

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6921943号
(P6921943)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月30日(2021.7.30)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A D
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
	A 6 1 P 27/02

請求項の数 3 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2019-516078 (P2019-516078)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成29年6月2日(2017.6.2)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2019-524870 (P2019-524870A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	令和1年9月5日(2019.9.5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/063506		T
(87) 国際公開番号	W02017/211731		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成29年12月14日(2017.12.14)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成31年2月1日(2019.2.1)	(74) 代理人	110001508
(31) 優先権主張番号	16173166.6		特許業務法人 津国
(32) 優先日	平成28年6月6日(2016.6.6)	(72) 発明者	ヒュールスマン, ペーター・ミヒャエル
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ドイツ国、82377 ペンツベルク、ノ
			ンネンヴァルト 2、ツェー/オー・ロシ
			ュ・ダイアグノスティックス・ゲーエムベ
			ーハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増加した眼球保持を伴う眼科用融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のカバットに従って決定された C D R を含む抗ヒトコラーゲン I I 抗体

- a) 配列番号 0 9 及び配列番号 1 0、又は
- b) 配列番号 1 5 及び配列番号 1 6

を含む、多特異性結合剤である、眼血管疾患の処置における使用のための医薬組成物。

【請求項 2】

前記抗体が以下の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 記載の 医薬組成物：

- a) 配列番号 0 9 及び配列番号 1 0、又は
- b) 配列番号 1 5 及び配列番号 1 6。

【請求項 3】

前記抗体が s c F v である、請求項 1 又は 2 記載の 医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は眼科疾患及びそれらの処置の分野にある。本明細書において、眼科疾患の処置のために適切である眼内/硝子体内適用のための融合タンパク質、即ち、多機能結合剤を報告する。それらの多機能性のために、融合タンパク質は、眼球保持標的及び治療標的に結合することができる。

【 0 0 0 2 】

発明の背景

【 0 0 0 3 】

眼球からの治療分子のクリアランスをもたらす要因の1つは拡散である。治療分子の拡散特性は、最終的にはFc受容体結合との組み合わせでそのサイズにより主に決定される。眼球からの排除後、治療分子は体循環中に見出すことができる。

【 0 0 0 4 】

Kleinberg, T.T.ら (Surv. Ophthalmol. 56 (2011) 300-323) は硝子体代替物の総説を提供した。永久硝子体代替は、コラーゲン、ヒアルロン酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及び天然ヒドロゲルポリマーを用いて試みられてきた。しかし、臨床的に実行可能であることが証明されたものはない。

10

【 0 0 0 5 】

Favara, D.M.及びHarris, A.L. (EMBO Mol. Med. 6 (2014) 577-579) は、検出可能な全身性副作用を伴わない血管新生の局所的阻害を伴う非全身作用血管新生阻害剤としてのVEGFスティックトラップを開示した。VEGFスティックトラップは、VEGF受容体1ドメイン2、VEGF受容体2ドメイン3、CH3ドメイン、及びヘパリン結合ドメイン(エクソン6、7、及び8からの部分)を含むポリペプチドの二量体である。

【 0 0 0 6 】

Ponsioen, T. L.ら (Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 49 (2008) 4089-4095) は、ヒト硝子体網膜界面におけるコラーゲン分布を開示した。網膜切除術サンプルでは、全ての試験されたコラーゲン型のmRNAが発現していた。

20

【 0 0 0 7 】

WO 2008/135734には、酸化コラーゲンIIに対する抗体又はそのフラグメントを含む組成物が開示されており、それにおいて抗体又はフラグメントは医薬的に活性な部分に結合されている。

【 0 0 0 8 】

Uysal, H.ら (Mol. Immunol. 45 (2008) 2196-2204) は、病原性II型コラーゲン特異的モノクローナル抗体C11Fabの結晶構造を開示した。

【 0 0 0 9 】

Nandakumar, K-S.ら (Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2269-2277) は、単一モノクローナルIgG抗コラーゲンII型抗体による関節炎の誘導及び阻害性FcガンマRIIbを欠くマウスにおける関節炎の増強を開示した。

30

【 0 0 1 0 】

Xu, Y.ら (Mol. Immunol. 41 (2004) 411-419) は、II型コラーゲンの正確に同じエピトープへの2つのモノクローナル抗体によって、ファージディスプレイによる非交差反応性ファージクローンが選択されることを開示した。

【 0 0 1 1 】

WO 2012/047583には、ヒトコラーゲンIIに結合する抗体が開示されている。

【 0 0 1 2 】

発明の概要

40

【 0 0 1 3 】

本発明は抗ヒトコラーゲンII抗体に関する。

【 0 0 1 4 】

本明細書中で開示するのは、以下のKabattに従って/以下のように決定された6つのCDRを含む抗ヒトコラーゲンII抗体である：

- a) 配列番号09及び配列番号10、又は
- b) 配列番号12及び配列番号13、又は
- c) 配列番号15及び配列番号16。

【 0 0 1 5 】

50

一実施形態において、抗体は、以下の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む：

- a) 配列番号 09 及び配列番号 10、又は
- b) 配列番号 12 及び配列番号 13、又は
- c) 配列番号 15 及び配列番号 16。

【0016】

一実施形態において、抗体は s c F v である。

【0017】

本明細書において、一態様として、以下の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む抗体と同じエピトープに結合する抗体を開示する：

- a) 配列番号 09 及び配列番号 10、又は
- b) 配列番号 12 及び配列番号 13、又は
- c) 配列番号 15 及び配列番号 16。

10

【0018】

本明細書において、一態様として、本明細書中で開示する抗体及び、場合により医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬製剤を開示する。

【0019】

一実施形態において、医薬製剤は、眼血管疾患の処置における使用のためである。

【0020】

本明細書において、一態様として、医薬としての使用のための本明細書中で開示する抗体を開示する。

20

【0021】

一実施形態において、その使用は、眼血管疾患の処置のためである。

【0022】

本明細書中で一態様として開示するのは、医薬の製造における本明細書中で開示する抗体の使用である。

【0023】

一実施形態において、その使用は、眼血管疾患の処置用の医薬の製造のためである。

【0024】

本明細書において、一態様として、眼血管疾患の処置における使用のための本明細書中で開示する抗体を開示する。

30

【0025】

本明細書において、一態様として、本明細書中で開示する抗体を、そのような処置を必要とする患者に投与することによる、眼血管疾患に罹患した患者の処置方法を開示する。

【0026】

本発明は、少なくとも 2 つの結合部位を有し、そのうちの 1 つがコラーゲン II に特異的に結合する融合タンパク質を報告する。

【0027】

眼疾患に関連付けられる標的に特異的に結合する第 1 の結合部位と、眼内での保持に影響する標的（眼球保持標的）に特異的に結合する第 2 の結合部位を組み合わせることにより、眼球保持標的への結合特異性を有さない分子と比較して、改善された硝子体内保持を伴う多特異性結合剤を提供することができるが見出された。第 2 の結合部位は、硝子体液又は網膜中の細胞外マトリックス（ECM）において見出される化合物又は分子に特異的に結合する。細胞外マトリックスのこの化合物は、十分な負荷を可能にし、それにより多特異性結合剤の投与を可能にする量で存在しなければならない。コラーゲン、特にコラーゲン II は、この目的のために硝子液中の ECM において適切な化合物であることが見出された。

40

【0028】

そのような多特異性結合剤は、（組換え）融合タンパク質として組換え的に產生することができる。

【0029】

50

このように、本明細書中で一態様として開示するのは、以下を含む融合タンパク質である：

- 第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位、及び
- 硝子体液の細胞外マトリックス中に存在する化合物に特異的に結合する第2の結合部位。

【0030】

一実施形態において、硝子体液の細胞外マトリックス中に存在する化合物はコラーゲンである。一実施形態において、コラーゲンはコラーゲンIIである。

【0031】

一実施形態において、第1の抗原は眼血管疾患に関連する。

10

【0032】

一態様として本明細書中で開示するのは、以下を含む融合タンパク質である：

- 第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位、及び
- コラーゲンIIに特異的に結合する第2の結合部位。

【0033】

一実施形態において、融合タンパク質は以下を含む：

- 第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位、
- コラーゲンIIに特異的に結合する第2の結合部位、及び
- 第2の抗原に特異的に結合する第3の結合部位。

【0034】

20

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、コラーゲンIIはヒトコラーゲンIIである。一実施形態において、ヒトコラーゲンIIは、配列番号17、18、又は19のアミノ酸配列を有する。

【0035】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、結合部位の各々は、抗体結合部位、抗体フラグメント、アンチカリン、DARPIN、受容体リガンド又はその結合フラグメント、受容体又はその結合フラグメント、及びテトラネクチンドメインからなる群より互いに独立して選択される。

【0036】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、結合部位の各々は、互いに独立して抗体結合部位又は抗体フラグメントである。一実施形態において、結合部位の各々は、抗体重鎖可変ドメイン及び抗体軽鎖可変ドメインの対である。

30

【0037】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1の結合部位は第1のポリペプチド中に含まれ、第2の結合部位は第2のポリペプチドに含まれ、ここで、第1のポリペプチドは、直接的に又はペプチドリンカーを介して、もしくはジスルフィド結合を介してのいずれかで第2のポリペプチドに共役又は融合している。

【0038】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1の結合部位は第1のポリペプチド中に含まれ、第2の結合部位は第2のポリペプチド中に含まれ、及び第3の結合部位は第3のポリペプチド中に含まれ、ここで、第1のポリペプチド及び第3のポリペプチドは抗体又は抗体フラグメントを形成し、抗体又は抗体フラグメントは直接的に又はペプチドリンカーもしくはジスルフィド結合を介して第2のポリペプチドに共役される。

