

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6734919号
(P6734919)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月14日(2020.7.14)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/542 (2006.01)		GO 1 N 33/542		A
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53		Y

請求項の数 8 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2018-516834 (P2018-516834)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成28年9月29日 (2016.9.29)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2018-533725 (P2018-533725A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成30年11月15日 (2018.11.15)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/073186		T
(87) 国際公開番号	W02017/055399		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	令和1年9月13日 (2019.9.13)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	15188065.5		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成27年10月2日 (2015.10.2)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 同時結合を測定するための細胞ベースのFRETアッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の抗原および第2の抗原への二重特異性抗体の同時結合を測定するための方法であって、

(a) 細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした第1の抗原および細胞膜に結合しているFRETアクセプターをタグ付けした第2の抗原を発現する細胞を、該二重特異性抗体と共にインキュベートする段階、ならびに

(b) 該FRETドナーから該FRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって該二重特異性抗体の同時結合を測定する段階

を含む、方法。

【請求項2】

細胞膜に結合しているFRETドナーおよび細胞膜に結合しているFRETアクセプターが、N末端からC末端の方向に

H₂N-抗原-FRETドナー/アクセプター-膜貫通ドメイン-COOH

を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

FRETドナーおよび/またはFRETアクセプターが、それぞれ、タグとFRETドナー蛍光色素またはタグとFRETアクセプター蛍光色素の結合体である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

結合体が非共有結合性結合体であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプ

ター蛍光色素が蛍光色素結合型抗体である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

結合体が共有結合性結合体であり、タグが酵素であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプター蛍光色素が、蛍光色素で標識された自殺酵素基質である、請求項3記載の方法。

【請求項6】

(i)FRETドナーまたはFRETアクセプターが、SNAPタグおよびベンジルグアニンの共有結合性複合体であり、かつ(ii)該FRETアクセプターまたは該FRETドナーが、CLIPタグおよびO²-ベンジルシトシンの共有結合性複合体であり、該FRETドナーおよび該FRETアクセプターが、異なるタグである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項7】

二重特異性抗体が、第1の抗原に特異的に結合する1つまたは2つの結合部位および第2の抗原に特異的に結合する1つまたは2つの結合部位を含む、請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位および第2の抗原に特異的に結合する第2の結合部位を含み、該2つの結合部位がそれぞれの抗原に少なくとも10倍の差がある結合親和性で結合する、二重特異性抗体について、大きい方のK_D値でその抗原に特異的に結合する結合部位の結合相互作用(強度)を測定するための方法であって、

(a)細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした第1の抗原およびFRETアクセプターをタグ付けした第2の抗原を発現する細胞を、該二重特異性抗体と共にインキュベートし、該FRETドナーから該FRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって該二重特異性抗体の結合を測定する段階、

20

(b)該二重特異性抗体の、K_D値が小さい方の結合部位を含む漸増濃度の単一特異性抗体の存在下で段階(a)を繰り返す段階、ならびに

(c)該FRETドナーから該FRETアクセプターへのエネルギー移動が減少する該単一特異性抗体の濃度を測定することによって、結合相互作用(強度)を測定する段階

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

その標的/抗原の両方への二重特異性抗体の同時結合を測定するための細胞FRETアッセイ法が、本明細書において報告される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

抗体の機能的結合の測定は、医薬品開発において行われる日常的試験である。

【0003】

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、50年前よりも前に最初に説明された物理的現象である。FRETは、ドナー分子からアクセプター分子へのエネルギーの無放射移動に基づいている。両方の分子の直接的な接触は必要とされないため、すなわち、これは距離依存的なエネルギー移動である。したがって、FRETを用いて分子の相互作用を調査することができる。

40

【0004】

US 2015/024410(特許文献1)では、以下の段階を含む、測定媒体中に存在する細胞膜または無傷の細胞において発現されるFc受容体への抗体の結合を測定するためのインビトロ方法が、対象とされている:(i)該Fc受容体を、FRETパートナーのペアの第1のメンバーで直接的もしくは間接的に標識する段階、またはさもなければ、Fc受容体がFRETパートナーのペアの第1のメンバーで前もって直接的に標識された細胞膜もしくは無傷の細胞を、媒体中に導入する段階;(ii)該FRETパートナーのペアの第2のメンバーで直接的もしくは間

50

接的に標識された前記抗体を、測定媒体に添加する段階;(iii)FRETシグナルを測定する段階であって、FRETシグナルの存在が、Fc受容体への抗体の結合を表している、段階。

【0005】

以下の段階を含む、抗原または抗原エピトープとFc受容体またはその断片の両方への抗体の結合活性を測定する方法が、US 2010/190266 (特許文献2)において報告されている:抗体を、蛍光共鳴エネルギー移動をすることができるドナーおよびアクセプターのセットの1つのメンバーで標識された抗原または抗原エピトープならびに該ドナーおよびアクセプターのセットの他方のメンバーで標識されたFc受容体またはその断片と混合する段階;得られた混合物に、ドナーを励起することができる波長を有している光を照射する段階;ならびに該混合物の蛍光レベルを測定する段階。

10

【0006】

US 2006/165685 (特許文献3)では、二重特異性抗Erb-B抗体および腫瘍治療法におけるそれらの使用が報告されている。

【0007】

US 2015/0204847 (特許文献4)では、生細胞におけるタンパク質の構造変化を検出するためのハイスループットで高精度の方法が報告されている。ストークスシフトの大きな色素が、US 2015/0090936 (特許文献5)において報告されている。US 2015/0044690 (特許文献6)では、FRET測定装置およびFRET測定方法が報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0008】

【特許文献1】US 2015/024410

【特許文献2】US 2010/190266

【特許文献3】US 2006/165685

【特許文献4】US 2015/0204847

【特許文献5】US 2015/0090936

【特許文献6】US 2015/0044690

【発明の概要】

【0009】

以下の段階を含む、第1の抗原/標的および第2の抗原/標的への二重特異性抗体の同時結合を測定するための方法が、本明細書において報告される:

30

(a)細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした第1の抗原/標的およびFRETアクセプターをタグ付けした第2の抗原/標的を発現する細胞を、二重特異性抗体と共にインキュベートする段階、ならびに

(b)FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって二重特異性抗体の同時結合を測定する段階。

【0010】

1つの態様において、細胞膜に結合しているFRETドナーおよび細胞膜に結合しているFRETアクセプターは、N末端からC末端の方向に、以下を含む

H₂N-抗原/標的-FRETドナー/アクセプター-膜貫通ドメイン-COOH、または

H₂N-FRETドナー/アクセプター-抗原/標的-膜貫通ドメイン-COOH、または

H₂N-FRETドナー/アクセプター-膜貫通ドメイン-抗原/標的-COOH。

40

【0011】

1つの態様において、FRETドナーおよび/またはFRETアクセプターは、それぞれ、タグとFRETドナー蛍光色素またはタグとFRETアクセプター蛍光色素の結合体である。1つの態様において、結合体は、非共有結合性結合体であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプター蛍光色素は、蛍光色素結合型抗体である。1つの態様において、結合体は共有結合性結合体であり、タグは酵素であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプター蛍光色素は、蛍光色素で標識された自殺酵素基質である。

【0012】

50

1つの態様において、(i)FRETドナーまたはFRETアクセプターは、SNAPタグおよびベンジルグアニンの共有結合性複合体であり、かつ(ii)FRETアクセプターまたはFRETドナーは、CLIPタグおよびO²-ベンジルシトシンの共有結合性複合体であり、ここで、FRETドナーおよびFRETアクセプターは、異なるタグである。

【0013】

1つの態様において、二重特異性抗体は、第1の抗原/標的に特異的に結合する1つまたは2つの結合部位および第2の抗原/標的に特異的に結合する1つまたは2つの結合部位を含む。

【0014】

本明細書において報告される1つの局面は、第1の抗原/標的に特異的に結合する第1の結合部位および第2の抗原/標的に特異的に結合する第2の結合部位を含み、これら2つの結合部位がそれぞれの抗原/標的に少なくとも10倍の差がある結合親和性で結合する、二重特異性抗体について、大きい方のK_D値でその抗原/標的に特異的に結合する結合部位の結合相互作用(強度)を測定するための方法であり、この方法は、以下の段階を含む:

(a)細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした第1の抗原/標的およびFRETアクセプターをタグ付けした第2の抗原/標的を発現する細胞を、二重特異性抗体と共にインキュベートし、FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって二重特異性抗体の結合を測定する段階、

(b)二重特異性抗体の、K_D値が小さい方の結合部位を含む漸増濃度の単一特異性抗体の存在下で段階(a)を繰り返す段階、ならびに

(c)FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動が減少する単一特異性抗体の濃度を測定することによって、結合相互作用(強度)を測定する段階。

【0015】

1つの態様において、単一特異性抗体は、二価である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

ノブイントゥーホール二量体化モジュールおよび抗体工学におけるそれらの使用が、Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volume 2, Number 1, February 1996, pp. 73-73(1) において説明されている。

【0017】

ヒト免疫グロブリンの軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的情報は、Kabatt, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において示されている。

【0018】

本明細書において使用される場合、重鎖および軽鎖のすべての定常領域およびドメインのアミノ酸位置は、Kabatt, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において説明されているKabatt番号付与方式に基づいて番号を付けられ、本明細書において「Kabattに基づく番号付与」と呼ばれる。具体的には、Kabatt, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のKabatt番号付与方式(647~660頁を参照されたい)が、アイソタイプおよびアイソタイプの軽鎖定常ドメインCLに対して使用され、KabattのEU指標番号付与方式(661~723頁を参照されたい)が、定常重鎖ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3。この場合、「KabattのEU指標に基づく番号付与」を参照することにより、本明細書においてさらに明らかにされる)に対して使用される。

【0019】

I 定義

本明細書において使用される場合、「抗原」という用語は、抗体の結合部位が結合する

10

20

30

40

50

化合物/部分を意味する。抗原は、それに対して抗体が生成され得る任意の部分、すなわち標的、例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、または低分子であってよい。

【0020】

本明細書において使用される場合、「FRET」および「蛍光共鳴エネルギー移動」という用語は、2つの発色団の間で起こる非放射エネルギー移動プロセスを意味する。

【0021】

「発色団」という用語は、特定の波長の光を吸着する領域を含み、別の発色団のそのような領域と相互作用し、したがってFRETのために有用である、部分を意味する。FRETアッセイ法で使用するのに適している発色団は、当業者に公知であり、容易に入手可能である。1つの状態において、発色団は、ドナー(FRETドナーとも呼ばれる)であってよい。FRETドナーとは、エネルギーを吸収し、次いで、そのエネルギーの少なくとも一部分をある期間にわたって再放出する分子を意味する。1つの状態において、発色団は、アクセプター(FRETアクセプターとも呼ばれる)であってよい。FRETアクセプターとは、FRETドナーからの無放射性のエネルギーを受け取り、したがって、ドナーの発光強度および励起状態の持続時間を低減させる分子を意味する。したがって、FRETドナーおよびFRETアクセプターが物理的に十分近く(最も多くは、2.5~12nm以内)に位置していることを条件として、これら2種のFRET部分は一緒に機能し、適切な波長で励起されると、FRETドナーが、正確な量のエネルギー(FRETドナーとFRETアクセプターの距離の-6乗に比例)をFRETアクセプターに移動させる。このプロセスは、FRETドナーの蛍光強度もしくは持続期間の低減を、または場合によっては、FRETアクセプターによって蛍光として再放出されるエネルギーも、観察することによって、特異的かつ定量的に検出することができる。

【0022】

「多重特異性抗体」とは、同じ抗原または2種の異なる抗原上の少なくとも2種の異なるエピトープに対する結合特異性を有している抗体を意味する。多重特異性抗体は、完全長抗体もしくは抗体断片(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)またはそれらの組合せ(例えば、完全長抗体+付加的なscFv断片もしくはFab断片)として調製することができる。2つ、3つ、またはそれ以上(例えば4つ)の機能的抗原結合部位を有している操作された抗体もまた、報告されている(例えば、US 2002/0004587 A1を参照されたい)。

【0023】

本明細書の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義するように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、またはアミノ酸配列変更を含んでもよい。いくつかの状態において、アミノ酸変更の数は、10個もしくはそれ以下、9個もしくはそれ以下、8個もしくはそれ以下、7個もしくはそれ以下、6個もしくはそれ以下、5個もしくはそれ以下、4個もしくはそれ以下、3個もしくはそれ以下、または2個もしくはそれ以下である。いくつかの状態において、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0024】

「親和性」とは、ある分子(例えば抗体)の1つの結合部位とその結合相手(例えば抗原)の間の非共有結合性相互作用の総合計の強さを意味する。別段の定めが無い限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー(例えば、抗体および抗原)間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を意味する。通常、分子Xの相手Yに対する親和性は、解離定数(k_d)によって表すことができる。親和性は、例えば表面プラズモン共鳴、および本明細書において説明するものを含む、当技術分野において公知の一般的な方法によって測定することができる。

【0025】

「親和性成熟」抗体とは、その抗原に対する抗体の親和性を向上させるような変化を有していない親抗体と比べて、1つまたは複数の超可変領域(HVR)に1つまたは複数の変化を有している抗体を意味する。

【0026】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、限定されるわけではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)を含む、様々な抗体構造体を、それらが所望の抗原結合活性を示す限りにおいて、包含する。

