関連の顎骨喪失、加齢関連の頭蓋の骨喪失（ｓｋｕｌｌ ｂｏｎｅ ｌｏｓｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ａｇｉｎｇ）、ならびに宇宙旅行と関連する骨喪失からなる群から選択される骨関連障害を患う対象に投与される。

【０１６４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、整形外科処置、歯科処置、関節置換術、骨グラフト、骨美容外科術、ならびに骨修復、例えば骨折治癒、偽関節治癒、偽関節治癒の遅延、および顔面再構築における成果を改善するのに有用である。１つ以上のヘテロ二量体抗体またはフラグメントを含む組成物は、処置、置換、グラフト、手術、または修復の前、最中、および／または後に投与され得る。

【０１６５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体は、骨の２つの分節間に間隙（例えば、骨の２つの分節間に少なくとも１ｍｍの間隙）を含む、任意の骨折の治療に有用である。いくつかまたはいずれかの実施形態において、間隙は、少なくとも約２ｍｍ、少なくとも約３ｍｍ、少なくとも約４ｍｍ、少なくとも約５ｍｍ、少なくとも約６ｍｍ、少なくとも約７ｍｍ、少なくとも約８ｍｍ、少なくとも約９ｍｍ、または少なくとも約１ｃｍ以上である。いくつかまたはいずれかの実施形態において、間隙は、約５ｍｍ～１ｃｍ、または最大１ｃｍである。「骨間隙異常」および「分節性骨格異常」という用語は、本明細書において同義に使用され、骨の２つの分節間の間隙（例えば、少なくとも１ｍｍの間隙）を指す。

【０１６６】

例示的な骨間隙異常には、粉砕骨折、分節性骨格異常、外科手術に起因する骨欠損、外

科手術により治療された骨欠損、および骨への外傷性傷害または疾患に起因する骨欠損（関節炎、腫瘍除去（切除）、または感染除去を含むがこれらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかまたはいずれかの実施形態において、骨間隙異常は、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫、線維肉腫、および脊索腫を含むがこれらに限定されない、骨癌に起因する骨の感染部分の除去または骨からの癌の除去によって生じる。いくつかまたはいずれかの実施形態において、骨間隙異常は、例えば、遺伝子異常に起因する発育性奇形である。

【０１６７】

いくつかまたはいずれかの実施形態において、骨間隙異常は、良性腫瘍を含有する骨の分節の除去によって生じる。例示的な良性腫瘍には、骨腫、類骨骨腫、骨芽細胞腫、内軟骨腫、軟骨粘液線維腫（ｃｈｏｎｒｄｏｍｙｘｏｉｄ　ｆｉｂｒｏｍａ）、動脈瘤様骨嚢胞、単房性骨嚢胞、骨の線維性骨異型性、および骨の巨細胞腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６８】

ヘテロ二量体抗体の投与は、骨間隙異常の治癒を強化または加速させ、それによって、骨間隙異常を「治療する」。骨治癒を「強化する」とは、スクレロスチン阻害剤を投与されていない（例えば、ヒト等の哺乳動物）対象（すなわち、対照対象）において経験されるレベルの骨治癒を超える（すなわち、それを上回る）レベルの骨治癒を媒介することを意味する。骨治癒は、例えば、骨橋形成状況、骨量の改善、骨折間隙内の骨ミネラル含量および密度の改善（すなわち、架橋骨の形成）、成熟骨カルス、骨強度の改善（場合によっては、医学的に許容されるレベルの骨堅強度を伴う）、または患者による罹患部位の使用の改善により示される。「改善」とは、測定されたパラメータの（所望される）増加または減少を意味する。増加は、全体的または部分的に、測定されたパラメータが、ベースラインレベル（例えば、骨間隙異常の前のレベル）、等が技術分野で使用される規範的データベースに提供される値、または反対側の機能レベルに戻ること（例えば、全体的または部分的に、例えば対側肢の機能的能力に戻ること）であり得る。いくつかの場合において、増加は、ベースラインを超える改善であり得る。所望される場合、１つ以上の用量のヘテロ二量体抗体を投与した患者において測定されたパラメータを、ヘテロ二量体抗体を投与していない骨折患者（場合によっては、年齢および性別が一致する）における同じパラメータと比較して、本明細書に記載される方法の有効性をさらに分析してもよい。

【０１６９】

骨欠損の部位における架橋骨の形成、骨ミネラル含量および骨密度、ならびに／または成熟骨カルスは、放射線撮影法（例えば、放射線撮影吸光光度法（ｒａｄｉｏｇｒａｐｈｉｃ　ａｂｓｏｒｐｔｏｍｅｔｒｙ））、単一および／または二重エネルギーＸ線吸光光度法、定量的コンピュータ断層撮影法（ＱＣＴ）、超音波検査法、放射線撮影法（例えば、放射線撮影吸光光度法）、ならびに磁気共鳴画像法を使用して測定され得る。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、欠損部位における架橋骨形成、骨カルスの形成、または骨密度（もしくは量）を、少なくとも約５％（約６％、約７％、約８％、または約９％）増加させるのに有効な用量および期間で投与され得る。いくつかの実施形態において、欠損部位における架橋骨形成、骨カルスの形成、または骨密度は、少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約１０％、少なくとも約１２％、少なくとも約１５％、少なくとも約１８％、少なくとも約２０％、または少なくとも約２２％）増加される。他の実施形態において、欠損部位における架橋骨形成、骨カルスの形成、または骨密度は、スクレロスチン阻害剤によって、少なくとも約２５％（例えば、少なくとも約２６％または少なくとも約２８％）増加される。さらに他の実施形態において、欠損部位における架橋骨形成、骨カルスの形成、または骨密度は、少なくとも約３０％（例えば、少なくとも約３２％、少なくとも約３５％、少なくとも約３８％、もしくは少なくとも約４０％）、または少なくとも約５０％（例えば、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、もしくは約１００％）増加される。架橋骨形成の増加または再構築は、ヘテロ二量体抗体の初回投与の１週間後、２週間後、３週間後、または４

週間後に判定され得る。あるいは、骨密度レベルは、治療期間が終わった後（例えば、治療期間が終わった１週間後、２週間後、３週間後、または４週間後）に判定されてもよい。一態様において、本方法は、ヘテロ二量体抗体を受容しない年齢および性別が一致する患者と比較して、所望されるレベルの骨形成、骨量、骨カルス、または骨密度の構築（例えば、本明細書に記載される骨形成、骨ミネラル密度、骨カルス、または骨量における任意の割合の増加）に必要とされる期間を低減させ、それによって、対象の回復期間を低減させる。例えば、一実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、欠損部位における骨密度または量の増加に必要とされる期間を、少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、または少なくとも約５０％）低減させる。

【０１７０】

ヘテロ二量体抗体は、有益な生物学的応答を達成するために、障害を有する患者を治癒するか、または骨関連障害の発症を完全に防ぐ必要はない。ヘテロ二量体抗体は、骨関連障害またはその症状を、全体的または部分的に防ぐという意味で、予防的に使用され得る。ヘテロ二量体抗体はまた、骨関連障害もしくはその症状を、全体的もしくは部分的に緩和するか、または骨関連障害もしくはその症状のさらなる進行を、全体的もしくは部分的に防ぐために、治療的に使用されてもよい。実際には、本発明の材料および方法は、骨ミネラル密度を増加させ、増加した骨ミネラル密度を長期間にわたり維持するのに特に有用である。

【０１７１】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体の１回以上の投与は、例えば、約１週間～約１８カ月（例えば、約１カ月～約１２カ月、約１カ月～約９カ月、または約１カ月～約６カ月、または約１カ月～約３カ月）の治療期間にわたり実行される。いくつかの実施形態において、対象に、例えば、約１カ月～約１２カ月（５２週間）（例えば、約２カ月、約３カ月、約４カ月、約５カ月、約６カ月、約７カ月、約８カ月、約９カ月、約１０カ月、または約１１カ月）の治療期間にわたり、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体の１回以上の用量が投与される。いくつかの実施形態において、対象に、骨ミネラル密度を維持するためにヘテロ二量体抗体の１回以上の用量が投与される。本明細書に使用される「骨ミネラル密度を維持する」という用語は、ヘテロ二量体抗体の初回投与により得られた増加した骨ミネラル密度が、約６カ月、約９カ月、約１年、約１８カ月、約２年、またはそれ患者の生涯にわたって）、約１％～約５％を上回って低下することがないことを意味する。患者は、骨密度を増加させるためおよび骨密度を維持するための、交互の治療期間を必要とし得ることが理解されるであろう。

【０１７２】

加えて、具体的な対象のために選択された治療レジメンに応じて、複数回用量のヘテロ二量体抗体を投与するか、または用量投与の間隔を開けることが有利である場合がある。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントは、１年（１２カ月、５２週）またはそれ未満（例えば、９カ月未満、６カ月未満、もしくは３カ月未満）の期間にわたって、周期的に投与される。この点に関して、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントは、約３日、または約７日、または２週間、または３週間、または４週間、または５週間、または６週間、または７週間、または８週間、または９週間、または１０週間、または１１週間、または１２週間、または１３週間、または１４週間、または１５週間、または１６週間、または１７週間、または１８週間、または１９週間、または２０週間、または２１週間、または２２週間、または２３週間、または６カ月、または１２カ月に１回、ヒトに投与される。

【０１７３】

いくつかの実施形態において、治療期間は、骨間隙異常が検出された直後、例えば、異常の３０分以内、１時間以内、２時間以内、６時間以内、１２時間以内、または２４時間以内に開始する。他の実施形態において、本阻害剤は、骨欠損の１日以内、骨欠損の３日以内、骨欠損の５日以内、骨欠損の７日以内、または骨欠損の２週間以内に投与され、こ

こで、スクレロスチン結合剤は、骨欠損後少なくとも１１週間（例えば、１１週間、１２週間、１３週間、１４週間、１５週間、１６週間、１７週間、１８週間　１９週間、２０週間、２１週間、２２週間、２３週間、２４週間、２５週間、２６週間、２７週間　２８週間、２９週間、３０週間、３１週間以上（例えば、８ヶ月、９ヶ月、１０ヶ月、１１ヶ月、１年、１８ヶ月以上））の期間にわたり、投与される。

【０１７４】

いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントの１回以上の用量は、骨ミネラル密度の減少と関連する骨障害を治療するのに有効な量および時間で投与される。種々の実施形態において、約５０ミリグラム～約１，０００ミリグラムのヘテロ二量体抗体を含む１回以上の用量が、１週間毎に対象（例えば、ヒト対象）にと投与される。例えば、ヘテロ二量体抗体の用量は、少なくとも約５ｍｇ、１５ｍｇ、２５ｍｇ、５０ｍｇ、約６０ｍｇ、約７０ｍｇ、約８０ｍｇ、約９０ｍｇ、約１００ｍｇ、約１２０ｍｇ、約１５０ｍｇ、約２００ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２５０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３５０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４５０ｍｇ、約５００ｍｇ、約５５０ｍｇ、約６００ｍｇ、約６５０ｍｇ、約７００ｍｇ、約７５０ｍｇ、約８００ｍｇ、約８５０ｍｇ、約９００ｍｇ、約９５０ｍｇ、または最大約１，０００ｍｇのヘテロ二量体抗体を含み得る。これらの終端点中のありとあらゆる範囲、例えば、約５０ｍｇ～約８０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約２７０ｍｇ、約７５ｍｇ～約１００ｍｇ、約１００ｍｇ～約１５０ｍｇ、約１４０ｍｇ～約２１０ｍｇ、または約１５０ｍｇ～約２００ｍｇ、または約１８０ｍｇ～約２７０ｍｇ、または約２８０～約４１０ｍｇも企図される。用量は、１週間に複数回（例えば、１週間に２回もしくは３回）、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、または４週間に１回といった、任意の間隔で投与される。いくつかまたはいずれかの実施形態において、約１２０ｍｇ～約２１０ｍｇの範囲の用量のヘテロ二量体抗体が、１週間に２回投与される。いくつかまたはいずれかの実施形態において、約１４０ｍｇの用量のヘテロ二量体抗体が、１週間に２回投与される。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体の１回以上の用量は、体重１ｋｇ当たり約０．１～約５０ミリグラム（例えば、約５～約５０ミリグラム）、または約１～約１００ミリグラム（ｍｇ／ｋｇ）のヘテロ二量体抗体を含み得る。例えば、ヘテロ二量体抗体の用量は、少なくとも約０．１ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ、約２０ｍｇ／ｋｇ、約２５ｍｇ／ｋｇ、約２６ｍｇ／ｋｇ、約２７ｍｇ／ｋｇ、約２８ｍｇ／ｋｇ、約２９ｍｇ／ｋｇ、約３０ｍｇ／ｋｇ、約３１ｍｇ／ｋｇ、約３２ｍｇ／ｋｇ、約３３ｍｇ／ｋｇ、約３４ｍｇ／ｋｇ、約３５ｍｇ／ｋｇ、約３６ｍｇ／ｋｇ、約３７ｍｇ／ｋｇ、約３８ｍｇ／ｋｇ、約３９ｍｇ／ｋｇ、約４０ｍｇ／ｋｇ、約４１ｍｇ／ｋｇ、約４２ｍｇ／ｋｇ、約４３ｍｇ／ｋｇ、約４４ｍｇ／ｋｇ、約４５ｍｇ／ｋｇ、約４６ｍｇ／ｋｇ、約４７ｍｇ／ｋｇ、約４８ｍｇ／ｋｇ、または約４９ｍｇ／ｋｇ、または約５０ｍｇ／ｋｇ、約５５ｍｇ／ｋｇ、約６０ｍｇ／ｋｇ、約６５ｍｇ／ｋｇ、約７０ｍｇ／ｋｇ、約７５ｍｇ／ｋｇ、約８０ｍｇ／ｋｇ、約８５ｍｇ／ｋｇ、約９０ｍｇ／ｋｇ、約９５ｍｇ／ｋｇ、または最大約１００ｍｇ／ｋｇを含み得る。これらの終端点中のありとあらゆる範囲、例えば、約１ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約８ｍｇ／ｋｂ、約３ｍｇ／ｋｇ～約８ｍｇ．ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約４０ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇ、または約５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇもまた、企図される。

【０１７６】

監視療法

【０１７７】

骨ミネラル含量または骨密度におけるヘテロ二量体抗体媒介性増加は、単一または二重Ｘ線吸光光度法、超音波、コンピュータ断層撮像法、放射線撮影法、および自機共鳴画像法を使用して、測定され得る。骨質量は、体重から計算されるか、または他の方法を用いて計算され得る（Ｇｕｉｎｎｅｓｓ－Ｈｅｙ，Ｍｅｔａｂ．Ｂｏｎｅ Ｄｉｓ．Ｒｅｌａｔ．Ｒｅｓ．，５：１７７－１８１（１９８４）を参照されたい）。例えば、骨粗鬆症および骨減少症といったヒト疾患の症状を模倣する骨喪失、骨再吸収、骨形成、骨強度、または骨ミネラル化のパラメータに対する、薬学的組成物および方法の効果を試験するために、動物モデルが当該技術分野において使用される。このようなモデルの例には、卵巣切除ラットモデルが挙げられる（Ｋａｌｕ，Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ，１５：１７５－１９２（１９９１）、Ｆｒｏｓｔ ａｎｄ Ｊｅｅ，Ｂｏｎｅ ａｎｄ Ｍｉｎｅｒａｌ，１８：２２７－２３６（１９９２）、およびＪｅｅ ａｎｄ Ｙａｏ，Ｊ．Ｍｕｓｃｕｌｏｓｋｅｌ．Ｎｅｕｒｏｎ．Ｉｎｔｅｒａｃｔ．，１：１９３－２０７（２００１））。本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体活性を測定するための方法もまた、他のスクレロスチン阻害剤の有効性を判定するために使用され得る。

【０１７８】

ヒトにおいては、骨ミネラル密度は、例えば、臀部および脊椎の二重ｘ線吸光光度法（ＤＸＡ）を用いて臨床的に判定され得る。他の技法には、定量的コンピュータ断層撮影法（ＱＣＴ）、超音波検査法、単一エネルギーｘ線吸光光度法（ＳＸＡ）、および放射線吸光光度法が挙げられる。測定に一般的な中心骨格部位には、脊椎および臀部が挙げられ、末梢部位には、前腕、指、手首、および足首が挙げられる。超音波検査法を除いて、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎは、ＢＭＤ技法が、典型的に、ｘ線の使用を伴い、放射線の減衰が、放射線経路にある組織の厚さおよび組成に依存するという原理に基づくことを記す。すべての技法は、結果を規範的データベースと比較することを伴う。

【０１７９】

あるいは、１つ以上のスクレロスチン結合剤に対する生理学的応答は、骨マーカーレベルを監視することによって計測され得る。骨マーカーは骨再構築プロセス中に作出される生成物であり、骨、骨芽細胞、および／または破骨細胞により放出される。骨再吸収および／または骨形成「マーカー」レベルにおける変動は、骨再構築／構築における変化を意味する。Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｏｓｔｅｏｐｏｒｏｓｉｓ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ（ＩＯＦ）は、骨密度治療を監視するために骨マーカーを使用することを推奨する（例えば、Ｄｅｌｍａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｏｓｔｅｏｐｏｒｏｓ Ｉｎｔ．，Ｓｕｐｐｌ．６：Ｓ２－１７（２０００）を参照されたく、これは、参照により本明細書に組み込まれる）。骨再吸収（または破骨細胞活性）を示すマーカーには、例えば、Ｃ－テロペプチド（例えば、１型コラーゲンのＣ末端テロペプチド（ＣＴＸ）または血清架橋型Ｃ－テロペプチド）、Ｎ－テロペプチド（１型コラーゲンのＮ末端テロペプチド（ＮＴＸ））、デオキシピリジノリン（ＤＰＤ）、ピリジノリン、尿ヒドロキシプロリン、ガラクトシルヒドロキシリジン、および酒石酸塩耐性酸性ホスファターゼ（例えば、血清酒石酸塩耐性酸性ホスファターゼアイソフォーム５ｂ）が挙げられる。骨形成／ミネラル化マーカーには、骨特異的アルカリホスファターゼ（ＢＳＡＰ）、Ｉ型プロコラーゲンのＮおよびＣ末端伸長部分から放出されるペプチド（Ｐ１ＮＰ、ＰＩＣＰ）、ならびにオステオカルシン（ＯｓｔＣａ）が挙げられるが、これらに限定されない。尿及び血液といった臨床試料中のマーカーを検出および定量するためのいくつかのキットが市販入手可能である。

【０１８０】

組み合わせ療法

【０１８１】

同じ病原体または生化学経路または生物学的プロセスを標的とする２つ以上の薬剤を組み合わせることによる病理学処置は、しばしば、各薬剤の治療関連用量を単独で使用することと比較して、より優れた有効性および副作用の減少をもたらす。いくつかの場合において、薬物の組み合わせの有効性は、相加的である（その組み合わせの有効性は、各薬物

単独の効果の合計にほぼ等しい）が、他の場合においては、その効果は相乗的である（その組み合わせの有効性は、単独で与えられる各薬物の効果の合計を上回る）。本明細書に使用される際、「組み合わせ療法」という用語は、２つ以上の薬剤が、同時の様式で、例えば、同時に投与されるか、または薬剤のうちの１つが先に投与された後に、第２の薬剤が逐次的に投与されることを意味する。

【０１８２】

いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、減少した骨ミネラル密度の治療のための標準的な治療薬とともに投与される（すなわち、ヘテロ二量体抗体および標準治療薬が、同じ治療計画の一部である）。本明細書に使用される際、「標準治療」という用語は、ある種類の疾病であると診断されたある特定の種類の患者のための、臨床医によって一般に許容される治療を指す。いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体は、骨ミネラル密度の減少または骨損傷の治療に有用な第２の骨強化剤とともに投与される。いくつかの実施形態において、骨強化剤は、骨吸収抑制剤、骨形成剤（すなわち、同化剤）、エストロゲン受容体調節剤（ラロキシフェン、バゼドキシフェン、およびラソフォキシフェンを含むがこれらに限定されない）、ならびに破骨細胞に対して阻害効果を有する薬物からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第２の骨強化剤は、ビスホスホネート（アレンドロン酸ナトリウム（ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標））、リセドロン酸、イバンドロン酸ナトリウム（ＢＯＮＩＶＡ（登録商標））、およびゾレドロン酸（ＲＥＣＬＡＳＴ（登録商標））を含むがこれらに限定されない）；エストロゲンまたはエストロゲン類似体；抗ＲＡＮＫリガンド（ＲＡＮＫＬ）阻害剤、例えば、抗ＲＡＮＫＬ抗体（例えば、ＰＲＯＬＩＡ（登録商標））；ビタミンＤ、またはビタミンＤ誘導体もしくはその模倣体；カルシウム源、カテプシン－Ｋ（ｃａｔ－Ｋ）阻害剤（例えば、オダナカチブ）、チボロン、カルシトニン、またはカルチトリオール；ならびにホルモン置換薬からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第２の骨強化剤には、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）またはそのペプチドフラグメント、ＰＴＨ関連タンパク質（ＰＴＨｒｐ）、骨形成タンパク質、オステオゲニン（ｏｓｔｅｏｇｅｎｉｎ）、ＮａＦ、ＰＧＥ２アゴニスト、スタチン、ラネリック酸ストロンチウム、スクレロスチン阻害剤（例えば、例として米国特許第７，５９２，４２９号または同第７，８７２，１０６号に記載される抗スクレロスチン抗体）、ならびに抗ＤＫＫ１抗体もしくは阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第２の骨強化剤は、Ｆｏｒｔｅｏ（登録商標）（テリパラチド）、Ｐｒｅｏｔａｃｔ（登録商標）、またはＰｒｏｔｅｌｏｓ（登録商標）である。いくつかの実施形態において、第２の骨強化剤は、骨形成タンパク質（例えば、ＢＭＰ－１、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－３、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、ＢＭＰ－８、ＢＭＰ－９、ＢＭＰ－１０、ＢＭＰ－１１、ＢＭＰ－１２、ＢＭＰ－１３、ＢＭＰ－１４、および／またはＢＭＰ－１５）を含む。

【０１８３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体を用いる組み合わせ療法は、数分から数週間、さらには数ヶ月の範囲に及ぶ間隔で、追加の治療薬（複数可）（例えば、第２の骨強化剤）の投与に先行するか、またはそれの後に行われ得る。例えば、別個の治療法が、互いの約２４時間以内、例えば、互いの約６～１２時間以内、または互いの約１～２時間以内、または互いの約１０～３０分以内に、施され得る。いくつかの状況において、治療期間を著しく延長することが望ましい場合があり、それぞれの異なる治療法の施術の間に、数日間（２、３、４、５、６、または７日間）から数週間（１、２、３、４、５、６、７、または８週間）が経過する。一方または両方の薬剤／療法による治療を繰り返すことが、明確に企図される。

【０１８４】

治療レジメンの維持

【０１８５】

第２の骨強化剤および／または本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体を、例えば、骨ミネラル密度の喪失を防止または遅延させるための維持レジメンにおいて使用することも

また、企図される。この点に関して、本明細書に記載される方法または使用は、場合によっては、ヘテロ二量体抗体での治療期間が終了した後、約１週間～約５年間の維持期間にわたり、骨ミネラル密度を維持するために有効な１つ以上の量の第２の骨強化剤を投与することを含む。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法または使用は、約少なくとも約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、３カ月、１３週間、１４週間、１５週間、１６週間、４カ月、１７週間、１８週間、１９週間、２０週間、５カ月、２１週間、２２週間、２３週間、２４週間、６カ月、２５週間、２６週間、２７週間、２８週間、７カ月、２９週間、３０週間、３１週間、またはそれ以上（例えば、８カ月、９カ月、１０カ月、１１カ月、１年間、１５カ月、１８カ月、２年間、３年間、４年間、５年間、またはそれ以上（例えば、対象の生涯にわたる）の維持期間にわたって、対象に第２の骨強化剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、維持期間は、約６～１２週間である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約４～１２週間、または約１～３カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約１２～２０週間、または約３～５カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約２０～３２週間、または約５～８カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約２４～３６週間、または約６～９カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約１年間、約２年間、約３年間、約４年間、約５年間、またはそれ以上である。骨ミネラル密度を「維持すること」は、ヘテロ二量体抗体を受容した対象において経験される類似のレベルの骨ミネラル密度パラメータを維持することを含む。

【０１８６】

同様に、本明細書に記載される方法または使用は、場合によっては、治療期間が終了した後に、少なくとも約少なくとも約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、３カ月、１３週間、１４週間、１５週間、１６週間、４カ月、１７週間、１８週間、１９週間、２０週間、５カ月、２１週間、２２週間、２３週間、２４週間、６カ月、１年間、２年間、３年間、４年間、５年間、またはそれ以上（例えば、対象の生涯にわたる）維持期間の間、骨ミネラル密度を維持するのに有効な１つ以上の量のヘテロ二量体抗体を続いて投与することを含む。いくつかの実施形態において、維持期間は、約６～１２週間である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約４～１２週間、または約１～３カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約１２～２０週間、または約３～５カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約２０～３２週間、または約５～８カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約２４～３６週間、または約６～９カ月である。いくつかの実施形態において、維持期間は、約１年間、約２年間、約３年間、約４年間、約５年間、またはそれ以上である。

【０１８７】

薬学的組成物

【０１８８】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質のうちの１つまたは複数の治療有効量を、薬学的に有効な希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤、および／またはアジュバントとともに含む、薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、液体、凍結、および凍結乾燥組成物を含むが、これらに限定されない。

【０１８９】

好ましくは、製剤材料は、用いられる投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。特定の実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントの治療有効量を含む薬学的組成物が提供される。

【０１９０】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、例えば、組成物のｐＨ、オスモル濃度、粘度、透明度、色、等張性、臭い、滅菌性、分解もしくは放出速度、吸収、または浸透を修正、維持、または保存するための製剤材料を含有し得る。このような実施形態におい

て、好適な製剤材料には、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、プロリン、もしくはリジン等）；抗菌剤；酸化防止剤（アスコルビン酸、硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸塩、リン酸塩、もしくは他の有機酸等）；増量剤（マンニトールもしくはグリシン等）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリン、もしくはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン）；充填剤；単糖類；二糖類；および他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリン等）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等）；着色剤、香味剤、および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウム等）；保存剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、もしくは過酸化水素等）；溶媒（グリセリン、プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコール等）；糖アルコール（マンニトールもしくはソルビトール等）；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニック、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０等のポリソルベート、ポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル（ｔｙｌｏｘａｐａｌ）等）；安定性強化剤（スクロースもしくはソルビトール等）；等張性強化剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、マンニトール　ソルビトール等）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，１８”　Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｒｍｏ，ｅｄ．），１９９０，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙを参照されたい。

【０１９１】

いくつかの実施形態において、最適な薬学的組成は、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望される投薬量に応じて、当業者によって決定されるであろう。例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（上記）を参照されたい。ある特定の実施形態において、このような組成は、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントの物理的状態、安定性、インビボ放出速度、およびインビボクリアランス速度に影響を及ぼし得る。ある特定の実施形態において、薬学的組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、水溶性または非水溶性のいずれかの性質であり得る。例えば、好適なビヒクルまたは担体は、非経口投与用組成物に一般的な他の材料が補充されている可能性のある、注射用水、生理食塩水、または人工脳脊髄液であり得る。中性緩衝食塩水または血清アルブミンと混合した食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。特定の実施形態において、薬学的組成物は、約ｐＨ７．０～８．５のＴｒｉｓ緩衝液または約ｐＨ４．０～５．５の酢酸緩衝液を含み、ソルビトールまたはその好適な代替物をさらに含み得る。本発明のある特定の実施形態において、組成物は、所望される程度の純度を有する選択された組成物と、任意選択の製剤化剤（ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（上記））を混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保管用に調整され得る。さらに、いくつかの実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントは、スクロース等の適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化され得る。

【０１９２】

本発明の薬学的組成物は、非経口送達に選択され得る。あるいは、組成物は、吸入、または経口等の消化管を通じた送達に選択され得る。このような薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の技能の範囲内である。製剤成分は、好ましくは投与の部位に許容される濃度で存在する。ある特定の実施形態において、生理学的ｐＨまたはわずかに低いｐＨ、典型的には約５～約８のｐＨ範囲内に組成物を維持するために、緩衝液が使用される。

【０１９３】

非経口投与が企図される場合、本発明に使用される治療的組成物は、薬学的に許容され

るビヒクル中に所望のヘテロ二量体抗体またはフラグメントを含む、発熱物質不含の非経口に許容される水溶液の形態で提供される。非経口注射に特に好適なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントが、適切に保存される滅菌の等張溶液としてその中に製剤化される。ある特定の実施形態において、調製は、デポー注射によって送達され得る製品の制御または持続放出を提供し得る薬剤、例えば、注射可能ミクロスフェア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸もしくはポリグリコール酸等）、ビーズ、またはリポソームを用いた、所望される分子の製剤化を伴う。ある特定の実施形態において、循環時の持続期間を増加させる効果を有するヒアルロン酸もまた使用され得る。ある特定の実施形態において、埋め込み可能な薬物送達デバイスを使用して、所望のヘテロ二量体抗体またはフラグメントを導入してもよい。