40

【0039】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、及び第3のポリペプチドは、scFv、dsScFv、Fab、dsFab、CrossFab、モノボディ、及びVHH（sc＝一本鎖、ds＝ジスルフィド安定化）からなる群より互いに独立して選択される。一実施形態において、ポリペプチドの1つはFab又はdsFabであり、他方のポリペプチドはscFv又はdsScFvであり、及びポリペプチドはペプチドリンカーを介して共役されている。一実施形態におい

50

て、ポリペプチドの2つはF a b又はd s F a bであり、他のポリペプチドはs c F v又はd s s c F vであり、及びポリペプチドはペプチドリンカーを介して共役されている。

【0040】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、融合タンパク質は以下を含む：

- 第1の結合部位として、第1の抗原に特異的に結合するF a b、
- 第2の結合部位として、コラーゲンIIに特異的に結合するs c F v、及び
- ペプチドリンカー、

ここで、F a bは、そのC末端の1つで、ペプチドリンカーのN末端へのペプチド結合により共役され、s c F vは、そのN末端で、ペプチドリンカーのC末端へのペプチド結合により共役される。

10

【0041】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、融合タンパク質は以下を含む：

- 第1の抗原に特異的に結合する第1の結合部位、
- 第2の結合部位として、コラーゲンIIに特異的に結合するs c F v、
- 第2の抗原に特異的に結合する第3の結合部位、及び
- ペプチドリンカー

ここで、組み合わせた第1及び第3の結合部位は、それらのC末端で、ペプチドリンカーのN末端へのペプチド結合により共役され、s c F vは、そのN末端で、ペプチドリンカーのC末端へのペプチド結合により共役されている。

20

【0042】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、組み合わされた第1及び第3の結合部位は、少なくともF (a b ')₂又はダイアボディ又はB I T E又はt a n d A b又はD A R T内にある/である。

【0043】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1の抗原及び/又は第2の抗原は治療用眼球標的である/眼球血管疾患に関連する。

【0044】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1の抗原及び/又は第2の抗原は、互いに独立して、A N G 2、V E G F、P D G F - B、及びI L - 1ベータからなる群より選択される。

30

【0045】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第1の抗原及び/又は第2の抗原は、A N G 2、V E G F、P D G F - B、及びI L - 1ベータからなる群より選択される異なる抗原である。

【0046】

一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するs c F vは、以下を含む：

- a) 配列番号09のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号10の軽鎖可変ドメイン、又は
- b) 配列番号12のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号13の軽鎖可変ドメイン、又は
- c) 配列番号15のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号16の軽鎖可変ドメイン。

40

【0047】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するs c F vは、配列番号12のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号13の軽鎖可変ドメインを含む。

【0048】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結

50

合する s c F v は、配列番号 1 1 又は配列番号 1 4 又は配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 4 9 】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、コラーゲン I I に特異的に結合する s c F v は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 5 0 】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、第 1 の結合部位及び第 3 の結合部位は F a b である。

【 0 0 5 1 】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、融合タンパク質は以下を含む

10

：

- A N G 2、V E G F、P D G F - B、又は I L - 1 ベータに特異的に結合する F a b、
- 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 3 の軽鎖可変ドメインを含む、コラーゲン I I に特異的に結合する s c F v、及び
- ペプチドリinker、

それにより、F a b は、その C 末端の 1 つで、ペプチドリinker の N 末端へのペプチド結合により共役され、s c F v は、その N 末端で、ペプチドリinker の C 末端へのペプチド結合により共役される。

【 0 0 5 2 】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、7 5 kDa 未満の分子量として

20

の融合タンパク質。

【 0 0 5 3 】

本明細書中で開示する全ての態様の一実施形態において、融合タンパク質は抗体 F c 領域を欠いている。

【 0 0 5 4 】

本明細書において、一態様として、本明細書中で開示する融合タンパク質及び、場合により医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬製剤を開示する。

【 0 0 5 5 】

一実施形態において、医薬製剤は、眼血管疾患の処置における使用のためである。

【 0 0 5 6 】

本明細書において、一態様として、医薬としての使用のための、本明細書中で開示する融合タンパク質を開示する。

30

【 0 0 5 7 】

一実施形態において、使用は、眼血管疾患の処置のためである。

【 0 0 5 8 】

一態様として本明細書中で開示するのは、医薬の製造における、本明細書中で開示する融合タンパク質の使用である。

【 0 0 5 9 】

一実施形態において、使用は、眼血管疾患の処置用の医薬の製造のためである。

【 0 0 6 0 】

本明細書において、一態様として、眼血管疾患の処置における使用のための、本明細書中で開示する融合タンパク質を開示する。

40

【 0 0 6 1 】

本明細書において、一態様として、本明細書中で開示する融合タンパク質を、そのような処置を必要とする患者に投与することによる眼血管疾患に罹患した患者の処置方法を開示する。

【 0 0 6 2 】

発明の詳細な説明

【 0 0 6 3 】

ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報が、以下

50

において与えられる：Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。

【0064】

本明細書中で使用するように、重鎖及び軽鎖の全ての定常領域及びドメインのアミノ酸位置は、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されているK a b a tナンバリングシステムに従って番号付けし、本明細書において「K a b a tに従ったナンバリング」として言及する。具体的には、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のK a b a tナンバリングシステム(647~660頁を参照のこと)を、カッパ及びラムダアイソタイプの軽鎖定常ドメインC Lについて使用し、K a b a t E Uインデックスナンバリングシステム(661~723頁を参照のこと)を、定常重鎖ドメインについて使用する(C H 1、ヒンジ、C H 2、及びC H 3、それは、この場合において「K a b a t E Uインデックスに従ったナンバリング」に言及することにより本明細書中でさらに明確にする)。

10

【0065】

本発明を行うための有用な方法及び技術が、例えば、Ausubel, F.M. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I to III (1997); Glover, N.D., and Hames, B.D., ed., DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (1985), Oxford University Press; Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press Limited (1986); Watson, J.D., et al., Recombinant DNA, Second Edition, CHSL Press (1992); Winnacker, E.L., From Genes to Clones; N.Y., VCH Publishers (1987); Celis, J., ed., Cell Biology, Second Edition, Academic Press (1998); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, second edition, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)記載されている。

20

【0066】

組換えDNA技術の使用によって、核酸の誘導体の生成が可能になる。そのような誘導体は、例えば、置換、変化、交換、欠失、又は挿入により個々の又はいくつかのヌクレオチド位置において改変することができる。改変又は誘導体化は、例えば、部位特異的変異誘発により行うことができる。そのような改変は、当業者により簡単に行うことができる(例えば、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA; Hames, B.D., and Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, Englandを参照のこと)。

30

【0067】

I. 定義

【0068】

本明細書において使用する用語「含む」は、用語「からなる」を含むことが本明細書で明確に記載されている。このように、用語「含む」を含む全ての態様及び実施形態を、用語「からなる」とともに同様に開示する。

40

【0069】

用語「約」は、その後の続く数値の+/-20%の範囲を表示する。一実施形態において、この用語は、その後の続く数値の+/-10%の範囲を表示する。一実施形態において、この用語は、その後の続く数値の±5%の範囲を表示する。

【0070】

本明細書における用語「(インタクトな)抗体」は最も広い意味で使用し、種々の抗体構造(限定しないが、モノクローナル抗体を含む)を包含する。

【0071】

用語「(インタクトな)抗体」は、変動する構造を伴う免疫グロブリン分子を指す。イ

50

インタクトな I g G 抗体は、ジスルフィド結合している 2 つの同一の軽鎖及び 2 つの同一の重鎖で構成される、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 末端まで、各々の重鎖は、可変領域 (V H) (可変重鎖ドメイン又は重鎖可変領域とも呼ばれる)、それに続く 3 つの定常ドメイン (C H 1、C H 2、及び C H 3) を有する。同様に、N 末端から C 末端まで、各々の軽鎖は、可変領域 (V L) (可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変領域とも呼ばれる)、それに続く定常軽鎖 (C L) ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、2 つの型 (カップパ () 及びラムダ () と呼ばれる) の 1 つに割り当てられうる。

【0072】

用語「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を表示する。抗体フラグメントの例には、F v、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子 (例、s c F v)；及び抗体フラグメントから形成された多特異性抗体が含まれるが、これらに限定しない。

10

【0073】

用語「抗体結合部位」は、抗原結合に關与する抗体のアミノ酸残基を表示する。一般的に、これは抗体重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの対である。抗体の抗原結合部位は、「超可変領域」又は「H V R」からのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」又は「F R」領域は、本明細書において定義する超可変領域以外のそれらの可変ドメイン領域である。従って、抗体の軽鎖及び重鎖の可変ドメインは、N から C 末端までに、領域 F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、及び F R 4 (免疫グロブリンフレームワーク) を含む。特に、重鎖の C D R 3 領域は、抗原結合に最も寄与し、抗体を定義する領域である。

20

【0074】

用語「(抗原に)結合する」は、インビトロアッセイにおける、一実施形態において、抗体が表面に結合し、抗体への抗原の結合が、表面プラズモン共鳴 (S P R) により測定される結合アッセイにおける、その抗原への抗体の結合を表示する。結合は、約 10^{-7} M 又はそれ以下の、一部の実施形態において、 10^{-13} M ~ 10^{-8} M の結合親和性 (K_D) を意味する。