【0027】

「抗体断片」とは、インタクト抗体が結合する抗原に結合する、インタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子を意味する。抗体断片の例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;ダイアポディ;直鎖状抗体;単鎖抗体分子(例えばscFv);および抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0028】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部は、ある特定の供給源または種に由来するが、重鎖および/または軽鎖の残りの部分は、異なる供給源または種に由来する、抗体を意味する。

【0029】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有している定常ドメインまたは定常領域のタイプを意味する。抗体には5つの主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらの内のいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂にさらに分類され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、および μ とそれぞれ呼ばれる。

【0030】

IgG抗体のFc領域に対する受容体(Fc R)の架橋により、食作用、抗体依存性細胞障害、および炎症メディエーターの放出、ならびに免疫複合体クリアランス、および抗体産生の調節を含む、多種多様なエフェクター機能が引き起こされる。ヒトでは、以下の3つのクラスのFc Rが特徴を明らかにされている:

- Fc RI(CD64)は、高い親和性で単量体IgGに結合し、マクロファージ、単球、好中球、および好酸球において発現されている。IgGのFc領域中のアミノ酸残基E233~G236、P238、D265、N297、A327、およびP329(KabatのEU指標に基づく番号付与)の内の少なくとも1つの改変により、Fc RIへの結合が減少する。IgG2残基の233~236位をIgG1およびIgG4中に入れて置き換えると、Fc RIへの結合が10⁻³-分の1に減少し、抗体感作赤血球に対するヒト単球応答がなくなった(Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624)、

- Fc RII(CD32)は、複合体を形成したIgGに中度~低度の親和性で結合し、広範に発現されている。この受容体は、2つのサブタイプ、すなわちFc RIIAおよびFc RIIBに分けることができる。Fc RIIAは、死滅に関与している多くの細胞(例えば、マクロファージ、単球、好中球)の表面に存在しており、死滅プロセスを活性化することができるのである。Fc RIIBは、阻害プロセスにおいて役割を果たしていると思われ、B細胞、マクロファージ表面、ならびに肥満細胞および好酸球の表面に存在している。B細胞において、それは、さらなる免疫グロブリン産生および例えばIgEクラスへのアイソタイプスイッチを抑制する働きををすると思われる。マクロファージにおいて、Fc RIIBは、Fc RIIAによって媒介される食作用を阻害するように作用する。好酸球および肥満細胞において、B型は、別々の受容体へのIgE結合を介して、これらの細胞の活性化を抑制するのを助け得る。例えば、アミノ酸残基E233~G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292、およびK414(KabatのEU指標に基づく番号付与)の内の少なくとも1つに変異を有しているIgG Fc領域を含む抗体について、Fc RIIAに対する結合が減少していることが判明している、

- Fc RIII(CD16)は、IgGに中度~低度の親和性で結合し、2つのタイプとして存在してい

10

20

30

40

50

る。Fc R1IIIAは、NK細胞、マクロファージ、好酸球、ならびに一部の単球およびT細胞の表面に存在し、ADCCを媒介する。Fc R1IIIBは、好中球の表面で高度に発現されている。例えば、アミノ酸残基E233～G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338、およびD376(KabatのEU指標に基づく番号付与)の内の少なくとも1つに変異を有しているIgG Fc領域を含む抗体について、Fc R1IIIAへの結合が減少していることが判明している。

【0031】

Fc受容体に対するヒトIgG1上の結合部位のマッピング、前述の変異部位、ならびにFc RIおよびFc R1IIAへの結合を測定するための方法が、Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604において説明されている。

10

【0032】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」、および「全長抗体」という用語は、本明細書において同義的に使用されて、天然抗体の構造に実質的に同様の構造を有しているか、または本明細書において定義されるFc領域を含む重鎖を有している抗体を意味する。「完全長抗体」とは、抗原結合可変領域、ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)ならびに重鎖定常ドメインCH1、CH2、およびCH3を含む抗体である。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変種であってよい。より詳細には、完全長抗体は、2本の抗体軽鎖(それぞれが、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを含む)および2本の抗体重鎖(それぞれが、重鎖可変ドメイン、ヒンジ領域、ならびに重鎖定常ドメインCH1、CH2、およびCH3を含む)を含む。C末端アミノ酸残基KまたはGKは、完全長抗体の2本の抗体重鎖中に、互いとは無関係に存在する場合もあれば、しない場合もある。

20

【0033】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRに由来するアミノ酸残基およびヒトFRに由来するアミノ酸残基を含むキメラ抗体を意味する。特定の態様において、ヒト化抗体は、HVR(例えばCDR)のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト抗体のものに相当し、FRのすべてまたは実質的にすべてがヒト抗体のものに相当する、少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域についての少なくとも1つの部分を任意で含んでよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」とは、ヒト化を受けた抗体を意味する。

30

【0034】

「単離された」抗体とは、その天然環境の構成要素から分離された抗体である。いくつかの態様において、抗体は、例えば、電気泳動(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)またはクロマトグラフィー(例えば、イオン交換もしくは逆相HPLC)によって測定した場合に95%または99%を超える純度まで精製される。抗体純度を評価するための方法を再検討するためには、例えばFlatman, S., et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。

【0035】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を意味する。すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、存在し得る変種抗体(例えば、天然に存在する変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物を作製する間に発生し、このような変種は通常、少量で存在する)を除いて、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。異なる決定基(エピトープ)を対象とする異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られたものであるという抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用するためのモノクローナル抗体は、限定されるわけではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部分を含むトランスジェニック動物を使用する

40

50

方法を含む、様々な技術によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法および他の例示的な方法は、本明細書において説明される。

【0036】

「裸抗体」とは、異種部分(例えば細胞障害性部分)にも放射性標識物質にも結合されていない抗体を意味する。裸抗体は、薬学的製剤中に存在してよい。

【0037】

「天然抗体」とは、様々な構造を有している天然に存在する免疫グロブリン分子を意味する。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2本の同一の軽鎖および2本の同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)と、それに続く3つの定常ドメイン(CH1、CH2、およびCH3)を有しており、ここで、第1の定常ドメインと第2の定常ドメインの間にはヒンジ領域が位置している。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)とそれに続く軽鎖定常(CL)ドメインを有している。抗体の軽鎖は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる2つのタイプの内の1つに割り当てることができる。

10

【0038】

II 本明細書において報告される方法

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、50年前よりも前に最初に説明された物理的現象である。FRETは、ドナー分子からアクセプター分子へのエネルギーの無放射移動に基づいている。両方の分子の直接的な接触は必要とされないため、すなわち、これは距離依存的なエネルギー移動である。したがって、FRETを用いて分子の相互作用を調査することができる。

20

【0039】

FRETドナーは、供給されたエネルギーを最初に吸収する発色団である。FRETアクセプターは、続いてFRETドナーからそのエネルギーが引き渡される発色団である。この相互作用は、吸収されたエネルギーを熱エネルギーに変換せずに、かつ(例えば衝突による)直接的な分子相互作用を必要とせずに、起こる。FRETドナーからFRETアクセプターにエネルギーが移動することにより、FRETアクセプターのエネルギー状態が高まる。最終的に、これにより、放射エネルギーを発するFRETアクセプターが生じる。

30

【0040】

FRETが、特に近接したFRETドナーおよびFRETアクセプターのそばで起こるためには、FRETアクセプターの励起波長がFRETドナーの蛍光発光スペクトルの範囲内に存在しなければならない。

【0041】

通常、FRETに基づくエネルギー移動は、FRETアクセプター蛍光の出現またはFRETドナー蛍光の減少のいずれかによって検出することができる。FRETドナーは常に蛍光性分子である。

【0042】

FRETを検出するために、いくつかの異なる方法が存在する。FRETにより、FRETアクセプターの蛍光だけでなくFRETドナーの蛍光も変化するため、これら2つのシグナルの比を得ることができ、この比は、絶対濃度とは無関係である。

40

【0043】

蛍光に基づく分光測定法は、生物学的アッセイ法に並外れた感度を与える。これは、測定されるべき蛍光の波長が、励起蛍光およびバックグラウンド蛍光とは異なることによる。生物学的アッセイ法で使用される蛍光に基づく分光測定方法の1つの欠点は、検出可能なシグナルの強度が変わりやすいことである(Gribbon et al., Drug Discov. Today 8 (2003) 1035; Gakamsky et al., Anal. Biochem. 409 (2011) 89; Thorne et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 315)。

【0044】

50

時間分解シグナルは、強度の変動にたいして無関係であるため、時間分解蛍光測定が、アッセイ法の性能を向上させるために確立された(Moger et al., Screening 11 (2006) 765)。蛍光寿命は、モーメント解析(Isenberg et al., Biophys. J. 9 (1969) 1337)、多次指数関数的当てはめ(Knutson et al., Chem. Phys. Lett. 102 (1983) 501; Beechem et al., Num. Comput. Methods 210 (1992) 37)、またはフェーザー解析(Jameson et al., Methods 59 (2013) 278)などの方法で使用される。これは、共鳴エネルギー移動のような生物学的蛍光に基づくアッセイ法において使用されている(例えば、Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. (Springer, New York, 2006)を参照されたい)。生物学的相互作用は、このアプローチを用いる測定法であった(Jameson et al., Methods 59 (2013) 278; Dong et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 449 (2014) 196; Lebakken et al., J. Biomol. Screening 12 (2007) 828; Maltman et al., Chem. Commun. 46 (2010) 6929; Paterson et al., Anal. Biochem. 402 (2010) 54)。

【0045】

蛍光寿命測定を使用する方法には、時間相関単一光子計数法(TCSPC)(Becker, The BH TCSPC Handbook, 5th ed. (Becker & Hickl, Berlin, 2012))、直接的波形記録(DWR)(Muretta et al., Rev. Sci. Instrum. 81 (2010) 103101)が含まれる。

【0046】

本明細書において報告される方法は、多重特異性抗体がその抗原の内の2つに同時結合した際の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の変化(増大または発生)に基づいている。これらの抗原は、真核細胞の外側細胞膜上に蛍光体との融合タンパク質として提示されており、ここで、一方の抗原はFRETドナー蛍光体と融合されており、それぞれの他方の抗原は、FRETアクセプター蛍光体と融合されている。

【0047】

以下の段階を含む、第1の抗原および第2の抗原への多重特異性抗体の同時結合を測定するための方法が、本明細書において報告される:

- (a)細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした/FRETドナーに融合された第1の抗原およびFRETアクセプターをタグ付けした/FRETアクセプターに融合された第2の抗原を発現する細胞を、多重特異性抗体と共にインキュベートする段階、ならびに
- (b)FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって多重特異性抗体の同時結合を測定する段階。

【0048】

本明細書において報告される1つの局面は、第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位および第2の抗原に特異的に結合する第2の結合部位を含み、これら2つの結合部位がそれぞれの抗原に少なくとも10倍の差がある結合親和性で結合する、二重特異性抗体について、大きい方の K_D 値でその抗原に特異的に結合する結合部位の結合相互作用(強度)を測定するための方法であり、この方法は、以下の段階を含む:

- (a)細胞膜に結合しているFRETドナーをタグ付けした/FRETドナーに融合された第1の抗原およびFRETアクセプターをタグ付けした/FRETアクセプターに融合された第2の抗原を発現する細胞を、二重特異性抗体と共にインキュベートし、FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動を測定することによって二重特異性抗体の結合を測定する段階、
- (b)二重特異性抗体の、 K_D 値が小さい方の結合部位を含む漸増濃度の単一特異性(二価)抗体の存在下で段階(a)を繰り返す段階、ならびに
- (c)FRETドナーからFRETアクセプターへのエネルギー移動が減少する単一特異性(二価)抗体の濃度を測定することによって、結合相互作用(強度)を測定する段階。

【0049】

本明細書において報告される1つの局面は、第1の発色団と第2の発色団の間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の変化を測定することによって、第1の抗原および第2の抗原への多重特異性抗体の同時結合を測定するための方法であり、この方法は、以下の段階:

-細胞の外表面/膜上に第1の抗原および第2の抗原を含む遺伝子操作された細胞を提供する段階であって、第1の抗原が第1の発色団に融合されており、第2の抗原が第2の発色団に融

10

20

30

40

50

合されている、段階；

-細胞を多重特異性抗体と接触させて混合物を形成させる段階；ならびに

-第1の発色団、第2の発色団、またはそれらの組合せの蛍光寿命を測定する段階を含み、

ここで、多重特異性抗体の存在下での蛍光寿命と多重特異性抗体の非存在下での蛍光寿命とが異なることにより、その多重特異性抗体が第1の抗原および第2の抗原に同時に結合することが示される。

【0050】

1つの態様において、細胞膜に結合しているFRETドナーおよび細胞膜に結合しているFRETアクセプターは、N末端からC末端の方向に、以下を含む：

H₂N-抗原-FRETドナー/アクセプター-膜貫通ドメイン-COOH。

【0051】

1つの態様において、FRETドナーおよび/またはFRETアクセプターは、それぞれ、タグとFRETドナー蛍光色素またはタグとFRETアクセプター蛍光色素の結合体である。1つの態様において、結合体は、非共有結合性結合体であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプター蛍光色素は、蛍光色素結合型抗体である。1つの態様において、結合体は共有結合性結合体であり、タグは酵素であり、FRETドナー蛍光色素および/またはFRETアクセプター蛍光色素は、蛍光色素で標識された自殺酵素基質である。

【0052】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、FRETは、TR-FRET(time-resolved fluorescence resonance energy transfer)である。

【0053】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、第1の発色団はFRETドナーであり、第2の発色団はFRETアクセプターである。