【０１９４】

本発明の薬学的組成物は、吸入用に製剤化され得る。これらの実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントは、有利なことに、乾燥した吸入可能粉末として製剤化される。特定の実施形態において、ヘテロ二量体抗体またはフラグメント吸入溶液はまた、エアロゾル送達のために推進剤とともに製剤化され得る。ある特定の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺内投与およびそのための製剤化方法は、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９４／００１８７５号にさらに記載されており、これは、参照により組み込まれ、化学修飾タンパク質の肺内投与について説明している。

【０１９５】

製剤が経口投与され得ることもまた企図される。この様式で投与されるヘテロ二量体抗体またはフラグメントは、錠剤およびカプセルといった固形剤形の調合に慣習的に使用される担体ありまたはなしで製剤化され得る。ある特定の実施形態において、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され全身循環前の分解が最小化される胃腸管内の時点で、製剤の活性な部分が放出されるように設計され得る。ヘテロ二量体抗体またはフラグメントの吸収を促進するために追加の薬剤が含まれてもよい。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた用いられ得る。

【０１９６】

持続または制御送達製剤中の抗原結合タンパク質を含む製剤を含む、さらなる薬学的組成物が、当業者には明らかであろう。リポソーム担体、生体内分解性微小粒子もしくは多孔質ビーズ、およびデポー注射といった、種々の他の持続または制御送達手段を製剤化するための技法もまた、当業者に既知である。例えば、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９号を参照されたく、これは、参照により組み込まれ、薬学的組成物の送達のための多孔質ポリマー微小粒子の制御放出について説明している。持続放出調製物は、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態にある半透過性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出マトリックスには、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第３７７３９１９号および欧州特許出願公開第ＥＰ０５８４８１号に開示され、これらのそれぞれは、参照により組み込まれる）、Ｌ－グルタミン酸およびγエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２：５４７－５５６）、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７およびＬａｎｇｅｒ，１９８２，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８－１０５）、エチレン酢酸ビニル（Ｌａｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８１（上記））、またはポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第ＥＰ１３３９８８号）が含まれ得る。持続放出組成物はまた、当該技術分野で既知のいくつかの方法のうちのいずれかによって調製され得るリポソームが含まれ得る。例えば、Ｅｐｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８２：３６８８－３６９２、欧州特許出願公開第ＥＰ０３６６７６号、同第ＥＰ０８８０４６号、および同第ＥＰ１４３９４９号を参照されたく、これらは参照により組み込まれる。

【０１９７】

インビボ投与に使用される薬学的組成物は、典型的に、滅菌調製物として提供される。

滅菌は、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行われ得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液の状態で保管され得る。非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、静注用バッグまたは皮下注射針で穿刺可能なストッパーを有するバイアルに入れられる。

【０１９８】

本発明の態様は、薬学的組成物として使用可能な自己緩衝ヘテロ二量体抗体またはフラグメント製剤を含み得、これは、国際特許公開第ＷＯ ２００６／１３８１８１Ａ２号（ＰＣＴ／ＵＳ２００６／０２２５９９）に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１９９】

上述のように、ある特定の実施形態は、ヘテロ二量体抗体またはフラグメントに加えて、この節および本明細書の他の箇所に例示的に記載されるものといった１つ以上の賦形剤を含む、ヘテロ二量体抗体またはフラグメント組成物、特に薬学的ヘテロ二量体抗体またはフラグメント組成物を提供する。賦形剤は、製剤の物理的、化学的、もしくは生物学的特性の調節、例えば粘度の調節、ならびに／またはこのような製剤の有効性を改善するおよび／もしくは安定化させるためのプロセス、ならびに例えば、製造、輸送、保管、使用前調製、投与の際、およびその後に生じる応力に起因する分解および損傷に対するプロセスといった、広範な目的で、この点に関して本発明で使用され得る。

【０２００】

タンパク質の安定化ならびにこの点において有用な製剤材料および方法に関して、Ａｒａｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，”Ｓｏｌｖｅｎｔ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｉｎ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ，”Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．８（３）：２８５－９１（１９９１）、Ｋｅｎｄｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，”Ｐｈｙｓｉｃａｌ ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｉｎ ａｑｕｅｏｕｓ ｓｏｌｕｔｉｏｎ，” ｉｎ：ＲＡＴＩＯＮＡＬ ＤＥＳＩＧＮ ＯＦ ＳＴＡＢＬＥ ＰＲＯＴＥＩＮ ＦＯＲＭＵＬＡＴＩＯＮＳ：ＴＨＥＯＲＹ ＡＮＤ ＰＲＡＣＴＩＣＥ，Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ ａｎｄ Ｍａｎｎｉｎｇ，ｅｄｓ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．１３：６１－８４（２００２）、およびＲａｎｄｏｌｐｈ ｅｔ ａｌ．，”Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ－ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ，” Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１３：１５９－７５（２００２）といった、種々の解説が利用可能であり、これらのそれぞれは、参照によりその全体、特に、本発明による自己緩衝タンパク質製剤についてのその賦形剤およびプロセス、特に獣医学および／またはヒト医療用途のタンパク質薬学的生成物およびプロセスに関する部分が、本明細書に組み込まれる。

【０２０１】

例えば、製剤のイオン強度および／もしくは等張性の調節、ならびに／または本発明による組成物のタンパク質もしくは他の成分の可溶性および／もしくは安定性の改善のために、塩が、本発明のある特定の実施形態に従って使用されてもよい。

【０２０２】

周知のように、イオンは、タンパク質の表面上の荷電残基に結合し、タンパク質の荷電および極性基を遮蔽し、それらの静電相互作用、引力相互作用、および反発相互作用の強度を低減させることによって、タンパク質の天然の状態を安定化させ得る。イオンはまた、特に、タンパク質の変性ペプチド結合（－－ＣＯＮＨ）に結合することによって、タンパク質の変性状態を安定化させ得る。さらに、タンパク質の荷電および極性基とのイオン相互作用はまた、分子間静電相互作用を低減させ、それによって、タンパク質の凝集および不溶性を防止または低減させ得る。

【０２０３】

イオン種は、タンパク質への作用が著しく異なる。本発明に従って薬学的組成物を製剤化する際に使用することができるイオンおよびそれらのタンパク質に対する作用に関する

いくつかの分類別ランク付けが開発されている。一例は、ホフマイスターシリーズであり、これは、イオンおよび極性非イオン溶質を、溶液中のタンパク質の構造的安定性に対するそれらの作用によってランク付けする。安定化する溶質は、「コスモトロピック」と称される。不安定化する溶質は、「カオトロピック」と称される。コスモトロープは、一般に、高濃度（例えば、１モルを超える硫酸アンモニウム）で使用され、タンパク質を溶液から沈殿させる（「塩析」）。カオトロープは、一般に、タンパク質を変性および／または可溶化させるために使用される（「塩溶」）。「塩溶」および「塩析」に対するイオンの相対的有効性が、それらのホフマイスターシリーズでの位置付けを定義する。

【０２０４】

遊離アミノ酸は、本発明の種々の実施形態によるヘテロ二量体抗体またはフラグメントの製剤化において、増量剤、安定化剤、および酸化防止剤、ならびに他の標準的な用途として使用され得る。リジン、プロリン、セリン、およびアラニンは、製剤中のタンパク質を安定化するために使用され得る。グリシンは、正しいケーキ構造および特性を確実にするための凍結乾燥において有用である。アルギニンは、液体および凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質凝集を阻害するのに有用であり得る。メチオニンは、酸化防止剤として有用である。

【０２０５】

ポリオールには、糖、例えば、マンニトール、スクロース、およびソルビトール、ならびに多価アルコール、例えば、グリセロールおよびプロピレングリコール等、ならびに本明細書における考察の目的で、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）および関連物質が含まれる。ポリオールは、コスモトロピックである。それらは、液体および凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質を物理的および化学的分解プロセスから保護するために有用な安定化剤である。ポリオールは、製剤の等張性を調節するのに有用である。

【０２０６】

本発明の選択的な実施形態において有用なポリオールの中には、マンニトールがあり、これは、凍結乾燥製剤においてケーキの構造的安定性を確実にするために広く使用される。それは、ケーキの構造的安定性を確実にする。それは、一般に、凍結乾燥保護剤（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）、例えば、スクロースとともに使用される。ソルビトールおよびスクロースは、等張性を調節するため、ならびに製造プロセス中のバルクの輸送または調製中に凍結－解凍の応力に対して保護するための安定剤として、好ましい薬剤に含まれる。グルコースおよびラクトース等の還元糖（アルデヒドまたはケトン基を含有しない）は、表面リジンおよびアルギニン残基を糖化させ得る。したがって、それらは、一般に、本発明による使用に好ましいポリオールには含まれない。加えて、このような反応種を形成する糖、例えば、スクロース（酸性条件下でフルクトースおよびグルコースに加水分解され、結果として糖化をもたらす）もまた、この点に関して、本発明の好ましいポリオールには含まれない。ＰＥＧは、タンパク質を安定化させるため、および凍結保護剤として、有用であり、この点に関して本発明において使用され得る。

【０２０７】

ヘテロ二量体抗体またはフラグメント製剤の実施形態は、さらに、界面活性剤を含む。タンパク質分子は、表面上の吸収、ならびに変性およびその結果、気体－液体、固体－液体、および液体－液体の界面での凝集を受けやすい可能性がある。これらの作用は、一般に、タンパク質濃度と反比例する。これらの有害な相互作用は、一般に、タンパク質濃度に反比例し、典型的に、生成物の輸送および取り扱いの際に発生する物理的振動によって悪化する。

【０２０８】

界面活性剤は、表面吸収を防止、最小化、または低減させるために日常的に使用される。この点に関して本発明において有用な界面活性剤には、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ソルビタンポリエトキシレートの他の脂肪酸エステル、およびポリオキサマー１８８が挙げられる。

【０２０９】

界面活性剤はまた、タンパク質の構造的安定性を制御するために広く使用される。この点に関して界面活性剤の使用は、任意の所与の界面活性剤が、典型的には、一部のタンパク質を安定化させ、その他のものを不安定化させるため、タンパク質特異的である。

【０２１０】

ポリソルベートは、酸化分解を受けやすく、タンパク質残基側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含有して供給されることが多い。その結果、ポリソルベートは、注意深く使用する必要があり、使用する際、それらの最低有効濃度で用いなければならない。この点に関して、ポリソルベートは、賦形剤がそれらの最低有効濃度で使用されるべきであるという一般規則を例示する。

【０２１１】

ヘテロ二量体抗体またはフラグメント製剤の実施形態は、１つ以上の酸化防止剤をさらに含む。ある程度、タンパク質の有害な酸化は、適正なレベルの周囲酸素および温度を維持すること、ならびに光への曝露を回避することによって、薬学的製剤において防止することができる。酸化防止賦形剤も同様に、タンパク質の酸化分解を防止するために使用することができる。この点で有用な酸化防止剤の中には、還元剤、酸素／フリーラジカルスカベンジャー、およびキレート剤がある。本発明による治療的タンパク質製剤で使用するための酸化防止剤は、好ましくは、水溶性であり、生成物の保管期間を通じてそれらの活性を維持する。ＥＤＴＡは、この点において、本発明による好ましい酸化防止剤である。

【０２１２】

本発明による製剤は、タンパク質補助因子であり、タンパク質配位化合物を形成するために必要な金属イオン、例えば、ある特定のインスリン懸濁液を形成するために必要な亜鉛を含み得る。金属イオンはまた、タンパク質を分解する一部のプロセスを阻害し得る。しかしながら、金属イオンはまた、タンパク質を分解する物理的および化学的プロセスを触媒する。

【０２１３】

マグネシウムイオン（１０～１２０ｍＭ）は、アスパラギン酸からイソアスパラギン酸への異性化を阻害するために使用され得る。$Ca^{+2}$イオン（最大１００ｍＭ）は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を増加させ得る。$Mg^{+2}$、$Mn^{+2}$、および$Zn^{+2}$は、しかしながら、ｒｈＤＮａｓｅを不安定化させ得る。同様に、$Ca^{+2}$および$Sr^{+2}$は、第ＶＩＩＩ因子を安定化させ得、これは、$Mg^{+2}$、$Mn^{+2}$、および$Zn^{+2}$によって不安定化され得、$Cu^{+2}$および$Fe^{+2}$、ならびにその凝集体は、Ａｌ＋３イオンによって増加され得る。

【０２１４】

ヘテロ二量体抗体またはフラグメント製剤の実施形態は、１つ以上の保存剤をさらに含む。保存剤は、同じ容器からの１つを上回る抽出物を伴う、複数用量の非経口製剤を開発する際に必要である。それらの主要な機能は、微生物の成長を阻害し、薬物製品の保管期間または試用期間を通じて製品の滅菌性を確保することである。広く使用される保存剤には、ベンジルアルコール、フェノール、およびｍ－クレゾールが挙げられる。保存剤は、小分子非経口剤では長い使用歴があるが、保存剤を含むタンパク質製剤は、困難であり得る。保存剤は、ほぼ必ず、タンパク質に対して不安定化作用（凝集化）を有し、これが、複数用量のタンパク質製剤でのそれらの使用を制限する主要な要因となっている。現在までに、ほとんどのタンパク質薬が、単回使用のみで製剤化されている。しかしながら、複数用量の製剤が可能となれば、患者の利便性を可能にすること、および市場性の増加というさらなる利点を有する。よい例は、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）のものであり、保存製剤の開発が、より便利な複数回使用の注射ペンの提示をもたらした。ｈＧＨの保存製剤を含有する少なくとも４つのこのようなペン型デバイスが、現在、市場で利用可能である。ノルディトロピン（液体、Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）、ニュートロピンＡＱ（液体、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、およびジェノトロピン（凍結乾燥、二重チャンバカートリッジ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ＆Ｕｐｊｏｈｎ）は、フェノールを含有し、ソマトローブ（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ）は、ｍ－クレゾールとともに製剤化されている。

【０２１５】
複数の側面が、保存投薬形態の製剤化および開発の際に考慮される必要がある。薬物性剤中の有効な保存剤濃度は、最適化されなければならない。これは、タンパク質の安定性を低下させることなく抗菌の有効性を与える濃度範囲で、投薬形態中の所与の保存剤を試験することを必要とする。
【０２１６】
予測され得るように、保存剤を含有する液体製剤の開発は、凍結乾燥製剤よりもさらに困難である。凍結乾燥製品は、保存剤なしで凍結乾燥され、使用時に希釈剤を含有する保存剤で再構成され得る。これは、保存剤がタンパク質と接触する時間を短縮し、関連する安定性の危険性を大幅に最小化させる。液体製剤では、保存剤の有効性および安定性は、製品の全保管期間（約１８～２４カ月）にわたって維持される必要がある。注記すべき重要な点としては、保存剤の有効性が、活性な薬物およびすべての賦形剤成分を含有する最終製剤で提示される必要があることである。
【０２１７】
ヘテロ二量体抗体またはフラグメント製剤は、一般に、とりわけ、種々の範囲のバイオアベイラビリティおよび持続性で、特定の投与経路および方法、特定の投薬量および投与頻度、特定の疾患の特定の治療のために設計されることになる。製剤は、したがって、経口、経耳、経眼、経直腸、および経膣、ならびに静脈内および動脈内注射、筋肉内注射、および皮下注射を含む非経口経路を含むがこれらに限定されない、任意の好適な経路による送達のために、本発明に従って設計され得る。
【０２１８】
薬学的組成物が製剤化された後、それは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として、または緩衝もしくは凍結乾燥粉末として、滅菌バイアル中に保管され得る。このような製剤は、すぐに使用可能な形態、または投与前に再構成される形態（例えば凍結乾燥）のいずれかで保管され得る。本発明はまた、単一用量の投与単位をもたらすためのキットを提供する。本発明のキットは、それぞれ、乾燥タンパク質を有する第１の容器および水性製剤を有する第２の容器の両方を含み得る。本発明のある特定の実施形態において、単一チャンバまたは複数チャンバの事前充填シリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（ｌｙｏｓｙｒｉｎｇｅ）を含むキットが、提供される。
【０２１９】
用いられる薬学的組成物を含有する抗原結合タンパク質の治療有効量は、例えば、治療内容および目的に依存するであろう。当業者であれば、治療に適切な用量レベルが、部分的に、送達される分子、抗原結合タンパク質が使用される適応症（複数可）、投与の経路、ならびに患者の大きさ（体重、体表面、もしくは器官寸法）および／または状態（年齢および一般健康状態）に応じて多様であろうことを理解するであろう。ある特定の実施形態において、臨床医は、用量を滴定し、最適な治療効果を得るように投与経路を修正することができる。
【０２２０】
安定性
【０２２１】
ヘテロ二量体抗体（またはその抗原結合フラグメント）を含む組成物の文脈で本明細書に使用される「安定性」および「安定な」という用語は、組成物中のヘテロ二量体抗体（またはその抗原結合フラグメント）の、所与の製造、調製、輸送、および保管条件下での凝集、分解、または分裂に対する耐性を指す。高度の安定性を有する抗体製剤は、信頼性および安全性の強化を示し、そのため、臨床使用に有利である。
【０２２２】
組成物中の抗体の安定性は、任意で、組成物中の抗体の所望のパラメータ（重鎖および／または軽鎖の凝集、分解、化学修飾等）を経時的に試験することによって、評価される。この点に関して、パラメータは、典型的に、場合によっては抗体またはそのフラグメントを多数の環境条件のうちのいくつかに曝露している間に、初期時点（Ｔ０）および評価

時点（Ｔ１）で試験され、比較される。初期時点は、例えば、抗体またはそのフラグメントが最初に組成物中に製剤化されるか、または最初に品質に関して試験される（すなわち、抗体組成物が凝集または分解に関して規制基準または製造基準を満たすかどうかを判定するために試験される）時点であり得る。初期時点はまた、抗体または抗体フラグメントが、組成物中に再構築される（例えば、初期調製物と比較してより高いかまたは低い濃度で再構築される）時点であり得る。評価時点は、種々の実施形態において、初期時点の後、約１週間（または約２週間、または約３週間、または約４週間、または約５週間、または約６週間、または約７週間、または約８週間、または約１０週間、または約３カ月、または約６カ月、または約１年）である。組成物中の抗体またはフラグメントの所望されるパラメーター（例えば、凝集または分解）は、－３０℃、４℃、２０℃、または４０℃、振盪、ｐＨ、異なる容器材料（例えば、ガラスバイアル、事前充填シリンジ等）での保管等といった、種々の保管条件下で評価され得る。

【０２２３】

凝集の程度、ならびに／またはヘテロ二量体抗体を含む組成物中に存在する凝集体の種類および／もしくは寸法を判定するための例示的な方法には、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、高速サイズ排除クロマトグラフィー（ＨＰＳＥＣ）、静的光散乱（ＳＬＳ）、フーリエ変換赤外分光法（ＦＴＩＲ）、円二色性法（ＣＤ）、尿素誘導タンパク質アンフォールディング技法、本質的トリプトファン蛍光、示差走査熱量測定、および１－アニリノ－８－ナフタレンスルホン酸（ＡＮＳ）タンパク質結合技法が挙げられるが、これらに限定されない。サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、分子を適切な樹脂を充填したカラム上を通過させることによって、分子をそれらの寸法に基づいて分離するために行われ得、より大きな分子（例えば、凝集体）が、より小さな分子（例えば、モノマー）よりも前に溶出する。分子は、一般に、２８０ｎｍでのＵＶ吸光によって検出され、さらなる特徴付けのために収集され得る。高圧液体クロマトグラフィーカラムは、ＳＥＣ分析（ＨＰ－ＳＥＣ）に用いられることが多い。あるいは、分析超遠心法（ＡＵＣ）が用いられ得る。ＡＵＣは、液体試料中の巨大分子の沈降係数（スベドベリＳで報告される）を判定する直交技法である。ＳＥＣと同様に、ＡＵＣは、抗体フラグメント／凝集体を、モノマーから分離および検出することができ、さらに、分子質量に関する情報を提供することができる。組成物中の抗体または抗体フラグメントの凝集はまた、コールターカウンターを用いた粒子カウンター分析または濁度計を使用した濁度の測定によって、特徴付けられ得る。濁度は、溶液中の粒子が光を散乱させる量の尺度であり、したがって、タンパク質凝集の一般的な指標として使用され得る。加えて、非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）またはキャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）を使用して、組成物中の抗体または抗体フラグメントの凝集および／または分裂の状態を特徴付けることができる。

【０２２４】

抗体の分解を判定するための例示的な方法には、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）およびＳＤＳによるキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）、ならびに直列ＭＳ検出を伴う逆相ＨＰＬＣが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２５】

種々の実施形態において、組成物中、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体または抗体フラグメントの５％未満が、目的の条件下において凝集体形態である。例えば、組成物中、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントの４％未満、または３％未満、または２％未満、または１％未満が、－３０℃、４℃、２０℃、または４０℃で約１週間（または約２週間、または約３週間、または約４週間、または約５週間、または約６週間、または約７週間、または約８週間、または約１０週間、または約３カ月、または約６カ月、または約１年）の期間保管した後に、凝集体形態である。いくつかの実施形態において、組成物中、本明細書に記載される抗体フラグメントのヘテロ二量体抗体の５％未満（または４％未満、または３％未満、または２％未満、または１％未満）が、約４℃で２週間の保管の

後、凝集体形態である。

【０２２６】

例えば、組成物中、抗体またはそのフラグメントの少なくとも８５％（または少なくとも９０％、または少なくとも９１％、または少なくとも９２％、または少なくとも９３％、または少なくとも９４％、または少なくとも９５％、または少なくとも９６％、または少なくとも９７％、または少なくとも９８％、または少なくとも９９％）が、任意で、－３０℃、４℃、２０℃、または４０℃で、約１週間（または約２週間、または約３週間、または約４週間、または約５週間、または約６週間、または約７週間、または約８週間、または約１０週間、または約３カ月、または約６カ月、または約１年）の期間の保管後に、非凝集体（すなわち、モノマー）形態で存在する。いくつかの実施形態において、抗体またはそのフラグメントの少なくとも８５％（または少なくとも９０％、または少なくとも９１％、または少なくとも９２％、または少なくとも９３％、または少なくとも９４％、または少なくとも９５％、または少なくとも９６％、または少なくとも９７％、または少なくとも９８％、または少なくとも９９％、またはそれ以上）が、約４℃で２週間の保管後に、非凝集体形態で組成物中に存在する。いくつかの実施形態において、抗体の少なくとも９９％が、２週間約４℃で２週間保管した後に、非凝集体形態で組成物中に存在する、および／または存在する抗体の少なくとも９５％が、組成物中にあり、４０℃で２週間の保管の後、非凝集体形態である。

【０２２７】

種々の実施形態において、組成物中、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体または抗体フラグメントの５％未満が、分解される。例えば、組成物中、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントの４％未満、または３％未満、または２％未満、または１％未満が、目的の条件下で分解される。例えば、任意で、抗体またはフラグメントの少なくとも８５％（または少なくとも９０％、または少なくとも９１％、または少なくとも９２％、または少なくとも９３％、または少なくとも９４％、または少なくとも９５％、または少なくとも９６％、または少なくとも９７％、または少なくとも９８％、または少なくとも９９％）が、約－３０℃、約４℃、約２０℃、または約４０℃で約１週間（または約２週間、または約３週間、または約４週間、または約５週間、または約６週間、または約７週間、または約８週間、または約１０週間、または約３カ月、または約６カ月、または約１年）の期間保管した組成物中で、インタクトである（すなわち、分解されていない）。いくつかの態様において、抗体またはそのフラグメントの少なくとも８５％（または少なくとも９０％、または少なくとも９１％、または少なくとも９２％、または少なくとも９３％、または少なくとも９４％、または少なくとも９５％、または少なくとも９６％、または少なくとも９７％、または少なくとも９８％、または少なくとも９９％、またはそれ以上）が、約４℃で２週間、組成物中で保管した後、インタクトである（すなわち、分解されていない）。いくつかの実施形態において、抗体またはフラグメントの少なくとも９９％は、組成物中で、約４℃で２週間保管した際、インタクトなままである、および／または少なくとも９５％が、組成物中で、約４０℃で２週間保管した際、インタクトなままである。

【０２２８】

組成物中のヘテロ二量体抗体（またはその抗原結合フラグメント）の機能的または活性安定性もまた、本明細書に企図される。例えば、標的への抗体の結合、スクレロスチン中和、およびＤＫＫ－１中和を検出および／または定量化するためのアッセイが、当該技術分野で既知であり、本明細書において実施例４～６に記載される。任意で、抗体またはそのフラグメントは、目的の条件下で、初期時点での抗体またはそのフラグメントの活性と比較して、約５０～１００％の活性を示す。例えば、抗体またはそのフラグメントは、初期時点での活性と比較して、約６０～９０％または７０～８０％のレベルの活性を保持する。したがって、抗体またはそのフラグメントの機能的安定性は、少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の活性の保持を含み、初期時点での活性と比較して、１００％を超える、例えば、１０５％、１１０％、１１５％、１２０％、１２５％、または１５０％以上である加瀬市

測定値を含み得る。

【０２２９】

粘度

【０２３０】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体のうちの１つ以上を含む組成物の粘度が、判定される。本明細書に使用される「粘度」という用語は、「絶対粘度」を指す。絶対粘度は、しばしば、動的または単純粘度と呼ばれ、動粘度および流体密度の積である（絶対密度＝動粘度×密度）。動粘度の大きさは、$L^2$／Ｔであり、式中、Ｌは長さであり、Ｔは時間である。一般に、動粘度は、センチストーク（ｃＳｔ）で表される。動粘度のＳＩ単位は、$mm^2$／ｓであり、これは、１ｃＳｔである。絶対粘度は、センチポアズ（ｃＰ）単位で表される。絶対粘度のＳＩ単位は、ミリパスカル－秒（ｍＰａ－ｓ）であり、１ｃＰ＝１ｍＰａ－ｓである。

【０２３１】

組成物の粘度は、抗体を組成物に添加した数時間後（例えば、１～２３時間後）、数日後（例えば、１～１０日後）、数週間後（例えば、１～５週間後）、数ヶ月後（例えば、１～１２カ月後）、または数年後（例えば、１～２年後、１～３年後）に測定され得る。粘度測定は、例えば、２～８℃または２５℃（室温）の保管または投与温度で行われ得る。いくつかの実施形態において、保管および／または投与温度での液体または再構成した液体組成物の絶対粘度は、１５ｃＰ以下、または１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、もしくは４ｃＰ以下である。いくつかの実施形態において、液体または再構成した液体組成物の絶対粘度は、６ｃＰ以下である。

【０２３２】

いくつかの実施形態において、抗体組成物の粘度は、ヘテロ二量体抗体の添加の前および後に測定される。粘度を測定する方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、毛細管粘度計、または円錐平板レオメーターの使用が含まれる。試験および参照製剤を比較するために使用される前提で、任意の方法が使用され得る。

【０２３３】

キット

【０２３４】

本明細書に記載される１つ以上のヘテロ二量体抗体を含む薬学的組成物は、このような薬学的組成物の使用に関する説明を提供するパッケージ材料とともに、容器（例えば、バイアルまたはシリンジ）内に入れられ得る。一般に、このような説明は、ヘテロ二量体抗体の濃度、ならびにある特定の実施形態では、薬学的組成物を再構成するのに必要とされ得る賦形剤成分または希釈剤（例えば、水、食塩水、またはＰＢＳ）の相対量を説明する具体的な表現を含むであろう。

【０２３５】

追加の実施形態

【０２３６】

以下の番号付けされた項に提供される以下の実施形態もまた、企図される。

【０２３７】

１．ＡＨｏ５１位または１４１位のフレームワーク領域内にアミノ酸置換を含む、単離抗体重鎖可変領域であって、この置換は、前記位置で、重鎖可変領域フレームワークに正または負に荷電したアミノ酸を導入する、単離抗体重鎖可変領域。

【０２３８】

２．ＡＨｏ５１位またはＡＨｏ１４１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第１項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２３９】

３．ＡＨｏ４６位に正に荷電したアミノ酸との置換をさらに含む、第２項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４０】

４．ＡＨｏ５１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第２項または第３項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４１】

５．ＡＨｏ１４１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第１、２、または３項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４２】

６．ＡＨｏ４６位およびＡＨｏ１４１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第３項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４３】