【0075】

結合は、BIAcoreアッセイ (GE Healthcare Biosensor AB、スウェーデン、ウプサラ) により研究することができる。結合の親和性は、用語 k_a (抗体 / 抗原複合体からの抗体の会合についての速度定数)、 k_d (解離定数)、及び K_D (k_d / k_a) により定義する。

30

【0076】

用語「結合部位」は、標的への結合特異性を示す任意のタンパク質様実体を表示する。

【0077】

抗体の「クラス」は、その重鎖により保持される定常ドメイン又は定常領域の型を指す。抗体の 5 つの主要なクラスがある：I g A、I g D、I g E、I g G、及び I g M、これらのいくつかは、さらに、サブクラス (アイソタイプ) に分けることができる (例、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及び I g A₂)。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 κ 、 λ 、 μ 、及び δ と呼ばれる。

40

【0078】

「フレームワーク」又は「F R」は、超可変領域 (H V R) 残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインの F R は、一般的に、4 つの F R ドメインからなる：F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4。したがって、H V R 配列及び F R 配列は、一般的に、V H (又は V L) において以下の配列中に現れる：F R 1 - H 1 (L 1) - F R 2 - H 2 (L 2) - F R 3 - H 3 (L 3) - F R 4。

【0079】

50

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」は互換的に使用し、外因性核酸が導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）を指す。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、それらは、継代数に関係なく、一次形質転換細胞及びそれに由来する子孫を含む。子孫は、核酸含量において親細胞と完全に同一ではないであろうが、しかし、変異を含みうる。元々形質転換されていた細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物学的活性を有する変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【 0 0 8 0 】

「ヒト化」は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、それにおいて、HVR（例、CDR）の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも部分を含みうる。抗体（例、非ヒト抗体）の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

10

【 0 0 8 1 】

用語「超可変領域」又は「HVR」は、本明細書において使用する通り、配列（「相補性決定領域」又は「CDR」）において超可変であり、構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成し、及び/又は抗原接触残基（「抗原接触部」）を含む、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般的に、抗体は6つのHVRを含む；VH中の3つ（H1、H2、H3）及びVL中の3つ（L1、L2、L3）。本明細書において表示するHVRは以下を含む：

20

(a) アミノ酸残基 26 - 32 (L1)、50 - 52 (L2)、91 - 96 (L3)、26 - 32 (H1)、53 - 55 (H2)、及び96 - 101 (H3) で生じる超可変ループ (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917) ;

(b) アミノ酸残基 24 - 34 (L1)、50 - 56 (L2)、89 - 97 (L3)、31 - 35b (H1)、50 - 65 (H2)、及び95 - 102 (H3) で生じるCDR (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.) ;

30

(c) アミノ酸残基 27c - 36 (L1)、46 - 55 (L2)、89 - 96 (L3)、30 - 35b (H1)、47 - 58 (H2)、及び93 - 101 (H3) で生じる抗原接触部 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) ; 及び

(d) HVRアミノ酸残基 46 - 56 (L2)、47 - 56 (L2)、48 - 56 (L2)、49 - 56 (L2)、26 - 35 (H1)、26 - 35b (H1)、49 - 65 (H2)、93 - 102 (H3)、及び94 - 102 (H3) を含む、(a)、(b)、及び/又は(c)の組み合わせ。

【 0 0 8 2 】

一実施形態において、HVR残基は、本明細書中の他の場所で同定されたものを含む。

【 0 0 8 3 】

他に示さない限り、可変ドメイン中のHVR残基及び他の残基（例、FR残基）は、Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従って、本明細書においてナンバリングされている (Kabat et al., 上記)。

40

【 0 0 8 4 】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生される抗体、あるいはヒト抗体のレパトリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した、非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保持するものである。ヒト抗体のこの定義では、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体が除外される。特定の実施形態において、ヒト抗体は、非ヒトトランスジェニック哺乳動物、例えばマウス、ラット、又はウサギに由来する。特定の実施形態において、ヒト抗体はハイブリドーマ細胞株に由来する。特

50

定の実施形態において、ヒト抗体は（ファージ）ディスプレイライブラリーに由来する。
 特定の実施形態において、ヒト抗体はヒトB細胞に由来する。

【0085】

「個体」又は「被験体」は哺乳動物である。哺乳動物は、家畜（例、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばサルなど）、ウサギ、及び齧歯類（例、マウス及びラット）を含むが、これらに限定しない。特定の実施形態において、個体又は被験体はヒトである。

【0086】

「単離」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。一部の実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動（例、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、
 キピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例、サイズ排除クロマトグラフィー、
 イオン交換又は逆相HPLC）により決定されるように、95%又は99%を上回る純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87を参照のこと。

10

【0087】

「単離」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸は、通常、核酸分子を含む細胞中に含まれる核酸分子を含むが、核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0088】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、その集団を含む個々の抗体は同一である、及び/又は可能な変異体抗体（例、自然発生する変異を含む、又はモノクローナル抗体調製物の産生間に生じる）を除く、同じエピトープに結合し、そのような変異体は、一般的に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に向けられた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々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に向けられる。このように、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要求すると解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、種々の技術（ハイブリドーマ方法、B細胞方法、組換えDNA方法、ファージディスプレイ方法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用した方法を含むが、これらに限定されない）により作製することができる。

20

30

【0089】

用語「眼血管疾患」は、眼内血管新生症候群、例えば糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、未熟児の網膜症、血管新生緑内障、網膜静脈閉塞症、中枢性網膜静脈閉塞症、黄斑変性症、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、網膜血管腫増殖、黄斑毛細血管拡張症、虚血性網膜症、虹彩血管新生、眼内血管新生、角膜血管新生、網膜血管新生、脈絡膜血管新生、及び網膜変性などを含むが、これらに限定しない（例、Garner, A., *Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710を参照のこと）。

40

【0090】

用語「医薬製剤」は、その中に含まれる活性成分の生物学的活性が効果的になることを許すような形態であり、製剤が投与されうる被験体に対して非許容可能な毒性のある追加成分を含まない調製物を指す。

【0091】

「医薬的に許容可能な担体」は、被験体に非毒性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。医薬的に許容可能な担体は、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含むが、これらに限定しない。

【0092】

50

本明細書において使用する用語「ペプチドリンカー」は、アミノ酸配列を伴うペプチドを表示し、それは、一実施形態において、合成由来である。「ペプチドリンカー」はアミノ酸残基の直鎖を表す。このアミノ酸残基の直鎖は1～30残基の長さを有する。

【0093】

一実施形態において、ペプチドリンカーはグリシン残基、グルタミン残基、及び/又はセリン残基が豊富である。一実施形態において、これらの残基は、例えば5つまでのアミノ酸の小さな反復単位、例えばGS（配列番号：21）、GGS（配列番号：22）、GGGS（配列番号：23）、及びGGGS（配列番号：24）などにおいて配置される。小さい反復単位は1～5つ繰り返してもよい。多量体単位のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端に、追加の6つまでの任意の天然アミノ酸を加えてもよい。

10

【0094】

ペプチドリンカーは、一実施形態において、30アミノ酸までの長さを伴う、一実施形態において、5～20アミノ酸残基の長さを伴うアミノ酸配列を伴うペプチドである。一実施形態において、ペプチドリンカーは、G＝グリシン、S＝セリンを伴う $(G \times S)_n$ （ $x = 3$ 、 $n = 2, 3, 4$ 、又は5）又は（ $x = 4$ 及び $n = 2, 3$ 、又は4）であり、一実施形態において、 $x = 3$ 、 $n = 2$ を伴い、一実施形態において、 $x = 4$ 、 $n = 2$ を伴う。このペプチドリンカーは、それにもかかわらず、その末端の一方又は両方に追加のグリシン残基及び/又はセリン残基を含みうる。

【0095】

他の合成ペプチドリンカーは単一のアミノ酸で構成され、それは10～20回の間で反復し、アミノ末端及び/又はカルボキシル末端に6つまでの追加の任意の天然アミノ酸を含みうる。

20

【0096】

合成GSリッチペプチドリンカーの他、天然ペプチドリンカー、例えばヒトP糖タンパク質のようなIgGヒンジ、ヒトレプリカティンプロテインAのC末端リンカー、副甲状腺ホルモン関連タンパク質のリンカーなども使用することができる。

【0097】

全てのペプチドリンカーが、核酸分子によりコードされていてもよく、従って、組み換える的に発現されてもよい。リンカーはそれ自体ペプチドであるため、リンカーにより接続されたポリペプチドは、2つのアミノ酸の間に形成されたペプチド結合を介してリンカーに連結されている。

30

【0098】

用語「組換え」又は「組換え的に産生された」は、組換え手段により調製、発現、作製、又は単離されたポリペプチドを表示する。これは、宿主細胞（例えばNS0細胞又はCHO細胞など）から、又はトランスジェニックである動物（例、マウス）から単離されたポリペプチド、あるいは宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現プラスミドを使用して発現されたポリペプチドを含む。

【0099】

本明細書において使用するように、「処置」（及び、その文法上の変形、例えば「処置する」又は「処置している」など）は、処置されている個体の自然経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の経過の間に実施することができる。処置の望ましい効果は、疾患の出現又は再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的転帰の減弱、転移の防止、疾患進行の速度の減少、疾患状態の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含むが、これらに限定しない。一部の実施形態において、本発明において報告する抗体又はFc領域融合ポリペプチドを使用し、疾患の発生を遅延させる、又は疾患の進行を遅らせる。