【0054】

FRETドナーおよびFRETアクセプターは、FRETを実施するための適性に基づいて選択される。

【0055】

すべての局面および態様の1つの態様において、発色団は、蛍光色素が結合されているアミノ酸である。

【0056】

適切な発色団の例には、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および青色蛍光タンパク質を含む蛍光タンパク質が含まれるが、それらに限定されるわけではない。緑色蛍光タンパク質および赤色蛍光タンパク質が、FRETドナー-FRETアクセプターペアとして使用され得、青色蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質が、FRETドナー-FRETアクセプターペアとして使用され得る。異なる型の緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および青色蛍光タンパク質のアミノ酸配列は、当業者には公知であり、これらのタンパク質の類似体であるため、容易に入手可能である。他の発色団には、タンパク質が細胞表面に存在する場合にそのタンパク質に結合することができる蛍光色素のような蛍光色素が含まれる。このような色素の例は当技術分野において公知であり、日常的に使用される。例には、反応性のヨードアセトアミド基、マレイミド基、またはチオスルホナート基を有している、システインと反応する色素が含まれる。他の例には、タンパク質標識試薬FLASH-EDT2、すなわちドメインCCXXCCと反応できる色素(Invitrogen)、およびSNAPタグ、すなわち自己標識タンパク質タグ(New England Biolabs)が含まれる。改変tRNAによって標的タンパク質中に組み込まれている非天然アミノ酸と特異的に反応する他の蛍光色素が、利用可能である。

【0057】

FRETドナーが発するエネルギー(発光スペクトル)が、FRETアクセプターによって吸収されるエネルギー(励起スペクトル)と部分的に重なること、例えばエネルギー移動プロセス(FRET)が2つの発色団の間で起こることを条件として、適切に選択された任意の2つの発色

10

20

30

40

50

団を、本明細書において報告される方法においてFRETドナー-FRETアクセプターペアとして使用することができる。この重複を満たすFRETドナーおよびFRETアクセプターは、FRETドナー-FRETアクセプターペアと呼ばれる。1つの態様において、長い波長で励起され得るFRETドナーの方が、短い波長で励起可能なものより優れている。また、FLTが長い(3ナノ秒(ns)より長い)プローブの方が、FLTが短いプローブより優れている。

【0058】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、FRETドナーは、FRETアクセプターの励起波長と部分的に重なる発光波長を有している蛍光色素である。

【0059】

FRETドナーおよびFRETアクセプターは、ポリペプチド、すなわち各抗原のN末端、C末端、または内部の部位に、挿入されるか、または融合され得る。

10

【0060】

1つの態様において、(i)FRETドナーまたはFRETアクセプターは、SNAPタグおよびベンジルグアニンの共有結合性複合体であり、かつ(ii)FRETアクセプターまたはFRETドナーは、CLIPタグおよびO²-ベンジルシトシンの共有結合性複合体であり、ここで、FRETドナーおよびFRETアクセプターは、異なるタグである。

【0061】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、FRETは、細胞および多重特異性抗体を混合することによって開始される。

【0062】

20

本明細書において報告されるすべての局面および態様の内の1つの態様において、FRETドナーおよびFRETアクセプターは、蛍光色素が結合できる異種ペプチドドメインを含む。1つの態様において、本明細書において報告される方法は、表面に抗原を提示している細胞を、蛍光色素でその抗原を標識するための適切なタンパク質標識試薬と接触させる段階を含む。

【0063】

すべての局面および態様の1つの態様において、FRETドナーおよびFRETアクセプターはそれぞれ、酵素と蛍光体の共有結合性結合体である。

【0064】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、多重特異性抗体の存在下での蛍光寿命と多重特異性抗体の非存在下での蛍光寿命の差は、FRETドナーの蛍光寿命の減少量である。

30

【0065】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、多重特異性抗体の存在下での蛍光寿命と多重特異性抗体の非存在下での蛍光寿命の差は、FRETアクセプターの蛍光寿命の増加量である。

【0066】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。

【0067】

40

本明細書において報告されるすべての局面および態様の内の1つの態様において、第1の抗原は、第2の抗原とは異なる。

【0068】

本明細書において報告されるすべての局面の内の1つの態様において、第1の抗原および第2の抗原は同一であり、二重特異性抗体は、第1の抗原上の第1のエピトープおよび第1の抗原上の第2のエピトープに結合し、ここで、第1のエピトープは第2のエピトープと重なり合っていない。

【0069】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、FRETは、FRETドナーの発光シグナルとFRETアクセプターの発光シグナルの比またはFRETアクセプターの発光シグナルとFRET

50

ドナーの発光シグナルの比を測定することによって、測定される。

【0070】

すべての局面および態様の内の1つの態様において、測定に使用される発光波長の帯域幅は、励起波長の帯域幅より小さい。

【0071】

すべての局面の1つの態様において、細胞は真核細胞である。1つの態様において、細胞は、HEK細胞またはCHO細胞である。

【0072】

本明細書において報告される方法の1つの態様において、FRETは、単一の発光波長で測定される。特定の態様において、FRET蛍光寿命は、2つまたはそれ以上の波長で測定される。特定の態様において、本明細書において報告される方法は、複数のウェルを有しているプレート、例えばマルチウェルプレートまたはマルチドメインマルチウェルプレートのウェルにおいて実施される。

10

【0073】

III 多重特異性抗体

本発明の方法の抗体は、多重特異性抗体である。

【0074】

より詳細には、本発明の方法の抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる標的に対する結合特異性を有しているモノクローナル抗体である。特定の態様において、結合特異性の内の一方は、第1の抗原/標的に対するものであり、他方は、他の任意の抗原/標的に対するものである。特定の態様において、二重特異性抗体は、同じ抗原/標的の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

20

【0075】

多重特異性抗体を作製するための技術には、異なる特異性を有している2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え同時発現(Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, およびTraunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659を参照されたい)および「ノブインホール」操作(例えばUS 5,731,168を参照されたい)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。また、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電的操縦効果进行操作すること(WO 2009/089004);2つまたはそれ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、US 4,676,980およびBrennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83を参照されたい);二重特異性抗体を作製するためのロイシンジッパーを用いること(例えば、Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553を参照されたい);二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術を用いること(例えば、Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照されたい);および単鎖Fv(sFv)二量体を用いること(例えば、Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374を参照されたい);ならびに例えばTutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69で説明されているように三重特異性抗体を調製することによって、多重特異性抗体を作製することもできる。

30

【0076】

「オクトパス抗体」を含む、3つまたはそれ以上の機能的抗原結合部位を有している操作された抗体もまた、本明細書に含まれる(例えばUS 2006/0025576を参照されたい)。

40

【0077】

また、本明細書の抗体または断片には、[[PRO]]ならびに別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」または「DAF」も含まれる(例えばUS 2008/0069820を参照されたい)。

【0078】

また、本明細書の抗体または断片には、WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792、およびWO 2010/145793において説明されている多重特異性抗体も含まれる。

50

【 0 0 7 9 】

本発明の方法において見られるような抗体は、少なくとも二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、多重特異性抗体のグループのメンバーである。二重特異性抗体は、抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体軽鎖可変ドメイン(VL)のペアによってそれぞれ形成されており、異なる抗原または同じ抗原上の異なるエピトープに結合する、少なくとも2つの結合部位を含む。このような二重特異性抗体は、1+1型である。他の二重特異性抗体の型は、2+1型(第1の抗原もしくはエピトープに対する2つの結合部位および第2の抗原もしくはエピトープに対する1つの結合部位を含む)または2+2型(第1の抗原もしくはエピトープに対する2つの結合部位および第2の抗原もしくはエピトープに対する2つの結合部位を含む)である。

10

【 0 0 8 0 】

すべての局面の1つの態様において、本発明の方法の抗体は、以下を含む(位置はすべて、KabatのEU指標に基づく)

(i)任意で変異P329G、L234A、およびL235Aを含む、ヒトIgG1サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

(ii)任意で変異P329G、S228P、およびL235Eを含む、ヒトIgG4サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

(iii)任意で変異P329G、L234A、L235A、I253A、H310A、およびH435Aを含むか、もしくは任意で変異P329G、L234A、L235A、H310A、H433A、およびY436Aを含む、ヒトIgG1サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

20

(iv)(a)一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

(b)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびY349Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

(c)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む、ヘテロ二量体Fc領域、

または

(v)両方のFc領域ポリペプチドが、変異P329G、L234A、およびL235Aを含み、かつ

(a)一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

30

(b)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびY349Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

(c)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む、

ヒトIgG1サブクラスのヘテロ二量体Fc領域、

または

(vi)両方のFc領域ポリペプチドが、変異P329G、S228P、およびL235Eを含み、かつ

(a)一方のFc領域ポリペプチドが変異T366Wを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、およびY407Vを含むか、もしくは

40

(b)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびY349Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびS354Cを含むか、もしくは

(c)一方のFc領域ポリペプチドが、変異T366WおよびS354Cを含み、他方のFc領域ポリペプチドが、変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む、

ヒトIgG4サブクラスのヘテロ二量体Fc領域

または

(vii)(i)、(ii)、および(iii)の内の1つと(vi)、(v)、および(vi)の内の1つとの組合せ。

【 0 0 8 1 】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖、ならびに

50

(b)第2の軽鎖および第2の重鎖の可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替わっている、第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖を含む、
二価二重特異性抗体である。

【 0 0 8 2 】

(a)の抗体は、(b)で報告される改変を含まず、(a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【 0 0 8 3 】

(b)の抗体において、
軽鎖内部で

可変軽鎖ドメインVLは、該抗体の可変重鎖ドメインVHで置換されており、かつ
重鎖内部で

可変重鎖ドメインVHは、該抗体の可変軽鎖ドメインVLで置換されている。

【 0 0 8 4 】

1つの態様において、

(i)(a)の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸(Kabatに基づく番号付与)は、正電荷を持ったアミノ酸によって置換されており、(a)の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸(KabatのEU指標に基づく番号付与)は、負電荷を持ったアミノ酸によって置換されているか、

または

(ii)(b)の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸(Kabatに基づく番号付与)は、正電荷を持ったアミノ酸によって置換されており、(b)の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸(KabatのEU指標に基づく番号付与)は、負電荷を持ったアミノ酸によって置換されている。

【 0 0 8 5 】

1つの態様において、

(i)(a)の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸は、独立にリジン(K)、アルギニン(R)、もしくはヒスチジン(H)によって置換されており(Kabatに基づく番号付与)(1つの好ましい態様において、独立にリジン(K)もしくはアルギニン(R)による)、(a)の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、独立にグルタミン酸(E)もしくはアスパラギン酸(D)によって置換されているか(KabatのEU指標に基づく番号付与)、

または

(ii)(b)の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸は、独立にリジン(K)、アルギニン(R)、もしくはヒスチジン(H)によって置換されており(Kabatに基づく番号付与)(1つの好ましい態様において、独立にリジン(K)もしくはアルギニン(R)による)、(b)の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、独立にグルタミン酸(E)もしくはアスパラギン酸(D)によって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 0 8 6 】

1つの態様において、第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124位および123位のアミノ酸は、Kによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 0 8 7 】

1つの態様において、第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、123位のアミノ酸は、Rによって置換されており、124位のアミノ酸は、Kによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 0 8 8 】

1つの態様において、第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147位および213位のアミノ酸は、Eによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

1つの態様において、第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位および123位のアミノ酸はKによって置換されており、第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位および213位のアミノ酸は、Eによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【0090】

1つの態様において、第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、123位のアミノ酸はRによって置換されており、124位のアミノ酸は、Kによって置換されており、第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位および213位のアミノ酸は、どちらもEによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【0091】

1つの態様において、第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124位および123位のアミノ酸はKによって置換されており、第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147位および213位のアミノ酸はEによって置換されており、第1の軽鎖の変域ドメインVLにおいて、38位のアミノ酸はKによって置換されており、第1の重鎖の変域ドメインVHにおいて、39位のアミノ酸はEによって置換されており、第2の重鎖の変域ドメインVLにおいて、38位のアミノ酸はKによって置換されており、第2の軽鎖の変域ドメインVHにおいて、39位のアミノ酸はEによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

10

【0092】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖、ならびに
(b)第2の軽鎖および第2の重鎖の変域ドメインVLおよびVHが互いに入れ替わっており、かつ第2の軽鎖および第2の重鎖の定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替わっている、第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖を含む、
二価二重特異性抗体である。

20

【0093】

(a)の抗体は、(b)で報告される改変を含まず、(a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0094】

(b)の抗体において、
軽鎖内部で

可変軽鎖ドメインVLは、該抗体の可変重鎖ドメインVHで置換されており、定常軽鎖ドメインCLは、該抗体の定常重鎖ドメインCH1で置換されており;かつ

重鎖内部で

可変重鎖ドメインVHは、該抗体の可変軽鎖ドメインVLで置換されており、定常重鎖ドメインCH1は、該抗体の定常軽鎖ドメインCLで置換されている。

30

【0095】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖、ならびに
(b)第2の軽鎖および第2の重鎖の定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替わっている、第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖を含む、
二価二重特異性抗体である。

40

【0096】

(a)の抗体は、(b)で報告される改変を含まず、(a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0097】

(b)の抗体において、
軽鎖内部で

定常軽鎖ドメインCLは、該抗体の定常重鎖ドメインCH1で置換されており;かつ

重鎖内部で

50

定常重鎖ドメインCH1は、該抗体の定常軽鎖ドメインCLで置換されている。

【0098】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖および2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、ならびに

(b)1~4個の別の抗原に特異的に結合する(すなわち、第2および/または第3および/または第4および/または第5の抗原、好ましくは1つの別の抗原、すなわち第2の抗原に特異的に結合する)1つ、2つ、3つ、または4つの単鎖Fab断片を含み、