７．正に荷電したアミノ酸は、リジンである、第２～６項に記載の単離抗体重鎖。

【０２４４】

８．ＡＨｏ５１位またはＡＨｏ１４１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第１項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４５】

９．ＡＨｏ４６位に負に荷電したアミノ酸との置換をさらに含む、第８項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４６】

１０．ＡＨｏ５１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第８項または第９項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４７】

１１．ＡＨｏ１４１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第８、９、または１０項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４８】

１２．ＡＨｏ４６位およびＡＨｏ１４１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第９項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２４９】

１３．負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸である、第８～１２項のいずれかに記載の単離抗体重鎖。

【０２５０】

１４．重鎖ＣＨ１領域をさらに含む、第１～１３項のいずれかに記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５１】

１５．ＣＨ１領域は、１つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む、第１４項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５２】

１６．アミノ酸は、正または負の荷電アミノ酸をＣＨ１領域に導入するために置換される、第１５項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５３】

１７．正または負に荷電したアミノ酸が、ＥＵ　Ｓ１８３位に導入される、第１６項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５４】

１８．ＥＵ　Ｓ１８３位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第１７項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５５】

１９．置換は、Ｓ１８３Ｋである、第１８項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５６】

２０．ＥＵ　Ｓ１８３位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第１７項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５７】

２１．置換は、Ｓ１８３Ｄである、第２０項に記載の単離抗体重鎖可変領域。

【０２５８】
２２．第１～２１項のいずれかに記載の単離抗体重鎖可変領域を含む、抗体重鎖。
【０２５９】
２３．重鎖は、ホモ二量体化に不利な１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３領域を含む、第２２項に記載の抗体重鎖。
【０２６０】
２４．ＣＨ３領域内の負に荷電したアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第２３項に記載の抗体重鎖。
【０２６１】
２５．負に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、またはＥ３５７位である、第２４項に記載の抗体重鎖。
【０２６２】
２６．正に荷電したアミノ酸は、リジンである、第２５項に記載の抗体重鎖。
【０２６３】
２７．ＣＨ３領域は、Ｄ３９９ＫおよびＥ３５６Ｋの置換を含む、第２６項に記載の抗体重鎖。
【０２６４】
２８．ＣＨ３領域中の正に荷電したアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸で置換される、第２３項に記載の抗体重鎖。
【０２６５】
２９．正に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、またはＫ４０９位である、第２８項に記載の抗体重鎖。
【０２６６】
３０．負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸である、第２９項に記載の抗体重鎖。
【０２６７】
３１．ＣＨ３領域は、Ｋ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄの置換を含む、第３０項に記載の抗体重鎖。
【０２６８】
３２．第２４～２７項のいずれかに記載の抗体重鎖および第２８～３１項のいずれかに記載の抗体重鎖を含む、抗体。
【０２６９】
３３．重鎖は、Ｆｃエフェクター機能を改変する１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ２領域を含む、第２２～３１項のいずれかに記載の抗体重鎖。
【０２７０】
３４．ＡＨｏ５１位または１４１位のフレームワーク領域内にアミノ酸置換を含む抗体κ軽鎖可変領域であって、この置換は、前記位置のκ軽鎖可変領域フレームワークに正または負に荷電したアミノ酸を導入する、抗体κ軽鎖可変領域。
【０２７１】
３５．ＡＨｏ５１位またはＡＨｏ１４１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第３４項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。
【０２７２】
３６．ＡＨｏ位４６に正に荷電したアミノ酸との置換をさらに含む、第３５項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。
【０２７３】
３７．ＡＨｏ５１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第３５または３６項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。
【０２７４】
３８．ＡＨｏ１４１位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第３５、３６、または３７項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。
【０２７５】

３９．正に荷電したアミノ酸は、リジンである、第３５～３８項のいずれかに記載の抗体軽鎖。

【０２７６】

４０．ＡＨｏ５１位またはＡＨｏ１４１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第３４項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２７７】

４１．ＡＨｏ４６位に負に荷電したアミノ酸との置換をさらに含む、第４０項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２７８】

４２．ＡＨｏ５１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第４０または４１項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２７９】

４３．ＡＨｏ１４１位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第４０、４１、または４２項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２８０】

４４．正に荷電したアミノ酸は、リジンである、第４０～４３項のいずれかに記載の抗体軽鎖。

【０２８１】

４５．κ軽鎖定常領域をさらに含む、第３４～４４項のいずれかに記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２８２】

４６．κ軽鎖定常領域は、１つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む、第４５項に記載の抗体κ軽鎖可変領域。

【０２８３】

４７．アミノ酸は、正または負に荷電したアミノ酸をκ軽鎖定常領域に導入するために置換される、第４６項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８４】

４８．正または負に荷電したアミノ酸は、Ｅｕ　Ｓ１７６位に導入される、第４７項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８５】

４９．Ｅｕ　Ｓ１７６位は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第４８項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８６】

５０．置換は、Ｓ１７６Ｋである、第４９項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８７】

５１．Ｅｕ　Ｓ１７６位は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第４８項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８８】

５２．置換は、Ｓ１７６Ｄである、第５１項に記載の単離抗体κ鎖可変領域。

【０２８９】

５３．ＡＨｏ５１位または１４１位のフレームワーク領域内にアミノ酸置換を含む、抗体λ軽鎖可変領域であって、この置換は、前記位置でλ軽鎖可変領域フレームワークに正または負に荷電したアミノ酸を導入する、抗体λ軽鎖可変領域。

【０２９０】

５４．λ軽鎖定常領域をさらに含む、第５３項に記載の抗体λ軽鎖可変領域。

【０２９１】

５５．λ軽鎖定常領域は、１つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む、第５４項に記載の抗体λ軽鎖可変領域。

【０２９２】

５６．アミノ酸は、λ軽鎖定常領域に正または負に荷電したアミノ酸を導入するために

置換される、第５５項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９３】
５７．正または負に荷電したアミノ酸は、Ｋａｂａｔ　Ｓ１７６位に導入される、第５６項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９４】
５８．Ｓ１７６は、正に荷電したアミノ酸と置換される、第５７項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９５】
５９．置換は、Ｓ１７６Ｋである、第５８項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９６】
６０．Ｓ１７６は、負に荷電したアミノ酸と置換される、第５７項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９７】
６１．置換は、Ｓ１７６ＤまたはＳ１７６Ｅである、第６０項に記載の単離抗体λ鎖可変領域。
【０２９８】
６２．第１～２１項のうちのいずれかに記載の抗体重鎖可変領域、第２２～３１項のいずれかに記載の抗体重鎖、第３４～５２項のいずれかに記載の抗体κ軽鎖可変領域、または第５３～６１項のいずれかに記載の抗体軽鎖可変領域をコードする、単離核酸。
【０２９９】
６３．プロモーターに動作可能に連結される、第６２項に記載の単離核酸を含む、発現ベクター。
【０３００】
６４．第６２項に記載の単離核酸を含む組み換え宿主細胞。
【０３０１】
６５．第６３項に記載の発現ベクターを含む組み換え宿主細胞。
【０３０２】
６６．第１～２１項のいずれかに記載の単離重鎖可変領域および第２２～３１項または第３４～５２項のいずれかに記載の単離軽鎖可変領域を含む、抗原結合タンパク質。
【０３０３】
６７．抗原結合タンパク質は、２つの重鎖と２つの軽鎖とを含む抗体である、第６６項に記載の抗原結合タンパク質。
【０３０４】
６８．抗体は、二特異性抗体である、第６７項に記載の抗原結合タンパク質。
【０３０５】
６９．第６６～６８項のいずれかに記載の抗原結合タンパク質を含む、薬学的組成物。
【実施例】
【０３０６】
実施例１－ＤＫＫ１発現は、スクレロスチン抗体処置によって誘導される
異なる動物モデルの骨におけるＤＫＫ１の発現に対する抗スクレロスチン抗体処置の効果を評価した。予想外なことに、動物モデルのすべてにおいて、ＤＫＫ１発現の有意な増加が、抗スクレロスチン抗体で処置した動物の全骨抽出物に検出された。この増加した発現は、正常動物、閉経後骨粗鬆症の動物モデル、および骨折治癒の動物モデルから抽出した骨に観察された。抗スクレロスチン抗体処置後の観察されたＤＫＫ１発現の増加は、試験した3つすべての種（マウス、ラット、および霊長類）で発生した。
【０３０７】
例示的な研究の詳細は、次の通りである：１３歳の正常な雄性カニクイザルを、４．５または２２．５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－５（抗スクレロスチン抗体（ＳＡＢ））で２週間に１回、合計で８週間処置した。研究の最後に、動物を人道的に安楽死させ、骨を含む組織を摘出した。ＲＮＡを骨から単離し、ＤＫＫ１　ＲＮＡ発現を、製造業者の説明書に従って

ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ分枝ＤＮＡ（ｂＤＮＡ）アッセイ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）、ならびにカニクイザルＤＫＫ１　ｍＲＮＡおよびハウスキーピング遺伝子に特異的なプローブセット使用して判定した。図８に図示されるデータは、低用量（４．５ｍｇ／ｋｇ）での上腕中央幹骨におけるＤＫＫ１の発現の増加、および最も高い用量（２２．５ｍｇ／ｋｇ）でのＤＫＫ１　ｍＲＮＡの有意な誘導を示す。増加したＤＫＫ１発現はまた、腰椎でも観察された。データは、ハウスキーピング（ＨＫＧ）遺伝子ＨＰＲＴと比較した、正規化された発現として提示する（＋／－標準偏差）。図８のグラフの上の括弧は、ｐ＜０．０５（ＡＮＯＶＡ）を表す。

【０３０８】

本明細書に提示されるデータは、抗スクレロスチン抗体処置が、疾患の発生から独立して、ＤＫＫ１発現を誘導し、ヒトを含むすべての種に適用できる可能性が高いことを示す。ＤＫＫ１の誘導は、抗スクレロスチン抗体の活性を制限し得、スクレロスチンおよびＤＫＫ１の両方を阻害する治療薬が、より良好な活性を示すことを示唆する。さらに、ＤＫＫ１発現の増加は、スクレロスチン抗体処置のバイオマーカーとして機能し得る。

【０３０９】

実施例２－リンカーボディの生成

以下の実施例は、（ａ）抗スクレロスチン抗体および（ｂ）抗ＤＫＫ１抗体の軽鎖および重鎖が、Ｇ４Ｓリンカーによって連結されて、スクレロスチンに結合する一本のポリペプチド鎖およびＤＫＫ１に結合する一本のポリペプチド鎖（「リンカーボディ」）を形成する、ヘテロ二量体抗体（ＩｇＧ１骨格を有する）の生成について記載する。ＤＫＫ１およびスクレロスチン標的に対するポリペプチド鎖または半分の抗体を、次いで、ＣＨ３ドメインにおける荷電対置換を通じて二特異性抗体として構築する（すなわち、一方の重鎖がＫ３９２ＤおよびＫ４０９Ｄ置換を含有し、他方がＥ３５６ＫおよびＤ３９９Ｋ置換を含有した）。荷電対置換は、本明細書に記載される静電的操行機序を利用し、それによって、ヘテロ二量体形成（ＤＫＫ１　Ａｂ－スクレロスチンＡｂ）が、ＣＨ３領域の負に荷電した残基と正に荷電した残基とが引き合うことによって促進され、ホモ二量体（２つのＤＫＫ１　Ａｂアームまたは２つのアクレロスチン（ａｃｌｅｒｏｓｔｉｎ）Ａｂアーム）は、ＣＨ３－ＣＨ３接合部の対応する領域において同じ電荷を有するアミノ酸間の反発により阻止される。荷電対置換を、凝集のレベルを低減させるためにＣＨ１－ＣＬドメイン接合部にも導入した（重鎖ではＳ１８３Ｋ／Ｅおよび軽鎖ではＳ１７６Ｅ／Ｋ）。さらに、リンカーボディのいくつかはまた、重鎖－軽鎖接合部のさらなる安定化のために、ＶＬ－ＶＨ接合部に組み換えドメイン間ジスルフィド結合を有した。これは、重鎖内のＧ４４（Ｋａｂａｔ）および軽鎖内のＧ１００（Ｋａｂａｔ）を、システイン残基に置換することによって達成した。

【０３１０】

上述の方法は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって判定される高レベルの凝集をもたらした。凝集のレベルを低減させるために、Ｇ４Ｓリンカーを、重鎖および軽鎖定常領域（ＣＨ１－ＣＬ１）内の荷電対置換を有する軽鎖と重鎖との間に付加するか、または置き換えるかのいずれかを行った。凝集レベルが、荷電対置換をリンカーボディ構築物に付加した結果として低減されるであろうことが企図された。

【０３１１】

ＣＨ１－ＣＬ接合部における荷電対置換と組み合わせたリンカーボディ設計は、依然として、いくつかの構築物において望まれない凝集問題をもたらした。

【０３１２】

実施例３－リンカーを有さないヘテロ二量体抗体の生成

以下の実施例は、リンカーを有さないが、代わりに、親抗体のＣＨ／ＣＬ接合部およびＣＨ３／ＣＨ３接合部の両方に荷電対置換を含む、ヘテロ二量体抗体の生成について記載する。結果として得られるＣＨ／ＣＬおよびＣＨ３／ＣＨ３接合部に荷電置換を含むヘテロ二量体抗体は、本明細書において、ヘテロ二量体抗体バージョン１またはヘテロＩｇ－ｖ１と称される。

【０３１３】
簡単には、次の置換を、ＤＫＫ１抗体６．３７．５に導入した：ＣＨ３ドメインにおけるＫ３９２Ｄ（ＥＵ）およびＫ４０９Ｄ（ＥＵ）置換、ＣＨ１ドメインにおけるＳ１８３Ｋ（ＥＵ）置換、ならびにＣＬドメインにおけるＳ１７６Ｅ（ＥＵ）置換。次の置換を、スクレロスチン抗体２７Ｈ６に導入した：ＣＨ３ドメインにおけるＥ３５６Ｋ（ＥＵ）およびＤ３９９Ｋ（ＥＵ）置換、ＣＨ１ドメインにおけるＳ１８３Ｅ（ＥＵ）置換、ならびにＣＬドメインにおけるＳ１７６Ｋ（ＥＵ）置換。ＩｇＧ１足場を、ヘテロ二量体バージョン１設計に使用した。
【０３１４】
２つの異なる抗体に対して種々の入力ＤＮＡ比を使用して、ＩｇＧ産生を最大化し、凝集レベルを最小化した（高分子量種）。両方の抗体に等量のＤＮＡを使用することにより、最低限の凝集レベルをもたらした。
【０３１５】
ヘテロＩｇ二特異性抗体形成を評価するために、材料を精製し、質量分析に供した。ＮＲ質量分析により、抗体生成物が、２つの異なる軽鎖および２つの異なる重鎖を有したことが確認された。特定の軽鎖－重鎖結合を確認するために、Ｆａｂフラグメントを、タンパク質分解（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｆａｂ　Ｍｉｃｒｏ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ）により生成した。質量分析は、一方がＤＫＫ１抗体重鎖および軽鎖の対合に対応し、他方がスクレロスチン抗体のものに対応する、２つの種のみを示した。質量分析により、スクレロスチン／ＤＫＫ１ヘテロ二量体抗体の両方のアームにおいて、正しい対合の軽鎖および重鎖を有するヘテロ二量体抗体の存在を確認した。
【０３１６】
質量分析は、精製された試料中に単一種の抗体の存在を示し、観察された質量は、計算されたヘテロ二量体抗体の質量と一致した。結果として得られたヘテロ二量体抗体は、２つの軽鎖および２つの重鎖を有し、このヘテロ二量体抗体の抗スクレロスチン部分の重鎖が、ＣＨ１ドメインにＳ１８３Ｅ（ＥＵ）置換を有し、抗スクレロスチン部分の軽鎖が、ＣＬドメインにＳ１７６Ｋ（ＥＵ）置換を有した。ヘテロ二量体抗体の抗ＤＫＫ１部分の重鎖は、ＣＨ１ドメインにＳ１８３Ｋ（ＥＵ）置換を有し、ＤＫＫ１部分の軽鎖はＣＬドメインにＳ１７６Ｅ（ＥＵ）置換を有した。ヘテロ二量体抗体の抗スクレロスチン部分のＣＨ３ドメインは、Ｅ３５６Ｋ（ＥＵ）およびＤ３９９Ｋ（ＥＵ）置換を有し、抗ＤＫＫ１部分のＣＨ３ドメインは、Ｋ３９２Ｄ（ＥＵ）およびＫ４０９Ｄ（ＥＵ）に置換を有した。
【０３１７】
生成されたヘテロ二量体抗体がスクレロスチンおよび／またはＤＫＫ１の存在下で正準的Ｗｎｔシグナル伝達を活性化する能力を、細胞が分化して自己分泌様式でＷｎｔシグナル伝達を活性化する因子を分泌するように誘導される、独立した骨芽細胞Ｗｎｔ活性化アッセイにおいて評価した。このアッセイにおいて、ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１細胞に、Ｓｕｐｅｒ－ＴＯＰＦｌａｓｈレポーター構築物をトランスフェクトし、安定な細胞株を選択し、評価した。ＭＣ３Ｔ３Ｅ１／ＴｅｔＯＮＷｎｔ１／ルシフェラーゼは、レンチウイルス形質導入を使用して、Ｔ細胞因子応答ルシフェラーゼ構築物、Ｔｅｔリプレッサー構築物、およびドキシサイクリン誘導性Ｗｎｔ－１構築物で組み換え操作を行ったマウス骨芽細胞株である。ドキシサイクリンの存在下で、ＭＣ３Ｔ３Ｅ１／ＴｅｔＯＮＷｎｔ１／Ｌｕｃ細胞は、Ｗｎｔ－１を発現し、Ｗｎｔ－１と細胞表面ＬＲＰ５／６およびＦｒｉｚｚｌｅｄ受容体との結合を介してシグナル伝達を誘導し、ルシフェラーゼの発現をもたらす。ＭＣ３Ｔ３Ｅ１／ＴｅｔＯＮＷｎｔ１／Ｌｕｃ＃５細胞を、スクレロスチンおよび／またはＤＫＫ１の存在下でインキュベートすると、Ｗｎｔシグナル伝達は、Ｌｒｐ５／６βプロペラ１モチーフを介してこれらのタンパク質によって阻害される。バイオアッセイは、固定濃度のスクレロスチンおよび／またはＤＫＫ１で処置したヘテロ二量体抗体のおよび親抗体の細胞に基づくレポーターアッセイにおいて、用量依存性の刺激性効果を測定する。
【０３１８】

クローンＣ１０は、精製したスクレロスチンまたはＤＫＫ１タンパク質のいずれかとともにインキュベートした後、Ｗｎｔ経路活性化の阻害に起因して、レポーター活性の減少を示した。細胞を、増殖培地（１０％ＦＢＳ、１×Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ－Ｇｌｕ、および１．０ｕｇ／ｍｌのピューロマイシンを含有するα－ＭＥＭ培地）において培養した。細胞が８０％コンフルエンスに達したときに、培地を、４日間、分化培地「ＤＭ」（増殖培地、５０ｕｇ／ｍｌアスコルビン酸および１０ｍＭ　β－グリセロリン酸）に切り替えた。分化の後に、この細胞株は、自己分泌様式で正準的Ｗｎｔ活性化を引き起こす内在性タンパク質（複数可）を産生した。培地を吸引し、種々の濃度の一特異性抗体またはヘテロ二量体抗体（３７℃で４５～６０分間ＤＫＫ１および／またはスクレロスチンで４時間事前インキュベートした）を含有する１００μｌの新たなＤＭを、２４時間、ウェルに添加した。ルシフェラーゼ活性を、製造業者の指示書（Ｐｒｏｍｅｇａ’ｓ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ、カタログ番号：Ｅ４５３０）に従って測定した。試験した種々のラットおよびヒト二特異性抗体は、スクレロスチンおよびＤＫＫ１の両方の存在下で、骨芽細胞の正準的Ｗｎｔ経路を用量依存的に活性化することができ、さらに、抗体は、両方のか要請タンパク質のＷｎｔ阻害性機能を同時に中和することができることを示した。

【０３１９】

結果は、この実施例に記載される方法に従って産生されたヘテロ二量体抗体およびリンカーボディ（これは、陽性対照として使用した）の両方が、非常に類似する活性を有したことを示し、さらに、軽鎖および重鎖の正しい対合が確認された。

【０３２０】

実施例４－ＣＨ３ドメイン（複数可）、ＣＨ／ＣＬドメイン（複数可）、およびＶＨ／ＶＬドメイン（複数可）に置換を有するヘテロ二量体抗体の生成。

以下の実施例は、ＣＨ３、ＣＨ／ＣＬ、およびＶＨ／ＶＬドメインのそれぞれに、軽鎖および重鎖の正しい対合にさらに有利となる１つ以上の置換を有する、ヘテロ二量体抗体の生成について記載する。ヘテロ二量体抗体は、スクレロスチン部分についてはＡｂ－５およびＡｂ－２３、ならびにＤＫＫ１部分については抗体６．１４７および６．３７．５のいずれかに基づく。ＡＤＣＣを防止し、エフェクター機能を阻止するために、ＩｇＧ２クラスの定常ドメインが、本明細書に使用される。結果として得られるＶＨ／ＶＬ、ＣＨ／ＣＬ、およびＣＨ３／ＣＨ３の接合部に荷電置換を含むヘテロ二量体抗体は、本明細書において、ヘテロ二量体抗体バージョン２またはヘテロＩｇ－ｖ２と称される。

【０３２１】

１つの細胞内で２つの異なる抗体を共発現させる場合、４つの異なる鎖（ＨＣ１、ＬＣ１、ＨＣ２、ＬＣ２）が、転写され、翻訳される。ＨＣは、ホモ二量体（ＨＣ１－ＨＣ１）またはヘテロ二量体（ＨＣ１－ＨＣ２）のいずれかを形成し得、ＬＣは、無作為に２つの異なるＨＣと会合し得る。すべての場合において、１０個の異なる組み合わせが生じ得る［Ｐａｕｌ　Ｃａｒｔｅｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２４８（２００１）７－１５］。所望されない重鎖ホモ二量体は、$C_H3$領域を、ヘテロ二量体のみを形成するように遺伝子操作することによって最小化され得る。この実施例は、所望されないＬＣ／ＨＣ対合が、ＬＣ／ＨＣの接合部を、ＬＣとそれらの同種ＨＣとの正しい対合を強化するように操作することによって排除され得ることを示す。静電的操行機序を適用して、ＬＣ／ＨＣの対合および会合を指示した；逆の極性は所望される複合体サブユニットを引き寄せ、一方で同じ極性のホモ二量体サブユニットは反発する。

【０３２２】

逆の極性を有する荷電残基、例えばＡｓｐまたはＬｙｓによる置き換えのための重鎖および軽鎖の接合部の残基対を選択する際に、ＬＣとその同種ＨＣの正しい対合を制御するために、いくつかの規準を適用した：１）すべての位置が、ＶＬ／ＶＨおよびＣＬ／$C_H1$接合部と近接近して位置付けられる、２）すべての位置が、包埋され、異なる抗体ファミリーのすべてでなくともほとんどの間で、良好に保存される、３）すべての位置が、発現および抗原結合に最小限の影響を有する、ならびに４）荷電残基の導入が、抗体の折り

畳みおよび構築のプロセス中、シャペロンＢｉＰとＣ$_{H}$１領域との結合を妨害しない。

【０３２３】

組み換え操作に選択されたＶＬ／ＶＨおよびＣκ／Ｃ$_{H}$１接合部の残基を、表２に列挙する。可変領域において、ＶＨにおける優勢なＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ　Ｑ３９位）、ＡＨｏ５１位（Ｋａｂａｔ　Ｇ４４位）、およびＡＨｏ１４１位（Ｋａｂａｔ　Ｑ１０５位）は、それぞれ、ＶＬにおけるＡＨｏ４６位（Ｋａｂａｔ　Ｑ３８位）、ＡＨｏ１４１位（Ｋａｂａｔ　Ｑ１００位）、およびＡＨｏ５１位（Ｋａｂａｔ　Ａ４３位）と近接近している。定常領域では、Ｃ$_{H}$１領域におけるＡ１４１（ＥＵ）、Ｐ１７１（ＥＵ）、およびＳ１８３（ＥＵ）は、それぞれ、Ｃｋにおいて残基Ｆ１１６（ＥＵ）、Ｓ１６２（ＥＵ）、およびＳ１７６（ＥＵ）と接触するが、Ｃ$_{H}$１のＫ１４７（ＥＵ）は、Ｃｋ領域のＱ１２４（ＥＵ）、Ｓ１３１（ＥＵ）、またはＴ１８０（ＥＵ）のいずれかと相互作用し得る。

【０３２４】

表２：ＶＨ／ＶＬおよびＣＨ１／Ｃκ接合部に位置するアミノ酸残基を、荷電対残基の導入に選択した。ＶＨおよびＶＬの生殖細胞系残基を、異なる番号付けシステムによって番号付けし、太字の残基が、優勢なものである。抗体の大半のＶＨ／ＶＬにおける接触残基は、同じ行に配置する。Ｃκ領域の残基と接触するヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインの残基もまた、同じ行太字で示し、同じ行に配置する。ＦＷ：フレームワーク。

| VH | | | | | | | VL | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | FW | 残基 | 接触 | IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | FW | 残基 |
| 44 | 39 | 39 | 46 | 2 | **Q/R/T** | ↔ | 44 | 38 | 38 | 46 | 2 | **Q/G/H/L** |
| 49 | 44 | 44 | 51 | 2 | **G/R/A** | ↔ | * | 100 | 100 | 141 | 4 | **Q/G/P** |
| * | 105 | 109 | 141 | 4 | **Q/K/R/S** | ↔ | 49 | 43 | 43 | 51 | 2 | **A/G/S/P** |

| $C_H1$ | | | | | | | Cκ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | 参照 # | 残基 | 接触 | IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | 参照 # | 残基 |
| 20 | 139 | 141 | * | 176 | **A** | ↔ | 5 | 116 | 116 | * | 158 | **F** |
| 82 | 175 | 171 | * | 212 | **P** | ↔ | 81 | 162 | 162 | * | 211 | **S** |
| 86 | 188 | 183 | * | 230 | **S** | ↔ | 86 | 176 | 176 | * | 230 | **S** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 13 | 124 | 124 | * | 166 | **Q** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 20 | 131 | 131 | * | 176 | **S** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 90 | 180 | 180 | * | 234 | **T** |

【０３２５】

Ｗｎｔ１駆動型によるヘテロ二量体抗体の骨芽細胞レポーター分析は、ＤＫＫ１およびスクレロスチンの両方の存在下で、正準的Ｗｎｔシグナル伝達の強力な活性化を示したが、一方で対照ＤＫＫ１抗体（６．３７．５、６．１４７）および対照スクレロスチン抗体（Ａｂ－２３）は、部分的に阻害を逆転させただけであった。

【０３２６】

遺伝子操作されたヘテロ二量体抗体は、独立した細胞に基づくアッセイにおいて見られるように、ＤＫＫ１を中和し、組み換えＷｎｔ３ａに誘導されるＴＣＦ／ＬＥＦルシフェラーゼ活性を遮断することができた。このアッセイにおいて、Ｗｎｔシグナル伝達を、４℃で３０分間、１００ｎｇ／ｍｌの組み換えＷｎｔ３ａタンパク質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて、ＭＣ３Ｔ３　Ｅ１／ＳＴＦ－ルシフェラーゼ安定細胞株において誘導した。細胞を、次いで、対照ＰＢＳまたは４２６．７ｎＭで開始するヘテロ二量体抗体の２倍連続希釈物と事前混合した、０．１５ｕｇ／ｍｌのヒトＤＫＫ１タンパク質で処置した。ルシフェラーゼシグナルを、２４時間後に上述のように判定し、データを、ＰＲＩＳＭソフトウェアを使用してプロットした。結果は、スクレロスチンのループ２領域（すなわち、配列番号１のアミノ酸８６～１１１）およびＤＫＫ１の両方を標的とする可変領域を有するヘテロ二量体抗体が、スクレロスチンおよびＤＫＫ１を中和すること、ならびにＷｎｔ３ａによって駆動されるレポーター活性の増加が可能であったことを示した。