40

【0100】

本願内で使用する用語「価」は、（抗体）分子中の結合部位の指定された数の存在を表示する。そのようなものとして、用語「二価」、「四価」、及び「六価」は、それぞれ、（抗体）分子中の2つの結合部位、4つの結合部位、及び6つの結合部位の存在を表示す

50

る。本明細書において報告する二特異性抗体は、好ましい一実施形態において「二価」である。

【0101】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の、その抗原への結合に含まれる抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれVH及びVL）の可変領域は、一般的に、同様の構造を有し、4つのフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む各々のドメインを伴う（例、Kindt, T.J. et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと）。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分でありうる。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、相補的VL又はVHドメインのライブラリーをそれぞれスクリーニングするために、抗原に結合する抗体からのVH又はVLドメインを使用して単離してもよい。例えば、Portolano, S. et al., *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628)を参照のこと。

10

【0102】

用語「プラスミド」は、本明細書において使用するように、それが連結される別の核酸を伝播することが可能である核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびにそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられたベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結された核酸の発現を指示することが可能である。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」として言及する。

【0103】

用語「治療用眼球標的」は、眼球血管疾患に含まれる分子を表示する。

20

【0104】

用語「ダイアボディ」は、小さなペプチドリンカーにより接続された重鎖可変（VH）領域及び軽鎖可変（VL）領域からなる一本鎖Fv（scFv）フラグメントの非共有二量体を表示する。scFv中の一般的なリンカーは14～15のアミノ酸残基を有し、可変ドメインのN末端とC末端の間にある。しかし、長さ3～12アミノ酸残基のリンカーを使用することによってダイアボディが形成される。

【0105】

用語「タンデムscFv（taFv）」は、2つのscFv分子が短いリンカーを通じて共役されている分子を表示する。

30

【0106】

用語「ミニ抗体又はミニボディ」は、2つの改変二量体化ドメインを通じた2つのscFv分子の会合により産生される二価（又は二特異性）（scFv）₂を表示する。

【0107】

用語「tandAb」は、各々の抗原について2つの結合部位からなる四価二特異性抗体フォーマットを表示する。それはリンカーにより接続されている可変免疫グロブリンドメインだけからなる。

【0108】

用語「BiTE」は二特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）を表示する。これらは、癌細胞に対して宿主の免疫システム、より具体的にはT細胞の細胞傷害活性を指示する人工の二特異性モノクローナル抗体のクラスである。BiTEは、約55キログルトンの単一ペプチド鎖上の、異なる抗体の2つの単鎖可変フラグメント（scFv）、又は4つの異なる遺伝子からのアミノ酸配列からなる融合タンパク質である。scFvの1つはCD3受容体を介してT細胞に、他方は腫瘍特異的分子を介して腫瘍細胞に結合する。

40

【0109】

用語「DART」は、それら自体のVHが他のものと交換された2つの操作されたFvフラグメントからなる分子を表示する。詳細には、Fv1は抗体AからのVH及び抗体BからのVLを含み、Fv2はAb-BからのVH及びAb-AからのVLを含む。Fvドメインのこの相互交換によって、短い連結ペプチドによる立体配座拘束から変異体フラグメントが放出される。

50

【 0 1 1 0 】

「コラーゲン」は、動物身体の種々の結合組織中の細胞外空間における主な構造タンパク質である。結合組織の主成分として、それは、全身のタンパク質含有量の25%~35%を構成する、哺乳動物において最も豊富なタンパク質である。石灰化の程度に依存して、コラーゲン組織は硬質（骨）、軟質（腱）でありうる、又は硬質から軟質（軟骨）への勾配を有しうる。コラーゲンは、細長い原線維の形態であり、大半が線維組織（例えば腱、靭帯、及び皮膚など）において見出される。それは角膜、軟骨、骨、血管、腸、椎間板、及び歯における象牙質にも豊富である。筋肉組織中では、それは子宮内膜の主要な成分としての役割を果たす。コラーゲンは筋肉組織の1~2パーセントを構成し、強い腱筋の6%を占める。線維芽細胞はコラーゲンを作る最も一般的な細胞である。

10

【 0 1 1 1 】

「I I型コラーゲン」は関節軟骨及び硝子軟骨の基礎である。それは軟骨中の全タンパク質の50%まで及び関節軟骨のコラーゲンの85~90%を構成する。I I型コラーゲンは原線維を形成する。コラーゲンのこの繊維状ネットワークによって、軟骨がプロテオグリカン凝集体を捕捉すること、ならびに組織に引張強度を提供することが可能になる。I I型コラーゲンは軟骨及び眼の硝子体液中に見出される。

【 0 1 1 2 】

I I . 硝子体液 / 硝子体

【 0 1 1 3 】

眼中の大半の空間を埋めるマトリックスは、硝子体液 / 硝子体として表示する。

20

【 0 1 1 4 】

ヒトの硝子体液は透明な水溶液であり、水晶体と網膜の間に位置する眼の後部区画を満たす。それは眼球の容積の約80%を占め、99%の水を含むが、しかし、コラーゲン繊維のネットワーク及び巨大分子のヒアルロン酸のために出生時にゲル様構造を有する。その容積は約4~5mlである (Beauthier, J.P., (2008) In: De Boeck Universite [Ed]. Traite de medecine legale. Bruxelles: 715-725)。硝子体液は、無機塩、糖、及びアスコルビン酸を含むいくつかの低分子量溶質を含む。ヒト硝子体中のタンパク質の総濃度は約1200 µg/mlであり、そのうちコラーゲンは180 µg/mlを占める (例、Aretz, S., et al., Prot. Sci. 11 (2013) 22; Theocharis, A.D., et al., Biochim. 84 (2002) 1237-1243を参照のこと)。大部分がアルブミン (60~70%) からなる、健全な硝子体 30
 液の平均タンパク質濃度0.5mg/mLがAngi, M.らにより報告されている (Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation, Volume 2012, Article ID 148039)。さらに、硝子体液の成分が、グロブリン、凝固タンパク質、補体因子、及び低分子量タンパク質であることがその中に報告されている (Ulrich, J.N., et al., Clin. Exp. Ophthalmol. 36 (2008) 431-436)。毛様体は、拡散、限外濾過、及び後部への水性液体の能動輸送により、一定の液体交換を提供する (Bishop, P.N., Eye, 16 (2002) 454-460)。タンパク質が、局所分泌 (例、糖タンパク質)、血液からの濾過 (例、アルブミン)、又は周囲組織からの拡散により硝子体内に蓄積しうる (Wu, C.W., Am. J. Ophthalmol., 137 (2004) 655-661)。硝子体網膜と内網膜の間の密接な接触のため、網膜の生理学的及び病理学的条件は、硝子体液のプロテオーム及び生化学的特性の両方に影響を及ぼす。 40

【 0 1 1 5 】

I I I . 眼の保持が増加した眼科用の多機能結合剤

【 0 1 1 6 】

眼疾患に関連する、標的に特異的に結合する第1の結合部位と、眼中での保持に影響を及ぼす、標的に特異的に結合する第2の結合部位との組み合わせにより、単一特異性結合剤と比較して改善された硝子体内保持を伴う多特異性結合剤を提供することができることを見出された。第2の結合部位は、硝子体液 / 網膜中の細胞外マトリックス (ECM) 中に見出される化合物 / 分子に特異的に結合する。細胞外マトリックスのこの化合物は、十分な負荷 / 用量の薬物が結合することを可能にする量で存在しなければならない。コラー 50

ゲン、特にコラーゲン I I は、この目的のために硝子体液中の E C M において適切な化合物であることが見出された。

【 0 1 1 7 】

長い硝子体内半減期を伴うと、より少ない頻度の注射が要求され、全身循環中での短い半減期を伴うと、低い全身曝露をもたらすことができ、両方の組み合わせを伴うと、有効性の増加及び副作用の低下が期待される。

【 0 1 1 8 】

長い硝子体内半減期は、以下により達成することができる：

- 高分子量 (I g G、例えば、より小さなフォーマット (例えばダイアボディ、 F a b など) への P E G の付加)、
- 保持標的への高い親和性及び結合力 (より低い有効薬物濃度は、より少ない頻度の投薬をもたらす)、
- 3 7 での高い熱安定性、
- 硝子体液及び血液網膜関門 (B R B) を横切る分子の拡散の減少、
- 最適電荷又は p I。

10

【 0 1 1 9 】

迅速な全身排除は、以下により達成することができる：

- F c R n 結合の低下のための F c 領域の操作、
- 低分子量 (F a b、ダイアボディ、 D A R P I N)、
- 低い投与用量 (用量は親和性にも依存する)。

20

【 0 1 2 0 】

本発明の目的は、眼中への適用のための長期持続性薬物を提供することである。これによって、要求される適用の数、及び同様に単一の適用間の時間が低下する。これは、一方では各々の適用時に投与される用量を増加させることにより、又は他方では適用後の眼における薬物の半減期及び持続時間を増加させることにより達成することができる。

【 0 1 2 1 】

本発明は、一般的に、以下を含む多特異性結合剤 (即ち、組換え融合タンパク質) に関する：

- 治療用眼球標的に特異的に結合する第 1 の結合部位、及び
- コラーゲン I I に特異的に結合する第 2 の結合部位。

30

【 0 1 2 2 】

一実施形態において、結合部位の各々は、抗体結合部位、アンチカリン、 D A R P I N、受容体リガンド又はその結合フラグメント、受容体又はその結合フラグメント、テトラネクチンドメインからなる群より互いに独立して選択する。