(b)の該単鎖Fab断片が、(a)の該完全長抗体に、該完全長抗体の重鎖または軽鎖のC末端またはN末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている、
多重特異性抗体である。

10

【0099】

1つの態様において、第2の抗原に結合する1つまたは2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の重鎖または軽鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

【0100】

1つの態様において、第2の抗原に結合する1つまたは2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の重鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

20

【0101】

1つの態様において、第2の抗原に結合する1つまたは2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の軽鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

【0102】

1つの態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の各重鎖または各軽鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

【0103】

1つの態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の各重鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

30

【0104】

1つの態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の単鎖Fab断片は、完全長抗体に、該完全長抗体の各軽鎖のC末端の位置でペプチドリンカーを介して融合されている。

【0105】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖および2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、

(b)(ba)抗体重鎖可変ドメイン(VH)、

または

(bb)抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体定常ドメイン1(CH1)

からなる第1のポリペプチドであって、

そのVHドメインのN末端において、該完全長抗体の2本の重鎖の内の一方のC末端にペプチドリンカーを介して融合されている、第1のポリペプチド、

(c)(ca)抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、

または

(cb)抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)

からなる第2のポリペプチドであって、

そのVLドメインのN末端において、該完全長抗体の2本の重鎖の内の他方のC末端にペプチドリンカーを介して融合されている、第2のポリペプチド

40

50

を含み、

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)と第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが一緒になって、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成する、三価二重特異性抗体である。

【0106】

1つの態様において、(b)のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)および(c)のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)は、結合しており、以下の位置の間のジスルフィド結合の導入による鎖間ジスルフィド架橋を介して安定化される：

(i)重鎖可変ドメイン44位～軽鎖可変ドメイン100位、または

(ii)重鎖可変ドメイン105位～軽鎖可変ドメイン43位、または

(iii)重鎖可変ドメイン101位～軽鎖可変ドメイン100位(番号付与は、常にKabatのEU指標に基づく)。

10

【0107】

安定化のために非天然ジスルフィド架橋を導入するための技術は、例えば、WO 94/0293 50、Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al., Nucl. Med. Biol. 25 (1998) 387-393;およびSchmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721において説明されている。1つの態様において、(b)および(c)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメイン44位と軽鎖可変ドメイン100位の間に存在する。1つの態様において、(b)および(c)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメイン105位と軽鎖可変ドメイン43位の間に存在する(番号付与は、常にKabatに基づく)。1つの態様において、単鎖Fab断片の可変ドメインVHとVLの間に該任意のジスルフィド安定化がなされていない三価二重特異性抗体が好ましい。

20

【0108】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖、ならびに(b)可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替わっており、かつ/または定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替わっている、第2の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第2の(改変された)軽鎖および第2の(改変された)重鎖を含み、かつ

30

(c)1つまたは2つの別の抗原に(すなわち、第3および/または第4の抗原に)特異的に結合する1~4個の抗原結合ペプチドが、(a)および/または(b)の軽鎖または重鎖のC末端またはN末端にペプチドリンカーを介して融合されている、三重特異性抗体または四重特異性抗体である。

【0109】

(a)の抗体は、(b)で報告される改変を含まず、(a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0110】

1つの態様において、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、(c)において、1つまたは2つの別の抗原に特異的に結合する1つまたは2つの抗原結合ペプチドを含む。

40

【0111】

1つの態様において、抗原結合ペプチドは、scFv断片およびscFab断片からなる群より選択される。

【0112】

1つの態様において、抗原結合ペプチドは、scFv断片である。

【0113】

1つの態様において、抗原結合ペプチドは、scFab断片である。

【0114】

1つの態様において、抗原結合ペプチドは、(a)および/または(b)の重鎖のC末端に融合されている。

50

【 0 1 1 5 】

1つの態様において、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、(c)において、1つの別の抗原に特異的に結合する1つまたは2つの抗原結合ペプチドを含む。

【 0 1 1 6 】

1つの態様において、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、(c)において、第3の抗原に特異的に結合する2つの同一の抗原結合ペプチドを含む。1つの好ましい態様において、このような2つの同一の抗原結合ペプチドは両方とも、(a)および(b)の重鎖のC末端に、同じペプチドリンカーを介して融合されている。1つの好ましい態様において、2つの同一の抗原結合ペプチドは、scFv断片またはscFab断片のいずれかである。

【 0 1 1 7 】

1つの態様において、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、(c)において、第3および第4の抗原に特異的に結合する2つの抗原結合ペプチドを含む。1つの態様において、該2つの抗原結合ペプチドは両方とも、(a)および(b)の重鎖のC末端に、同じペプチドコネクタを介して融合されている。1つの好ましい態様において、該2つの抗原結合ペプチドは、scFv断片またはscFab断片のいずれかである。

【 0 1 1 8 】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する(かつ2つのFab断片を含む)、抗体の2本の軽鎖および2本の重鎖、

(b)第2の抗原に特異的に結合する、抗体の2つの追加のFab断片であって、(a)の重鎖のC末端またはN末端のいずれかにペプチドリンカーを介して両方とも融合されている、抗体の2つの追加のFab断片

を含み、

ここで、これらのFab断片において、以下の改変:

(i)(a)の両方のFab断片において、もしくは(b)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、かつ/もしくは定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられるか、

または

(ii)(a)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、かつ定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられ、かつ

(b)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられるか、もしくは定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられるか、

または

(iii)(a)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられるか、もしくは定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられ、かつ

(b)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、かつ定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられるか、

または

(iv)(a)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、かつ(b)の両方のFab断片において、定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられるか、

または

(v)(a)の両方のFab断片において、定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられ、かつ(b)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられる、

が行われた、

二重特異性四価抗体である。

【 0 1 1 9 】

1つの態様において、前記追加のFab断片は両方とも、(a)の重鎖のC末端または(a)の重鎖のN末端のいずれかに、ペプチドリンカーを介して融合されている。

【 0 1 2 0 】

1つの態様において、前記追加のFab断片は両方とも、(a)の重鎖のC末端のいずれかにペ

10

20

30

40

50

プチドリinkerを介して融合されている。

【0121】

1つの態様において、前記追加のFab断片は両方とも、(a)の重鎖のN末端にペプチドコネクターを介して融合されている。

【0122】

1つの態様において、Fab断片において、以下の改変が行われる：

(i)(a)の両方のFab断片において、もしくは(b)の両方のFab断片において、可変ドメインLおよびVHが互いに入れ替えられ、

かつ/または

定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられる。

10

【0123】

1つの態様において、Fab断片において、以下の改変が行われる：

(i)(a)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、

かつ/または

定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられる。

【0124】

1つの態様において、Fab断片において、以下の改変が行われる：

(i)(a)の両方のFab断片において、定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられる。

【0125】

1つの態様において、Fab断片において、以下の改変が行われる：

(i)(b)の両方のFab断片において、可変ドメインVLおよびVHが互いに入れ替えられ、

かつ/または

定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられる。

20

【0126】

1つの態様において、Fab断片において、以下の改変が行われる：

(i)(b)の両方のFab断片において、定常ドメインCLおよびCH1が互いに入れ替えられる。

【0127】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、かつ第1のVH-CH1ドメインペアを含む、第1の抗体の(改変された)重鎖であって、該重鎖のC末端に、該第1の抗体の第2のVH-CH1ドメインペアのN末端がペプチドリinkerを介して融合されている、第1の抗体の(改変された)重鎖、

(b)(a)の該第1の抗体の2本の軽鎖、

(c)第2の抗原に特異的に結合し、かつ第1のVH-CLドメインペアを含む、第2の抗体の(改変された)重鎖であって、該重鎖のC末端に、該第2の抗体の第2のVH-CLドメインペアのN末端がペプチドリinkerを介して融合されている、第2の抗体の(改変された)重鎖、および

(d)CL-CH1ドメインペアをそれぞれ含む、(c)の該第2の抗体の2本の(改変された)軽鎖を含む、二重特異性四価抗体である。

30

【0128】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する第1の完全長抗体の重鎖および軽鎖、ならびに

(b)重鎖のN末端がペプチドリinkerを介して軽鎖のC末端に連結されている、第2の抗原に特異的に結合する第2の完全長抗体の重鎖および軽鎖

を含む、二重特異性抗体である。

40

【0129】

(a)の抗体は、(b)で報告される改変を含まず、重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0130】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖および2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、ならびに

50

(b)第2の抗原に特異的に結合する、VH2ドメインおよびVL2ドメインを含むFv断片であって、両方のドメインがジスルフィド架橋によって互いに連結されている、Fv断片を含み、

VH2ドメインまたはVL2ドメインのどちらか一方のみが、第1の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖または軽鎖にペプチドリンカーを介して融合されている、二重特異性抗体である。

【0131】

この二重特異性物において、(a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0132】

1つの態様において、VH2ドメインまたはVL2ドメインの他方は、第1の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖にも軽鎖にもペプチドリンカーを介して融合されていない。

10

【0133】

本明細書において報告されるすべての局面において、第1の軽鎖はVLドメインおよびCLドメインを含み、第1の重鎖は、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。

【0134】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する2つのFab断片、

(b)CH1ドメインおよびCLドメインが互いに交換されている、第2の抗原に特異的に結合する1つのCrossFab断片、

20

(c)第1のFc領域重鎖および第2のFc領域重鎖を含む1つのFc領域を含み、

2つのFab断片のCH1ドメインのC末端が、重鎖Fc領域ポリペプチドのN末端に連結されており、かつCrossFab断片のCLドメインのC末端が、Fab断片の内の1つのVHドメインのN末端に連結されている、

二重特異性三価抗体である。

【0135】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合する2つのFab断片、

(b)CH1ドメインおよびCLドメインが互いに交換されている、第2の抗原に特異的に結合する1つのCrossFab断片、

30

(c)第1のFc領域重鎖および第2のFc領域重鎖を含む1つのFc領域を含み、

第1のFab断片のCH1ドメインのC末端が、重鎖Fc領域ポリペプチドの内の一方のN末端に連結されており、CrossFab断片のCLドメインのC末端が、他方の重鎖Fc領域ポリペプチドのN末端に連結されており、かつ

第2のFab断片のCH1ドメインのC末端が、第1のFab断片のVHドメインのN末端またはCrossFab断片のVHドメインのN末端に連結されている、

二重特異性三価抗体である。

【0136】

40

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖および2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、ならびに

(b)第2の抗原に特異的に結合する、VH2ドメインおよびVL2ドメインを含み重鎖断片および軽鎖断片を含むFab断片であって、

軽鎖断片内部で

可変軽鎖ドメインVL2は、該抗体の可変重鎖ドメインVH2で置換されており、かつ

重鎖断片内部で

可変重鎖ドメインVH2は、該抗体の可変軽鎖ドメインVL2で置換されている、

Fab断片

50

を含み、

重鎖Fab断片は、完全長抗体の重鎖の内の一方向のCH1ドメインと完全長抗体の各Fc領域との間に挿入されており、軽鎖Fab断片のN末端は、重鎖Fab断片が挿入された完全長抗体の重鎖と対になっている完全長抗体の軽鎖のC末端に結合されている、二重特異性抗体である。

【 0 1 3 7 】

1つの態様において、多重特異性抗体は、

(a)第1の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖および2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、ならびに

(b)第2の抗原に特異的に結合する、VH2ドメインおよびVL2ドメインを含み重鎖断片および軽鎖断片を含むFab断片であって、

軽鎖断片内部で

可変軽鎖ドメインVL2は、該抗体の可変重鎖ドメインVH2で置換されており、

重鎖断片内部で

可変重鎖ドメインVH2は、該抗体の可変軽鎖ドメインVL2で置換されている、

Fab断片

を含み、

Fab断片の重鎖断片のC末端は、完全長抗体の重鎖の内の一方向のN末端に結合されており、かつFab断片の軽鎖断片のC末端は、Fab断片の重鎖断片が結合されている完全長抗体の重鎖と対になっている完全長抗体の軽鎖のN末端に結合されている、

二重特異性抗体である。

【 0 1 3 8 】

すべての局面の1つの態様において、本明細書において報告される抗体は、少なくとも2本の重鎖ポリペプチドのヘテロ二量体化を必要とする多重特異性抗体である。

【 0 1 3 9 】

ヘテロ二量体化を支援する目的でCH3を改変するためのいくつかのアプローチが、例えば、WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291において説明されている。典型的には、当技術分野において公知のアプローチにおいて、第1の重鎖のCH3ドメインおよび第2の重鎖のCH3ドメインは両方も、1つの操作されたCH3ドメインを含む重鎖が、同じ構造の別の重鎖ともはやホモ二量体化できないように、相補的な様式で操作される(例えば、CH3を操作された第1の重鎖は、CH3を操作された別の第1の重鎖ともはやホモ二量体化できず;CH3を操作された第2の重鎖は、CH3を操作された別の第2の重鎖ともはやホモ二量体化できない)。その結果、1つの操作されたCH3ドメインを含む重鎖は、相補的な様式で操作された、CH3ドメインを含む別の重鎖とヘテロ二量体化することを余儀なくされる。この態様では、第1の重鎖のCH3ドメインおよび第2の重鎖のCH3ドメインは、アミノ酸置換によって相補的な様式で操作され、その結果、第1の重鎖および第2の重鎖はヘテロ二量体化することを余儀なくされ、一方で、(例えば、立体配置に関する理由のために)第1の重鎖および第2の重鎖は、もはやホモ二量体化できなくなる。