【０３２７】
実施例５－親抗体およびヘテロ二量体抗体の機能的分析
スクレロスチンのループ２領域（Ａｂ２３、Ａｂ５、２０Ｃ３）および非ループ２エピトープ（２７Ｈ６、Ａｂ１３、Ａｂ－Ｄ、Ａｂ－３）を対照とする抗スクレロスチン親抗体の機能的分析は、各抗体群に固有の作用機序を明らかにした。競合的αスクリーニング結合アッセイを行って、親スクレロスチン抗体の濃度を増加させることが、ｈｉｓ標的化ＬＲＰ６とビオチン標識ヒトスクレロスチンとの間の相互作用に与える影響を測定した。この分析は、スクレロスチンのループ２領域に結合した抗スクレロスチン抗体が、スクレロスチンとＬＲＰ６との間の相互作用を強力に阻害した場合、スクレロスチンの非ループ２領域を対象とした抗体が、これらのタンパク質間の相互作用を増加させたことを明らかにした。さらに、遺伝子操作したヘテロ二量体抗体は、非ループ２スクレロスチンエピトープ（すなわち、２７Ｈ６－６．３７．５、６．１４７－２７Ｈ６）を対象とするヘテロ二量体抗体が、スクレロスチンのループ２領域を対象とするヘテロ二量体抗体とは異なり、ＬＲＰ６とスクレロスチンの結合の増加を促進したという類似の現象を示した。すべてのヘテロ二量体抗体は、ＬＲＰ６への結合に関してヒトＤＫＫ１と競合することがわかった。

【０３２８】
正準的Ｗｎｔ経路活性化に対するこの現象の影響を理解するために、親抗体およびヘテロ二量体抗体を、骨芽細胞および２９３細胞を使用して、ＴＣＦ－レポーター細胞に基づくアッセイにおいて研究した。細胞を、ＬＲＰ６βプロペラ１モチーフに結合するＷｎｔ１またはＬＲＰ６βプロペラ３モチーフに結合するＷｎｔ３ａのいずれかで刺激した。正準的Ｗｎｔ経路活性化を、ルシフェラーゼ活性の増加によって測定した。このアッセイにおいて、スクレロスチンおよび／またはＤＫＫ１を添加して、レポーター活性を阻害し、異なる抗スクレロスチンまたは抗ＤＫＫ１抗体の中和活性を研究した。スクレロスチンは、ＴＣＦレポーターのＷｎｔ３ａ駆動型活性化を阻害したが、抗スクレロスチン非ループ２領域結合抗体（２７Ｈ６）はＷｎｔ３ａシグナル伝達を増強させたが、ループ２結合抗体（Ａｂ５およびＡｂ２３）は増強しなかった。類似のＷｎｔ３ａ増強の結果が、スクレロスチンの非ループ２領域に対する抗スクレロスチン可変領域を含有するヘテロ二量体抗体で得られた。対照的に、Ｗｎｔ１活性は、ルシフェラーゼ活性の増加（未処置対照のものを上回らなかった）によって示される、いずれかの抗体によるスクレロスチン阻害によって回復した。これらの効果は、ヘテスクレロスチンの不在下において、スクレロスチンの非ループ２領域を対象とするヘテロ二量体抗体では増強が観察されなかったため、スクレロスチンの存在に依存しなかった。他のヘテロ二量体抗体の類似の分析は、スクレロスチンのループ２に結合した抗スクレロスチン部分を含むヘテロ二量体抗体はＷｎｔ３ａを増強できなかったが、一方でスクレロスチンの非ループ２領域に結合した可変領域を含有するヘテロ二量体抗体が、Ｗｎｔ３ａシグナル伝達を増強させたことを示した。加えて、スクレロスチンの非ループ２領域に結合した可変領域を含むヘテロ二量体抗体は、ＤＫＫ１の存在下で、Ｗｎｔ３ａシグナル伝達を増強させたが、一方で一特異的非ループ２ヘテロ二量体抗体の増強は、ＤＫＫ１の存在下で阻害される。ＤＫＫ１のＣ末端領域がＬＲＰ６のβプロペラ３モチーフに結合し、Ｗｎｔ３ａクラスタンパク質とこの領域との相互作用を遮断することを示す最近の報告と一致して、すべての正準的Ｗｎｔ活性化がＤＫＫ１単独の存在下で阻害された（Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２０１１、Ａｎｈ Ｄｅｖ Ｃｅｌｌ ２０１１）。これらのデータは、スクレロスチンを介してβプロペラドメイン１に結合した抗体－リガンド複合体が、Ｗｎｔ３ａ／βプロペラ３活性を増加させるような様式で、受容体の構成に影響を及ぼし得ることを示唆する。抗ＬＲＰ６βプロペラ１結合抗体による類似のＷｎｔ３ａ依存性増強現象が、以前に報告されており、これらの抗体は、癌細胞株における分裂促進性および腫瘍異種移植片の成長を増加させた（Ｅｔｔｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ，ＰＮＡＳ ２０１０）。

【０３２９】

非ループ２結合抗スクレロスチン抗体によるＷｎｔ３ａ増強もまた、非骨芽細胞系細胞において観察された。この結果は、Ｗｎｔ３クラスタンパク質またはβプロペラ３結合タンパク質が存在し、ＤＫＫ１が不在であることを前提として、スクレロスチン／非ループ２結合抗体複合体が、ＬＲＰ６を発現する任意の細胞型においてＷｎｔシグナル伝達を活性化し得る可能性を向上させた。ヘテロ二量体抗体の場合、増強は、ＤＫＫ１の存在下で生じ得る。これらの観察に基づき、かつ非骨芽細胞系細胞における分裂促進性の危険性を軽減させるために、Ｗｎｔ１－骨芽細胞ＴＣＦレポーターアッセイにおいてレポーター活性を強力に増加させることが示された、ループ２領域を対象とする抗スクレロスチン可変領域を有する新規なヘテロ二量体抗体を、設計した。

【０３３０】

加えて、スクレロスチンの非ループ２領域に結合する親抗スクレロスチン抗体は、スクレロスチンと、その同種ＬＲＰ受容体との相互作用を破壊せず、ＬＲＰ６相互作用またはＬＲＰ４相互作用のいずれかを保持した。スクレロスチンのループ２領域に対する親スクレロスチン抗体およびヘテロ二量体抗体が、ＬＲＰ６とスクレロスチンとの間の相互作用を阻害したが、それらは、共免疫沈降実験において、スクレロスチンとＬＲＰ４との間の相互作用は阻害できなかった。対照的に、抗非ループ２可変ドメインを含有する親抗体またはヘテロ二量体抗体は、すべてが、ＬＲＰ４とスクレロスチンとの間の結合を減少させた（１９Ｄ１１、２７Ｈ６、Ｌ８、およびＮ２２）。新規なヘテロ二量体抗体を、ＩｇＧ２骨格で設計した。

【０３３１】

実施例６－ヘテロ二量体抗体は、インビボで活性を示した。

以下の実施例は、実施例３および４に記載される方法に従って生成されたヘテロ二量体抗体が、低骨ミネラル密度の動物モデルにおいて、骨ミネラル密度を増加させたことを示す。

【０３３２】

雄性の１０週齢のＢ６Ｄ２Ｆ１マウスを、この研究に使用した。研究の開始時に、動物を、インビボＤＸＡによって、体重および大腿骨－脛骨領域における骨ミネラル密度（ＢＭＤ）の両方でバランスがとれた５つの群（ｎ＝９／群）に分けた。マウスに、ビヒクル（プロリン）もしくはスクレロスチンＡｂ（Ｓｃｌ－Ａｂ）、またはＤＫＫ１－ＡｂもしくはＳｃｌ－ＡｂとＤＫＫ１－Ａｂとの組み合わせ（組み合わせ）、またはヘテロ二量体抗体（ヘテロＩｇ）のいずれかを、１週間に２回、３週間注射した。抗体は、１２．５ｍｇ／ｍｌで投与した。動物を、週１回インビボＤＸＡによってスキャニングして、腰椎および大腿骨－脛骨領域における薬物処置の骨同化活性を監視した。マウスは、次いで、研究の最後に安楽死させた。大腿骨を、μＣＴおよび骨強度分析によるエキソビボ密度測定のために採取した。

【０３３３】

図１は、次のヘテロ二量体抗体のインビボ研究デザインを図示する：（１）Ａｂ２３－Ａｂ６．１４７　ｖ２、（２）Ａｂ５－Ａｂ６．３７．５　ｖ１、および（３）Ａｂ５－Ａｂ６．１４７　ｖ１。この研究において、Ａｂ－５を単剤療法対照として使用し、ＤＶＤ　Ｉｇ　６．１４７－Ａｂ２３（国際公開第ＷＯ　２０１２／１１８９０３号に記載される）を二特異性抗体対照として使用する。ＤＶＤ　Ｉｇは、単剤療法対照およびヘテロ二量体抗体よりも高い分子量のため、わずかに高く（１７ｍｇ／ｋｇ）投薬した。ヘテロ二量体抗体の形式は、各標的に対して一価であるが、一方でＤＶＤは、各標的に対して二価であることに留意しなければならない。したがって、容量モル濃度に関しては、投薬レベルは、ＤＶＤとヘテロ二量体抗体（ヘテロＩｇ）で同等であるが、結合部位（パラトープ）の数に関しては異なる。

【０３３４】

図２は、上述の一特異性Ｉｇ（Ａｂ５）、二特異性ＤＶＤ（６．１４７－Ａｂ２３）、ならびにヘテロ二量体抗体１、２、および３の間で、３週目のマウスにおける腰椎および脚における骨量密度（ＢＭＤ）増加の割合を比較する。

【０３３５】
図２に示されるデータは、ヘテロ二量体抗体Ａｂ５－６．３７．５　ｖ１（ヘテロ二量体抗体２－「ヘテロＩｇ２」）および７８５－６．１４７　ｖ１（ヘテロ二量体抗体３－「ヘテロＩｇ３」）が、骨量密度を増加させたことをはっきりと示す。しかしながら、可変ドメイン接合部（ＶＨ／ＶＬ）に過剰な荷電対置換を有するヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．１４７　ｖ２（ヘテロ二量体抗体１－「ヘテロＩｇ１」）は、ＢＭＤを増加させなかった。可変ドメインに追加の荷電対置換を付加することが、軽鎖および重鎖の特異的な対合（例えば、Ａｂ５軽鎖とＡｂ５重鎖との対合）を達成することを助けるであろうことが予測された。しかしながら、この場合、可変ドメインにおける追加の荷電対置換が、ヘテロ二量体抗体の安定性の低下をもたらしたと見られる。このＰＤ研究の後のＰＫ研究は、実際に、ヘテロ二量体抗体Ａｂ２３－６．１４７のＤＫＫ１アームが、低いインビボ安定性を有することを示した。
【０３３６】
実施例７－薬物動態データ
血清試料中のヘテロ二量体抗体を捕捉および検出するために、４つの異なる薬物動態アッセイ（すなわち、スクレロスチン／ＤＫＫ１アッセイ、スクレロスチン／Ｆｃアッセイ、ＤＫＫ１／スクレロスチンアッセイ、およびＦＣ／ＦＣ架橋ＥＬＩＳＡアッセイ）を行った。
【０３３７】
スクレロスチン／ＤＫＫ１アッセイ：簡単には、ハーフエリアプレートを、１×ＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのヒトスクレロスチンでコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを、少なくとも１時間、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ緩衝液でブロッキングした。標準物（Ｓｔｄ）および品質対照試料（ＱＣ）を、ラット血清試料中に調製した。標準物、ＱＣ、および血清試料を、緩衝液（１×ＰＢＳ、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．５％ｔｗｅｅｎ　２０、および１０ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）中、１：３０に希釈した。希釈したＳｔｄ、ＱＣ、および試料を、次いで、ＥＬＩＳＡプレートに充填し、９０分間インキュベートした。次いで、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、緩衝液中２００ｎｇ／ｍｌのビオチニル化ヒトＤＫＫ１を添加し、９０分間インキュベートした。プレートを洗浄し、２００ｎｇ／ｍｌのストレプトアビジン－ＨＲＰ共役体を添加し、３０分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、ＴＭＢ基質を添加した。１５分後に、１Ｍの硫酸を添加することにより反応を停止させた。プレートを、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーによって読み取った。
【０３３８】
スクレロスチン／ＦＣアッセイ：ハーフエリアプレートを、１×ＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのヒトスクレロスチンでコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを、少なくとも１時間、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ緩衝液でブロッキングした。標準物（Ｓｔｄ）および品質対照試料（ＱＣ）を、ラット血清試料中に調製した。標準物、ＱＣ、および血清試料を、緩衝液（１×ＰＢＳ、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．５％ｔｗｅｅｎ　２０、および１０ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）中、１：３０に希釈した。希釈したＳｔｄ、ＱＣ、および試料を、次いで、ＥＬＩＳＡプレートに充填し、９０分間インキュベートした。次いで、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、ＨＲＰを共役した抗ヒトＦｃ抗体、Ｍａｂ　１．３５．１を１０ｎｇ／ｍｌ添加し、９０分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、ＴＭＢ基質を添加した。１５分後に、１Ｍの硫酸を添加することにより反応を停止させた。プレートを、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーによって読み取った。
【０３３９】
ＤＫＫ１／ＦＣアッセイ：ハーフエリアプレートを、１×ＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのヒトＤＫＫ１でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを、少なくとも１時間、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ緩衝液でブロッキングした。標準物（Ｓｔｄ）および品質対照試料（ＱＣ）を、ラット血清試料中に調製した。標準物、ＱＣ、および血清試料を、緩衝液（１×ＰＢＳ、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．５％ｔｗｅｅｎ　２０、および１０ｍｇ／ｍｌ　ＢＳ

Ａ）中、１：３０に希釈した。希釈したＳｔｄ、ＱＣ、および試料を、次いで、ＥＬＩＳＡプレートに充填し、９０分間インキュベートした。次いで、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、ＨＲＰを共役した抗ｈｕ　Ｆｃ抗体、Ｍａｂ　１．３５．１を１０ｎｇ／ｍｌ添加し、９０分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、ＴＭＢ基質を添加した。１５分後に、１Ｍの硫酸を添加することにより反応を停止させた。プレートを、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーによって読み取った。

【０３４０】

ＦＣ／ＦＣ架橋ＥＬＩＳＡアッセイ：簡単には、ハーフエリアプレートを、１×ＰＢＳ中０．２μｇ／ｍｌの抗ヒトＦｃ抗体、Ｍａｂ　１．３５．１でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートを、少なくとも１時間、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ緩衝液でブロッキングした。標準物（Ｓｔｄ）および品質対照試料（ＱＣ）を、ラット血清試料中に調製した。標準物、ＱＣ、および血清試料を、緩衝液（１×ＰＢＳ、１Ｍ　ＮａＣｌ、０．５％ｔｗｅｅｎ　２０、および１０ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）中、１：３０に希釈した。次いで、希釈したＳｔｄ、ＱＣ、および試料を、ＥＬＩＳＡプレートに充填し、９０分間インキュベートした。次いで、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、ＨＲＰを共役した抗ヒトＦｃ抗体、Ｍａｂ　１．３５．１を５０ｎｇ／ｍｌ添加し、３０分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、ＴＭＢ基質を添加した。１０分後に、１Ｍの硫酸を添加することにより反応を停止させた。プレートを、次いで、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーによって読み取った。

【０３４１】

図３は、試験した４つのスクレロスチン－ＤＫＫ１ヘテロ二量体抗体（すなわち、Ａｂ２３－６．３７．５　ｖ１、Ａｂ５－６．３７．５　ｖ１、Ａｂ５－６．１４７　ｖ２、およびＡｂ２３－６．１４７　ｖ２）の薬物動態（ＰＫ）プロファイルを示す。結果は、スクレロスチン／ＤＫＫ１およびＤＫＫ１／Ｆｃアッセイに基づくＰＫプロファイルがスクレロスチン／ＦｃおよびＦｃ／Ｆｃアッセイのものから外れたため、ＶＨ／ＶＬドメインに荷電アミノ酸置換を含むヘテロ二量体抗体が安定性に悪影響を及ぼしたことを示した。

【０３４２】

実施例８：ヘテロ二量体抗体の産生の際、軽鎖とその同種重鎖との正しい対合を静電的操行機序により制御する

１つの細胞内で２つの異なる抗体を共発現させる場合、４つの異なる鎖（ＨＣ１、ＬＣ、ＨＣ２、ＬＣ２）が、転写され、翻訳される。ＨＣは、ホモ二量体またはヘテロ二量体のいずれかを形成し得、ＬＣは、無作為に２つの異なるＨＣと結合し得る。１０個の異なる組み合わせが生じ得る［Ｐａｕｌ　Ｃａｒｔｅｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２４８（２００１）７－１５］。重鎖ホモ二量体に由来する所望されない側鎖生成物は、ＣＨ３領域を、ヘテロ二量体のみを形成するように遺伝子操作することによって最小化され得る。この実施例は、所望されないＬＣ／ＨＣ対合が、ＬＣ／ＨＣの接合部を、ＬＣとそれらの同種ＨＣとの正しい対合を強化するように操作することによって排除され得ることを示す。逆の極性が引き合い、一方で同じ極性は反発するため、静電的奏効機序を適用して、ＬＣ／ＨＣの対合および構築を指示した。

【０３４３】

逆の極性を有する荷電残基、例えばＡｓｐまたはＬｙｓによって置き換えられた重鎖および軽鎖の接合部の残基対を選択する際に、ＬＣとその同種ＨＣとの正しい対合を制御するために、いくつかの規準を適用した：１）すべての位置が、ＶＬ／ＶＨおよびＣＬ／ＣＨ１接合部と近接近して位置付けられる、２）すべての位置が、包埋され、異なる抗体ファミリーのすべてでなくともほとんどの間で、良好に保存される、３）すべての位置が、発現および抗原結合に最小限の影響を有する、ならびに４）荷電残基の導入が、抗体の折り畳みおよび構築のプロセス中、シャペロンＢｉＰとＣＨ１領域との結合を妨害しない。

【０３４４】

Ｈｅｒ２／ＥＧＦＲヘテロ二量体抗体を遺伝子操作するために選択されたＶＬ／ＶＨお

よびＣκ／ＣＨ１接合部の残基を、表２に列挙する。可変領域において、ＶＨ内のＱ３９（Ｋａｂａｔ番号付け、ＡＨｏ４６位）、Ｇ４４（ＡＨｏ５１位）、およびＱ１０５（ＡＨｏ１４１位）は、それぞれ、ＶＬ内のＱ３８（Ｋａｂａｔ番号付け、ＡＨｏ４６位）、Ｑ１００（ＡＨｏ１４１位）、およびＡ４３（ＡＨｏ５１位）に近接近である。定常領域では、ＣＨ１領域のＡ１４１（Ｅｕ番号付け）、Ｐ１７１、およびＳ１８３は、それぞれ、Ｃｋの残基Ｆ１１６（Ｅｕ番号付け）、Ｓ１６２、およびＳ１７６と接触するが、ＣＨ１のＫ１４７（Ｅｕ番号付け）は、Ｃｋ領域のＱ１２４、Ｓ１３１、またはＴ１８０（Ｅｕ番号付け）のいずれかと相互作用し得る。

【０３４５】

概念実証のヘテロ二量体ＩｇＧを、抗ＥＧＦＲ抗体および抗ＨＥＲ２抗体由来のｖ遺伝子を使用して構築した。図４は、ヘテロ二量体抗体変異体を作製するための異なる構造を示す。１つのＦｃ鎖は、ＣＨ２ドメインにＡＤＣＣ強化置換Ｓ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖを有し、ＣＨ３ドメインにヘテロ二量体化置換Ｋ３９２Ｄ＋Ｋ４０９Ｄを有するが、一方で他のＦｃ鎖は、ＣＨ３ドメイン内のヘテロ二量体化置換Ｅ３５６Ｋ＋Ｄ３９９Ｋとともに、より低いヒンジ領域およびＣＨ２ドメインにＡＤＣＣ強化置換Ｌ２３４Ｙ＋Ｋ２９０Ｙ＋Ｙ２９６Ｗを有する。抗体は、それらのＦａｂ領域を有する腫瘍細胞に特異的に結合する場合に、強力なＡＤＣＣ殺滅を誘導するヘテロ二量体を形成しやすい。

【０３４６】

表２：ＶＨ／ＶＬおよびＣＨ１／Ｃκ接合部に位置するアミノ酸残基を、荷電対残基の導入に選択した。ＶＨおよびＶＬの生殖細胞系残基を、異なる番号付けシステムによって番号付けし、太字の残基が、優勢なものである。抗体の大半のＶＨ／ＶＬにおける接触残基は、同じ行に配置する。Ｃκ領域の残基と接触するヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインの残基もまた、同じ行太字で示し、同じ行に配置する。ＦＷ：フレームワーク。

【０３４７】

表２．

| VH | | | | | | | VL | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | FW | 残基 | 接触 | IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | FW | 残基 |
| 44 | 39 | 39 | 46 | 2 | **Q/R/T** | ↔ | 44 | 38 | 38 | 46 | 2 | **Q/G/H/L** |
| 49 | 44 | 44 | 51 | 2 | **G/R/A** | ↔ | * | 100 | 100 | 141 | 4 | **Q/G/P** |
| * | 105 | 109 | 141 | 4 | **Q/K/R/S** | ↔ | 49 | 43 | 43 | 51 | 2 | **A/G/S/P** |

| $C_H1$ | | | | | | | Cκ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | 参照 # | 残基 | 接触 | IMGT # | Kabat # | Eu # | AHo # | 参照 # | 残基 |
| 20 | 139 | 141 | * | 176 | **A** | ↔ | 5 | 116 | 116 | * | 158 | **F** |
| 82 | 175 | 171 | * | 212 | **P** | ↔ | 81 | 162 | 162 | * | 211 | **S** |
| 86 | 188 | 183 | * | 230 | **S** | ↔ | 86 | 176 | 176 | * | 230 | **S** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 13 | 124 | 124 | * | 166 | **Q** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 20 | 131 | 131 | * | 176 | **S** |
| 26 | 145 | 147 | * | 182 | **K** | ↔ | 90 | 180 | 180 | * | 234 | **T** |

【０３４８】

概念実証研究では、Ｆｎ３タグ（１２ＫＤａ）を、抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＨＣのＮ末端に挿入し、Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６タグ（１４ＫＤａ）を、抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＬＣのＣ末端にインフレームで融合させたため、ＬＣ／ＨＣの４つの異なる組み合わせを、異なる寸法によりＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで区別することができる：望ましいＬＣ１／ＨＣ１：：ＬＣ２－Ｆｎ３－ＦＨ／Ｆｎ３－ＨＣ２または望ましくないＬＣ２－Ｆｎ３－ＦＨ／ＨＣ１：：ＬＣ１／Ｆｎ３－ＨＣ２は１７６ＫＤａ、望ましくないＬＣ１／ＨＣ１：：ＬＣ１／Ｆｎ３－ＨＣ２は１６２ＫＤａ、および望ましくないＬＣ２－Ｆｎ３－ＦＨ／ＨＣ１：：ＬＣ２－Ｆｎ３－ＦＨ／Ｆｎ３－ＨＣ２は１９０ＫＤａ。１７６ＫＤａの生成物の組成物を、続いて、部分的還元を伴う質量分析によって判定した。二重抗原結合プレートＥＬＩＳＡを利用して、好ましいＬＣ／ＨＣ対合を有する望ましい変異体をスクリーニ

ングした。

【０３４９】

異なる変異体（表３）を調べて、最も高い二重抗原結合および正しいＬＣ／ＨＣ対合を有する最良の組み合わせを発見した。いずれの結合シグナルも生成しなかった一特異的抗Ｈｅｒ２　Ａｂ１（Ｃ０１）または抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２（Ｃ０７）、および無作為なＬＣ／ＨＣ対合で４つの通常の鎖から作製された内部対照Ｃ１１と比較すると、変異体１Ｃ０２、１Ｃ０４、２Ａ０５、２Ｂ０４、２Ｂ０５、および５Ｄ０３は、用量依存様式で二重抗原（Ｈｅｒ２およびＥＧＦｒ細胞外ドメイン）への改善された結合を示した。変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３は、曲線が最も左にシフトしたため、もっとも強い結合を有した。これらの変異体はまた、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル中、全長ヘテロ二量体ＩｇＧ１の優勢な形成を有した。発現試験は、調節因子ＸＢＰ１の添加は、ヘテロ二量体抗体変異体の発現レベルをわずかに上昇させたが、一方で別の調節因子ＥＲＰ２３は、発現をほとんど上昇させなかった。

【０３５０】

表３：静電的操行機序により作製された変異体。Ａｂ１のＨＣが、ＣＨ２ドメインにＳ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖを有し、ＣＨ３ドメインにＫ３９２Ｄ＋Ｋ４０９Ｄを有し、Ａｂ２のＨＣが、より低いヒンジおよびＣＨ２ドメインにＬ２３４Ｙ＋Ｋ２０９Ｙ＋Ｙ２９６Ｗを有し、ＣＨ３ドメインにＥ３５６Ｋ＋Ｄ３９９Ｋを有する、ヘテロ二量体抗体ＩｇＧ１としての抗Ｈｅｒ２　Ａｂ１および抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２のＶＨ／ＶＬおよびＣＨ１／ＣＬ接合部におけるアミノ酸変化。Ｆｎ３タグを、抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＨＣのＮ末端に挿入し、Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６タグを、抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＬＣのＣ末端にインフレームで融合させた。可変領域（ＶＨまたはＶＬ）内の残基は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって番号付けし、一方で定常領域（ＣＨ１またはＣＬ）の残基は、Ｅｕ番号付けシステムにより番号付けする。

| | 抗 Her2 Ab1 HC (K392D + K409D) | | 抗 Her2 Ab1 LC | | 抗 EGFr Ab2 HC (E356K + D399K) | | 抗 EGFr Ab2 LC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 変異体 | VH1 | CH1 | VL1 | CL | VH2 | CH1 | VL2 | CL |
| C12 | Q39K+G44K | | Q38D+Q100D | | Q39D+G44D | | Q38K+G100K | |
| C13 | Q39K+G44K | | Q38D+Q100D | | Q39D+Q105D | | Q38K+A43K | |
| C14 | Q39K+G44K | | Q38D+Q100D | | G44D+Q105D | | G100K+A43K | |
| C15 | Q39K+Q105K | | Q38D+A43D | | Q39D+G44D | | Q38K+G100K | |
| C16 | Q39K+Q105K | | Q38D+A43D | | Q39D+Q105D | | Q38K+A43K | |
| C17 | Q39K+Q105K | | Q38D+A43D | | G44D+Q105D | | G100K+A43K | |
| C18 | G44K+Q105K | | Q100D+A43D | | Q39D+G44D | | Q38K+G100K | |
| C19 | G44K+Q105K | | Q100D+A43D | | Q39D+Q105D | | Q38K+A43K | |
| C20 | G44K+Q105K | | Q100D+A43D | | G44D+Q105D | | G100K+A43K | |
| 1A01 | | K147K + S183K | | Q124D+S176D | | K147D + S183D | | Q124K + S176K |
| 1A02 | | K147K + S183K | | Q124D+S176D | | K147D + S183D | | S131K + S176K |
| 1A03 | | K147K + S183K | | Q124D+S176D | | K147D + S183D | | S176K + T180K |
| 1A04 | | K147K + S183K | | S131D+S176D | | K147D + S183D | | Q124K + S176K |
| 1A05 | | K147K + S183K | | S131D+S176D | | K147D + S183D | | S131K + S176K |
| 1A06 | | K147K + S183K | | S131D+S176D | | K147D + S183D | | S176K + T180K |
| 1B01 | | K147K + S183K | | S176D+T180D | | K147D + S183D | | Q124K + S176K |
| 1B02 | | K147K + S183K | | S176D+T180D | | K147D + S183D | | S131K + S176K |
| 1B03 | | K147K + S183K | | S176D+T180D | | K147D + S183D | | S176K + T180K |
| 1B04 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | Q124K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | Q124D + S176D |
| 1B05 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | Q124K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S131D + S176D |
| 1B06 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | Q124K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D + T180D |
| 1C01 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S131K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | Q124D + S176D |
| 1C02 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S131K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S131D + S176D |
| 1C03 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S131K + S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D + T180D |
| 1C04 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S176K + T180K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | Q124D + S176D |
| 1C05 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S176K + T180K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S131D + S176D |
| 1C06 | Q39K+Q105K | K147D + S183D | Q38D + A43D | S176K + T180K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D + T180D |
| 1D01 | | K147K | | Q124D | | K147D | | Q124K |
| 1D02 | | K147K | | Q124D | | K147D | | S131K |
| 1D03 | | K147K | | Q124D | | S183D | | S176K |
| 1D04 | | K147K | | S131D | | K147D | | Q124K |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1D05 | | K147K | | S131D | | K147D | | S131K |
| 1D06 | | K147K | | S131D | | S183D | | S176K |
| 2A01 | | S183K | | S176D | | K147D | | Q124K |
| 2A02 | | S183K | | S176D | | K147D | | S131K |
| 2A03 | | S183K | | S176D | | S183D | | S176K |
| 2A04 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | Q124K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | Q124D |
| **2A05** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | Q124K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | S131D |
| 2A06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | Q124K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D |
| 2B01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | Q124D |
| 2B02 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | S131D |
| 2B03 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D |
| **2B04** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | T180K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | Q124D |
| **2B05** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | T180K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | S131D |
| 2B06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | T180K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D |
| 2C01 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | Q124D |
| 2C02 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | S131D |
| 2C03 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D |
| 5A01 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | Q39D + Q105D | A141K | Q38K + A43K | F116D |
| 5A02 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | Q39D + Q105D | P171K | Q38K + A43K | S162D |
| 5A03 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | Q39D + Q105D | K147K | Q38K + A43K | S131D |
| **5A04** | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | Q39D + Q105D | S183K | Q38K + A43K | S176D |
| 5A05 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D + A43D | S162K | Q39D + Q105D | A141K | Q38K + A43K | F116D |
| 5A06 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D + A43D | S162K | Q39D + Q105D | P171K | Q38K + A43K | S162D |
| 5B01 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D + A43D | S162K | Q39D + Q105D | K147K | Q38K + A43K | S131D |
| 5B02 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D + A43D | S162K | Q39D + Q105D | S183K | Q38K + A43K | S176D |
| 5B03 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | Q39D + Q105D | A141K | Q38K + A43K | F116D |
| **5B04** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | Q39D + Q105D | P171K | Q38K + A43K | S162D |
| 5B05 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | Q39D + Q105D | K147K | Q38K + A43K | S131D |
| 5B06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D + A43D | S131K | Q39D + Q105D | S183K | Q38K + A43K | S176D |
| 5C01 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | Q39D + Q105D | A141K | Q38K + A43K | F116D |
| 5C02 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | Q39D + Q105D | P171K | Q38K + A43K | S162D |
| 5C03 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | Q39D + Q105D | K147K | Q38K + A43K | S131D |
| 5C04 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D + A43D | S176K | Q39D + Q105D | S183K | Q38K + A43K | S176D |
| 5C05 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | G44D + Q105D | A141K | G100K + A43K | F116D |
| 5C06 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | G44D + Q105D | P171K | G100K + A43K | S162D |
| 5D01 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | G44D + Q105D | K147K | G100K + A43K | S131D |
| 5D02 | Q39K+Q105K | A141D | Q38D + A43D | F116K | G44D + Q105D | S183K | G100K + A43K | S176D |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5D03 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D＋A43D | S162K | G44D＋Q105D | A141K | G100K＋A43K | F116D |
| 5D04 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D＋A43D | S162K | G44D＋Q105D | P171K | G100K＋A43K | S162D |
| 5D05 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D＋A43D | S162K | G44D＋Q105D | K147K | G100K＋A43K | S131D |
| 5D06 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D＋A43D | S162K | G44D＋Q105D | S183K | G100K＋A43K | S176D |
| 6A01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D＋A43D | S131K | G44D＋Q105D | A141K | G100K＋A43K | F116D |
| 6A02 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D＋A43D | S131K | G44D＋Q105D | P171K | G100K＋A43K | S162D |
| 6A03 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D＋A43D | S131K | G44D＋Q105D | K147K | G100K＋A43K | S131D |
| 6A04 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D＋A43D | S131K | G44D＋Q105D | S183K | G100K＋A43K | S176D |
| 6A05 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D＋A43D | S176K | G44D＋Q105D | A141K | G100K＋A43K | F116D |
| 6A06 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D＋A43D | S176K | G44D＋Q105D | P171K | G100K＋A43K | S162D |
| 6B01 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D＋A43D | S176K | G44D＋Q105D | K147K | G100K＋A43K | S131D |
| 6B02 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D＋A43D | S176K | G44D＋Q105D | S183K | G100K＋A43K | S176D |