【 0 1 2 3 】

一実施形態において、結合部位の各々は抗体結合部位である。一実施形態において、結合部位の各々は、抗体重鎖可変ドメイン及び抗体軽鎖可変ドメインの (同族) 対である。

【 0 1 2 4 】

一実施形態において、第 1 の結合部位は第 1 のドメイン中に含まれ、第 2 の結合部位は第 2 のドメイン中に含まれ、第 1 のドメインは直接的に又はペプチドリッカーを介して第 2 のドメインに共役される。一実施形態において、第 1 のドメイン及び第 2 ドメインは、 s c F v、 d s s c F v、 F a b、 d s F a b、 C r o s s F a b、モノボディ、及び V H H (s c = 一本鎖、 d s = ジスルフィド安定化) からなる群より互いに独立して選択する。一実施形態において、ドメイの 1 つは F a b 又は d s F a b であり、他のドメインは s c F v 又は d s s c F v であり、ドメインはペプチドリッカーを介して共役されている。

40

【 0 1 2 5 】

一実施形態において、多特異性結合剤は、タンデム F v、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、ジスルフィド安定化ダイアボディ、 D A R T、 s c F v 2、 F a b - s c F v、ミ

50

ニボディからなる群より選択する。

【0126】

本明細書において、以下を含む多特異性結合剤（即ち、組換え融合タンパク質）を開示する：

- 治療用眼球標的に特異的に結合する第1の結合部位を含むFab又はscFv、
- コラーゲンIIに特異的に結合するscFv、及び
- ペプチドリンカー、

それにより、第1の結合部位を含むFab又はscFvは、そのC末端の1つで、ペプチドリンカーのN末端にペプチド結合により共役され、コラーゲンIIに特異的に結合するscFvは、そのN末端で、ペプチドリンカーのC末端にペプチド結合により共役される。

10

【0127】

一実施形態において、治療用眼球標的は、ANG 2、VEGF、PDGF-B、IL-1ベータからなる群より選択する。

一実施形態において、多特異性結合剤は、以下を含む二特異性結合剤である：

- ANG 2、VEGF、PDGF-B、又はIL-1ベータに特異的に結合するFab、
- コラーゲンIIに特異的に結合するscFv、及び
- ペプチドリンカー、

それにより、Fabは、そのC末端の1つで、ペプチドリンカーのN末端へのペプチド結合により共役され、scFvは、そのN末端で、ペプチドリンカーのC末端へのペプチド結合により共役される。

20

【0128】

一実施形態において、多特異性結合剤は、以下を含む三重特異性結合剤である：

- ANG 2、VEGF、PDGF-B、又はIL-1ベータに特異的に結合する第1の結合部位、
- ANG 2、VEGF、PDGF-B、又はIL-1ベータに特異的に結合する第2の結合部位、
- コラーゲンIIに特異的に結合するscFv、及び
- ペプチドリンカー、

それにより、組み合わせられた第1及び第2の結合部位は、それらのC末端でのペプチド結合によりペプチドリンカーのN末端に共役され、scFvは、そのN末端でのペプチド結合によりペプチドリンカーのC末端に共役される。

30

【0129】

一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するscFvは以下を含む：

- a) 配列番号09のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号10の軽鎖可変ドメイン、又は
- b) 配列番号12のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号13の軽鎖可変ドメイン、又は
- c) 配列番号15のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号16の軽鎖可変ドメイン。

40

【0130】

一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するscFvは、配列番号12のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号13の軽鎖可変ドメインを含む。

【0131】

一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するscFvは、配列番号11、配列番号14、又は配列番号17のアミノ酸配列を有する。

【0132】

一実施形態において、コラーゲンIIに特異的に結合するscFvは、配列番号14のアミノ酸配列を有する。

【0133】

50

－実施形態において、多特異性結合剤は、以下を含む二特異性結合剤である：

- A N G 2、V E G F、P D G F - B、又は I L - 1 ベータに特異的に結合する F a b、
- 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を伴う重鎖可変ドメイン及び配列番号 1 3 の軽鎖可変ドメインを含む、コラーゲン I I に特異的に結合する s c F v、ならびに
- ペプチドリinker、

それにより、F a b は、その C 末端の 1 つで、ペプチドリinker の N 末端へのペプチド結合により共役され、s c F v は、その N 末端で、ペプチドリinker の C 末端へのペプチド結合により共役される。

【 0 1 3 4 】

薬物の硝子体内半減期及び持続時間は、異なる手段、例えば、とりわけ、薬物の流体力学的半径の増加（それにより眼からの拡散を遅らせる）、薬物のその標的への高い親和性（それにより薬物 - 標的複合体の解離を低下させる）、眼中での高い（熱）分解安定性、及び高注射用量などにより増加させることができる。

10

【 0 1 3 5 】

持続時間に影響を及ぼすと考えられる主な因子は、用量（適用可能な用量の増加によって持続時間が向上する）、半減期（半減期における増加によって持続時間が向上する）、及び標的への親和性（ K_D で表される）（親和性における増加によって持続時間が向上する）である。

【 0 1 3 6 】

硝子体内適用後、大量の薬物が、眼中での薬物の保持のために選択された硝子体液中での E C M の化合物により結合されなければならない。前記化合物への結合動態によって、最小有効量を維持するために、網膜 / 脈絡膜中への薬物の十分な残存拡散が可能にならない（目的：硝子体内適用後に可能な限り長い最小有効量を上回る薬物濃度）。

20

【 0 1 3 7 】

「拡散速度」（眼中での薬物の保持のために選択された E C M の化合物に対する k_{on} / k_{off} 及び硝子体液中でのデポのキャパシティに依存する）は、全身循環中への除去速度と等しいかわずかに高くなければならない。

【 0 1 3 8 】

眼中での薬物の保持のために選択された E C M の化合物の「キャパシティ」（= デポサイズ）は十分に高くなければならない。そのキャパシティは、眼中での薬物の保持のために選択された E C M の化合物の量 / 接近可能性、その結合部位の数、及びその代謝回転に依存している。

30

【 0 1 3 9 】

結合剤 - E C M 化合物 - 相互作用によって、拡散定数、それにより目からの共役物の排除が低下するはずである。硝子体液中の拡散速度の低下は、眼球保持の増加 / 改善のための必要条件である。複雑な溶液中での蛍光標識タンパク質の拡散定数は、蛍光相関分光法（FCS；即ち、蛍光を使用した DLS）により決定することができる。

【 0 1 4 0 】

濃度、拡散係数、及び MW のようなパラメータは、測定値から直接決定することができる。拡散率の試験は、硝子体液の組成を表す人工試験溶液中（薬物の保持のために選択された E C M の化合物を含む）又は直接ミニプタの硝子体液中で実施することができる。

40

【 0 1 4 1 】

蛍光相関分光法（FCS）によって、集束レーザービームにより照射された開放顕微鏡容積要素における蛍光標識分子の確率的運動を分析する。FCS は、溶液中での分子間相互作用の試験に成功裏に適用されてきた。1 つの結合パートナーを、フルオロフォアを用いて標識し、指定された相互作用物質とインキュベートする。結合時に、標識複合体の分子量及び、故に拡散移動度が変化し、これは FCS により定量化することができる。結合パートナーの一定濃度にわたる標識リガンドの滴定によって、相互作用の親和性を決定することが可能になる。時間分解測定によって、対応する速度定数が生じる。このように、

50

複雑なサイズの FCS における十分なシフトを解離定数及び速度定数の決定のために使用することができる。

【0142】

ブラウン運動によって、照射された検出容積を通じて蛍光標識分子の拡散が促進される。容積要素を通過する間に放出された光子は、超高感度な単光子検出器 (APD) で記録する。変動は、記録された光子数を自己相関と呼ばれる数学的方法を用いて処理し、推定された自己相関関数を適当な生物物理学的モデルに適合させることにより分析する。

【数1】

$$J = -D * dc/dx$$

$$dc/dt = D * (d^2c)/(dx^2)$$

10

J : 拡散流束

D : 拡散定数

c : 濃度

x : 距離

t : 時間

【0143】

眼中での薬物の保持のために選択することができる ECM の化合物は、硝子体液 / 硝子体において見出される潜在的に不溶性のタンパク質、例えば、コラーゲン (I I 型、I X 型、V / X I 型、I V 型など)、ヒアルロン酸 (コラーゲンと一緒に構造を形成する)、コンドロイチン硫酸、及びヘパリン硫酸などである。

20

【0144】

本発明は、治療効果を発揮するために標的に特異的に結合する第 1 の結合部位及び眼中での (少なくとも) 二特異性の結合剤の保持のために選択された ECM の化合物に特異的に結合する第 2 の結合部位を含む、(少なくとも) 二特異性の結合剤に関する。

【0145】

本発明に従った例示的な結合剤は、眼中での薬物の保持のために選択された ECM の化合物に対する第 2 の結合特異性と組み合わせた抗ジゴキシゲニン結合剤である。

30

【0146】

異なる構築物をインビトロ及びインビボで試験した：
参照として：

- 抗ジゴキシゲニン抗体 Fab (以下において FAB として表示する)。
- 20 kDa の PEG 残基に共役された抗ジゴキシゲニン抗体 Fab (以下において FAB - PEG として表示する)。