【 0 1 4 0 】

上記に挙げられ含められた、当技術分野において公知の重鎖ヘテロ二量体化を支援するための様々なアプローチは、第1の抗原に特異的に結合する第1の抗体由来の「非交差Fab領域」および第2の抗原に特異的に結合する第2の抗体由来の「交差Fab領域」を、前述した特定のアミノ酸置換と組み合わせて含む本明細書において報告される多重特異性抗体を提供する際に使用される、様々な代替手段として企図される。

【 0 1 4 1 】

本明細書において報告される多重特異性抗体のCH3ドメインは、例えば、WO 96/027011、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621;およびMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681においていくつかの例を用いて詳細に説明さ

10

20

30

40

50

れている「ノブイントゥーホール」技術によって改変することができる。この方法では、2つのCH3ドメインの相互作用面を改変して、これら2つのCH3ドメインを含む両方の重鎖のヘテロ二量体化を増加させる。(2本の重鎖の)2つのCH3ドメインのそれぞれが、「ノブ」となることができ、他方が「ホール」である。ジスルフィド架橋の導入により、ヘテロ二量体はさらに安定し(Merchant, A.M., et al., Nature Biotechnol. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)、収率は上昇する。

【 0 1 4 2 】

1つの好ましい態様において、多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにT366W変異、および「ホール鎖」のCH3ドメインに変異T366S、L368A、Y407Vを含む(KabatのEU指標に基づく番号付与)。また、例えば、「ノブ鎖」のCH3ドメイン中へのY349C変異および「ホール鎖」のCH3ドメイン中へのE356C変異またはS354C変異の導入による、CH3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋も使用され得る(Merchant, A.M., et al., Nature Biotechnol. 16 (1998) 677-681)。したがって、別の好ましい態様において、多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの内的一方における変異Y349CおよびT366Wならびに2つのCH3ドメインの内の方における変異E356C、T366S、L368A、およびY407Vを含むか、または多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの内の方における変異Y349CおよびT366Wならびに2つのCH3ドメインの内の方における変異S354C、T366S、L368A、およびY407Vを含む(一方のCH3ドメイン中の追加のY349C変異および他方のCH3ドメイン中の追加のE356C変異またはS354C変異が鎖間ジスルフィド架橋を形成する)(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 4 3 】

しかし、EP 1870459において説明されている他のノブインホール技術もまた、代わりにまたは追加で使用することができる。1つの態様において、多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメイン中の変異R409DおよびK370Eならびに「ホール鎖」のCH3ドメイン中の変異D399KおよびE357Kを含む(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 4 4 】

1つの態様において、多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメイン中のT366W変異ならびに「ホール鎖」のCH3ドメイン中の変異T366S、L368A、およびY407V、さらに、「ノブ鎖」のCH3ドメイン中の変異R409DおよびK370Eならびに「ホール鎖」のCH3ドメイン中の変異D399KおよびE357Kを含む(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 4 5 】

1つの態様において、多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの内の方における変異Y349CおよびT366Wならびに2つのCH3ドメインの内の方における変異S354C、T366S、L368A、およびY407Vを含むか、または多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの内の方における変異Y349CおよびT366Wならびに2つのCH3ドメインの内の方における変異S354C、T366S、L368A、およびY407V、さらに、「ノブ鎖」のCH3ドメイン中の変異R409DおよびK370Eならびに「ホール鎖」のCH3ドメイン中の変異D399KおよびE357Kを含む(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 4 6 】

「ノブイントゥーホール技術」以外に、ヘテロ二量体化を強制するために多重特異性抗体の重鎖のCH3ドメインを改変するための他の技術が、当技術分野において公知である。これらの技術、特に、WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、およびWO 2013/096291において説明されているものは、「ノブイントゥーホール技術」の代替手段として、多重特異性抗体と組み合わせて本明細書において企図される。

【 0 1 4 7 】

1つの態様において、多重特異性抗体において、EP 1870459において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。このアプローチは、両方、すなわち第1の重鎖と第2の重鎖の間のCH3/CH3ドメイン境界面の特定のアミノ酸位置に、反対電荷を有している荷電アミノ酸を導入するこ

とに基づいている。

【0148】

したがって、この態様では、多重特異性抗体の三次構造において、第1の重鎖のCH3ドメインおよび第2の重鎖のCH3ドメインが、各抗体CH3ドメインの間に位置している境界面を形成し、ここで、第1の重鎖のCH3ドメインの各アミノ酸配列および第2の重鎖のCH3ドメインのアミノ酸配列が、抗体の三次構造において該境界面内に位置する一組のアミノ酸をそれぞれ含み、一方の重鎖のCH3ドメイン中の境界面に位置する一組のアミノ酸から、第1のアミノ酸が、正電荷を持ったアミノ酸によって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメイン中の境界面に位置する一組のアミノ酸から、第2のアミノ酸が、負電荷を持ったアミノ酸によって置換されている。この態様による多重特異性抗体は、本明細書において、「CH3(+/-)に作り変えられた多重特異性抗体」とも呼ばれる(略語「+/-」は、各CH3ドメインに導入された、反対の電荷を持つアミノ酸を意味する)。

10

【0149】

CH3(+/-)に作り変えられた多重特異性抗体の1つの態様において、正電荷を持ったアミノ酸は、K、R、およびHより選択され、負電荷を持ったアミノ酸は、EまたはDより選択される。

【0150】

CH3(+/-)に作り変えられた多重特異性抗体の1つの態様において、正電荷を持ったアミノ酸は、KおよびRより選択され、負電荷を持ったアミノ酸は、EまたはDより選択される。

【0151】

CH3(+/-)に作り変えられた多重特異性抗体の1つの態様において、正電荷を持ったアミノ酸はKであり、負電荷を持ったアミノ酸はEである。

20

【0152】

CH3(+/-)に作り変えられた多重特異性抗体の1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、409位のアミノ酸RはDによって置換されており、位置のアミノ酸KはEによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、399位のアミノ酸DはKによって置換されており、357位のアミノ酸EはKによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【0153】

1つの態様において、WO 2013/157953において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはKによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸LはDによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。別の態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはKによって置換されており、351位のアミノ酸LはKによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸LはDによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

30

【0154】

別の態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはKによって置換されており、351位のアミノ酸LはKによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸LはDによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。さらに、次の置換の内の少なくとも1つが、他方の重鎖のCH3ドメイン中に含まれる:349位のアミノ酸YがEによって置換され、349位のアミノ酸YがDによって置換され、368位のアミノ酸LがEによって置換される(KabatのEU指標に基づく番号付与)。1つの態様において、368位のアミノ酸Lは、Eによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

40

【0155】

1つの態様において、WO 2012/058768において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸LはYによって置換され

50

ており、407位のアミノ酸YはAによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはAによって置換されており、409位のアミノ酸KはFによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。別の態様において、前述の置換に加えて、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、411位のアミノ酸(もともとはT)、399位のアミノ酸(もともとはD)、400位のアミノ酸(もともとはS)、405位のアミノ酸(もともとはF)、390位のアミノ酸(もともとはN)、および392位のアミノ酸(もともとはK)の内の少なくとも1つが置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。好ましい置換は、以下のものである:

- N、R、Q、K、D、E、およびWより選択されるアミノ酸による、411位のアミノ酸Tの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)
- R、W、Y、およびKより選択されるアミノ酸による、399位のアミノ酸Dの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)、
- E、D、R、およびKより選択されるアミノ酸による、400位のアミノ酸Sの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)、
- I、M、T、S、V、およびWより選択されるアミノ酸による、405位のアミノ酸Fの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)、
- R、K、およびDより選択されるアミノ酸による、390位のアミノ酸Nの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)、ならびに
- V、M、R、L、F、およびEより選択されるアミノ酸による、392位のアミノ酸Kの置換(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 5 6 】

(WO 2012/058768に従って作り変えた)多重特異性抗体の別の態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸LはYによって置換されており、407位のアミノ酸YはAによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはVによって置換されており、409位のアミノ酸KはFによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。多重特異性抗体の別の態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸YはAによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはAによって置換されており、409位のアミノ酸KはFによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。最後の前述の態様において、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、392位のアミノ酸KはEによって置換されており、411位のアミノ酸TはEによって置換されており、399位のアミノ酸DはRによって置換されており、400位のア

【 0 1 5 7 】

1つの態様において、WO 2011/143545において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。1つの態様において、両方の重鎖のCH3ドメインにおけるアミノ酸改変は、368位および/または409位に導入される(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 5 8 】

1つの態様において、WO 2011/090762において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。WO 2011/090762は、「ノブイントゥーホール」(KiH)技術によるアミノ酸改変に関する。1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはWによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸YはAによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。別の態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸TはYによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸YはTによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【 0 1 5 9 】

1つの態様において、WO 2011/090762において説明されるアプローチが、IgG2アイソタイプのものである多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。

【 0 1 6 0 】

1つの態様において、WO 2009/089004において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、392位のアミノ酸KまたはNは、負電荷を持ったアミノ酸によって(1つの態様においてはEまたはDによって、1つの好ましい態様においてはDによって)置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、399位のアミノ酸D、356位のアミノ酸EもしくはD、または357位のアミノ酸Eは、正電荷を持ったアミノ酸によって置換されている(1つの態様においてはKもしくはR、1つの好ましい態様においてはKによって、1つの好ましい態様においては399位もしくは356位のアミノ酸がKによって置換されている)(KabatのEU指標に基づく番号付与)。1つの別の態様において、前述の置換に加えて、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、409位のアミノ酸KまたはRは、負電荷を持ったアミノ酸によって(1つの態様においてはEまたはDによって、1つの好ましい態様においてはDによって)置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。1つのさらに別の態様において、前述の置換に加えて、または前述の置換の代わりに、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、439位のアミノ酸Kおよび/または370位のアミノ酸Kは、負電荷を持ったアミノ酸によって(1つの態様においてはEまたはDによって、1つの好ましい態様においてはDによって)互いとは無関係に置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

10

【0161】

1つの態様において、WO 2007/147901において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。1つの態様において、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、253位のアミノ酸KはEによって置換されており、282位のアミノ酸DはKによって置換されており、322位のアミノ酸KはDによって置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、239位のアミノ酸DはKによって置換されており、240位のアミノ酸EはKによって置換されており、292位のアミノ酸KはDによって置換されている(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

20

【0162】

1つの態様において、WO 2007/110205において説明されるアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖および第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。

【0163】

本明細書において報告されるすべての局面および態様の1つの態様において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体または三重特異性抗体である。1つの好ましい態様において、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。

30

【0164】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、抗体は、二価または三価の抗体である。1つの態様において、抗体は、二価の抗体である。

【0165】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、多重特異性抗体は、IgGタイプの抗体の定常ドメイン構造を有している。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、ヒトサブクラスIgG1のもの、または変異L234AおよびL235Aを有しているヒトサブクラスIgG1のものである。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、ヒトサブクラスIgG2のものである。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、ヒトサブクラスIgG3のものである。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、ヒトサブクラスIgG4のもの、または追加の変異S228Pを有しているヒトサブクラスIgG4のものである。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、ヒトサブクラスIgG1またはヒトサブクラスIgG4のものである。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、変異L234AおよびL235Aを有しているヒトサブクラスIgG1のものである(KabatのEU指標に基づく番号付与)。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、変異L234A、L235A、およびP329Gを有しているヒトサブクラスIgG1のものである(KabatのEU指標に基づく番号

40

50

付与)。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、変異S228PおよびL235Eを有しているヒトサブクラスIgG4のものである(KabatのEU指標に基づく番号付与)。本明細書において報告されるすべての局面の1つの別の態様において、多重特異性抗体は、変異S228P、L235E、およびP329Gを有しているヒトサブクラスIgG4のものである(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

【0166】

1つの態様において、本明細書において報告される抗体は、変異PVA236、L234A/L235A、および/もしくはGLPSS331(KabatのEU指標に基づく番号付与)を有しているヒトサブクラスIgG1のもの、またはサブクラスIgG4のものである。別の態様において、抗体は、任意のIgGクラスのものであり、1つの態様において、サブクラスIgG1またはIgG4のものであり、E233、L234、L235、G236、D270、N297、E318、K320、K322、A327、A330、P331、および/またはP329に少なくとも1つの変異を含む(KabatのEU指標に基づく番号付与)。さらに、1つの態様において、抗体は、IgG4サブクラスのものであり、変異S228P、または変異S228PおよびL235Eを含む(Angal, S., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108)(KabatのEU指標に基づく番号付与)。

10

【0167】

本明細書において報告される抗体の重鎖のC末端は、アミノ酸残基PGKで終わる完全なC末端であってよい。重鎖のC末端は、C末端アミノ酸残基の内の1つまたは2つが除去されている短縮されたC末端であってよい。1つの好ましい態様において、重鎖のC末端は、PGで終わる短縮されたC末端である。

20

【0168】

本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、本明細書において指定されるC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、C末端グリシン-リジンジペプチド(G446およびK447、KabatのEU指標に基づく番号付与)を含む。本明細書において報告されるすべての局面の1つの態様において、本明細書において指定されるようにC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、C末端グリシン残基(G446、KabatのEU指標に基づく番号付与)を含む。

【0169】

以下の実施例、配列、および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲において説明される。本発明の精神から逸脱しないように、説明される手順に修正を加えてよいことが理解される。

30

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1】二重特異性抗体の抗原/標的を提示している組換え細胞に二重特異性抗体が同時結合した後のFRETドナーとFRETアクセプターの間のFRET誘導に関する、本明細書において報告されるFRETアッセイ法の図解。