【０３５１】

ＨＥＫ　２９３６Ｅ細胞に一過性トランスフェクションを行うことによって変異体１Ｃ０２、１Ｃ０４、２Ａ０５、２Ｂ０５、および５Ｄ０３を作製し、タンパク質Ａカラムを用いて精製し、次いで、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００サイズ排除カラムを用いて研磨した。９００ｍＬの上清、分析ＳＥＣにより約１００％の純度を有する１．２～６．８ｍｇの最終生成物が、得られた。非還元ＳＤＡ－ＰＡＧＥゲル（図４、左）において、すべての変異体は、Ｆｎ３タグが抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＨＣのＮ末端に挿入され、Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６タグが抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＬＣのＣ末端にインフレームで融合された、非常に優勢な全長ＩｇＧ１を有する。変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３が、極めて低いレベルの小さなバンドを有し、最も純粋である。還元条件下では、４つの異なる鎖が、それらの異なる寸法のため分離した（６１ＫＤａでＦｎ３－ＨＣ２、５０ＫＤａでＨＣ１、３６ＫＤａでＬＣ２－Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６、２３ＫＤａでＬＣ１）。４つの異なる鎖は、構築された全長ＩｇＧ１抗体中、１：１：１：１の比率であることが示された。構成要素および正しいＬＣ／ＨＣ対合が、質量分析によって確認された。

【０３５２】

実施例９－Ｈｅｒ２／ＥＧＦＲヘテロ二量体抗体は、親抗体の遮断機能を維持した

この実施例は、実施例７に記載されるヘテロ二量体抗体が、それらが作製された個々の抗体の遮断機能を維持することを示す。さらに、ヘテロ二量体抗体は、標的発現細胞に対するＡＤＣＣを媒介することができた。

【０３５３】

二重抗原結合に加えて、変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３を、細胞に基づくアッセイによってそれらの機能性を試験するために選択した。ＣＨＯ細胞株に、ヒトＥＧＦｒを安定にトランスフェクトした。リガンドＥＧＦを、培養培地に添加し、ＣＨＯ細胞表面上の受容体ＥＧＦｒを活性化およびリン酸化させ、ＭＡＰＫ、ＥＲＫ１／２、ＰＩ３Ｋ、ＪＡＫ／ＳＴＡＴ、およびＰＫＣといった下流シグナル経路を作動させた。２Ｂ０５および５Ｄ０３が由来する抗ＥＧＦｒ抗体は、ＩＣ５０＝２．７ｎＭで、リガンドＥＧＦと受容体ＥＧＦｒとの結合を遮断し、受容体ＥＧＦｒのリン酸化を阻害した。抗ＥＧＦｒ抗体および抗Ｈｅｒ２抗体の組み合わせは、ＩＣ５０＝３．２ｎＭで同様に機能した。抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３はいずれも、それぞれ、ＩＣ５０＝４．２ｎＭおよびＩＣ５０＝４．６ｎＭで、受容体ＥＧＦｒのリン酸化が同程度であり、ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３の抗ＥＧＦｒ　Ｆａｂアームが、野生型抗ＥＧＦｒ抗体と同程度に機能していたことを示す。

【０３５４】

ＢＴ４７４は、ヒト乳房腫瘍細胞株である。ＢＴ４７４細胞は、その表面上にＨｅｒ２（Ｅｒｂ２）およびＨｅｒ３（Ｅｒｂ３）を発現する。抗Ｈｅｒ２抗体は、Ｈｅｒ２のド

メインＩＶに結合し、受容体の内在化および分解を引き起こし得る［Ｗｅｈｒｍａｎ　ＴＳ，ｅｔ　ａｌ．（２００６）ＰＮＡＳ　１０３（５０）：１９０６３－１９０６８およびＢｕｓｃｈｅｎｆｅｌｄｅ　ＣＭ　ｅｔ　ａｌ（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６２（８）：２２４４－２２４７］。この抗体は、したがって、Ｒａｆ／ＭＥＫ　１および２／ＥＲＫ　１および２、ならびにＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路等、下流シグナル伝達経路を遮断する［Ｙａｋｅｓ　ＦＭ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６２（１４）：４１３２－４１４１およびＳｃｏｔｔｉ　ＭＬ　ｅｔ　ａｌ（２００８）Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　Ｔｒｅａｔ　１１１（２）：２４１－５０］。抗Ｈｅｒ２抗体は、ＢＴ４７４細胞において、Ｈｅｒ２リン酸化を減少させないが、基底Ｈｅｒ３リン酸化を阻害する。リガンドをＢＴ４７４細胞の培養培地に添加しない場合、Ｈｅｒ２抗体は、単独で、ＩＣ５０＝２．８ｎＭでＨｅｒ３のリン酸化を遮断した。抗ＥＧＦｒ抗体および抗Ｈｅｒ２抗体の組み合わせは、ＩＣ５０＝５．２ｎＭで同様に機能した。抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３はいずれも、それぞれ、ＩＣ５０＝３．０ｎＭおよびＩＣ５０＝３．６ｎＭで受容体Ｈｅｒ３の基底レベルのリン酸化を阻害し、抗Ｈｅｒ２アームが機能していたことを示す。

【０３５５】

上述の２つの異なる細胞に基づくアッセイからの合わせたデータは、抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３のいずれの鎖も、ＥＧＦｒおよびＨｅｒ２の活性化の阻害に適正に機能することを示唆した。

【０３５６】

実施例１０－Ｈｅｒ２／ＥＧＦＲヘテロ二量体抗体は、腫瘍細胞のＡＤＣＣ殺滅を媒介することができる

Ｎ８７は、高いレベルのＨｅｒ２および中程度のレベルのＥＧＦｒを発現する、ヒト胃腫瘍細胞株である。無関係なヒトＩｇＧ１を対照として使用した。抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３は、それらのＦｃ領域に、ＡＤＣＣ強化置換およびヘテロ二量体化置換が組み込まれている。ＡＤＣＣアッセイを行って、ヘテロ二量体抗体変異体が、それらの特異的抗原に結合し、Ｎ８７細胞の殺滅を誘導するかどうかを試験した。１μｇ／ｍＬで、無関係なヒトＩｇＧ１対照抗体は、３０％のバックグラウンド溶解を有し、滴定により漸減させたときに、用量依存性の応答を示さなかった。変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３のいずれも、１μｇ／ｍＬ濃度でいっそう高い特異的溶解を有し、それぞれ、０．１０ｐＭおよび０．１９ｐＭのＥＣ５０で容量依存性の応答を示した。データは、ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３が、標的ＥＧＦｒおよびＨｅｒ２に結合し、ＮＫ細胞に結合することによって、Ｎ８７細胞の強力な殺滅を誘導し得ることを示す。

【０３５７】

実施例１１－代替的な変異体もまた、正しいＬＣ／ＨＣ対合を導き得る

静電的操行は、他の操行技法と組み合わせることができる。例えば、ＶＨ／ＶＬ接合部の１つの荷電残基対と、システイン残基対との置き換えを検討した。システイン残基対は、ジスルフィド結合を形成するために近接近（４～５．６Å）にあり、したがって、正しく対合したＬＣ／ＨＣを固定させる。変異体２Ｂ０５（表４）に基づく荷電対およびＣｙｓ－Ｃｙｓ対の７つの異なる組み合わせを、哺乳動物２９３６Ｅ細胞に一過性トランスフェクションを行うことによって作製した。上清を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによって分離させた。内部対照Ｃ１１は、１４８～２５０ＫＤａで４つの異なる帯域を示した一方で、変異体２Ｃ０４および２Ｃ０６は、主に全長ＩｇＧ１を産生した；別個のＦａｂアームのＱ１０５Ｃ－Ａ４３ＣおよびＧ４４Ｃ－Ｇ１００Ｃに異なるジスルフィド結合を有する変異体２Ｄ０４が、結合して全長ＩｇＧ１抗体となり、荷電対残基およびシステイン対残基の組み合わせが、正しく対合し、折り畳まれたヘテロ二量体抗体を作製するように協働的に機能し得ることを示す。

【０３５８】

表４：可変領域における荷電対残基およびシステイン対残基の組み合わせにより作製さ

れた変異体。可変領域（ＶＨまたはＶＬ）内の残基は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって番号付けし、一方で定常領域（ＣＨ１またはＣＬ）の残基は、Ｅｕ番号付けシステムにより番号付けする。Ｆｎ３タグを抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＨＣのＮ末端に挿入し、Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６タグを抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＬＣのＣ末端にインフレームで融合させる。

| | 抗 Her2 Ab1 HC(K392D+K409D) | | 抗 Her2 Ab1 LC | | 抗 EGFr Ab2 HC(E356K+D399K) | | 抗 EGFr Ab2 LC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 変異体 | VH1 | $C_H1$ | VL1 | CL | VH2 | $C_H1$ | VL2 | CL |
| 2C04 | Q39C+Q105K | K147D | Q38C+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 2C05 | Q39K+Q105C | K147D | Q38D+A43C | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 2C06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44C+Q105D | K147K | G100C+A43K | S131D |
| 2D01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105C | K147K | G100K+A43C | S131D |
| 2D02 | Q39C+Q105K | K147D | Q38C+A43D | T180K | G44C+Q105D | K147K | G100C+A43K | S131D |
| 2D03 | Q39C+Q105K | K147D | Q38C+A43D | T180K | G44D+Q105C | K147K | G100K+A43C | S131D |
| 2D04 | Q39K+Q105C | K147D | Q38D+A43C | T180K | G44C+Q105D | K147K | G100C+A43K | S131D |

【０３５９】

ＶＨ／ＶＬ接合部の荷電残基対と、大／小残基対との置き換え［Ｚａｍｙａｔｎｉｎ　ＡＡ（１９７２）Ｐｒｏｇ．Ｂｉｏｐｈｏｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：１０７－１２３、Ｃｈｏｔｈｉａ　Ｃ（１９７５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：１－１４］もまた、試験した。大／小残基対は、突起と穴（ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ）の効果を発揮し、静電的操行機序との組み合わせで、正しいＬＣ／ＨＣ対合を導くことができた。大きな残基、例えば、トリプトファン（Ｗ）は、２２７．８Å３の体積、および２５５Å２の露出面積を有し、チロシン（Ｙ）は、１９３．６Å３の体積および２３０Å２の露出面積を有する。小さな残基であるアラニン（Ａ）は、わずか８８．６Å３の体積および１１５Å２の露出面積を有し、一方でセリン（Ｓ）も同様に、８９Å３の体積および１１５Å２の露出面積を有する。ヘテロ二量体抗体変異体２Ｂ０５を基準として一連の６４個の変異体（表５）を作製し、ウエスタンブロットにより試験した。変異体３Ａ０１、３Ａ０２、３Ａ０３、３Ａ０４、３Ａ０５、３Ａ０６、３Ｂ０１、３Ｂ０２、３Ｂ０３、３Ｂ０４、８Ａ０３、および８Ａ０４だけが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによる分離の後、単一の帯域を示し、４つの異なる差が結合して全長ヘテロ二量体抗体となり得ることを示す。他の変異体は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによる分離の後、複数の帯域を有し、これらのＬＣが、それらの同種ＨＣとの対合に関して、何らかの問題を有し得ることを示唆する。

【０３６０】

表５．可変領域における荷電対残基および大／小対残基の組み合わせにより作製された変異体。大きな残基は、本明細書において、トリプトファン（Ｗ）またはチロシン（Ｙ）を表し、一方で小さな残基は、アラニン（Ａ）またはセリン（Ｓ）を表す。可変領域（ＶＨまたはＶＬ）内の残基は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって番号付けし、一方で定常領域（ＣＨ１またはＣＬ）の残基は、Ｅｕ番号付けシステムにより番号付けする。Ｆｎ３タグを抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＨＣのＮ末端に挿入し、Ｆｎ３－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ６タグを抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２　ＬＣのＣ末端にインフレームで融合させる。

| | 抗 Her2 Ab1 HC(K392D+K409D) | | 抗 Her2 Ab1 LC | | 抗 EGFr Ab2 HC(E356K+D399K) | | 抗 EGFr Ab2 LC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 变异体 | VH1 | CH1 | VL1 | CL | VH2 | CH1 | VL2 | CL |
| 3A01 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3A02 | Q39A+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3A03 | Q39S+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3A04 | Q39S+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3A05 | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| **3A06** | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3B01 | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| **3B02** | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3B03 | Q39W+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3B04 | Q39W+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3B05 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3B06 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C01 | Q39K+Q105W | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C02 | Q39K+Q105Y | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C03 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C04 | Q39A+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C05 | Q39S+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3C06 | Q39S+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D01 | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D02 | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D03 | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D04 | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D05 | Q39W+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 3D06 | Q39W+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 4A01 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 4A02 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 4A03 | Q39K+Q105W | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 4A04 | Q39K+Q105Y | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 7A01 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7A02 | Q39A+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7A03 | Q39S+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7A04 | Q39S+Q105K | K147D | Q38Y+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7A05 | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7A06 | Q39K+Q105A | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B01 | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43W | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B02 | Q39K+Q105S | K147D | Q38D+A43Y | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B03 | Q39W+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B04 | Q39W+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B05 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7B06 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38S+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7C01 | Q39K+Q105W | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7C02 | Q39K+Q105Y | K147D | Q38D+A43S | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| 7C03 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100W+A43K | S131D |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7C04 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100Y+A43K | S131D |
| 7C05 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44S+Q105D | K147K | G100W+A43K | S131D |
| 7C06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44S+Q105D | K147K | G100Y+A43K | S131D |
| 7D01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105A | K147K | G100K+A43W | S131D |
| 7D02 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105A | K147K | G100K+A43Y | S131D |
| 7D03 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105S | K147K | G100K+A43W | S131D |
| 7D04 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105S | K147K | G100K+A43Y | S131D |
| 7D05 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44W+Q105D | K147K | G100A+A43K | S131D |
| 7D06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44W+Q105D | K147K | G100S+A43K | S131D |
| 8A01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44Y+Q105D | K147K | G100A+A43K | S131D |
| 8A02 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44Y+Q105D | K147K | G100S+A43K | S131D |
| **8A03** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105W | K147K | G100K+A43S | S131D |
| **8A04** | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105Y | K147K | G100K+A43S | S131D |
| 8A05 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44W+Q105D | K147K | G100A+A43K | S131D |
| 8A06 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44Y+Q105D | K147K | G100A+A43K | S131D |
| 8B01 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44W+Q105D | K147K | G100S+A43K | S131D |
| 8B02 | Q39A+Q105K | K147D | Q38W+A43D | T180K | G44Y+Q105D | K147K | G100S+A43K | S131D |
| 8B03 | Q39W+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100W+A43K | S131D |
| 8B04 | Q39W+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100Y+A43K | S131D |
| 8B05 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100W+A43K | S131D |
| 8B06 | Q39Y+Q105K | K147D | Q38A+A43D | T180K | G44A+Q105D | K147K | G100Y+A43K | S131D |

【０３６１】

実施例１２－タグの不在下でのヘテロ二量体抗体の最適化

抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２変異体２Ｂ０５および５Ｄ０３のタグを除去し、哺乳動物２９３６Ｅ細胞に４つのＤＮＡをトランスフェクトして全長抗体を作製するか、または２つだけのＤＮＡをトランスフェクトするかのいずれかによって試験して、不適正なＬＣ／ＨＣ対合の耐容性について評価した。すべての４つの異なる鎖が存在していた場合、いずれの変異体も、有意な量の半分の抗体とともに、全長抗体を産生した。適正なＬＣ１＋ＨＣ１またはＬＣ２＋ＨＣ２をコードする２つのプラスミドのトランスフェクションもまた、有意な量の半分の抗体とともに、全長ホモ二量体抗体を産生した。ＬＣ２が、それらの非同種ＨＣ１と不適正に対合した場合（ＬＣ２＋ＨＣ１）、少量の産物がゲル中に示されるが、一方でＬＣ１がその非同種ＨＣ２と不適正に対合した場合（ＬＣ１＋ＨＣ２）、産物は全く形成されなかった。発現試験は、抗ＥＧＦｒ抗体のＬＣ２が抗Ｈｅｒ２抗体のＨＣ１に耐容されるが、抗Ｈｅｒ２抗体のＬＣ１は、抗ＥＧＦｒ抗体のＨＣ２に耐容されないことを示す。静電的操行効果を最大化するために、荷電対残基を、同じ位置にであるが、別の極性で導入することによって、一連の新しい変異体（表６）を調べた。ＬＣ／ＨＣ接合部は、互いに相反性であり、同じ極性の残基が接近すると反発するか、逆の極性の残基が近接すると引き合うかのいずれかである。

【０３６２】

変異体Ｖ１５およびＶ２０は、主として、４つの異なる鎖が転写され、翻訳された後に、インタクトな抗体として発現した。適正なＨＣ／ＬＣ（すなわち、ＬＣ１＋ＨＣ１またはＬＣ２＋ＨＣ２）の存在下で、半分の抗体およびホモ二量体全長抗体が産生された。不適正なＨＣ／ＬＣ（例えば、ＬＣ２＋ＨＣ１）が共発現された場合、産物は観察されず、ＬＣ２が、ＨＣ１と適合性でなかったことを示唆した。しかしながら、ＬＣ１は、ＨＣ２に耐容性であり、半分の抗体またはホモ二量体抗体を形成し、Ｖ１５およびＶ２０のＬＣ１が、非同種ＨＣ２と対合して構築された後に分泌され得ることを示す。対照的に、変異体Ｖ２１、Ｖ２３、およびＶ２５は、主として、４つの異なる鎖が転写され、翻訳された後に、インタクトな抗体として発現された。適正な２つの鎖（すなわち、ＬＣ１＋ＨＣ１またはＬＣ２＋ＨＣ２）の存在下で、完全ＩｇＧ抗体が産生され、ＬＣが、それらの同種ＨＣと適合性であることを示唆した。不適正なＬＣ２＋ＨＣ1またはＬＣ１＋ＨＣ２の存在下では、産物は形成されず、ＬＣが、非同種ＨＣに耐容性でなかったことを示唆した。変異体Ｖ２２は、不適正なＬＣが非同種ＨＣとの対合を強制された場合に少量の産物が観察されたため、Ｖ２１、Ｖ２３、およびＶ２５ほど有効ではなかった。質量分析による分析は、変異体Ｖ１２、Ｖ２１、Ｖ２３、およびＶ２５は、４つの異なる鎖（ＬＣ１＋ＨＣ

１＋ＬＣ２＋ＨＣ２）および正しいＬＣ／ＨＣ対合（ＬＣ１＋ＨＣ１およびＬＣ２＋ＨＣ２）の存在を有することを示した。

【０３６３】

表６．相互反発／引き合い機序によりヘテロ二量体ＩｇＧ１としての抗Ｈｅｒ２　Ａｂ１および抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２のＶＨ／ＶＬおよびＣＨ１／ＣＬ接合部におけるアミノ酸変化。抗Ｈｅｒ２　Ａｂ１のＨＣは、ＣＨ２ドメインにＳ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖを有し、ＣＨ３ドメインにＫ３９２Ｄ＋Ｋ４０９Ｄを有し、抗ＥＧＦｒ　Ａｂ２のＨＣは、より低いヒンジ／ＣＨ２ドメインにＬ２３４Ｙ＋Ｋ２０９Ｙ＋Ｙ２９６Ｗを有し、ＣＨ３ドメインにＥ３５６Ｋ＋Ｄ３９９Ｋを有する。可変領域（ＶＨまたはＶＬ）内の残基は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって番号付けし、一方で定常領域（ＣＨ１またはＣＬ）の残基は、Ｅｕ番号付けシステムにより番号付けする。

| | 抗 Her2 Ab1 HC (K392D+K409D) | | 抗 Her2 Ab1 LC | | 抗 EGFr Ab2 HC (E356K+D399K) | | 抗 EGFr Ab2 LC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 変異体 | VH1 | CH1 | VL1 | CL | VH2 | CH1 | VL2 | CL |
| V01 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105D | K147K | G100K+A43K | S131D |
| V02* | Q39K+Q105C | K147D | Q38D+A43C | T180K | G44C+Q105D | K147K | G100C+A43K | S131D |
| V03 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D+A43D | S162K | G44D+Q105D | A141K | G100K+A43K | F116D |
| V04 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D+A43D | S162K | Q105D | A141K | A43K | F116D |
| V05 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D+A43D | S162K | Q39D+Q105D | A141K | Q38K+A43K | F116D |
| V06 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | G44D+Q105D | | G100K+A43K | |
| V07 | Q39K | P171D | Q38D | S162K | Q39D | A141K | Q38K | F116D |
| V08 | Q39K | A141D | Q38D | F116K | Q39D | P171K | Q38K | S162D |
| V09 | Q39K | A141D | Q38D | F116K | Q39D | A141K | Q38K | F116D |
| V10 | Q39K | P171D | Q38D | S162K | Q39D | P171K | Q38K | S162D |
| V11 | Q105K | A141D | A43D | F116K | Q105D | A141K | A43K | F116D |
| V12 | Q105K | P171D | A43D | S162K | Q105D | P171K | A43K | S162D |
| V13 | Q105K | A141D | A43D | F116K | Q105D | P171K | A43K | S162D |
| V14 | Q105K | P171D | A43D | S162K | Q105D | A141K | A43K | F116D |
| V15 | Q39K | S183D | Q38D | S176K | Q39D | S183K | Q38K | S176D |
| V16 | Q105K | S183D | A43D | S176K | Q105D | S183K | A43K | S176D |
| V17 | Q39K | S183D | Q38D | S176K | Q105D | S183K | A43K | S176D |
| V18 | Q105K | S183D | A43D | S176K | Q39D | S183K | Q38K | S176D |
| V19 | Q39K | A141D+S183K | Q38D | F116K+S176D | Q39D | A141K+S183D | Q38K | F116D+S176K |
| V20 | Q39K | A141D+P171K | Q38D | F116K+S162D | Q39D | A141K+P171D | Q38K | F116D+S162K |
| V21 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | Q39D+Q105D | K147K | Q38K+A43K | T180D |
| V22 | Q39K+Q105K | K147D | Q38D+A43D | T180K | Q39D+Q105D | K147K | Q38K+A43K | S131D |
| V23 | Q39K+Q105K | S183D | Q38D+A43D | S176K | Q39D+Q105D | S183K | Q38K+A43K | S176D |
| V24 | Q39K+Q105K | P171D | Q38D+A43D | S162K | Q39D+Q105D | P171K | Q38K+A43K | S162D |
| V25 | G44K+Q105K | S183D | Q100D+A43D | S176K | G44D+Q105D | S183K | G100K+A43K | S176D |

【０３６４】

実施例１３－最適化されたＥＧＦＲ／Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体は、熱安定性を示した

同じ溶媒条件下で、温度に誘導される、抗ＥＧＦｒ　ＩｇＧ２、抗Ｈｅｒ２　ＩｇＧ１

、抗Ｈｅｒ２脱フコシル化ＩｇＧ１、および４つの抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体のアンフォールディングを、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって評価した。各タンパク質のサーモグラムは、２または３つの遷移からなった。野生型抗Ｈｅｒ２抗体は、８２℃にＦａｂ／ＣＨ３のＴｍ、７２℃にＣＨ２のＴｍを示した；抗Ｈｅｒ２抗体を非フコシル化したものは、別個のドメインのＴｍを変化させなかったが、エンタルピーをわずかに減少させた。抗ＥＧＦｒ抗体は、類似の温度に誘導されるアンフォールディングプロファイルを有した。すべての４つの抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体は、すべてがＣＨ２ドメインにＡＤＣＣ強化置換を有し、ＣＨ３ドメインにヘテロ二量体化置換を有したため、わずかに減少した６８℃にＣＨ２／ＣＨ３のＴｍを有した。ＦａｂドメインのＴｍに関しては、変異体Ｖ１２およびＶ２４は、８２℃から７２℃への最も有意な減少を有し、変異体Ｖ２５は、７２℃および７８℃に２つの別個のピークを有し、一方で変異体Ｖ２３は、７８℃に単一のピークを有した。全体として、４つのヘテロ二量体抗体変異体は、良好な熱安定性を示した。データは、荷電対残基をＦａｂ領域に導入するために選択される位置が、６８℃を上回る別個のドメインのＴｍで、インタクトなヘテロ二量体抗体の安定性にある程度影響を及ぼすことを示唆した。

【０３６５】

実施例１４－同じ抗原の２つの異なるエピトープを標的とするヘテロ二量体抗体

同じヘテロ二量体抗体作製アプローチが異なる抗体に適用できることを示すために、ヘテロ二量体ＩｇＧを、２つの異なる抗Ｈｅｒ２抗体から生成した。一方の抗体は、Ｈｅｒ２のドメインＩＶに結合するが、他方は、Ｈｅｒ２のドメインＩＩに結合する。ＶＨ／ＶＬに２つの荷電残基対およびＣＨ１／ＣＬに１つの荷電残基対が相反に導入された変異体Ｖ２３（表６）を、４つのＤＮＡをトランスフェクトして全長抗体を作製するか、２つだけのＤＮＡをトランスフェクトするかのいずれかによって試験して、不適正なＬＣ／ＨＣ対合の耐容性について評価した。抗ＥＧＦｒ×Ｈｅｒヘテロ二量体抗体変異体Ｖ２３と同様に、抗Ｈｅｒ２×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体Ｖ２３は、主として、４つの異なる鎖が翻訳され、構築された後に、インタクトな抗体として発現された。２つの適正な鎖（すなわち、ＬＣ１＋ＨＣ１またはＬＣ２＋ＨＣ２）の存在下で、半分の抗体およびホモ二量体抗体が産生され、ＬＣが、それらの同種ＨＣと適合性であることを示唆した。不適正な鎖であるＬＣ２＋ＨＣ１またはＬＣ１＋ＨＣ２の存在下では、産物は全く形成されず、ＬＣが、非同種ＨＣに耐容性でなかったことを示唆した。