二特異性結合剤 / 融合タンパク質として：

- ヘパリン結合ドメインに共役された抗ジゴキシゲニン抗体 Fab (残基 111 ~ 165 を含むヒト VEGF フラグメント；以下において FAB - HBD として表示する)。
- 3 つの異なる抗コラーゲン I I 抗体 scFv に共役された抗ジゴキシゲニン抗体 Fab (以下において FAB - COLL - 1 (配列番号 9 (VH)、10 (VL)、及び 11 (scFv))、FAB - COLL - II (配列番号 12 (VH)、13 (VL)、及び 14 (scFv))、FAB - COLL - III (配列番号 15 (VH)、16 (VL)、及び 17 (scFv)) として表示し、これらは結合動態において異なる)。

40

【0147】

ミニプタ試験において、異なる構築物の濃度を、それぞれの構築物の 500 nM 溶液の硝子体内注射 (d0) 後 168、336、及び 672 時間に硝子体、網膜、及び脈絡膜において測定した。

【0148】

硝子体においては、以下の時間依存的濃度を決定している：

50

【表 1】

	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
FAB	82.5	53.6	6.7
FAB-PEG	128.6	93.3	32.5
FAB-HBD	45.2	10.3	2.1
FAB-COLL-I	165.6	59.2	10.4
FAB-COLL-II	171.0	58.5	19.6
FAB-COLL-III	149.3	62.0	11.1

10

【 0 1 4 9 】

網膜においては、以下の時間依存的濃度を決定している：

【表 2】

	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
FAB	85.9	17.6	5.6
FAB-PEG	50.3	43.6	5.4
FAB-HBD	72.5	12.6	1.1
FAB-COLL-I	78.2	52.6	6.7
FAB-COLL-II	101.3	67.7	13.6
FAB-COLL-III	68.2	41.6	6.6

20

【 0 1 5 0 】

脈絡膜においては、以下の時間依存的濃度を決定している：

【表 3】

	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
FAB	29.6	21.4	2.0
FAB-PEG	54.8	34.4	23.9
FAB-HBD	60.2	13.1	1.6
FAB-COLL-I	64.2	51.7	5.4
FAB-COLL-II	68.2	41.6	6.6
FAB-COLL-III	129.5	37.8	7.2

30

【 0 1 5 1 】

異なるコラーゲン s c F v は、以下のインビトロでの特徴を有する：

【 0 1 5 2 】

眼の異なる区画（組織）における異なる構築物の半減期を図 1 に示す。

【 0 1 5 3 】

異なる構築物に関する眼の異なる区画（組織）の曝露を図 2 に示す。

40

【 0 1 5 4 】

構築物の特徴的なパラメータを、ミニプタにおいてインビボで、及びBIAcoreを使用してインビトロで、ならびに人工拡散試験溶液中で決定した。データを以下の表に示す。

【表 4】

	KD(nM)ブタ／ヒトコラーゲンII	拡散率FCS (PBS 単独と比較した、等モル濃度のECM化合物を含むPBS 中での増加)	拡散率FCS (PBS と比較した硝子体液中での増加)
FAB	n.a.	100 %	100 %
FAB-PEG	n.a.	+ 65-100 %	+ 70-100 %
FAB-HBD (40 nM)	n.a.	+ 25 %	+ 35 %
FAB-COLL-I (2 nM)	56 / 30	+ 180 %	+ 35-130 %
FAB-COLL-II (8 nM)	50 / 15	+ 260 %	+ 140-310 %
FAB-COLL-III (8 nM)	342 / 180	+ 40 %	+ 30-85 %

10

【表 5】

	濃度 (nM)	拡散時間硝子体液 (マイクロ秒)	拡散時間PBS (マイクロ秒)
FAB	8	270	267
FAB-COLL-I	2	632	477
FAB-COLL-II	8	1113	347
FAB-COLL-III	8	497	390

20

【 0 1 5 5 】

FAB-COLL-II について、3.2 倍の拡散時間の増加（即ち、拡散の低下）が VF において見出され、2.7 倍の拡散時間の増加が、コラーゲンを添加した PBS（同じ FAB-COLL-II 濃度）において見出された。

【表 6】

	t _{1/2} 硝子体(時間)	CO推定値(nM)
FAB	135	196
FAB-PEG	249	205
FAB-HBD (40 nM)	118	121
FAB-COLL-I (8 nM)	125	421
FAB-COLL-II (2 nM)	169	341
FAB-COLL-III (8 nM)	134	355

30

【 0 1 5 6 】

本明細書中に開示する多特異性結合剤／融合タンパク質は

- 低頻度の投与を可能にし、全身毒性効果を最小化／排除するために、長い硝子体内半減期及び短い全身半減期を支持する。
- 硝子体の保持を有し、眼からの放出が遅くなり、低い全身 C_{max} 及びより少ない全身毒性をもたらされる、
- 選択された ECM 化合物への増加した親和性を有し、より低い有効薬物濃度に導き、より低頻度の投与頻度をもたらさうる。
- 特定の硝子体保持部分を有し、長い硝子体内半減期をもたらす。
- 硝子体及び血液網膜関門を横切る速い拡散を補償するための硝子体保持部分を組み合わせた低分子量フォーマットを有する。
- 眼科機器における使用のために最も適した低分子量フォーマットである。

40

50

- 第3の特異性の追加によって、さらに高い有効性に導きうる。
- Fc領域を含む場合、FcRnに結合しない「サイレント」Fc部分のために、短縮した全身半減期を伴う高MWフォーマットである。

【0157】

一態様において、本発明は、ヒトコラーゲンIIに結合する単離された抗体を提供する。

【0158】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、750を上回る、一実施形態においては1000を上回る、8nM濃度でのマイクロ秒におけるミニブタの硝子体液中での拡散時間を有する。

【0159】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体はブタコラーゲンIIにも特異的に結合する。

【0160】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、8nMの濃度で400nM未満のブタコラーゲンIIへの結合のための K_D 値を有する。一実施形態において、 K_D は100nM未満である。

【0161】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、200nM未満のヒトコラーゲンIIについての K_D 値を有する。一実施形態において、 K_D は50nM未満である。

【0162】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、ミニブタ硝子体において150時間を上回る半減期を有する。

【0163】

特定の実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、ミニブタにおいて200nMを上回る推定 C_0 を有する。一実施形態において、 C_0 は300nMを上回る。

【0164】

一態様において、本発明は、配列番号09のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH HVRを含む抗体を提供する。

【0165】

一態様において、本発明は、配列番号12のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH HVRを含む抗体を提供する。

【0166】

一態様において、本発明は、配列番号15のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH HVRを含む抗体を提供する。

【0167】

一態様において、本発明は、配列番号10のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL HVRを含む抗体を提供する。

【0168】

一態様において、本発明は、配列番号13のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL HVRを含む抗体を提供する。

【0169】

一態様において、本発明は、配列番号16のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL HVRを含む抗体を提供する。

【0170】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)配列番号09のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び (b)配列番号10のKabatに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0171】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明の抗体は、(a)配列番号12のK a b a tに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのV H H V R配列を含むV Hドメイン；及び(b)配列番号13のK a b a tに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのV L H V R配列を含むV Lドメインを含む。

【0172】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)配列番号15のK a b a tに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのV H H V R配列を含むV Hドメイン；及び(b)配列番号16のK a b a tに従って決定された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのV L H V R配列を含むV Lドメインを含む。

【0173】

上記実施形態のいずれにおいても、抗ヒトコラーゲンII抗体はヒト化されている。一実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、上記の実施形態のいずれかにおけるようにH V Rを含み、アクセプターヒトフレームワーク(例、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク)をさらに含む。

【0174】

別の態様において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号09のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H)配列を含む。特定の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV H配列は、参照配列と比べて、置換(例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲンII抗体は、ヒトコラーゲンIIに結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計1~10のアミノ酸が、配列番号09において置換、挿入、及び/又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の領域中(即ち、F R中)で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号09においてV H配列を含む(その配列の翻訳後修飾を含む)。

【0175】

別の態様において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号12のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H)配列を含む。特定の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV H配列は、参照配列と比べて、置換(例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲンII抗体は、ヒトコラーゲンIIに結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計1~10のアミノ酸が、配列番号12において置換、挿入、及び/又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の領域中(即ち、F R中)で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号12においてV H配列を含む(その配列の翻訳後修飾を含む)。

【0176】

別の態様において、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H)配列を含む。特定の実施形態において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV H配列は、参照配列と比べて、置換(例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲンII抗体は、ヒトコラーゲンIIに結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計1~10のアミノ酸が、配列番号15において置換、挿入、及び/又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の領域中(即ち、F R中)で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲンII抗体は、配列番号15においてV H配列を含む(その配列の翻訳後修飾を含む)。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 7 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体を提供し、それにおいて抗体は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。特定の実施形態において、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比べて、置換 (例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、ヒトコラーゲン I I に結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 のアミノ酸が、配列番号 1 0 において置換、挿入、及び / 又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の領域中 (即ち、F R 中) で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、配列番号 1 0 において V L 配列を含む (その配列の翻訳後修飾を含む) 。

10

【 0 1 7 8 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体を提供し、それにおいて抗体は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。特定の実施形態において、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比べて、置換 (例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、ヒトコラーゲン I I に結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 のアミノ酸が、配列番号 1 3 において置換、挿入、及び / 又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の領域中 (即ち、F R 中) で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、配列番号 1 3 において V L 配列を含む (その配列の翻訳後修飾を含む) 。

20

【 0 1 7 9 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体を提供し、それにおいて抗体は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。特定の実施形態において、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比べて、置換 (例、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、しかし、その配列を含む抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、ヒトコラーゲン I I に結合する能力を保持する。特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 のアミノ酸が、配列番号 1 6 において置換、挿入、及び / 又は欠失されている。特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の領域中 (即ち、F R 中) で生じる。場合により、抗ヒトコラーゲン I I 抗体は、配列番号 1 6 において V L 配列を含む (その配列の翻訳後修飾を含む) 。