【図2】PD-1発現細胞またはTim3発現細胞(シングルトランスフェクションされている)のFACS結果。1:PD1-CLIP;2:PD1-SNAP;3:Tim3-CLIP;4:Tim3-SNAP。

【図3】PD-1およびTim3発現細胞(ダブルトランスフェクションされている)のFACS結果(下段のドットプロット);各アイソタイプ対照の染色を上段のドットプロットに示している

40

【図4A】PD1およびTim3発現細胞に対して様々な二重特異性抗PD1/Tim3抗体で処理した/を結合させた際のFRETの誘導。BMG Pherastarリーダーを用いて665/620nmで時間分解蛍光を測定した(FRETシグナルの平均 \pm SDを示している[比665/620nm*10,000]、n=3)。A: 1+1型の二重特異性抗体(抗体PD1-Tim3-0389およびPD1-Tim3-0168)および2+2型の二重特異性抗体(抗体PD1-Tim3-0358およびPD1-Tim3-0359)。

【図4B】PD1およびTim3発現細胞に対して様々な二重特異性抗PD1/Tim3抗体で処理した/を結合させた際のFRETの誘導。BMG Pherastarリーダーを用いて665/620nmで時間分解蛍光を測定した(FRETシグナルの平均 \pm SDを示している[比665/620nm*10,000]、n=3)。B: 二重特異性抗体PD1-Tim3-0476およびPD1-Tim3-0477。

50

【図5】PD1およびTim3発現細胞に対して二重特異性抗PD1/Tim3抗体で処理した/を結合させた際のFRETの誘導。BMG Pherastarリーダーを用いて665/620nmで時間分解蛍光を測定した(FRETシグナルの平均±SDを示している[比665/620nm*10,000]、n=3)。1+1型の二重特異性抗体PD1-Tim3-0389および単一特異性の二価の抗PD1抗体を試験し、二重特異性抗体だけがFRETを誘導した。

【図6】単独または混合物として単一特異性抗体および二重特異性抗体を用いたFRETアッセイ法。菱形:二重特異性抗体PD1-Tim3-0168のみ FRETシグナルが視認できる;四角形:二重特異性PD1-Tim3-0168抗体および単一特異性抗PD1抗体の混合物 FRETシグナルが視認できない;三角形:単一特異性の二価の抗PD1モノクローナル抗体のみ FRETシグナルが視認できない。

10

【図7】単独または混合物として単一特異性抗体および二重特異性抗体を用いたFRETアッセイ法。菱形:二重特異性抗体PD1-Tim3-0168のみ FRETシグナルが視認できる;四角形:二重特異性PD1-Tim3-0168抗体および単一特異性抗Tim3抗体の混合物 FRETシグナルが視認できない。

【図8】二重特異性抗体および様々な濃度の単一特異性抗PD1抗体を用いたFRETアッセイ法 抗PD1抗体濃度およびTim3相互作用強度に依存するFRETシグナル;2種の異なる二重特異性抗PD1/Tim3抗体を試験した:PD1-Tim3-0168(黒色)およびPD1-Tim3-0389(灰色)。

【0171】

材料および一般的方法

ヒト免疫グロブリンの軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的情報は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において示されている。抗体鎖のアミノ酸は、Kabatに基づく番号付与に従って番号付与され、言及される(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。

20

【0172】

組換えDNA技術

Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989において説明されているように、標準的方法を用いてDNAを操作した。分子生物学的試薬は、製造業者の取扱説明書に従って使用した。

30

【0173】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、化学合成によって作製したオリゴヌクレオチドから調製した。特異な制限エンドヌクレアーゼ切断部位には含まれた長い遺伝子セグメントを、PCR増幅を含む、オリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーションによって組み立て、続いて、指定された制限部位を介してクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。遺伝子合成断片は、所与の仕様に従ってGenearth (Regensburg, Germany)に注文した。

40

【0174】

DNA配列決定

DNA配列は、MediGenomix GmbH(Martinsried, Germany)またはSequiServe GmbH(Vaterstetten, Germany)で実施された二重鎖配列決定によって決定された。

【0175】

DNAおよびタンパク質の配列解析および配列データの管理

GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)のソフトウェアパッケージバージョン10.2およびInfomaxのVector NT1 Advance suiteバージョン8.0を、配列の作製、マッピング、解析、アノテーション、および図示のために使用した。

【0176】

発現ベクター

50

前述の二重特異性抗体を発現させるために、CMV-イントロンAプロモーターを含むもしくは含まないcDNA構成、またはCMVプロモーターを含むゲノム構成のいずれかに基づく、(例えば、HEK293細胞における)一過性発現のための発現プラスミドを適用することができる。

【0177】

抗体発現カセットのほかに、これらのベクターは以下を含む：

- 大腸菌(E. coli)におけるこのプラスミドの複製を可能にする複製起点、および
- 大腸菌にアンピシリン耐性を与える -ラクタマーゼ遺伝子。

【0178】

抗体遺伝子の転写単位は、以下のエレメントから構成される：

- 5'末端の独特な制限部位
- ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- cDNA構成の場合、イントロンA配列、
- ヒト抗体遺伝子に由来する5'非翻訳領域、
- 免疫グロブリンの重鎖シグナル配列、
- cDNAとしての、またはゲノムのエキソン-イントロン構成を有している、各抗体鎖をコードする核酸、
- ポリアデニル化シグナル配列を有している3'非翻訳領域、ならびに
- 3'末端の独特な制限部位。

【0179】

抗体鎖をコードする融合遺伝子を、PCRおよび/または遺伝子合成によって作製し、公知の組換え法および組換え技術により、例えば、各ベクター中の独特な制限部位を用いて、一致する核酸セグメントを連結することによって、組み立てる。サブクローニングした核酸配列を、DNA配列決定によって確認する。一過性トランスフェクションのために、形質転換された大腸菌培養物(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)からのプラスミド調製によって、より多量のプラスミドを調製する。

【0180】

すべての構築物に対して、第1のCH3ドメイン中の典型的なノブ(T366W)置換および第2のCH3ドメイン中の対応するホール置換(T366S、L368A、およびY407V)(ならびに2つの付加的な導入されたシステイン残基S354C/Y349' C)(上に示した対応する各重鎖(HC)配列中に含まれる)を用いて、ノブイントゥーホールヘテロ二量体化技術を使用した。

【0181】

細胞培養技術

Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc. に説明されているような標準的な細胞培養技術を使用する。

【0182】

HEK293系における一過性トランスフェクション

一過性発現によって二重特異性抗体を作製する。したがって、製造業者の取扱い説明書に従ってHEK293系(Invitrogen)を用いて、各プラスミドによるトランスフェクションを実施する。簡単に説明すると、無血清FreeStyle(商標)293発現培地(Invitrogen)を入れた振盪フラスコまたは攪拌発酵槽のいずれかにおいて、懸濁した状態で増殖するHEK293細胞(Invitrogen)を、各発現プラスミドおよび293フェクチン(商標)またはフェクチン(Invitrogen)の混合物を用いてトランスフェクトする。2L容振盪フラスコ(Corning)の場合、600mL中に 1.0×10^6 細胞/mLの密度でHEK293細胞を播種し、120rpm、8%CO₂でインキュベートする。翌日、約 1.5×10^6 細胞/mLの細胞密度の細胞を、A)全プラスミドDNA 600 μg(1 μg/mL)を含むOpti-MEM培地(Invitrogen)20mLとB)293フェクチンまたはフェクチン1.2mL(2 μl/mL)を添加したOpti-MEM培地20mlとの約42mLの混合物を用いてトランスフェクトする。グルコース消費に応じて、発酵の過程でグルコース溶液を添加する。分泌された抗体を含む上清を5~10日後に回収し、抗体を上清から直接的に精製するか、または上清を凍結し、保存

10

20

30

40

50

する。

【0183】

1+1CrossMabの場合は1:1:1:1のプラスミド相対比または2+2CrossMabの場合は1:1:1のプラスミド相対比を、LCプラスミド、HCプラスミド、交差されたLCプラスミド、および交差されたHCプラスミドの同時トランスフェクションのために使用した。

【0184】

タンパク質測定

280nmにおける光学濃度(OD)を測定し、Pace, et al., Protein Science 4 (1995) 2411-1423に従いアミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を用いることによって、精製した抗体および派生物のタンパク質濃度を決定した。

10

【0185】

上清中の抗体濃度の測定

細胞培養上清中の抗体および派生物の濃度を、プロテインAアガロース-ビーズ(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いる免疫沈降法によって推定した。したがって、プロテインAアガロースビーズ60 μ Lを、TBS-NP40(150mM NaClおよび1% Nonidet-P40を添加した50mM Tris緩衝液、pH7.5)中で3回洗浄した。続いて、細胞培養上清1~15mLを、TBS-NP40中で予め平衡にしたプロテインAアガロースビーズに添加した。室温で1時間インキュベーションした後、Ultrafree-MCフィルターカラム(Amicon)を用いて、0.5mLのTBS-NP40で1回、0.5mLの2 \times リン酸緩衝生理食塩水(2 \times PBS、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)で2回、および0.5mLの100mMクエン酸Na緩衝液(pH5.0)で手短に4回、ビーズを洗浄した。NuPAGE(登録商標)LDS試料緩衝液(Invitrogen)35 μ Lを添加することによって、結合した抗体を溶出させた。試料の半分をそれぞれ、NuPAGE(登録商標)試料還元剤と混合するか、または還元しないままにし、70 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した。したがって、(非還元SDS-PAGEの場合はMOPS緩衝液を用い、還元SDS-PAGEの場合はNuPAGE(登録商標)抗酸化泳動用緩衝液添加剤(Invitrogen)を含むMES緩衝液を用いる)4~12% NuPAGE(登録商標)Bis-Tris SDS-PAGEゲル(Invitrogen)に5~30 μ Lを添加し、クーマシーブルーで染色した。

20

【0186】

細胞培養上清中の抗体の濃度を、アフィニティーHPLCクロマトグラフィーによって定量的に測定した。簡単に説明すると、Agilent HPLC 1100システムにおいて、プロテインAに結合する抗体を含む細胞培養上清を、200mM KH_2PO_4 、100mMクエン酸ナトリウム、pH 7.4にてApplied Biosystems Poros A/20カラムにかけ、200mM NaCl、100mMクエン酸、pH2.5を用いて溶出させた。溶出させた抗体を、UV吸光度およびピーク領域の積分によって定量した。精製された標準IgG1抗体が、標準物質としての機能を果たした。

30

【0187】

別法として、細胞培養上清中の抗体および派生物の濃度を、サンドイッチ-IgG-ELISAによって測定した。簡単に説明すると、StreptaWellハイバインドストレプトアビジンA-96 ウェルマイクロタイタープレート(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を、100 μ L/ウェルの0.1 μ g/mLピオチン標識抗ヒトIgG捕捉分子F(ab')₂-hFc >BI(Dianova)で、室温で1時間あるいは4 $^{\circ}$ Cで一晩、コーティングし、続いて、200 μ L/ウェルのPBS、0.05% Tween(PBST、Sigma)で3回洗浄した。その後、100 μ L/ウェルの、各抗体を含む細胞培養上清のPBS(Sigma)中希釈系列を、ウェルに添加し、振盪機上で室温にて1~2時間、インキュベートした。ウェルを200 μ L/ウェルのPBSTで3回洗浄し、100 μ Lの0.1 μ g/mL F(ab')₂-hFc >POD(Dianova)を検出抗体として用いて、振盪機上で室温にて1~2時間インキュベーションすることにより、結合した抗体を検出した。未結合の検出抗体を、200 μ L/ウェルのPBSTで3回洗浄することによって除去した。100 μ L ABTS/ウェルを添加し、続いてインキュベーションすることにより、結合した検出抗体を検出した。吸光度の測定は、Tecan Fluor分光計を用いて405nmの測定波長(基準波長492nm)において実施した。

40

【0188】

調製用の抗体精製

標準プロトコールを参照して、ろ過した細胞培養上清から抗体を精製した。端的に言え

50

ば、抗体をプロテインAセファロースカラム (GE healthcare) に添加し、PBSで洗浄した。抗体の溶出をpH2.8で実行し、続いて、直ちに中和した。凝集したタンパク質は、PBSまたは150mM NaClを含む20mMヒスチジン緩衝液 (pH 6.0) におけるサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200、GE Healthcare) によって単量体抗体から分離した。単量体抗体画分を集め、例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30MWC0) 遠心濃縮装置を用いて (必要に応じて) 濃縮し、凍結し、-20 または-80 で保存した。これらの試料の一部を、例えば、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、または質量分析法によるその後のタンパク質解析および解析による特性決定のために提供した。

【 0 1 8 9 】

SDS-PAGE

NuPAGE (登録商標) Pre-Cast ゲルシステム (Invitrogen) を、製造業者の取扱い説明書に従って使用した。具体的には、10% または 4~12% の NuPAGE (登録商標) Novex (登録商標) Bis-TRIS Pre-Cast ゲル (pH6.4) および NuPAGE (登録商標) MES (還元ゲル、NuPAGE (登録商標) 抗酸化泳動用緩衝液添加剤を含む) 泳動用緩衝液または MOPS (非還元ゲル) 泳動用緩衝液を使用した。