【０３６６】

実施例１５－異なる組み合わせの荷電残基が、ヘテロ二量体抗体発現およびＬＣ／ＨＣ対合に影響を及ぼす

異なる組み合わせの荷電残基が、異なる発現レベルをもたらすか、またはＬＣ／ＨＣ対合に影響を及ぼすかを調べるために、同じ位置に異なる組み合わせで荷電対残基を導入することによって、複数の抗Ｈｅｒ２×Ｈｅｒ２ヘテロ二量体抗体変異体を作製した（表７）。Ｖ２３Ｂは、Ｖ２３Ａのように正しいＬＣ／ＨＣ対合を有したが、発現レベルは、インタクトな抗体または半分の抗体のいずれかの形態で、低下した。しかしながら、Ｖ２３ＣおよびＶ２３Ｄは、ＬＣ／ＨＣの不適正な対合に耐容した。まとめると、この一連のデータは、静電的操行が、正しいＬＣ／ＨＣ対合を導く唯一の要因ではなく、形状相補性（ｓｈａｐｅ　ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔａｒｉｔｙ）等の他の機序が、このプロセスにおいて役割を果たし得ることを示唆した。

【０３６７】

表７．ＶＨ／ＶＬおよびＣＨ１／ＣＬ接合部の同じ位置における異なる荷電対の組み合わせの比較。可変領域（ＶＨまたはＶＬ）内の残基は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって番号付けし、一方で定常領域（ＣＨ１またはＣＬ）の残基は、Ｅｕ番号付けシステムにより番号付けする。抗Ｈｅｒ２　Ａｂ１のＨＣは、ＣＨ２ドメインにＡＤＣＣ強化置換Ｓ２９８Ｔ＋Ａ３３０Ｍ＋Ｋ３３４Ｖを有し、ＣＨ３ドメインにヘテロ二量体化変化Ｋ３９２Ｄ＋Ｋ４０９Ｄを有し、抗Ｈｅｒ２　Ａｂ２のＨＣは、より低いヒンジ／ＣＨ２ドメインにＡＤＣＣ強化置換Ｌ２３４Ｙ＋Ｋ２０９Ｙ＋Ｙ２９６Ｗを有し、ＣＨ３ドメインに

ヘテロ二量体化変化Ｅ３５６Ｋ＋Ｄ３９９Ｋを有する。

| | 抗 Her2 Ab1 HC (K392D+K409D) | | 抗 Her2 Ab1 LC | | 抗 Her2 Ab2 HC (E356K+D399K) | | 抗 Her2 Ab2 LC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 変異体 | VH1 | CH1 | VL1 | CL | VH2 | CH1 | VL2 | CL |
| V23A | Q39K+Q105K | S183D | Q38D+A43D | S176K | Q39D+Q105D | S183K | Q38K+A43K | S176D |
| V23B | Q39D+Q105K | S183K | Q38K+A43D | S176D | Q39K+Q105D | S183D | Q38D+A43K | S176K |
| V23C | Q39K+Q105D | S183K | Q38D+A43K | S176D | Q39D+Q105K | S183D | Q38K+A43D | S176K |
| V23D | Q39D+Q105D | S183K | Q38K+A43K | S176D | Q39K+Q105K | S183D | Q38D+A43D | S176K |

【０３６８】

実施例１６－安定性および粘度研究

本明細書に記載される代表的なヘテロ二量体抗体を含む組成物に関して安定性研究を行い、抗体組成物の特性を、同等のＤＶＤ（二重可変ドメイン）抗体組成物と比較した。抗体試料を、Ａ５２Ｓｕ製剤（すなわち、１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．２）中、４℃または４０℃で、２週間または２カ月の期間、保管した。抗体凝集を、例えば、ＳＥ－ＨＰＬＣ、ＣＥＸ－ＨＰＬＣ、ＨＩＡＣ（肉眼では見えない粒子）、および目視検査を用いて、安定性の代替として測定した。結果を、表８に、モノマーピークの割合（すなわち、１００％は、凝集が観察されなかったことを示す）としてまとめる。

【０３６９】

表８.

| 抗体の種類 | 抗体の名称 | 2週間 4℃でのモノマーピーク% | 2週間 40℃でのモノマーピーク% |
|---|---|---|---|
| ヘテロ Ig | Ab-5-6.147v1 | 99.2 | 95.3 |
| ヘテロ Ig | Ab-23-6.147v1 | 99.6 | 98.0 |
| ヘテロ Ig | Ab-23-6.147v2 | 99.7 | 98.7 |
| ヘテロ Ig | Ab-5-6.37.5v1 | 99.6 | 96.1 |
| ヘテロ Ig | Ab-23-6.37.5v1 | 99.6 | 98.7 |
| DVD | Ab-23-6.147 | 該当なし | 62 |
| DVD | Ab-5-6.147 | 該当なし | 15 |
| DVD | Ab-23-6.37.5 | 該当なし | 89 |
| DVD | Ab-20C3-6.147 | 該当なし | 53 |

【０３７０】

表８に記載される結果によって示されるように、Ａ５２Ｓｕ中のヘテロＩｇ抗体の５％未満が、４０℃で２週間保管した際に、試験したＤＶＤ抗体（Ａ５２Ｓｕ中のＤＶＤ抗体の１１％～８５％が、同様の条件下で保管した際に凝集体を形成した）と比較して凝集した。４℃で２週間保管したとき、試験したヘテロＩｇ抗体のうちの１％未満が、凝集体を形成した。

【０３７１】

別個の研究を行って、粘度と、Ａ５２Ｓｕ製剤中のＤＶＤおよびヘテロ二量体抗体の濃度を変化させること（７０ｍｇ／ｍＬまたは１５０ｍｇ／ｍＬ）との間の関係を調べた。粘度は、円錐／平板形状のレオメーター（ＲＶ　ＩＩＩ＋モデル、Ｂｒｏｏｋｆｉｅｌｄ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　Ｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｍｉｄｄｌｅｂｏｒｏ，Ｍａｓｓ．）を使用して測定した。試料温度は、水浴を使用した測定の間、２５℃に維持した。主軸速度は、１０ｒｐｍの増分で、１５～１２５ｒｐｍの範囲であった。データ収集は、Ｒｈｅｏｃａｌｃ（商標）ソフトウェア、バージョン２．７を用いて行った。Ａ５２Ｓｕ製剤中の試験した種々の抗体の粘度測定値を、以下の表９に提供する。

【０３７２】

表９.

| 抗体の種類 | 抗体の名称 | 70mg/mLでの粘度(cP) | 150mg/mLでの粘度(cP) |
|---|---|---|---|
| ヘテロIg | Ab-5-6.147v1 | 4.5 | 35.7 |
| ヘテロIg | Ab-23-6.147v1 | 3.5 | 15.6 |
| ヘテロIg | Ab-23-6.147v2 | 4.2 | 16.8 |
| ヘテロIg | Ab-5-6.37.5v1 | 3.1 | 51.5 |
| ヘテロIg | Ab-23-6.37.5v1 | 2.1 | 13.7 |
| DVD | Ab-23-6.147 | 4.3 | 94 |
| DVD | Ab-5-6.147 | 4.4 | 65 |
| DVD | Ab-23-6.37.5 | 4.6 | 43 |
| DVD | Ab-20C3-6.147 | 4.6 | 15 |

【０３７３】

表９に示されるように、試験したヘテロ二量体抗体またはＤＶＤ抗体（７０ｍｇ／ｍＬ）のうちの１つを含む組成物のそれぞれの粘度は、６ｃＰ未満であった。ヘテロ二量体抗体が、１５０ｍｇ／ｍＬの濃度で組成物中に存在する場合、組成物のうちの３つが、１７ｃＰ未満の粘度を有した。ヘテロ二量体抗体製剤とは対照的に、ＤＶＤ抗体が１５０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する場合、１つのＤＶＤ抗体製剤だけが、１６ｃＰ未満の粘度を有した。

【０３７４】

前述の実施例は、本明細書に記載されるヘテロ二量体抗体が、試験した二特異性ＤＶＤ抗体よりも安定である（すなわち、組成物中、抗体の１％未満が、４℃で２週間保管した場合に、凝集体を形成する）ことを示す。このようなヘテロ二量体抗体を含む製剤は、好ましい粘度要件を満たし、したがって、大規模な製造に特に好適である。

【０３７５】

実施例１７－スクレロスチンおよびＤＫＫ１を標的とするヘテロ二量体抗体は、霊長類において骨同化作用を促進する。

スクレロスチンおよびＤＫＫ１を標的とするヘテロ二量体抗体は、霊長類において骨同化作用を促進することを実証するために、９週間のＰＫ／ＰＤ研究を、年齢が４～６歳の４０匹のナイーブな雌性カニクイザル行った動物を、それぞれの群が異なるヘテロ二量体抗体を投与される、３つの群に分けた。

【０３７６】

合計３回の用量を、各群の動物に２週間毎に投与した（２５ｍｇ／ｋｇの静脈内用量を、１日目および１５日目に投与した後、１回の２５ｍｇ／ｋｇの皮下用量を４３日目に投与した）。血液を、研究過程にわたり数回採取した。血清を、遠心沈殿させ、アリコートに分け、後続の分析のために凍結させた。対照には、未処置動物、ならびに単一抗スクレロスチン抗体（Ａｂ－５）、またはスクレロスチンおよびＤＫＫ１を対象とする中和ヘテロ二量体抗体（バージョン１）、またはスクレロスチンおよびＤＫＫ１を対象とする二重可変ドメイン（ＤＶＤ抗体）（６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３）のいずれかで処置した動物が含まれた。すべての動物は、血清骨形成マーカー測定値（ＣＩＣＰ、ＢＳＡＰ、およびオステオカルシン）ならびに体重を使用して、ベースラインで無作為化した。

【０３７７】

最初の４０匹の動物の血清試料を、骨代謝回転マーカー（ＢＴＭ）評価の予備スクリーニングのために採取した。２３匹の動物を、バランスのとれたバイオマーカープロファイルおよび体重に基づいて選択し、治療群に割り当てた。ベースライン（ＢＬ）の予備スクリーニング時点で、群間ですべてのＢＴＭ濃度に有意な差はなかった（表１０）。

表１０．ＢＬ予備スクリーニングでの血清ＢＴＭタンパク質濃度

| BL予備スクリーニング | TRACP 5b(U/L) | OC (ng/ml) | BAP (U/L) | C1CP(ng/ml) | DKK1(pg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| すべて n=40 | 8.3±0.6 | 24.9±1.4 | 221.5±13.0 | 90.5±8.1 | 907.5±42.3 |
| 対照 n=2 | 7.0±2.6 | 28.7±12.0 | 167.1±41.9 | 83.9±53.0 | 969.3±456.3 |
| 1/Ab-5 n=3 | 6.9±0.6 | 23.9±5.6 | 216.8±64.9 | 78.6±13.7 | 1004.8±157.0 |
| 2/6.147-AbL-Ab23、n=4 | 11.1±4.6 | 21.0±3.3 | 219.1±30.4 | 83.2±22.6 | 949.6±153.4 |
| 3/Ab-23-6.37.5.v.1 n=3 | 8.1±1.8 | 25.0±2.7 | 202.8±36.2 | 73.6±29.8 | 837.6±55.2 |
| 4/Ab-5-6.37.5.v.1 n=4 | 5.5±0.2 | 22.6±2.3 | 179.5±22.8 | 90.7±20.6 | 790.9±75.9 |
| 5/Ab-5-6.147.v.1 n=3 | 7.2±1.1 | 25.6±2.4 | 264.8±62.4 | 64.4±9.0 | 895.5±173.0 |

【０３７８】

絶対血清酒石酸塩耐性酸ホスファターゼ５ｂ（ＴＲＡＣＰ　５ｂ）データを、表１１に示す。ＴＲＡＣＰは、骨を吸収する破骨細胞によって多量に発現される酵素である。ＴＲＡＣＰ　５ｂは、破骨細胞数および骨吸収のマーカーとして有用である。Ｈａｌｌｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｌａｂ．，５２：４９９－５０９，２００６を参照されたく、この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。投薬前と比べたＴＲＡＣＰ　５ｂの変化パーセントの分析（表１１および図９）は、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３およびヘテロ二量体抗体Ａｂ－２３－６．３７．５）の処置が、５日目および７日目に、ＴＲＡＣＰ　５ｂの有意な減少（Ａｂ－５処置動物と比較して）をもたらしたことを明らかにした。

表１１．血清ＴＲＡＣＰ　５ｂ（１日目の投薬前からの変化％）

| 研究における時点 | TRACP 5b(1日目の投薬前からの変化%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 | 群2 Ab-2 n=4 | 群3 Ab-23-6.37.5 n=3 | 群4 Ab-5-6.37.5 n=4 | 群5 Ab-5-6.147 n=3 |
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| 5日目 | 該当なし | -4.2±5.0 | -19.1±1.7** | -16.7±1.8* | -5.0±0.7 | -11.4±2.2 |
| 7日目 | 該当なし | -8.8±2.9 | -25.3±4.1* | -25.9±2.2* | -8.4±3.5 | -17.5±4.3 |
| 14日目 | 1.2±10.2 | -19.5±11.1 | -33.6±3.2 | -38.0±7.4 | -15.8±2.2 | -25.5±10.2 |
| 21日目 | 該当なし | -29.0±8.3 | -39.9±3.1 | -39.8±11.4 | -24.8±2.6 | -24.6±10.3 |
| 28日目 | 6.3±10.0 | -24.2±7.7 | -33.5±1.9 | -32.0±17.1 | -27.0±5.1 | -26.1±11.9 |
| 36日目 | 該当なし | -19.3±4.2 | -7.8±3.7 | -13.0±15.3 | -13.4±5.6 | -9.9±5.7 |
| 43日目 | 該当なし | -10.1±6.3 | -6.9±3.5 | -2.9±15.1 | -8.1±6.1 | -9.9±8.3 |
| 45日目 | 該当なし | -20.6±5.6 | -20.7±3.1 | -15.0±14.4 | -3.5±4.8 | -18.9±6.1 |
| 50日目 | 該当なし | -20.7±2.3 | -37.9±2.7 | -32.4±12.0 | -4.3±6.7 | -27.1±4.0 |
| 57日目 | 8.0±20.0 | -24.1±1.3 | -30.0±5.1 | -36.7±9.4 | -9.9±5.4 | -23.7±6.5 |
| 64日目 | -5.2±13.4 | -25.6±3.1 | -18.2±8.1 | -22.4±9.4 | -6.7±5.8 | -24.0±6.9 |

*$p$＜０．０５、**$p$＜０．０１、群１と比較。

【０３７９】

ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．１４７の血清オステオカルシン（ＯＣ）濃度（表１２および図１０）は、研究の３６、４３、および５７日目で、Ａｂ－５処置動物と比較して有意に高かった。投薬前と比べた血清ＯＣの変化の分析（表１０および図９）は、ヘテロ二量体抗体Ａｂ－２３－６．３７．５処置が、２１日目～４５日目の試験時点に、この検体の有意な上昇をもたらしたことを明らかにした。ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．１４７での処置は、２１日目～４３日目ならびに５０日目および５７日目に、Ａｂ－５－６．１４７処置動物と比較して、ＯＣの有意な増加をもたらした。

表１２．血清ＯＣ（１日目の投薬前からの変化%）

| 研究における時点 | OC(1日目の投薬前からの変化%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 | 群2 Ab-2 n=4 | 群3 Ab-14-6.37.5 n=3 | 群4 Ab-5-6.37.5 n=4 | 群5 Ab-5-6.147 n=3 |
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| 5日目 | 該当なし | 3.1±0.5 | -9.2±11.8 | 5.4±27.3 | 4.0±21.5 | 28.6±17.5 |
| 7日目 | 該当なし | 59.9±36.1 | 71.8±27.6 | 24.2±32.1 | 26.7±24.5 | 38.7±14.2 |
| 14日目 | 10.2±11.8 | 83.0±21.4 | 57.5±5.3 | 146.0±6.5 | 143.7±22 | 156.2±35.4 |
| 21日目 | 該当なし | 76.8±8.0 | 127±21.8 | 152.1±21.8 | 178.5±25.6* | 193.4±23.7* |
| 28日目 | 31.2±3.4 | 78.9±25.2 | 49.5±4.5 | 99.3±34.7 | 195.9±27.0* | 184.5±20.2* |
| 36日目 | 該当なし | 46.3±37.4 | 9.3±7.8 | 39.2±21.2 | 175.5±19.2** | 158.2±19.3* |
| 43日目 | 該当なし | -5.0±7.0 | -7.9±8.1 | 23.0±16.3 | 83.7±10.4*** | 91.9±10.9*** |
| 45日目 | 該当なし | -7.2±20.5 | -18.0±6.3 | -11.9±11.7 | 48.2±14.1* | 44.8±2.2 |
| 50日目 | 該当なし | 10.1±13.4 | 43.9±11.9 | 57.1±20.3 | 62.6±25.7 | 124.1±6.8** |
| 57日目 | 39.9±31.8 | 23.3±20.8 | 12.0±3.4 | 34.4±26.6 | 72.4±20.2 | 136.7±21.1** |
| 64日目 | 46.2±49.2 | 3.6±20.0 | -19.4±12.0 | 2.6±16.8 | 66.9±8.9 | 65.1±16.7 |

*$p$＜０．０５、**$p$＜０．０１、***$p$＜０．００１、群１と比較。

【０３８０】

投薬前に対する血清骨アルカリホスファターゼ（ＢＡＰ）の変化パーセントを分析し、結果を、表１３および図１１に示す。結果は、ＢＡＰが、５日目に、ヘテロ二量体抗体Ａｂ－２３－６．３７．５処置動物において有意に上昇した（Ａｂ－５群と対比）ことを示した。

表１３．血清ＢＡＰ（１日目の投薬前からの変化%）

| 研究における時点 | BAP(1日目の投薬前からの変化%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 | 群2 Ab-2 n=4 | 群3 Ab-23-6.37.5 n=3 | 群4 Ab-5-6.37.5 n=4 | 群5 Ab-5-6.147 n=3 |
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| 5日目 | 該当なし | 3.5±0.8 | 35.2±6.4 | 47.9±17.2* | 15.1±4.6 | 38.5±10.3 |
| 7日目 | 該当なし | 26.6±9.6 | 60.7±9.3 | 67.7±16.7 | 24.2±6.3 | 60.6±11.0 |
| 14日目 | -15.9±2.1*** | 125.2±23.1 | 89.4±8.0 | 153.6±20.6 | 77.3±9.8 | 129.8±11.8 |
| 21日目 | 該当なし | 118.7±24.4 | 123.7±20.2 | 158.1±21.3 | 110.2±16.5 | 165.7±8.1 |
| 28日目 | -14.3±4.0* | 109.2±15.9 | 82.2±14.5 | 133.4±26.0 | 119.8±27.2 | 136.8±13.4 |
| 36日目 | 該当なし | 72.5±30.9 | 27.5±10.1 | 34.6±17.8 | 83.7±34.5 | 80.0±23.9 |
| 43日目 | 該当なし | 10.4±19.7 | -8.6±8.0 | 6.6±9.7 | 41.6±24.7 | 25.5±10.7 |
| 45日目 | 該当なし | -7.6±17.1 | -9.9±7.4 | 3.7±10.5 | 43.7±25.9 | 28.4±15.1 |
| 50日目 | 該当なし | 48.7±14.7 | 90.4±19.1 | 121.3±21.6 | 80.9±20.5 | 110.5±7.2 |
| 57日目 | -11.0±20.2 | 67.3±14.1 | 59.5±14.3 | 108.0±35.9 | 103.9±21.6 | 110.7±13.5 |
| 64日目 | -2.3±28.5 | 46.4±16.3 | 7.5±7.9 | 35.2±26.3 | 66.9±22.5 | 62.3±11.8 |

*$p$＜０．０５、***$p$＜０．００１、群１と比較。

【０３８１】

血清Ｃ１ＣＰデータを、表１４に提示する。ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３処置群は、１４日目に、Ａｂ－５処置動物と比較して有意に低い投薬前に対するＣ１ＣＰの変化パーセント（表１４および図１２）を有した。

表１４．血清Ｃ１ＣＰ（１日目の投薬前からの変化％）

| 研究における時点 | C1CP(1日目の投薬前からの変化%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 | 群2 Ab-2 n=4 | 群3 Ab-23-6.37.5 n=3 | 群4 Ab-5-6.37.5 n=4 | 群5 Ab-5-6.147 n=3 |
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| 5日目 | 該当なし | 140.9±31.9 | 197.1±67.6 | 246.0±119.2 | 59.6±42.9 | 224.6±67.5 |
| 7日目 | 該当なし | 392.0±87.6 | 439.3±168.8 | 569.2±263.6 | 218.2±64.2 | 317.5±72.1 |
| 14日目 | 49.8±7.2* | 386.9±80.9 | 96.0±27.4* | 346.3±70.7 | 377.1±103.8 | 332.3±26.8 |
| 21日目 | 該当なし | 298.7±33 | 515.2±129.3 | 609.6±135.7 | 450.3±72.5 | 397.5±11.2 |
| 28日目 | 80.9±15.7 | 276.8±76.7 | 103.4±21.7 | 267.2±130.4 | 519.3±122.3 | 433.0±71.1 |
| 36日目 | 該当なし | 46.6±74.4 | -49.0±7.0 | -44.9±8.9 | 208.6±64.5 | 54.4±32.6 |
| 43日目 | 該当なし | -55.5±5.1 | -60.1±8.8 | -54.3±11.3 | 5.0±38.0 | -29.0±8.1 |
| 45日目 | 該当なし | 31.7±28.8 | 63.0±18.1 | 52.8±29.0 | 50.5±35.3 | 105.5±34.7 |
| 50日目 | 該当なし | 103.7±33.6 | 248.9±98.5 | 357.1±153.6 | 130.4±68.1 | 219.1±24.3 |
| 57日目 | 38.2±42.5 | 36.4±19.5 | -30.9±12.4 | 7.5±64.3 | 49.3±45.1 | 47.4±1.4 |
| 64日目 | 48.4±62.8 | -24.8±25.4 | -59.4±4.2 | -60.7±9.9 | -20.3±10.6 | -28.1±12.5 |

*$p<0.05$、群１と比較。

【０３８２】

絶対血清ＤＫＫ１濃度ならびに投与前と比べた変化パーセント（表１７）は、測定したすべての時点にわたり、対照とＡｂ－５処置動物との間で有意な差はなかった。

表１７．研究の期間にわたるナイーブ雌性カニクイザルの血清中のＤＫＫ１濃度および１日目の投薬前からの変化％

| 研究における時点 | DKK1(pg/ml) | | 研究における時点 | DKK1(1日目の投薬前からの変化%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 | | 群0 対照 n=2 | 群1 Ab-5 n=3 |
| | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 | | 平均±標準誤差 | 平均±標準誤差 |
| 1日目の投薬前 | 1263.7±366.9 | 1532.5±140.8 | | | |
| 5日目 | 該当なし | 1088.9±117.4 | 5日目 | 該当なし | -29.2±1.8 |
| 7日目 | 該当なし | 1080.5±136.9 | 7日目 | 該当なし | -29.9±2.5 |
| 14日目 | 1077.5±452.9 | 1239.8±142.5 | 14日目 | 0.8±25.5 | -19.3±5.1 |
| 21日目 | 該当なし | 1288.1±47.1 | 21日目 | 該当なし | -14.8±6.8 |
| 28日目 | 1199.3±430.0 | 1438.3±23.3 | 28日目 | 17.8±37.6 | -4.8±7.3 |
| 36日目 | 該当なし | 1769.4±32.3 | 36日目 | 該当なし | 17.6±11.9 |
| 43日目 | 該当なし | 1895.6±52.8 | 43日目 | 該当なし | 25.8±12.5 |
| 45日目 | 該当なし | 1607.6±99.8 | 45日目 | 該当なし | 7.7±15.5 |
| 50日目 | 該当なし | 1523.5±95.9 | 50日目 | 該当なし | 1.4±13.1 |
| 57日目 | 1370.6±427.0 | 1607.2±91 | 57日目 | 39.5±51.1 | 7.6±15.6 |
| 64日目 | 1353.2±440.0 | 1826.1±146.9 | 64日目 | 36.4±48.1 | 21.9±18.4 |

【０３８３】

要約すると、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３処置は、５日目（ｐ＜０．０１）および７日目（ｐ＜０．０５）に、Ａｂ－５処置と比較して、血清ＴＲＡＣＰ　５ｂを一過的に低下させた（投薬前と比べた変化パーセントで）。ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３処置群におけるＣ１ＣＰ（投薬前と比べた変化パーセントで）は、１４日目（ｐ＜０．０５）に、Ａｂ－５処置動物と比較して有意に低減した。血清ＯＣおよびＢＡＰ濃度は、ＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３処置によって影響を受けなかった。

【０３８４】

ヘテロ二量体抗体Ａｂ－２３－６．３７．５処置もまた、５日目および７日目（ｐ＜０．０５）に、Ａｂ－５処置単独と比較して、血清ＴＲＡＣＰ　５ｂ（投薬前と比べた変化パーセントで）を有意に減少させた。ヘテロ二量体抗体Ａｂ－２３－６．３７．５で処置

した動物は、５日目（ｐ＜０．０５）に、Ａｂ－５処置群と比較して、有意に高いＢＡＰ（投薬前と比べた変化パーセント）を示したが、ＯＣおよびＣ１ＣＰのレベルに有意な差は見られなかった。

【０３８５】

評価したいずれの時点においても、Ａｂ－５処置単独と比較して、ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．３７．５での処置に、血清ＴＲＡＰ５ｂ、ＢＡＰ、またはＣＩＣＰに対する効果はなかった。しかしながら、ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．３７．５処置群におけるＯＣ（投薬前と比べた変化パーセントで）は、２１日目（ｐ＜０．０５）、２８日目（ｐ＜０．０５）、３６日目（ｐ＜０．０１）、４３日目（ｐ＜０．００１）、および４５日目（ｐ＜０．０５）に、Ａｂ－５処置群と比較して有意に増加した。

【０３８６】

同様に、ＴＲＡＰＣＰ　５ｂ、ＢＡＰ、およびＣ１ＣＰの濃度は、Ａｂ－５処置単独と対比して、ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．１４７処置によって影響を受けなかった。この群の血清ＯＣ濃度は、３６日目（ｐ＜０．０５）、４３日目（ｐ＜０．０５）、および５７日目（ｐ＜０．０１）に、Ａｂ－５処置群と比較して有意に上昇した。Ａｂ－５－６．１４７処置群における投薬前と比べた変化パーセントでの血清ＯＣは、２１日目、２８日目、３６日目（それぞれｐ＜０．０５）、４３日目（ｐ＜０．００１）、５０日目、および５７日目（それぞれｐ＜０．０１）に、Ａｂ－５処置群と比較して有意に増加した。

【０３８７】

ＤＫＫ１濃度は、評価したすべての時点にわたり、対照とＡｂ－５処置群との間で有意な差はなかった。

【０３８８】

この実施例で提供されたこれらのデータは、ＤＫＫ１およびスクレロスチンを対象とするヘテロ二量体抗体が、親抗体であるＡｂ、Ａｂ－５に類似するＩｇＧ様の薬物動態特性を有し、カニクイザルにおける投与後に特異的な骨形成マーカーの優れた増加をもたらしたことを示す。非ヒト霊長類および齧歯類において観察されたＤＫＫ１およびスクレロスチン阻害は、骨障害の治療に対するヘテロ二量体抗体の治療有効性を強調する。

【０３８９】

実施例１８－ヘテロ二量体抗体の薬物動態特性

３つのヘテロ二量体抗体（Ａｂ２３－６．３７．５　ｖ．１、Ａｂ－５－６．３７．５　ｖ．１、およびＡｂ－５－６．１４７　ｖ．１）の薬物動態（ＰＫ）プロファイルを、この研究で特徴付けた。

【０３９０】

カニクイザルを、１日目および１５日目に静脈内投与ならびに４３日目に皮下投与によって、２５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－５（群１）、３４．４ｍｇ／ｋｇのＤＶＤ抗体６．１４７－ＡｂＬ－Ａｂ２３（群２）、またはそれぞれ２５ｍｇ／ｋｇのＡｂ－２３－６．３７．５．ｖ．１（群３）、Ａｂ－５－６．３７．５．ｖ．１（群４）、もしくはＡｂ－５－６．１４７．ｖ．１（群５）を受容する５つの治療群に分けた。６６２個の血清試料（６４日にわたる）研究の１日目に開始するＰＫ分析のために採取し、試料は、研究の１５日目および４３日目にも採取した。