30

【 0 1 8 0 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体が提供され、それにおいて抗体は、上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V H、及び上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V L を含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号 0 9 及び配列番号 1 0 において V H 配列及び V L 配列を含む (それらの配列の翻訳後修飾を含む) 。

40

【 0 1 8 1 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体が提供され、それにおいて抗体は、上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V H、及び上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V L を含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号 1 2 及び配列番号 1 3 において V H 配列及び V L 配列を含む (それらの配列の翻訳後修飾を含む) 。

【 0 1 8 2 】

別の態様において、抗ヒトコラーゲン I I 抗体が提供され、それにおいて抗体は、上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V H、及び上に提供する実施形態のいずれかにおけるような V L を含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号 1 5 及び配

50

列番号16においてVH配列及びVL配列を含む(それらの配列の翻訳後修飾を含む)。

【0183】

さらなる態様において、本発明は、本明細書において提供する抗ヒトコラーゲンII抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。

【0184】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかに従った抗ヒトコラーゲンII抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗ヒトコラーゲンII抗体は抗体フラグメント(例、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')₂フラグメント)である。

【0185】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかに従った抗ヒトコラーゲンII抗体は、モノクローナル抗体scFvフラグメント又はFabである。一実施形態において、scFvフラグメントは配列番号11のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、scFvフラグメントは配列番号14のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、scFvフラグメントは配列番号17のアミノ酸配列を有する。

【0186】

IV.産生

【0187】

本明細書中に開示されるような多特異性結合剤/融合タンパク質は組換え手段により産生する。このように、本発明において報告する一態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤をコードする核酸であり、さらなる態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤をコードする核酸を含む細胞である。組換えの産生のための方法が、最先端技術において広く公知であり、原核細胞及び真核細胞中でのタンパク質発現を含み、続く多特異性結合剤の単離及び通常は医薬的に許容可能な純度までの精製を伴う。宿主細胞における上記の多特異性結合剤の発現のために、それぞれの鎖をコードする核酸を、標準方法により発現ベクターに挿入する。発現は、適当な原核宿主細胞又は真核宿主細胞(CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母、又はE.coli細胞など)において実施し、多特異性結合剤を細胞(培養上清又は溶解後の細胞)から回収する。抗体の組換え産生のための一般的方法が、最先端技術において周知であり、例えば、概説文献Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202, Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282, Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160及びWerner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880において記載されている。

【0188】

抗体は、例えば、US 4,816,567に記載される組換え方法及び製剤を使用して産生しうる。

【0189】

一実施形態において、本明細書において記載する多特異性結合剤をコードする単離核酸が提供される。そのような核酸は、多特異性結合剤のVLを含むアミノ酸配列及び/又はVHを含むアミノ酸配列をコードしうる。さらなる実施形態において、そのような核酸を含む1つ又は複数のベクター(例、発現ベクター)を提供する。さらなる実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞を提供する。そのような一実施形態において、宿主細胞は、以下を含む(例、以下を用いて形質転換されている): (1)多特異性結合剤のVLを含むアミノ酸配列及び多特異性結合剤のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2)多特異性結合剤のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター及び多特異性結合剤のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクター。一実施形態において、宿主細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞又はリンパ系細胞(例、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施形態において、本明細書において報告する多特異性結合剤の作製方法を提供し、その方法は、多特異性結合剤の発現のために適切な条件下で上に提供する多特異性結

10

20

30

40

50

合剤をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、及び、場合により、宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から多特異性結合剤を回収することを含む。

【0190】

したがって、本明細書において報告する一態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤の調製のための方法であって、以下の工程を含む：

- a) 多特異性結合剤をコードする核酸分子を含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換すること、
- b) 多特異性結合剤の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養すること、及び
- c) 培養物から多特異性結合剤を回収すること。

【0191】

一実施形態において、c)の下での回収工程は、軽鎖定常ドメイン特異的な捕捉試薬（それは、例えば、カッパ軽鎖又はラムダ軽鎖が二特異性抗体中に含まれているかに依存して、カッパ定常軽鎖又はラムダ定常軽鎖について特異的である）の使用を含む。一実施形態において、この軽鎖特異的な捕捉試薬を、結合及び溶出モードにおいて使用する。そのような軽鎖定常ドメイン特異的な捕捉試薬の例は、例えば、KappaSelect（商標）及びLambdaFabSelect（商標）（GE Healthcare/BACから入手可能）であり、それらは、高い流速及び低い背圧を大規模で可能にする、高度に強固なアガロースベースマトリクスに基づく。これらの材料は、カッパ軽鎖又はラムダ軽鎖の定常領域にそれぞれ結合するリガンドを含む（即ち、軽鎖の定常領域を欠くフラグメントは結合しない）。両方が、従って、軽鎖の定常領域を含む他の標的分子（例えばIgG、IgA、及びIgM）に結合することが可能である。リガンドは、長い親水性スパーアームを介してマトリクスに付着され、それらを、標的分子への結合のために簡単に利用可能にする。それらは、ヒトIgカッパ又はラムダのいずれかについてスクリーニングされる単鎖抗体フラグメントに基づく。

【0192】

多特異性結合剤は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば親和性クロマトグラフィー（プロテインAセファロース、KappaSelect（商標）、LambdaFabSelect（商標））、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、又は透析などにより培養培地から適切に分離される。

【0193】

モノクローナル抗体をコードするDNA及びRNAは、容易に単離され、従来の手順を使用して配列決定される。B細胞又はハイブリドーマ細胞は、そのようなDNA及びRNAの供給源としての役割を果たすことができる。一度単離されると、DNAを発現ベクター中に挿入してもよく、それを次に、本来なら免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞（例えばHEK 293細胞、COS細胞、又はミエローマ細胞など）中にトランスフェクトし、宿主細胞において組換えモノクローナル抗体の合成を得る。

【0194】

細胞成分又は他の混入物（例、他の細胞性核酸又はタンパク質）を、標準的な技術（アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動を含む）、及び当技術分野において公知の他（例、Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照のこと）により除去するために、多特異性結合剤の精製を実施する。異なる方法が、タンパク質精製のために十分に確立され、広範に使用されている。例えば、親和性クロマトグラフィー（例、プロテインA又はプロテインG親和性クロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例、陽イオン交換（カルボキシメチル樹脂）、陰イオン交換（アミノエチル樹脂）、及び混合モード交換）、チオフィリック吸着（例、ベータ-メルカプトエタノール及び他のSHリガンドを伴う）、疎水的相互作用又は芳香族吸着クロマトグラフィー（例、フェニル基-セファロース、アザ-アレノフィリック樹脂、又はm-アミノフェニルボロン酸を伴う）、金属キレート親和性クロマトグラフィー（例、Ni(II)及びCu(II)親和性材料を伴う）、サイズ排除クロマトグラフィー、及び電気泳動方法（例えばゲル電気泳動法、キャピラリー電気泳動など）（Vi

10

20

30

40

50

jayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102) など。

【 0 1 9 5 】

多特異性結合剤をコードするベクターのクローニング又は発現のための適切な宿主細胞は、本明細書において記載する原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、多特異性結合剤は、特にグリコシル化が必要とされない場合、細菌中で産生してもよい。細菌におけるポリペプチドの発現については、例えば、US 5,648,237、US 5,789,199、及びUS 5,840,523を参照のこと(また、大腸菌における抗体フラグメントの発現を記載する、Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254を参照のこと)。発現後、多特異性結合剤は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離してもよく、さら

10

【 0 1 9 6 】

原核生物に加えて、真核微生物(例えば糸状菌又は酵母菌など)が、多特異性結合剤をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」されている真菌株及び酵母菌株を含み、部分的又は完全ヒトグリコシル化パターンを伴う多特異性結合剤の産生をもたらす。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 及びLi, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照のこと。

【 0 1 9 7 】

グリコシル化された多特異性結合剤の発現のための適切な宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)から由来する。無脊椎動物細胞の例は植物及び昆虫の細胞を含む。昆虫細胞と併せて使用されうる多数のパキウウイルス株が、特にスポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために同定されている。

20

【 0 1 9 8 】

植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978、及びUS 6,417,429を参照のこと(トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)技術が記載されている)。

【 0 1 9 9 】

脊椎動物細胞も宿主として使用してもよい。例えば、懸濁液中で成長するように適合されている哺乳動物細胞株が有用でありうる。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7); ヒト胚腎臓株(例えばGraham, F.L., et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74において記載されているHEK293又は293細胞); ベビーハムスター腎臓細胞(BHK); マウスセルトリ細胞(例えばMather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252において記載されているTM4細胞); サル腎臓細胞(CV1); アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76); ヒト子宮頸癌細胞(HEL A); イヌ腎臓細胞(MDCK); バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A); ヒト肺細胞(W138); ヒト肝臓細胞(Hep G2); マウス乳腺腫瘍(MMT 060562); TRI細胞(例えばMather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68において記載されている); MRC5細胞; 及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(DHFR-CHO細胞を含む)(Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); 及び骨髄腫細胞株(例えばY0、NS0、及びSP2/0など)を含む。抗体産生のために適切な特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照のこと。