【 0 1 9 0 】

CE-SDS

純度および抗体の完全性を、マイクロ流体 Labchip 技術 (PerkinElmer, USA) を用いる CE-SDS によって解析した。したがって、5 μ l の抗体溶液を、製造業者の取扱い説明書に従って HT タンパク質発現試薬キットを用いる CE-SDS 解析のために調製し、HT タンパク質発現チップを用いて LabChip GXII システムにおいて解析した。データは、LabChip GX ソフトウェアを用いて解析した。

【 0 1 9 1 】

解析的サイズ排除クロマトグラフィー

抗体の凝集およびオリゴマー状態を明らかにするためのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を、HPLC クロマトグラフィーによって実施した。簡単に説明すると、プロテインAによって精製した抗体を、Dionex Ultimate (登録商標) システム (Thermo Fischer Scientific) において 300mM NaCl、50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH7.5) で Tosoh TSKgel G3000SW カラムに、または Dionex HPLC システムにおいて 2 \times PBS で Superdex 200 カラム (GE Healthcare) に、かけた。溶出させた抗体を、UV 吸光度およびピーク領域の積分によって定量した。BioRad ゲルろ過標準物質 151-1901 が、標準物質としての機能を果たした。

【 0 1 9 2 】

質量分析

このセクションでは、正確な組立てに重点を置いて、二重特異性抗体の特性決定を説明する。予測される一次構造を、脱グリコシル化したインタクト抗体、および特別な場合には、脱グリコシル化した/LysCによって限定消化した抗体のエレクトロスプレーイオン化法質量分析法 (ESI-MS) によって解析した。

【 0 1 9 3 】

これらの抗体を、タンパク質濃度 1mg/ml で、37 $^{\circ}$ C にて最長 17 時間、リン酸緩衝液または Tris 緩衝液に溶かした N-グリコシダーゼ F を用いて脱グリコシル化した。LysC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 限定消化を、それぞれ室温にて 120 時間、または 37 $^{\circ}$ C にて 40 分間、Tris 緩衝液 (pH8) に溶かした 100 μ g の脱グリコシル化抗体を用いて実施した。質量分析の前に、Sephadex G25 カラム (GE Healthcare) を用いる HPLC によって試料を脱塩した。TriVersa NanoMate 供給源 (Advion) を装備した maXis 4G UHR-QTOF MS システム (Bruker Daltonik) において、ESI-MS によって総質量を測定した。

【 実施例 】

【 0 1 9 4 】

実施例 1

PD1 および Tim3 に結合する多重特異性抗体の作製および発現

ヒト PD1 および ヒト Tim3 に結合する多重特異性 (二重特異性) 抗体を、古典的な分子生物

10

20

30

40

50

学技術によって、一般的方法のセクションで説明したようにして作製し、前述したように HEK293細胞において一過性に発現させた。

【0195】

1つの結合アーム中にVH/VLドメイン交換/置換を含んでいる二重特異性抗体(CrossMAb^{VH-VL}) (1+1二重特異性抗体型)

使用される二重特異性1+1抗体型は、WO 2009/080252においても説明されている。以下の表に示すアミノ酸配列をコードする核酸を含む発現プラスミドを用いて、二重特異性抗体を発現させた。

【0196】

(表) 二重特異性抗体(1+1CrossMAb^{VH-VL})の軽鎖(LC)および重鎖(HC)のアミノ酸配列

1+1抗体	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1-Tim3-0389	SEQ ID NO: 01	SEQ ID NO: 02	SEQ ID NO: 03	SEQ ID NO: 04
PD1-Tim3-0168	SEQ ID NO: 05	SEQ ID NO: 06	SEQ ID NO: 07	SEQ ID NO: 08
PD1-Tim3-0476	SEQ ID NO: 09	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
PD1-Tim3-0477	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
PD1-Tim3-0166	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

【0197】

すべての構築物に対して、第1のCH3ドメイン中の典型的なノブ(T366W)置換および第2のCH3ドメイン中の対応するホール置換(T366S、L368A、およびY410V)(ならびに2つの付加的な導入されたシステイン残基S354C/Y349C)(上に示した対応する各重鎖(HC)配列中に含まれる)を用いて、ノブイントゥーホールヘテロ二量体化技術を使用した。

【0198】

2つの結合アーム中にVH/VLドメイン交換/置換を含んでいる二重特異性抗体(2+2CrossMAb^{VH-VL}) (2+2二重特異性抗体型)

使用される多重特異性2+2抗体型は、WO 2010/145792においても説明されている。以下の表に示すアミノ酸配列をコードする核酸を含む発現プラスミドを用いて、二重特異性抗体を発現させた。

【0199】

(表) 二重特異性抗体(2+2CrossMAb^{VH-VL})の軽鎖(LC)および重鎖(HC)のアミノ酸配列

2+2抗体	HC	LC1	LC2
PD1-Tim3-0358	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
PD1-Tim3-0359	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
PD1-Tim3-0321	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29

【0200】

実施例2

PD1およびTim3に結合する多重特異性抗体の精製および特性決定

上記で発現させた二重特異性抗体を、分取用プロテインAアフィニティークロマトグラフィーおよび分取用サイズ排除クロマトグラフィーの組合せによって上清から精製した。すべての二重特異性抗体は、優れた収率で作製することができ、安定である。得られた産物を、質量分析によってアイデンティティについて、SDS-PAGEに基づく純度、単量体含有量、および安定性などの解析的特性について、特性決定した。

【0201】

質量分析

予測される一次構造を、脱グリコシル化したインタクト二重特異性抗体、および脱グリコシル化した/プラスミンによって消化した、あるいは脱グリコシル化した/LysCによって限定消化した二重特異性抗体のエレクトロスプレーイオン化法質量分析(ESI-MS)によって解析した。

【0202】

10

20

30

40

50

これらの二重特異性抗体を、タンパク質濃度1mg/mlで、37℃にて最長17時間、リン酸緩衝液またはTris緩衝液に溶かしたN-グリコシダーゼFを用いて脱グリコシル化した。プラスミン消化またはLysC(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)限定消化を、それぞれ室温にて120時間、または37℃にて40時間、Tris緩衝液(pH8)に溶かした100 µgの脱グリコシル化二重特異性抗体を用いて実施した。質量分析の前に、Sephadex G25カラム(GE Healthcare)を用いるHPLCによって試料を脱塩した。TriVersa NanoMate供給源(Advion)を装備したmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム(Bruker Daltonik)において、ESI-MSによって総質量を測定した。

【0203】

実施例3

組換え細胞への二重特異性抗体の同時結合に関するFRETアッセイ法

一般原理

この実施例では、1つの細胞の外膜(表面)に提示されている、2種の異なる標的、例えば受容体への二重特異性抗体型の同時結合を測定するための細胞ベースのTR-FRETアッセイ法を説明する。tag-lite(登録商標)技術が、例示的なFRET方法として選択されたが、他の任意のFRET方法を同様に選択することができる。古典的なTR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer)とSNAPタグ技術(例えばNew England Biolabs, C1SB10)を組み合わせることにより、細胞表面に存在する抗原を蛍光性ドナー色素または蛍光性アクセプター色素で標識することが可能になる。

【0204】

このアッセイ法形式を用いて、二重特異性抗体の両方の抗原、この場合、PD1受容体およびTim3受容体を発現する細胞への二重特異性抗体の同時結合を実証することが可能である。これらの抗原は、所与の受容体の細胞外ドメイン(ECD)と蛍光色素を付加することができるタグとからなる組換え融合タンパク質として提示される。両方の受容体に結合し、したがって、それによって間接的にFRETドナーおよびFRETアクセプターに結合することができる抗PD1/Tim3二重特異性抗体の存在下では、同時結合すると、これら2つの受容体および同様にFRETドナーおよびFRETアクセプターが極めて近くなって、エネルギー移動(FRET)が可能になる(図1を参照されたい)。

【0205】

細胞外アプローチで機能する2つの二重特異性抗体を用いて細胞内アプローチを使用したところ、FRETは誘導されなかった。このアプローチで使用されなければならない膜透過性色素に伴うバックグラウンドは、かなり高い(データ不掲載)。

【0206】

組換えPD1⁺Tim3⁺HEK細胞の作製

Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989において説明されているように、標準的方法を用いてDNAを作製した。PD1変種およびTim3変種のクローニングのために、受容体の各膜貫通領域の近位にSNAPまたはCLIPを挿入し、7個のアミノ酸残基以外の細胞質ドメインを除去し、Flagタグで置き換えた。

【0207】

一過性トランスフェクション

30ml培養体積で、トランスフェクション試薬293free(Novagen)およびOpti-MEM(登録商標)I低濃度血清培地(Life Technologies)と共に、DNA総量15 µgの2つのプラスミドを同時に用いて、HEK293細胞を同時トランスフェクトした。簡単に説明すると、別の箇所で説明したように、それぞれPD1 ECDまたはTim3 ECDと、それぞれSNAPタグまたはCLIPタグとからなる融合タンパク質をコードする以下のプラスミドで、HEK293細胞を一過性にトランスフェクトした。

【0208】

プラスミド:

(a)PD1-SNAP(5'から3'の方向に):

10

20

30

40

50

-シグナルペプチドを含むヒトPD1細胞外ドメイン(SEQ ID NO: 30の残基1~170)をコードする核酸、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸

-06-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ(hAGT)のヒト遺伝子の変異型である、pSNAPタグ(T7)2に由来するSNAP(N末端メチオニン残基を含まない)をコードする核酸。(野生型hAGTと比べて、SNAPタグタンパク質は、変異C26A、K125A、A127T、R128A、G131K、G132T、M134L、R135S、C150S、N157G、S159Eを含み、G182の後ろで切断されている)(SEQ ID NO: 32)、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸、

-ヒトPD1膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメイン(SEQ ID NO: 30の残基171~191)をコードする核酸、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸、

-Flagタグ(DYKDDDDK;SEQ ID NO: 33)をコードする核酸。

(b)Tim3-CLIP(5'から3'の方向に):

-シグナルペプチドを含むヒトTim3細胞外ドメイン(SEQ ID NO: 34の残基1~202)をコードする核酸、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸、

-06-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ(hAGT)のヒト遺伝子の変異型である、pCLIPfに由来するCLIP(N末端メチオニン残基を含まない)(SEQ ID NO: 35)をコードする核酸、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸、

-ヒトTim3膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメイン(SEQ ID NO: 34の残基203~230)をコードする核酸、

-GGGSスパーサー(SEQ ID NO: 31)をコードする核酸、

-Flagタグ(DYKDDDDK; SEQ ID NO: 33)をコードする核酸。

【0209】

PD1-CLIPおよびTim3-SNAPの組合せも構築し発現させたところ、ごく少しであるが、それでもなお検出可能であるFRETシグナルが生じた(データ不掲載)。

【0210】

トランスフェクションの直後に、FACS実験(トランスフェクション後24~48時間目)またはFRET実験(48時間後)のために最終的に使用するまで、細胞を振盪フラスコ中でインキュベートした。

【0211】

一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞におけるPD1およびTim3の発現の確認(FACSによる)

HEK293細胞の一過性トランスフェクションの24~48時間後に、これらの細胞をPD1およびTim3の発現について解析した。通常、 $1\sim 3 \times 10^5$ 個のシングルトランスフェクトされた細胞またはダブルトランスフェクトされた細胞を濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ で、氷上で30分間染色し、PBS/2% FCSで2回洗浄し、以下を用いるFacsCanto IIによって解析した:

-FITC結合型抗ヒトPD1抗体(Biolegend、カタログ番号329904、クローンEH12.2H7)もしくはフィコエリトリン(PE)結合型抗ヒトPD-1抗体(R&D Systems、カタログ番号FAB1086P)、および/または

-フィコエリトリン(PE)結合型抗ヒトTim3抗体(R&Dsystems、カタログ番号FAB2365P、クローン344823)。

【0212】

シングルトランスフェクトされた細胞のFACS結果を図2に示し、ダブルトランスフェクトされた細胞のFACS結果を図3に示している。

【0213】

細胞標識および抗PD1/Tim3二重特異性抗体を用いるFRETアッセイ法の説明

トランスフェクトされた細胞を沈降させ、tag-lite(登録商標)緩衝液(Cisbio)中に 1×1

10

20

30

40

50

0⁶細胞/mlの濃度で再懸濁させた。その後、tag-lite(登録商標)緩衝液(Cisbio)中で、37℃で1時間、100nM SNAP-Lumi4-Tb(Cisbio)および100nM CLIP-Red(Cisbio)を用いて細胞を染色した。洗浄し2%FCS(v/v)を含むPBS緩衝液中に再懸濁させた後、約50,000個の細胞(体積50μl中)を96ウェルの白色平底プレート(Costar)中に播種し、その後、対照抗体(例えば、二価の単一特異性抗体もしくはアイソタイプ対照)または二重特異性抗体のいずれかを0.001~10nMの最終濃度で細胞に添加した。4 または室温で1時間インキュベーションした後、各販売業者によって提供される標準的設定を用いてBMG PherastarリーダーまたはTecan Infinite M1000 Proを用いて、665nmおよび620nmにおける発光シグナルの比(665/620nm比)として、時間分解蛍光を測定した。

【0214】

例示的な標準的設定は、以下のとおりであった：

- モード:上方蛍光強度
- 励起波長 340nm
- 発光波長 620/665nm
- 励起帯域幅 20nm
- 発光帯域幅 10nm
- ゲイン 232最適(100%)
- フラッシュ数 100
- フラッシュ周波数 100Hz
- 積分時間 500μs
- 待ち時間 60μs
- 安定時間 0ms。

【0215】

任意で、SNAP-Lumi4-Tb標識細胞および100nM CLIP-Red標識細胞を、-80℃で、または液体窒素中で保存し、FRET実験のために新たに解凍した。