【０３９１】

血清試料を、実施例７で上述されるように、４つの異なる酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）（スクレロスチン／ＤＫＫ１アッセイ、スクレロスチン／Ｆｃアッセイ、ＤＫＫ１／スクレロスチアッセイ、およびＦＣ／ＦＣ架橋ＥＬＩＳＡアッセイ）を用いて分析した。インタクトなＡｂ－５濃度に関して、群１からの血清試料を、Ａｂ－５に対する抗イディオタイプ抗体対を用いてＥＬＩＳＡにより分析した。群２からの血清試料を、２つの異なるＥＬＩＳＡを用いて分析した：インタクトな抗ＤＫＫ１　Ｍａｂを測定するもの、および総Ｍａｂ濃度を測定するもの。群３、４、および５の血清試料を、３つの異なるＥＬＩＳＡを用いて分析した：インタクトな抗ＤＫＫ１　Ｍａｂを測定するもの、インタクトな抗スクレロスチン（ＳＯＳＴ）Ｍａｂを測定するもの、および総Ｍａｂ濃度を測

定するもの。インタクトな（ＤＫＫ１）血清Ｍａｂ濃度を、ＥＬＩＳＡによって判定し、ここで、組み換えヒトＤＫＫ１および抗ヒトＦｃが、それぞれ、捕捉および検出試薬として使用される。インタクトな（ＳＯＳＴ）血清Ｍａｂ濃度を、ＥＬＩＳＡによって判定し、ここで、組み換えヒトＳＯＳＴおよび抗ヒトＦｃが、それぞれ、捕捉および検出試薬として使用される。さらに、総血清Ｍａｂ濃度を、ＥＬＩＳＡによって、ここで、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体対が、捕捉および検出試薬として使用される。

【０３９２】

３つのヘテロ二量体抗体および陽性対照のＰＫプロファイルを、図１３に示し、最初の静脈内投薬データから導出したＰＫパラメータを、以下の表１８に要約する。

表１８．カニクイザルにおける最初の静脈内投薬間隔からのＡｂ２３－６．３７．５　ｖ．１、Ａｂ－５－６．３７．５　ｖ．１、およびＡｂ－５－６．１４７　ｖ．１のヘテロＩｇ候補のＰＫパラメータ推定。

| 化合物 (インタクト) | 用量 (mg/kg) | $T_{1/2}$ (日数) | C0_uM (uM) | AUC0_inf (日数*uM) | CL_pred (mL/時間/kg) | F (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ab-5 | 25 | 4.6 | 4.24 | 18.0 | 0.394 | 63 |
| DVD 6.147-AbL-Ab23 | 34.4 | 1.5 | 3.68 | 8.3 | 0.869 | 78 |
| Ab-23-6.37.5.v.1 | 25 | 3.2 | 3.49 | 12.6 | 0.553 | 83 |
| Ab-5-6.37.5.v.1 | 25 | 5.5 | 3.91 | 18.4 | 0.379 | 78 |
| Ab-5-6.147.v.1 | 25 | 3.5 | 4.0 | 13.8 | 0.527 | 78 |

【０３９３】

この研究では５匹のサルが、抗薬物抗体（ＡＤＡ）と異なるＭａｂとの結合を生じて薬物曝露を減少させ、これらの対象は、したがって、分析から除外した。ヘテロ二量体抗体Ａｂ－５－６．３７．５　ｖ．１、Ａｂ－５－６．１４７　ｖ．１、およびＡｂ２３－６．３７．５　ｖ．１の最終半減期（$T_{1/2}$）は、それぞれ、５．５、３．５、および３．２日間であると推定した。Ａｂ－５－６．３７．５　ｖ．１の曝露は、Ａｂ－５と同程度であった（ＡＵＣ　０－Ｉｎｆが、１８．０日＊μＭと比較して１８．４日＊μＭ）が、他の２つのヘテロＩｇは、Ａｂ－５と比較して２５～３０％低い曝露を有した。３つのヘテロＩｇのバイオアベイラビリティ（Ｆ）は、７８～８３％の範囲で同程度であった。

【０３９４】

実施例１９－追加のインビボ実験

３週間の研究を、１０週齢のインタクトなマウスに行って、親抗体であるＤＫＫ１　Ａｂ６．３７．５およびＡｂ－５のそれぞれ、ならびに２つの親抗体の組み合わせ（ＩｇＧ）に対して、ヘテロ二量体抗体（Ａｂ－５－６．３７．５．ｖ．１）の骨同化活性を比較した（１群当たりｎ＝６）。ヘテロ二量体抗体が、スクレロスチンおよびＤＫＫ１の一価阻害剤であると想定して、２つの用量のヘテロ二量体抗体（すなわち、２５ｍｇ／ｋｇおよび１２．５ｍｇ／ｋｇ）を、対照として使用した二価分子と比べて生体活性に対する価数の影響を測定するために評価した。

【０３９５】

単剤治療（Ａｂ－５およびＤＫＫ１　Ａｂ６．３７．５を別個に投与する）およびヘテロ二量体抗体治療を、それぞれ、１２．５ｍｇ／ｋｇで１週間に２回皮下で施し、ＤＫＫ１　Ａｂ（６．３７．５、１２．５ｍｇ／ｋｇ）に加えて抗スクレロスチンＡｂ（Ａｂ－５、１２．５ｍｇ／ｋｇ）を、対照コホートに同様に投与した。加えて、ヘテロ二量体抗体を、この研究で使用される二価対照に対して価数を補正するために、２５ｍｇ／ｋｇで投薬した。骨ミネラル密度を、１週間に１回ＤＸＡによって測定した。

【０３９６】

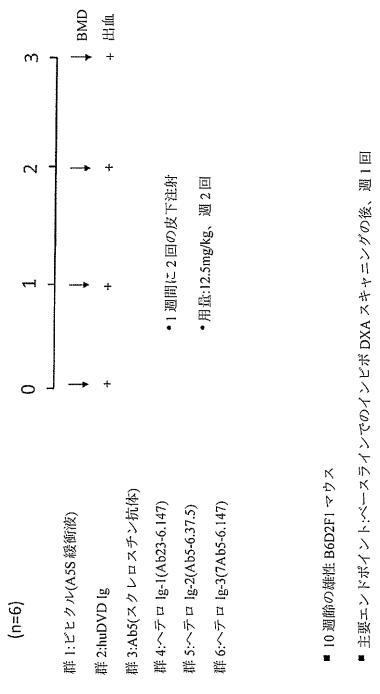
図１４に図示される結果は、ヘテロ二量体抗体によって媒介される腰椎骨量の増加が、いずれの単剤治療よりも有意に優れていたことを示す。骨同化活性は、より低用量のヘテ

ロ二量体抗体が、組み合わせ治療により処置したマウスで測定されたものに対して有意な差がなかったことを示す。より高用量のヘテロ二量体抗体は、組み合わせ治療よりもわずかに優れていたが、この差は有意ではなかった。類似の骨量増加が、大腿骨にも観察された（データは示されない）。

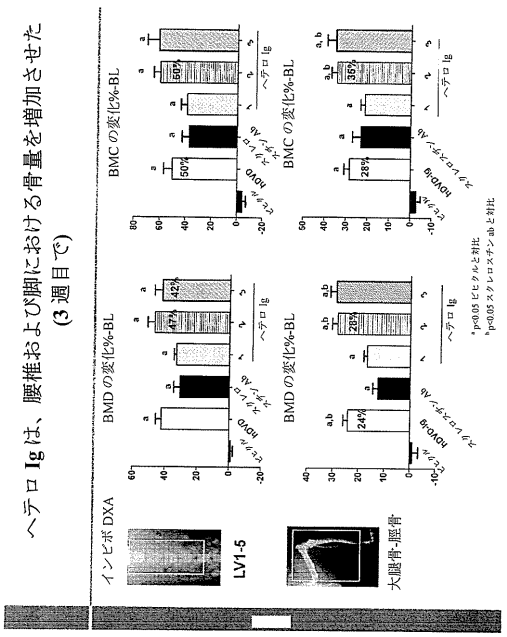
【０３９７】

齧歯類において観察された同時の二重ＤＫＫ１およびスクレロスチン阻害は、抗アクレロスチン（ａｃｌｅｒｏｓｔｉｎ）抗体またはＤＫＫ１抗体単独での処置と比較して、骨障害の治療に対するヘテロ二量体抗体の治療有効性を強調する。

【図１】




【図２】



【図３－１】

図３Ａ

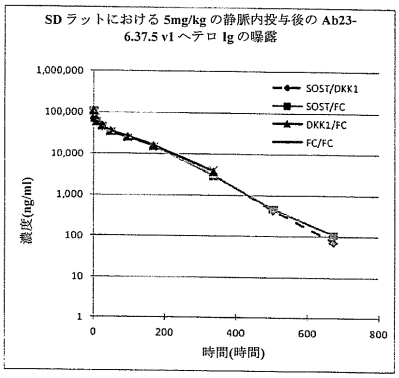
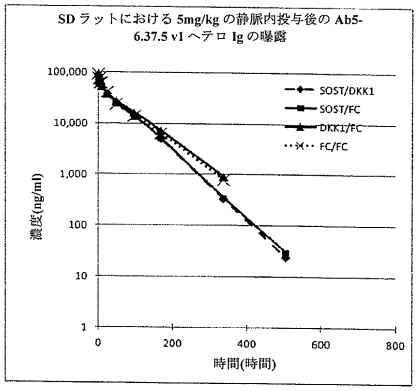



図３Ｂ




【図３－２】

図３Ｃ

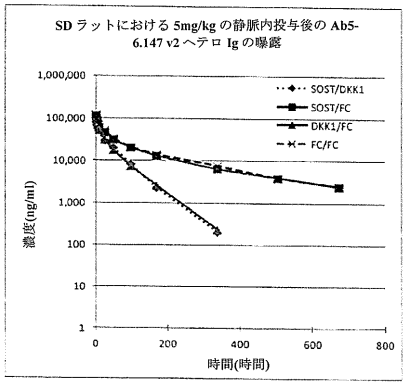
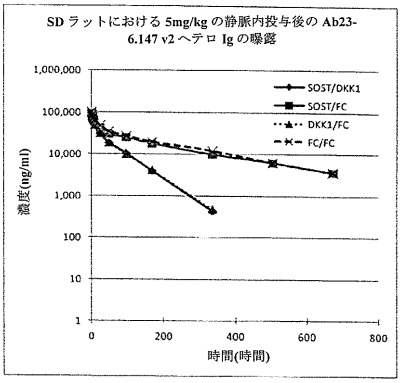
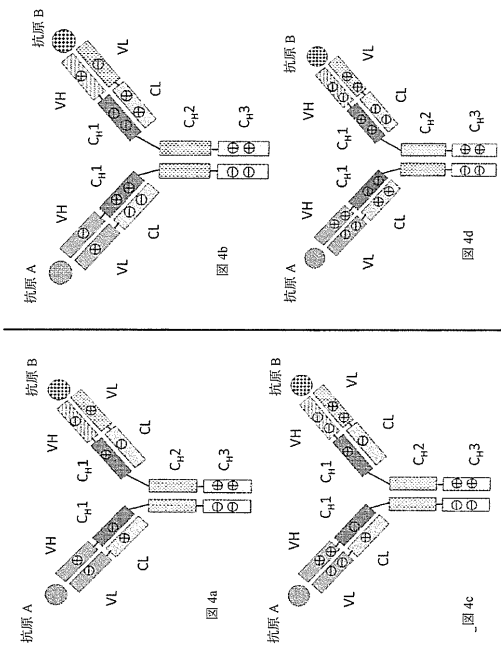


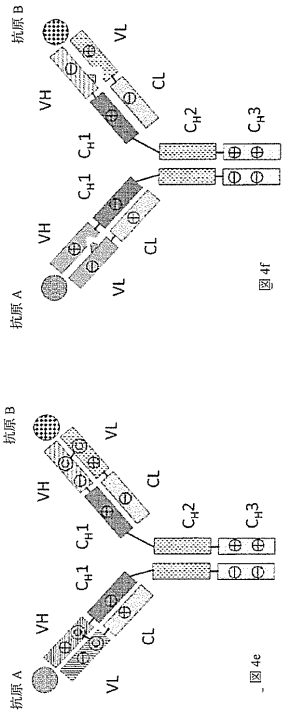

図３Ｄ



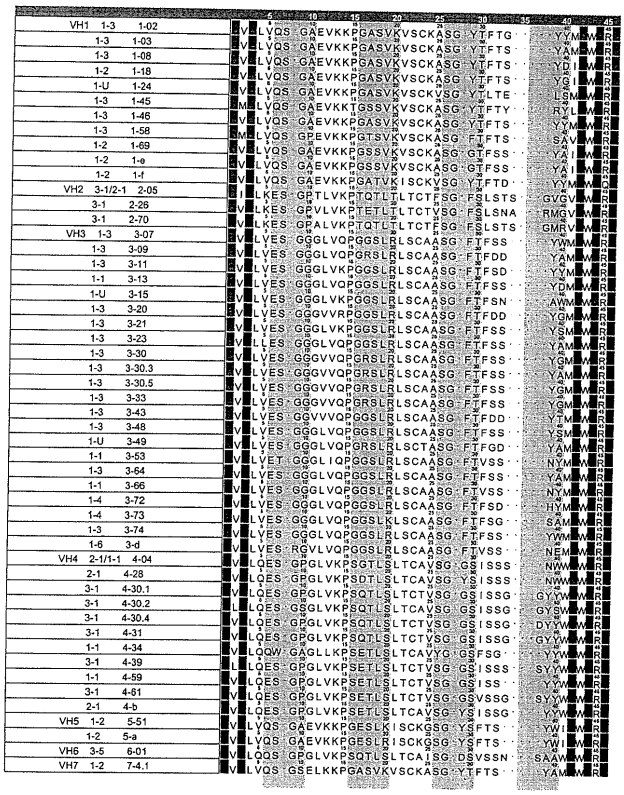

【図４－１】



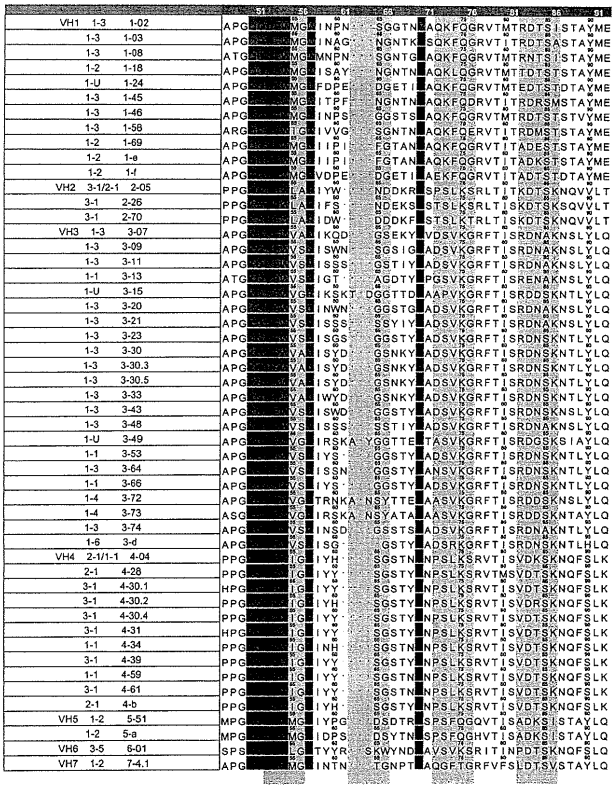

【図４－２】



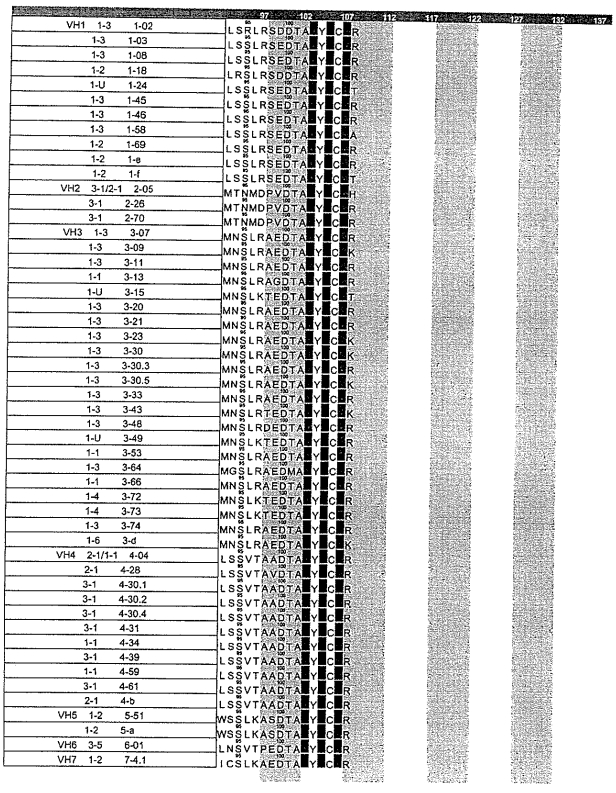
【図５Ａ－１】



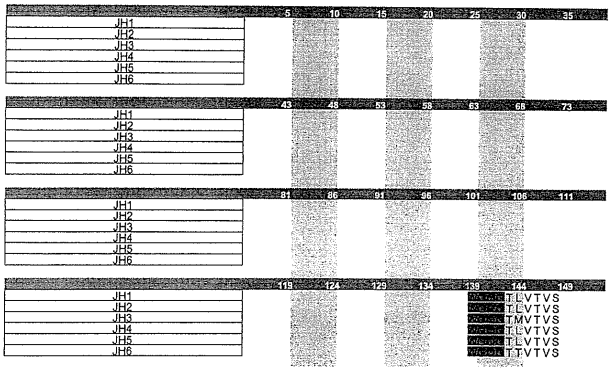
【図５Ａ－２】



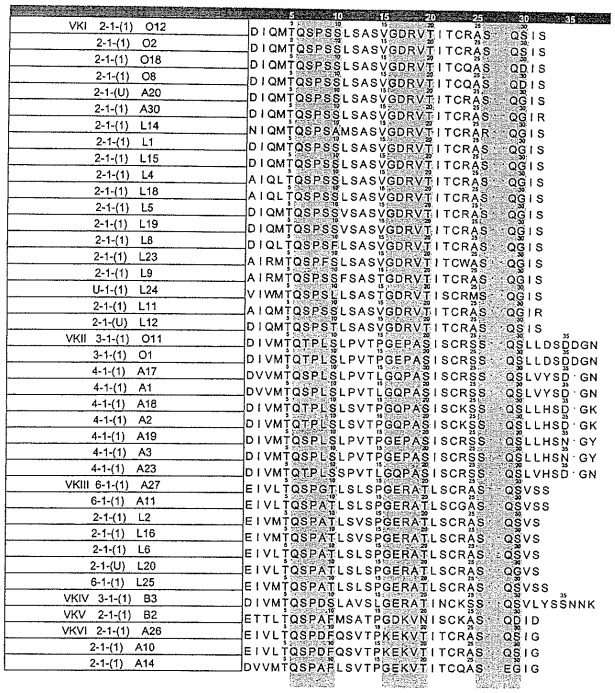
【図５Ａ－３】



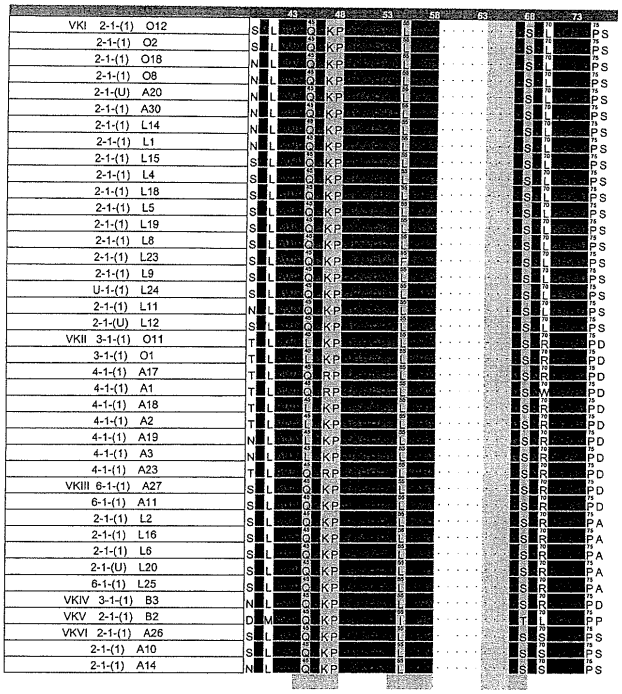
【図５Ｂ】



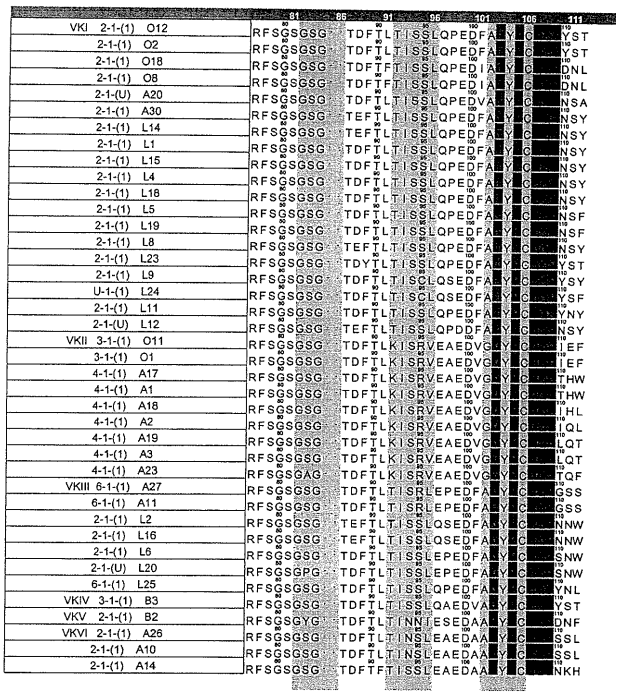
【図６Ａ－１】



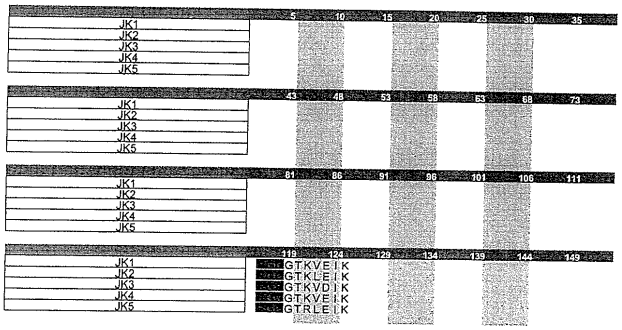
【図６Ａ－２】



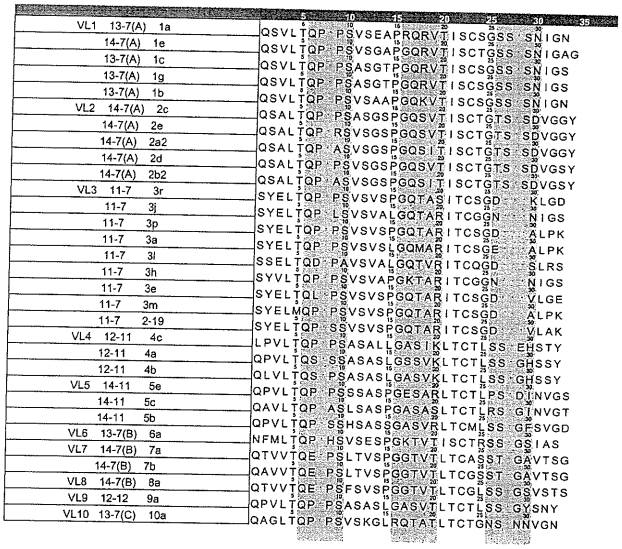
【図６Ａ－３】



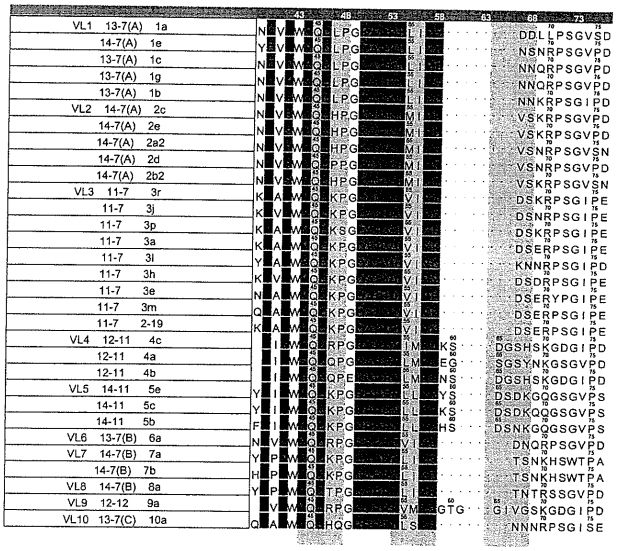
【図６Ｂ】



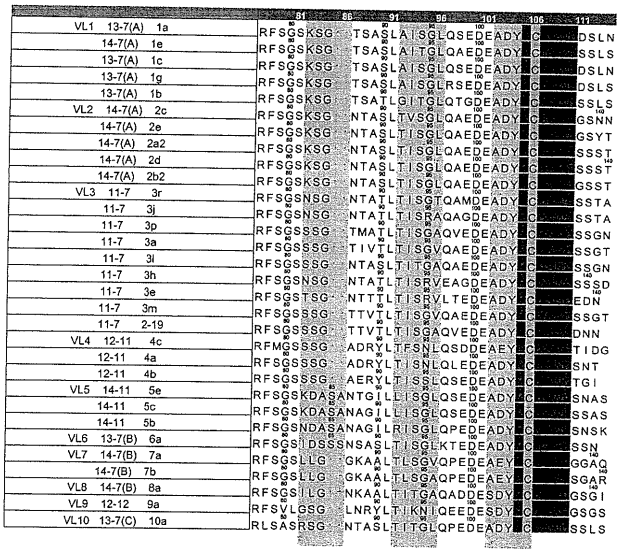
【図７Ａ－１】



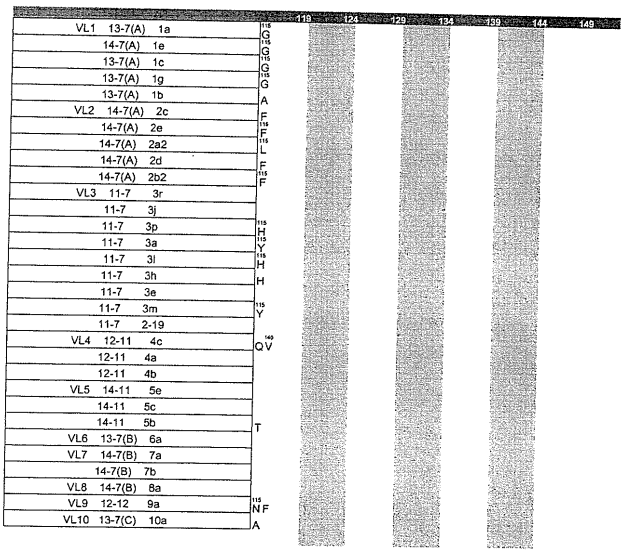
【図７Ａ－２】



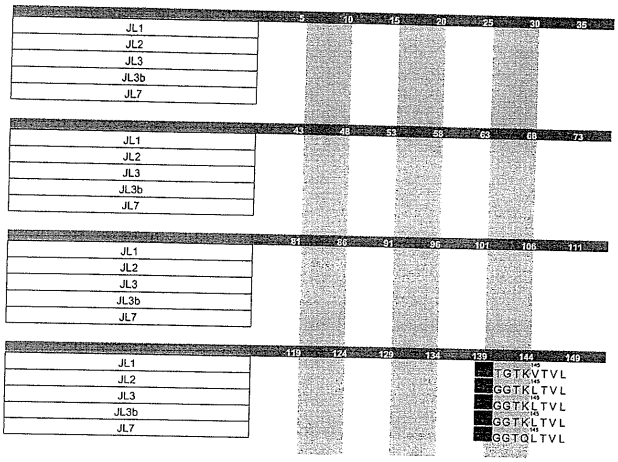
【図７Ａ－３】



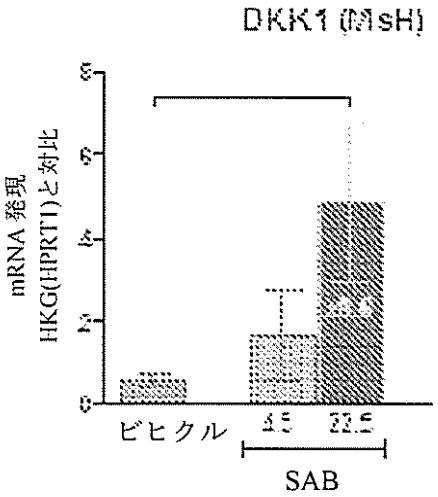
【図７Ａ－４】



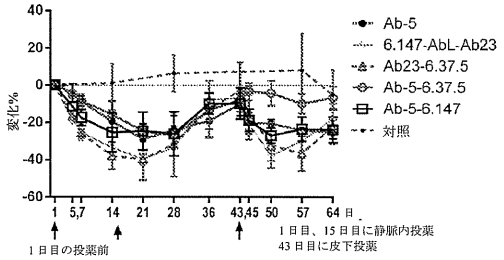
【図７Ｂ】



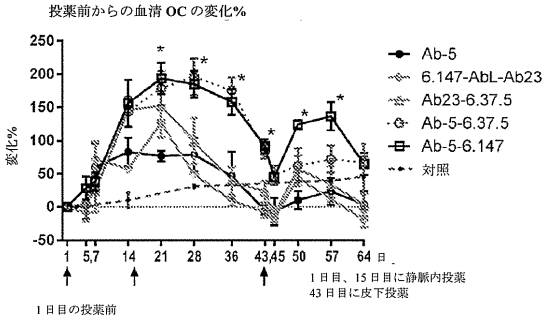

【図８】




【図９】

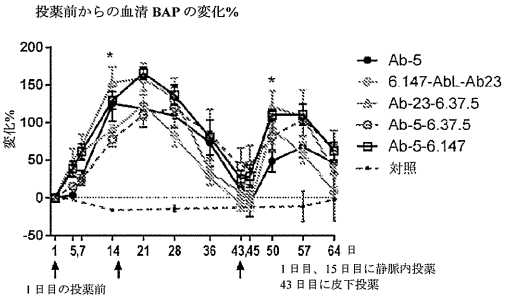



【図１０】



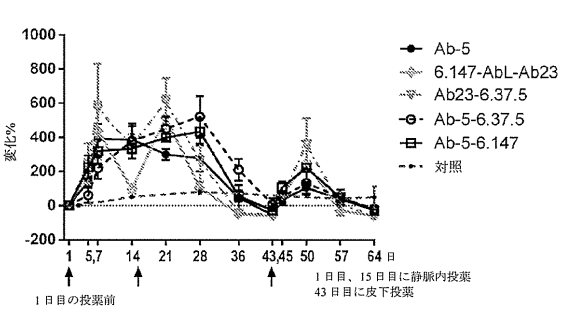

*p<0.05、Ab-5 と対比(一元配置 ANOVA)

【図１１】

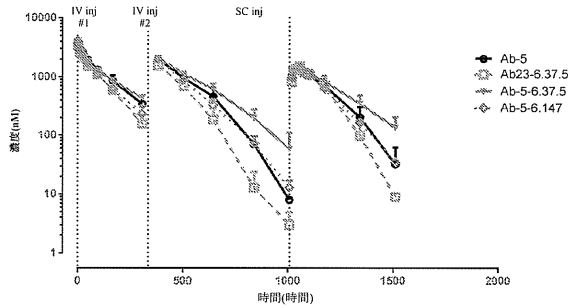



*p<0.05、Ab-5 と対比(一元配置 ANOVA)

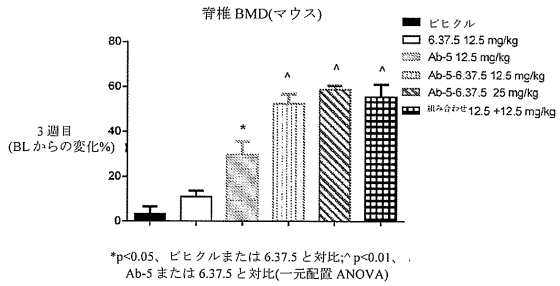
【図１２】



【図１３】




【図１４】




*p<0.05、ビヒクルまたは 6.37.5 と対比;^ p<0.01、
Ab-5 または 6.37.5 と対比(一元配置 ANOVA)

【配列表】
2019201645000001.app
【手続補正書】
【提出日】令和1年8月2日(2019.8.2)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、前記第１及び第２の重鎖は、ＥＵ１８３位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、それらのアミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。
【請求項２】
前記第１の重鎖のＥＵ１８３位のセリンが、アスパラギン酸またはグルタミン酸に置換され、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位のセリンが、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンに置換され、前記第１の軽鎖のＥＵ１７６位のセリンが、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンに置換され、前記第２の軽鎖のＥＵ１７６位のセリンが、アスパラギン酸またはグルタミン酸に置換される、請求項１に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項３】
請求項１に記載のヘテロ二量体抗体の前記第１の重鎖、第２の重鎖、第１の軽鎖、または第２の軽鎖のうちいずれか１つをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。
【請求項４】

請求項３に記載のヌクレオチド配列を含む、ベクター。
【請求項５】
請求項３に記載の核酸を含む、単離宿主細胞。
【請求項６】
前記第１および第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位にアミノ酸置換をさらに含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位にアミノ酸置換をさらに含み、ここで、前記第１および第２の重鎖のＡＨｏ４６位のアミノ酸置換ならびに前記第１および第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のアミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、請求項１に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項７】
前記第１の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはアスパラギン酸またはグルタミン酸に置換され、前記第２の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはヒスチジン、アルギニンまたはリジンに置換され、前記第１の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはヒスチジン、アルギニンまたはリジンに置換され、前記第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはアスパラギン酸またはグルタミン酸に置換される、請求項６に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項８】
前記第１の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸に置換され、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはリジンに置換され、前記第１の軽鎖のＥＵ１７６位のセリンはリジンに置換され、前記第２の軽鎖のＥＵ１７６位のセリンはグルタミン酸に置換される、請求項２に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項９】
前記第１の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸に置換され、前記第２の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンに置換され、前記第１の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンに置換され、前記第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸に置換される、請求項７に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項１０】
前記第１の重鎖のＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンに置換され、前記第１の重鎖のＥＵ３９９位のグルタミン酸はリジンに置換され、前記第２の重鎖のＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸に置換され、前記第２の重鎖のＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸に置換される、請求項１、２、および６～９のいずれか１項に記載のヘテロ二量体抗体。
【請求項１１】
請求項４に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００４２】
標準的な技法が、組み換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、組織培養および形質転換、タンパク質精製等に使用され得る。酵素反応および精製技法は、製造業者の使用に従って、または当該技術分野で一般に行われるように、または本明細書に記載されるように、行うことができる。以下の手順および技法は、概して、当該技術分野で周知の従来的な方法に従って、ならびに本明細書を通じて引用および考察される種々の一般的およびより具体的な参考文献に記載されるように、行うことができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕｅｌ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照されたく、これは、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。具体的な定義が提供されない限り、分析化学、有機化学、ならびに医化学および薬化学と関連して使用され

る命名法、ならびにそれらの研究室手順および技法は、当該技術分野で周知であり、広く使用されるものである。標準的な技法が、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、ならびに送達および患者の治療に使用され得る。

本願は以下の実施形態にも関する。

［１］　配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、前記抗体は、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、および$C_L$ドメインのそれぞれに置換を含み、

前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

［２］　配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する抗体であって、前記抗体は、１つ以上のアミノ酸置換を含むＣＨ３ドメインを有する重鎖を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

［３］　前記ＣＨ３ドメイン内の負に荷電したアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸で置換される、［２］に記載の抗体。

［４］　前記負に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、またはＥ３５７位にある、［３］に記載の抗体。

［５］　前記ＥＵ　Ｄ３９９位、Ｅ３５６位、およびＥ３５７位の負に荷電したアミノ酸は、それぞれ、正に荷電したアミノ酸で置換される、［３］に記載の抗体。

［６］　前記正に荷電したアミノ酸は、リジンである、［３］または［５］に記載の抗体。

［７］　前記ＣＨ３ドメイン内の正に荷電したアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸で置換される、［３］に記載の抗体。

［８］　前記正に荷電したアミノ酸は、ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、またはＫ４０９位にある、［７］に記載の抗体。

［９］　前記ＥＵ　Ｋ３７０位、Ｋ３９２位、およびＫ４０９位の正に荷電したアミノ酸は、それぞれ、負に荷電したアミノ酸で置換される、［７］に記載の抗体。

［１０］　前記負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸である、［７］または［９］に記載の抗体。

［１１］　ａ）配列番号５４、５５、および５６のＣＤＲ配列ならびに配列番号５１、５２、および５３のＣＤＲ配列、ｂ）配列番号６０、６１、および６２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５７、５８、および５９のＣＤＲ配列、ｃ）配列番号４８、４９、および５０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号４５、４６、および４７のＣＤＲ配列、ｄ）配列番号４２、４３、および４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３９、４０、および４１のＣＤＲ配列、ｅ）配列番号２７５、２７６、および２７７のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２８７、２８８、および２８９のＣＤＲ配列、ｆ）配列番号２７８、２７９、および２８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９０、２９１、および２９２のＣＤＲ配列、ｇ）配列番号７８、７９、および８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４５、２４６、および２４７のＣＤＲ配列、ｈ）配列番号８１、９９、および１００のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４８、２４９、および２５０のＣＤＲ配列、ｉ）配列番号１０１、１０２、および１０３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５１、２５２、および２５３のＣＤＲ配列、ｊ）配列番号１０４、１０５、および１０６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５４、２５５、および２５６のＣＤＲ配列、ｋ）配列番号１０７、１０８、および１０９のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５７、２５８、および２５９のＣＤＲ配列、ｌ）配列番号１１０、１１１、および１１２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６０、２６１、および２６２のＣＤＲ配列、ｍ）配列番号２８１、２８２、および２８３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９３、２９４、および２９５のＣＤＲ配列、ｎ）配列番号１１３、１１４、および１１５のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６３、２６４、および２６５のＣＤＲ配列、ｏ）配列番号２８４、２８５、および２８６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９６、２９７、および２９８のＣＤＲ配列、ｐ）配列番号１１６、２３７、および２３８のＣＤＲ配

列、ならびに配列番号２６６、２６７、および２６８のＣＤＲ配列、ｑ）配列番号２３９、２４０、および２４１のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６９、２７０、および２７１のＣＤＲ配列、）配列番号２４２、２４３、および２４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２７２、２７３、および２７４のＣＤＲ配列、ならびにｓ）配列番号３５１、３５２、および３５３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３５８、３５９、および３６０のＣＤＲ配列、からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む含む、［１］～［１０］のいずれかに記載の抗体。

［１２］　配列番号３６４、配列番号３７６、配列番号７５、配列番号３８４、配列番号３８８、配列番号３８０、配列番号２９９、配列番号３０３、配列番号３１４、配列番号３１１、配列番号３１５、および配列番号３６８からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖を含む、［１］～［１１］のいずれかに記載の抗体。

［１３］　配列番号３６６、配列番号３７８、配列番号７７、配列番号３８６、配列番号３９０、配列番号３８２、配列番号３０１、配列番号３０５、配列番号３２７、配列番号３１３、配列番号３１７、および配列番号３７０からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む重鎖を含む、［１］～［１２］のいずれかに記載の抗体。

［１４］　前記抗体は、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する、［１］～［１３］のいずれかに記載の抗体。

［１５］　配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、前記抗体は、

スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖、ならびにＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、前記第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

［１６］　配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体であって、前記抗体は、

スクレロスチン結合部分を含む第１の重鎖および第１の軽鎖、ならびにＤＫＫ１結合部分を含む第２の重鎖および第２の軽鎖を含み、前記第１の重鎖は、ＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記抗体。

［１７］　前記スクレロスチン結合部分は、ａ）配列番号５４、５５、および５６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５１、５２、および５３のＣＤＲ配列、ｂ）配列番号６０、６１、および６２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号５７、５８、および５９のＣＤＲ配列、ｃ）配列番号４８、４９、および５０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号４５、４６、および４７のＣＤＲ配列、ｄ）配列番号４２、４３、および４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３９、４０、および４１のＣＤＲ配列、ｅ）配列番号２７５、２７６、および２７７のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２８７、２８８、および２８９のＣＤＲ配列、ｆ）配列番号２７８、２７９、および２８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９０、２９１、および２９２のＣＤＲ配列、ｇ）配列番号７８、７９、および８０のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４５、２４６、および２４７のＣＤＲ配列、ｈ）配列番号８１、９９、および１００のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２４８、２４９、および２５０のＣＤＲ配列、ｉ）配列番号１０１、１０２、および１０３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５１、２５２、および２５３のＣＤＲ配列、ｊ）配列番号１０４、１０５、および１０６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５４、２５５、および２５６のＣＤＲ配列、ｋ）配列番号１０７、１０８、および１０９のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２５７、２５８、および２５９のＣＤＲ配列、ｌ）配列番号１１０、１１１、および１１２のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６０、２６１、および２６２のＣＤＲ配列、ｍ）配列番号２８１、２８２、および

２８３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９３、２９４、および２９５のＣＤＲ配列、ｎ）配列番号１１３、１１４、および１１５のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６３、２６４、および２６５のＣＤＲ配列、ｏ）配列番号２８４、２８５、および２８６のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２９６、２９７、および２９８のＣＤＲ配列、ｐ）配列番号１１６、２３７、および２３８のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６６、２６７、および２６８のＣＤＲ配列、ｑ）配列番号２３９、２４０、および２４１のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２６９、２７０、および２７１のＣＤＲ配列、）配列番号２４２、２４３、および２４４のＣＤＲ配列、ならびに配列番号２７２、２７３、および２７４のＣＤＲ配列、またはｓ）配列番号３５１、３５２、および３５３のＣＤＲ配列、ならびに配列番号３５８、３５９、および３６０のＣＤＲ配列からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、［１５］または［１６］に記載のヘテロ二量体抗体。

［１８］　前記スクレロスチン結合部分は、ａ）配列番号２８４のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２８５のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号２８６のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号２９６のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２９７のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号２９８のＣＤＲ－Ｈ３、ｂ）配列番号４８のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４９のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号５０のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号４５のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４６のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４７のＣＤＲ－Ｈ３、またはｃ）配列番号４２のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４３のＣＤＲ－Ｌ２、配列番号４４のＣＤＲ－Ｌ３、配列番号３９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４０のＣＤＲ－Ｈ２、および配列番号４１のＣＤＲ－Ｈ３からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、［１５］または［１６］に記載のヘテロ二量体抗体。

［１９］　前記スクレロスチン結合部分は、配列番号２６９のＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２７０のＣＤＲ－Ｈ２、配列番号２７１のＣＤＲ－Ｈ３、配列番号２３９のＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２４０のＣＤＲ－Ｌ２、および配列番号２４１のＣＤＲ－Ｌ３を含む、重鎖および軽鎖を含む、［１５］または［１６］に記載のヘテロ二量体抗体。

［２０］　前記第１の軽鎖は、配列番号３６４、配列番号３７６、配列番号７５、配列番号３８４、配列番号３８８、配列番号３８０、配列番号２９９、配列番号３０３、配列番号３１４、配列番号３１１、配列番号３１５、および配列番号３６８からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、［１５］または［１６］に記載のヘテロ二量体抗体。

［２１］　前記第１の重鎖は、配列番号３６６、配列番号３７８、配列番号７７、配列番号３８６、配列番号３９０、配列番号３８２、配列番号３０１、配列番号３０５、配列番号３２７、配列番号３１３、配列番号３１７、および配列番号３７０からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、［１５］または［１６］に記載のヘテロ二量体抗体。

［２２］　（ａ）配列番号８２０～８２５、（ｂ）配列番号８２８～８３３、（ｃ）配列番号８３６～８４１、（ｄ）配列番号８４４～８４９、（ｅ）配列番号８５２～８５７、（ｆ）配列番号８６０～８６５、（ｇ）配列番号８６８～８７３、（ｈ）配列番号８７６～８８１、（ｉ）配列番号８８４～８８９、（ｊ）配列番号８９２～８９７、（ｋ）配列番号９００～９０５、（ｌ）配列番号９０８～９１３、（ｍ）配列番号９１６～９２１、（ｎ）配列番号９２４～９２９、（ｏ）配列番号９３２～９３７、（ｐ）配列番号９４０～９４５、（ｑ）配列番号９４８～９５３、（ｒ）配列番号９５６～９６１、（ｓ）配列番号９６４～９６９、（ｔ）配列番号９７２～９７７、（ｕ）配列番号９８０～９８５、（ｖ）配列番号９８８～９９３、（ｗ）配列番号９９６～１００１、および（ｘ）配列番号１００４～１００９からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、［１５］～［２１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

［２３］　前記ＤＫＫ１結合部分は、配列番号９８０～９８５および配列番号１００４～１００９からなる群から選択される、６つ１セットのＣＤＲを含む、［１５］～［２１］のいずれかに記載の抗体。

［２４］　前記第２の軽鎖は、配列番号８１８、配列番号８２６、配列番号８３４、配列番号８４２、配列番号８５０、配列番号８６６、配列番号８７４、配列番号８８２、配列

番号８９０、配列番号８９８、配列番号９０６、配列番号８１４、配列番号８２２、配列番号８３０、配列番号９３８、配列番号９４６、配列番号９５４、配列番号９６２、配列番号９７０、配列番号９７８、配列番号９８８、配列番号９９４、および配列番号１００２からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、［１５］～［２１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

［２５］　前記第２の重鎖は、配列番号８１９、配列番号８２７、配列番号８３５、配列番号８４３、配列番号８５１、配列番号８５９、配列番号８６７、配列番号８７５、配列番号８８３、配列番号８９１、配列番号８９９、配列番号９０７、配列番号９１５、配列番号９２３、配列番号９３１、配列番号９３９、配列番号９４７、配列番号９５５、配列番号９６３、配列番号９７１、配列番号９７９、配列番号９８７、配列番号９９５、および配列番号１００３からなる群から選択される、可変領域アミノ酸配列を含む、［１５］～［２１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。

［２６］　スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、

配列番号３７８および３６６からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む、第１の重鎖であって、前記第１の重鎖のＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含む、第１の重鎖と、

配列番号１００３および９７４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の重鎖であって、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含む、第２の重鎖と、

配列番号３７６および３６４からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第１の軽鎖であって、前記第１の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、

配列番号１００２および９７８からなる群から選択される可変領域アミノ酸配列を含む第２の軽鎖であって、前記第２の軽鎖のＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含む、第１の軽鎖と、を含み、

前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。

［２７］　スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、

（ａ）配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、

（ｂ）配列番号１０３８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０３９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、

（ｃ）配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、

（ｄ）配列番号１０４０に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０３６に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４１に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０３７に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、

（ｅ）配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、

（ｆ）配列番号１０４６に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４７に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の

軽鎖、
（ｇ）配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４２に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４３に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖、または
（ｈ）配列番号１０４８に記載されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖、配列番号１０４４に記載されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖、配列番号１０４９に記載されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、および配列番号１０４５に記載されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を含む、前記ヘテロ二量体抗体。
［２８］　スクレロスチンおよびＤＫＫ－１に結合するヘテロ二量体抗体であって、
（ａ）配列番号１０３８、配列番号１０４６、配列番号１０４０、および配列番号１０４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で配列番号１０３９、配列番号１０４７、配列番号１０４１、および配列番号１０４９からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含むか、または
（ｂ）配列番号１０３４、配列番号１０４２、配列番号１０３６、および配列番号１０４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含み、任意で配列番号１０３５、配列番号１０４３、配列番号１０３７、および配列番号１０４５からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列をさらに含む、前記ヘテロ二量体抗体。
［２９］　次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、$C_L$ドメイン、$V_H$ドメイン、および$V_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、
前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入する、ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３０］　前記第１の$CH_3$ドメインまたは前記第２の$CH_3$ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３１］　前記第１の$CH_3$ドメインまたは前記第２の$CH_3$ドメインは、野生型ヒトＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３２］　前記$CH_1$ドメインまたは前記$C_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸配列と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３３］　前記$CH_1$ドメインまたは前記$C_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸配列と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３４］　前記$V_H$ドメインまたは前記$V_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の正に荷電したアミノ酸が、１つ以上の負に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはフラグメント。
［３５］　前記$V_H$ドメインまたは前記$V_L$ドメインは、野生型ＩｇＧアミノ酸配列内の１つ以上の負に荷電したアミノ酸が、１つ以上の正に荷電したアミノ酸と置き換えられるように、野生型ＩｇＧアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはフラグメント。
［３６］　前記正に荷電したアミノ酸は、リジン、ヒスチジン、およびアルギニンからなる群から選択される、［２９］～［３５］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。

［３７］　前記負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される、［２９］～［３５］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３８］　前記第１の$CH_3$ドメインは、グルタミン酸と正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［３９］　前記グルタミン酸は、Ｇｌｕ３５６である、［３８］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４０］　前記第１の$CH_3$ドメインは、アスパラギン酸と負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４１］　前記アスパラギン酸は、Ａｓｐ３５６およびＡｓｐ３９９である、［４０］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４２］　前記第２の$CH_3$ドメインは、リジンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４３］　前記リジンは、Ｌｙｓ３９２、Ｌｙｓ４０９、Ｌｙｓ４３９、およびＬｙｓ３７０からなる群から選択される、［４２］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４４］　前記$CH_1$ドメインは、セリンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４５］　前記セリンは、Ｓｅｒ１８３である、［４４］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４６］　前記$C_L$ドメインは、セリンと正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４７］　前記セリンは、Ｓｅｒ１７６である、［４６］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４８］　前記$V_H$ドメインは、グルタミンと負に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［４９］　前記グルタミンは、Ｇｌｎ３８（Ｋａｂａｔ３８位、ＡＨｏ４６位）である、［４８］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５０］　前記$V_L$ドメインは、グルタミンと正に荷電したアミノ酸との置き換えを含む、［２９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５１］　前記グルタミンは、Ｇｌｎ３９（Ｋａｂａｔ３９位、ＡＨｏ４６位）である、［５０］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５２］　抗体、二特異性抗体、一特異性一価抗体、二特異性マキシボディ、モノボディ、ペプチボディ、二特異性ペプチボディ、一価ペプチボディ、および受容体融合タンパク質からなる群から選択される、［２９］～［５１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５３］　ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、
（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ａ）の荷電アミノ酸は、前記（ｂ）の荷電アミノ酸と同じ電荷を有し、
前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸とは逆の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５４］　前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、前記第４のアミノ酸

置換はＥＵの３９９位にある、［５２］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５５］　ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、ＥＵ３９９位のアスパラギン酸はリジンと置き換えられる、［５３］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５６］　抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、
（ａ）ＡＨｏ３５～４３位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３８８～３９８位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）４０４～４１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸とは逆の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５７］　前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ置換はＥＵ３９３位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ４０９位にある、［５６］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［５８］　ＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、ＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、ＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられ、ＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる、［５７］に記載の抗体またはそのフラグメント。
［５９］　ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、軽鎖であって、
（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏに、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含む、軽鎖を含む、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６０］　前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１７６位にある、［５９］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６１］　ＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、ＥＵ１７６位のセリンはグルタミン酸と置き換えられる、［６０］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６２］　抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、
（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３５２～３６０位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）３９５～４０３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有し、前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有する、前記抗体またはそのフラグメント。
［６３］　前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵ３５６位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ３９９位にある、［６２］に記載の抗体。
［６４］　正に荷電したアミノ酸をＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位に含む軽鎖を含む、

［６２］に記載の抗体またはそのフラグメント。
［６５］　ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントであって、重鎖であって、（ａ）ＡＨｏ４２～５０位からなる群から選択されるＡＨｏ位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第１のアミノ酸置換を含み、
（ｂ）１２６～２１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第２のアミノ酸置換を含み、
（ｃ）３８８～３９７位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、前記位置に荷電アミノ酸を導入する第３のアミノ酸置換を含み、
（ｄ）４０４～４１３位（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される位置に、荷電アミノ酸を導入する第４のアミノ酸置換を含む、重鎖を含み、
前記（ａ）および（ｂ）の荷電アミノ酸は、正の電荷を有し、前記（ｃ）および（ｄ）の荷電アミノ酸は、負の電荷を有する、前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６６］　前記第１のアミノ酸置換はＡＨｏ４６位にあり、前記第２のアミノ酸置換はＥＵ１８３位にあり、前記第３のアミノ酸置換はＥＵの３９２位にあり、前記第４のアミノ酸置換はＥＵ４０９位にある、［６５］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６７］　負に荷電したアミノ酸をＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位に含む軽鎖を含む、［６５］に記載のヘテロ二量体抗体またはそのフラグメント。
［６８］　第１の重鎖および第２の重鎖ならびに第１の軽鎖および第２の軽鎖を含むヘテロ二量体抗体であって、前記第１の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３５６位、および３９９位にアミノ酸置換を含み、前記第２の重鎖は、ＡＨｏ４６位ならびにＥＵ１８３位、３９２位、および４０９位にアミノ酸置換を含み、前記第１および第２の軽鎖は、ＡＨｏ４６位およびＥＵ１７６位にアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換は、前記位置に荷電アミノ酸を導入する、前記ヘテロ二量体抗体。
［６９］　前記第１の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第２の重鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、前記第１の軽鎖ＡＨｏ４６位のグルタミンはリジンと置き換えられ、前記第２の軽鎖のＡＨｏ４６位のグルタミンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはグルタミン酸と置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ３５６位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、前記第１の重鎖のＥＵ３９９位のグルタミン酸はリジンと置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ１８３位のセリンはリジンと置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ３９２位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられ、前記第２の重鎖のＥＵ４０９位のリジンはアスパラギン酸と置き換えられる、［６８］に記載のヘテロ二量体抗体。
［７０］　前記抗体は、配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合する、［２９］～［６９］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。
［７１］　ＩｇＧ免疫グロブリンである、［１］～［７０］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体。
［７２］　［１］～［７１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。
［７３］　［７２］に記載のヌクレオチド配列を含む、ベクター。
［７４］　［７２］に記載の核酸または［７３］に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。
［７５］　哺乳動物対象における骨ミネラル密度を増加させる方法であって、前記対象に、前記対象における骨ミネラル密度を増加させるのに有効な量で、［１］～［７１］のいずれかに記載のヘテロ二量体抗体を投与することを含む、前記方法。
［７６］　［１］～［７１］のいずれかに記載の抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物。
［７７］　前記組成物中、前記抗体の５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、［７６］に記載の組成物。
［７８］　前記組成物中、前記抗体の１％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形

態となる、［７６］に記載の組成物。
［７９］　凝集体形態で存在する前記組成物中の抗体の量は、サイズ排除クロマトグラフィーによって判定される、［７７］または［７８］に記載の組成物。
［８０］　ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントと、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物であって、
前記ヘテロ二量体抗体またはそのフラグメントは、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、$C_L$ドメイン、$V_H$ドメイン、および$V_L$ドメインのそれぞれに１つ以上の置換を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、
前記組成物中、前記抗体またはフラグメントの５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、前記組成物。
［８１］　配列番号１のアミノ酸８６～１１１を含むスクレロスチンの領域に結合するヘテロ二量体抗体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、またはアジュバントと、を含む、組成物であって、
前記抗体は、次のドメイン：第１の$CH_3$ドメイン、第２の$CH_3$ドメイン、$CH_1$ドメイン、および$C_L$ドメインのそれぞれに置換を含み、前記１つ以上の置換は、ホモ二量体形成には静電的に有利でなく、ヘテロ二量体形成には静電的に有利である、荷電アミノ酸を導入し、
前記組成物中、前記抗体の５％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、前記組成物。
［８２］　前記組成物中、前記抗体の１％未満が、約４℃で２週間保管した後、凝集体形態となる、［８０］または［８１］に記載の組成物。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C12N* | *1/21* | *(2006.01)* | C12N | 1/21 | | |
| *C12N* | *5/10* | *(2006.01)* | C12N | 5/10 | | |
| *C12N* | *15/10* | *(2006.01)* | C12N | 15/10 | 200 | |

２．ＴＷＥＥＮ

(72)発明者　カナン，グナセカラン
アメリカ合衆国　９１３２０－１７９９　カリフォルニア州，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(72)発明者　フロリオ，モニカ
アメリカ合衆国　９１３６２　カリフォルニア州，サウザンド　オークス，カジノ　ドライブ　３２６４
(72)発明者　リウ，ジー
アメリカ合衆国　９８１７７　ワシントン州，ショアライン，８ティーエイチ　アベニュー　エヌダブリュ　１９１３９
(72)発明者　ヤン，ウェイ
アメリカ合衆国　９８０７５　ワシントン州，サマミッシュ，２７４ティーエイチ　プレイス　エスイー　１１１６

Ｆターム(参考)　4B065 AB01 BA02 BA16 CA24 CA25 CA44
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2019201645000001.pdf