【0216】

別法として、いくつかの場合において、ヤギ抗ヒトFc領域抗体(20nM最終濃度)を介した一価または二価の非経口単一特異性モノクローナル抗体の架橋も、可能であり得る。

【0217】

二重特異性抗体の同時結合によって誘導されるFRET反応の特異性を示すために、特異性が1つだけであるモノクローナルIgGを競合させるために添加した。

【0218】

結果

PD1およびTim3を発現するHEK細胞を前述したようにして処理して、量を漸増させた様々な二重特異性抗体(0.12nM~10nM)と共にインキュベーションすることによって受容体が同時結合した際のFRETシグナルを測定した。

【0219】

試験した二重特異性抗体はどれも、PD1/Tim3発現細胞において用量依存的にFRETシグナルを誘導した。試験したすべての二重特異性抗体型(1+1、2+2、および2+1(データ不掲載))は、同程度であった。1+1型の二重特異性抗体(抗体PD1-Tim3-0389およびPD1-Tim3-0168)ならびに2+2型の二重特異性抗体(抗体PD1-Tim3-0358およびPD1-Tim3-0359)を用いて得られた結果の比較を、図4Aに示している。さらに2種の二重特異性抗体PD1-Tim3-0476およびPD1-Tim3-0477もまた、処理時に細胞においてFRETを誘導する能力について評価した。図4Bに示すように、どちらの二重特異性抗体も、PD1⁺Tim3⁺HEK細胞において顕著なFRETシグナルを誘導して、機能的な様式の同時結合を明示した。

【0220】

同様に、図5に示したように、単一特異性の二価抗体のみを添加した場合、FRETアッセイ法はうまくいかないが、二重特異性抗体(抗体PD1-Tim3-0389)の場合、FRETシグナルを観察することができた。

【0221】

二重特異性抗体の同時結合によって誘導されるFRETシグナルの特異性を示すために、特異性が1つだけであるモノクローナルIgGを競合させるために添加した。したがって、前述したPD1およびTim3を発現するHEK細胞を、100nM SNAP-Lumi4-Tbおよび100nM CLIP-Redで標識した。洗浄後、標識した細胞を、0.01nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、および40nMの指定濃度の二重特異性抗PD1/Tim3抗体PD1-Tim3-0168と共に4℃で1時間インキュベートした後、BMG Pherastarリーダーを用いて665/620nmで時間分解蛍光を測定した(図6、菱形)。FRETシグナルが検出された。二重特異性抗体による処理後のFRETシグナルの特異性を明示するために、二価の単一特異性抗PD1モノクローナル抗体を単独で試験した(図6、三角形)。FRETシグナルは検出されなかった。二価の単一特異性抗PD1モノクローナル抗体および二重特異性抗PD1/Tim3抗体が存在する場合(単一特異性抗体濃度80nM)、FRETシグナルは検出されなかった(図6、四角形)。同様に、二価の単一特異性抗Tim3抗体を添加した場合、FRETシグナルは得られなかった(図7を参照されたい)。

10

【0222】

実施例4

結合強度を測定するためのFRETアッセイ法

二重特異性抗体の2つの結合部位の寄与を区別するために、下記に概説するように競合実験を実施した。

【0223】

全体の相互作用へのPD1結合部位およびTim3結合部位の寄与を区別するために、特殊な設定を使用した。PD1結合部位の方が、Tim3結合部位よりも高い親和性を有している。これらの異なる二重特異性抗体は、標準条件下で同様のFRETシグナル強度を示した。PD1相互作用(すなわち、高い親和性による相互作用/低い K_D 値)が妨害されるか、または少なくとも小さくなった場合、差を可視化することができた。

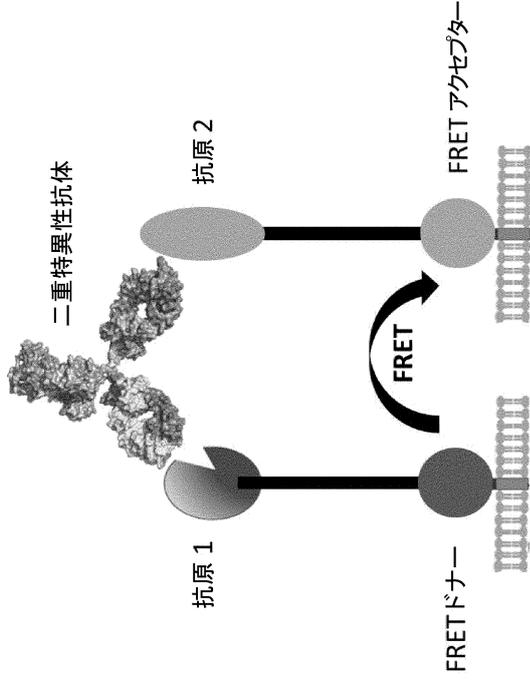
20

【0224】

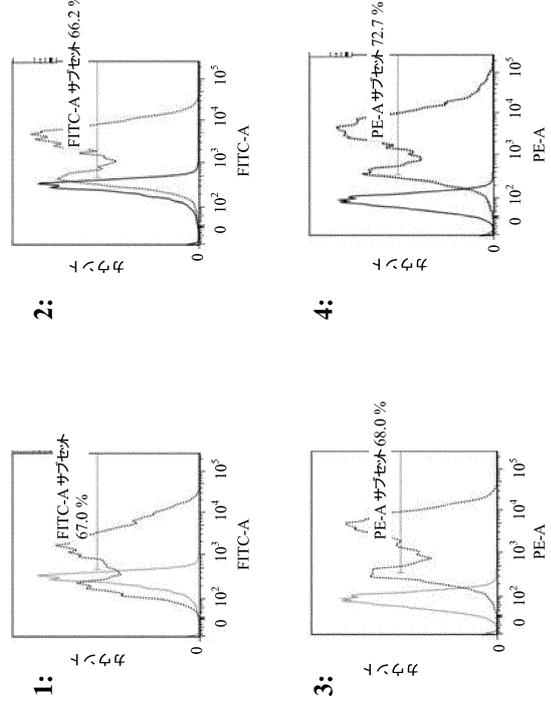
したがって、二価の単一特異性抗PD1抗体を、様々な濃度(80nM、20nM、5nM、1.25nM、および0.31nM)で、Tim3結合部位が異なる二重特異性抗PD1/Tim3抗体(抗体PD1-Tim3-0168およびPD1-Tim3-0389)に添加した。完全にPD1が中和されると、FRETシグナルはほとんど測定されなかったが、低めの抗PD1抗体濃度では、FRETシグナルが回復し、Tim3結合部位がTim3に対して高い親和性を有している抗体PD1-Tim3-0168を用いると、より強いシグナルが観察された(図8を参照されたい)。

30

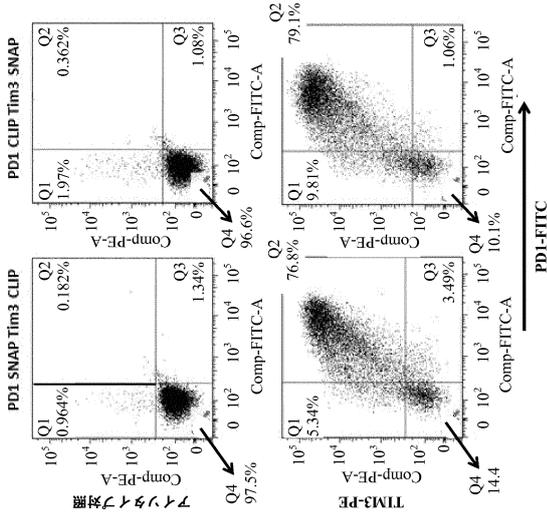
【図1】



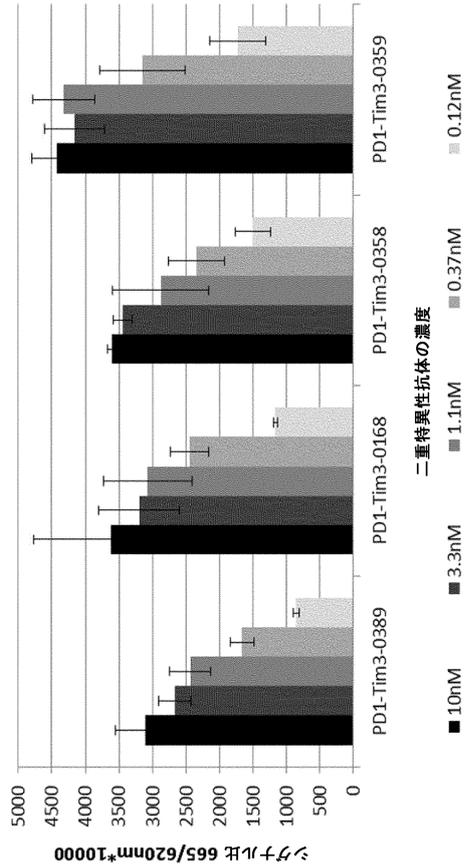
【図2】



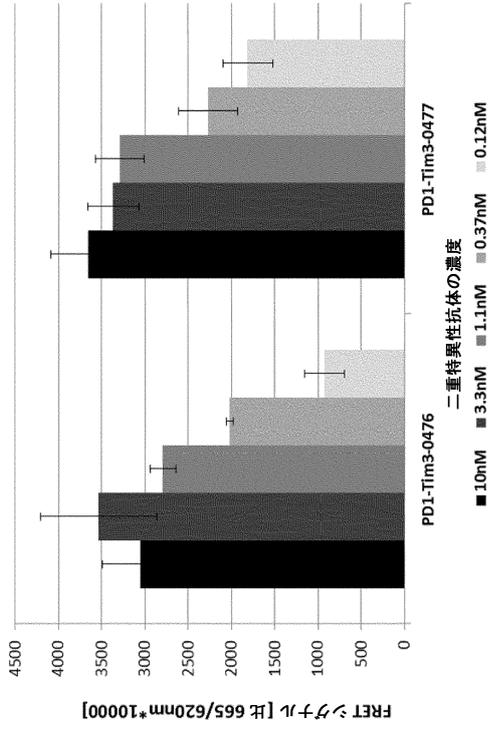
【図3】



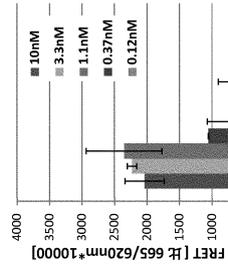
【図4 A】



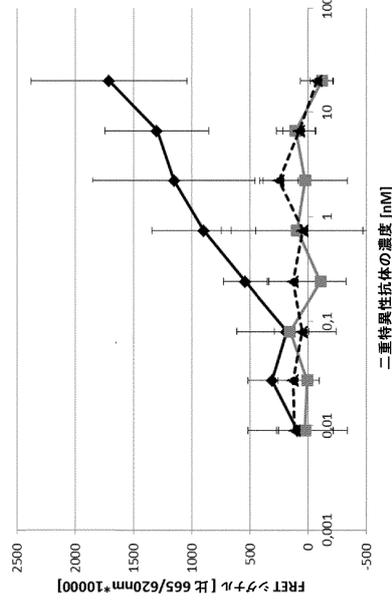
【図 4 B】



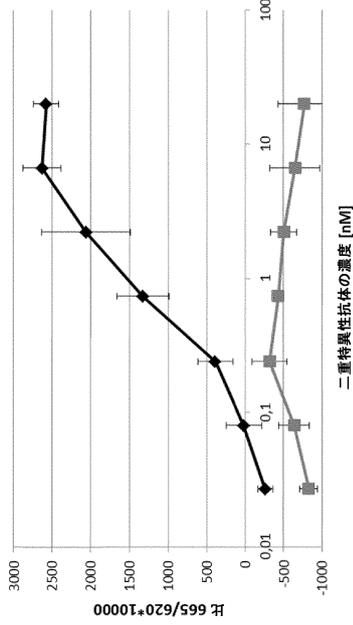
【図 5】



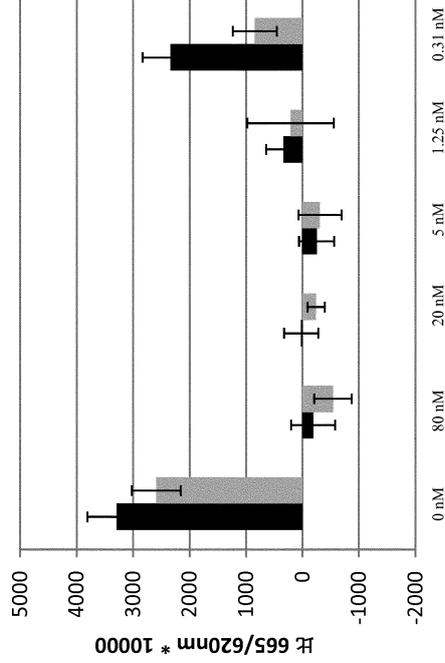
【図 9】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

0006734919000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ゼーバー シュテファン
ドイツ連邦共和国 8 2 4 0 4 ジンデルスドルフ ミッターヴェーク 2
- (72)発明者 フィッシャー イェンス
ドイツ連邦共和国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム イン オーバーバイエルン アンドレアス - シュミットナー - シュトラーセ 4 2
- (72)発明者 フェアティヒ ゲオルク
ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ザンクト - クララ - シュトラーセ 2

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第2008/156083(WO, A1)
特表2014-527179(JP, A)
特開2010-281595(JP, A)
米国特許出願公開第2015/0204847(US, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98