30

40

【 0 2 0 0 】

V. 医薬製剤

【 0 2 0 1 】

本明細書中で開示する多特異性結合剤/融合タンパク質は価値ある有効性/安全性プロ

50

ファイルを有しうる、及びそれぞれの治療を必要とする患者に利益を提供しうる。

【0202】

一態様において、医薬としての使用のための本明細書において報告する多特異性結合剤を提供する。

【0203】

さらなる態様において、本発明は、医薬の製造又は調製における多特異性結合剤の使用を提供する。任意の実施形態に従った「個体」はヒトでありうる。

【0204】

さらなる態様において、本発明は、例えば、本明細書において概要を述べる治療方法のいずれかにおける使用のための、本明細書において提供する多特異性結合剤のいずれかを含む医薬製剤を提供する。一実施形態において、医薬製剤は、本明細書において提供する多特異性結合剤のいずれか及び医薬的に許容可能な担体を含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書において提供する多特異性結合剤のいずれか及び少なくとも1つの追加の治療薬剤を含む。

10

【0205】

本明細書において報告する一態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤を含む医薬製剤である。

【0206】

本明細書において記載する多特異性結合剤の医薬製剤は、所望の程度の純度を有するそのような多特異性結合剤を、1つ又は複数の任意の医薬的に許容可能な担体と混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980))、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製する。医薬的に許容可能な担体は、一般的に、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸など；抗酸化剤 (アスコルビン酸及びメチオニンを含む)；保存剤 (例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリ (ビニルピロリドン) など；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジンなど；単糖類、二糖類、及び他の糖質 (グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む)；キレート剤 (例えばEDTAなど)；糖 (例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトールなど)；塩形成対イオン (例えばナトリウムなど)；金属複合体 (例、Znタンパク質複合体)；及び/又は非イオン性界面活性剤 (例えばポリエチレングリコール (PEG) など) を含むが、これらに限定しない。例示的な医薬的に許容可能な担体は、本明細書においてさらに、間質性薬物分散剤、例えば可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhUPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) などを含む。特定の例示的なsHASEGP及び使用方法 (rhUPH20を含む) が、US 2005/0260186及びUS 2006/0104968に記載されている。一態様において、sHASEGPは、1つ又は複数の追加のグリコサミノグリカナーゼ (例えばコンドロイチナーゼなど) と組み合わせる。

20

30

40

【0207】

例示的な凍結乾燥された抗体製剤が、US 6,267,958に記載されている。水性抗体製剤は、US 6,171,586及びWO 2006/044908に記載されている製剤を含み、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝剤を含む。

【0208】

本明細書における製剤はまた、処置されている特定の適応症のために必要な1を上回る活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を伴う製剤を含みうる。そ

50

のような活性成分は、意図される目的のために効果的である量で、組み合わせで適切に存在する。

【0209】

インビボ投与のために使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、無菌濾過膜を通じた濾過により容易に達成されうる。

【0210】

本明細書において報告する別の態様は、医薬製剤の製造のための本明細書において報告する多特異性結合剤の使用である。本明細書において報告するさらなる態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤を含む医薬製剤の製造方法である。別の態様において、製剤、例えば、医薬担体と一緒に製剤化された、本明細書において報告する多特異性結合剤を含む医薬製剤を提供する。

10

【0211】

送達の多くの可能なモードを使用することができ、眼内適用又は局所適用を含むが、それに限定しない。一実施態様において、適用は眼内であり、結膜下注射、前房内注射、側頭部角膜縁を介した前房中への注射、基質内注射、角膜内注射、網膜下注射、眼房水注射、テノン嚢下注射又は持続送達機器、硝子体内注射（例、前、中、又は後硝子体内注射）を含むが、それらに限定しない。一実施態様において、適用は局所的であり、角膜への点眼を含むが、それに限定しない。

【0212】

一実施態様において、本明細書において報告する二特異性結合剤又は医薬的組成物は、硝子体内適用を介して、例えば、硝子体内注射を介して投与する。これは、当技術分野において公知の標準的手順に従って実施することができる（例、Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276、Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206、及びWray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185を参照のこと）。

20

【0213】

一部の実施態様において、治療用キットを提供し、それは、本明細書において記載する医薬製剤中に存在する二特異性抗体の1又は複数の用量、医薬製剤の硝子体内注射のための適切な機器、ならびに適切な被験体を詳述する指示書及び注射を行うためのプロトコールを含む。これらの実施態様において、製剤は典型的には、処置を必要とする被験体に硝子体内注射を介して投与される。これは、当技術分野において公知の標準的な手順に従って実施することができる（例、Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276、Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206、及びWray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185を参照のこと）。

30

【0214】

製剤はまた、アジュバント（例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤など）を含んでもよい。微生物の存在の防止は、滅菌手順（上記）により、ならびに、種々の抗菌薬剤及び抗真菌薬剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など）の包含により確実にしてもよい。また、等張剤（例えば糖、塩化ナトリウムなど）を製剤中に含むことが望ましいであろう。また、注射可能な医薬的形態の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど）の包含によりもたらしてもよい。

40

【0215】

選択された投与経路にかかわらず、本明細書において報告する多特異性結合剤（それは適切な水和形態において使用してもよい）、及び/又は本明細書において報告する医薬製剤は、当業者に公知の従来の方法により医薬的に許容可能な投与形態中に製剤化される。

【0216】

本明細書において報告する医薬製剤中での活性成分の実際の投与量レベルを変動させてもよく、患者への毒性を伴わず、特定の患者、製剤、及び投与様式について所望の治療的応答を達成するために効果的である活性成分の量を得るようにする。選択される投与量レ

50

ベルは、種々の薬物動態学的因子（用いられる特定の製剤の活性、投与経路、投与時間、用いられている特定の化合物の排出速度、治療の持続時間、他の薬物、用いられる特定の製剤との組み合わせにおいて使用される化合物及び／又は材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態、及び以前の病歴、ならびに医学分野において周知の同様の因子を含む）に依存しうる。

【0217】

製剤は無菌であり、製剤がシリンジにより送達可能である範囲まで液体でなければならない。水に加えて、担体は、好ましくは、等張緩衝生理食塩水である。

【0218】

適した流動性は、例えば界面活性剤の使用により維持することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖、多価アルコール（例えばマンニトール又はソルビトールなど）、及び塩化ナトリウムを製剤中に含むことが好ましい。

10

【0219】

製剤は、結膜下投与のための活性薬剤を含む眼科用デポー製剤を含むことができる。眼科用デポー製剤は、本質的に純粋な活性薬剤、例えば、本明細書において報告する二特異性抗体の微粒子を含む。本明細書において報告する二特異性抗体を含む微粒子は、生体適合性の医薬的に許容可能なポリマー又は脂質封入薬剤中に埋め込むことができる。デポー製剤を、延長期間にわたり、実質的に全ての活性物質の全てを放出するように適応してもよい。ポリマー又は脂質マトリクスは、存在する場合、全て又は実質的に全ての活性薬剤の放出後に、十分に分解され、投与部位から輸送されるように適応してもよい。デポー製剤は、医薬的に許容可能なポリマー及び溶解又は分散した活性薬剤を含む、液体製剤でありうる。注射時、ポリマーは、例えば、ゲル化又は沈殿により、注射部位でデポーを形成する。

20

【0220】

本明細書において報告する別の態様は、眼血管疾患の処置における使用のための、本明細書において報告する多特異性結合剤である。

【0221】

本明細書において報告する別の態様は、眼血管疾患の処置における使用のための、本明細書において報告する医薬製剤である。

【0222】

本明細書において報告する別の態様は、眼血管疾患の処置用の医薬の製造のための、本明細書において報告する多特異性結合剤の使用である。

30

【0223】

本明細書において報告する別の態様は、本明細書において報告する多特異性結合剤を、そのような処置を必要とする患者に投与することによる、血管性眼疾患に罹患した患者の処置方法である。

【0224】

VI. 治療方法

【0225】

本明細書中に開示する多特異性結合剤／融合タンパク質のいずれかを治療方法において使用してもよい。

40

【0226】

特定の実施形態において、処置方法における使用のための多特異性結合剤を提供する。そのような一実施形態において、方法はさらに、少なくとも1つの追加の治療薬剤の効果的な量を個体に投与することを含む（例、下に記載する通り）。上の実施形態のいずれかに従った「個体」は、好ましい一実施形態においてヒトである。

【0227】

特定の実施形態において、処置方法における使用のための多特異性結合剤を提供する。そのような一実施形態において、方法はさらに、少なくとも1つの追加の治療薬剤の効果的な量を個体に投与することを含む（例、下に記載する通り）。実施形態のいずれかに従

50

った「個体」は、好ましい一実施形態においてヒトである。

【0228】

本明細書において報告する抗体は、良好な医療行為と一致する様式において、製剤化、投薬、及び投与されうる。この文脈における考慮のための因子は、処置されている特定の障害、処置されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医療従事者に公知の他の因子を含む。多特異性結合剤は、問題の障害を防止又は処置するために現在使用される1つ又は複数の薬剤を用いて製剤化する必要はないが、しかし、場合により製剤化される。そのような他の薬剤の効果的な量は、製剤中に存在する多特異性結合剤の量、障害又は処置の型、及び上で考察する他の因子に依存する。これらは一般的に、本明細書において記載するのと同じ投与量で、及び投与経路を用いて、又は任意の投与量で、及び適当であると経験的/臨床的に決定される任意の経路により使用される。

10

【0229】

疾患の防止又は処置のために、本明細書において報告する多特異性結合剤の適当な投与量（単独で、あるいは1つ又は複数の他の追加の治療薬剤との組み合わせにおいて使用した場合）は、処置される疾患の型、多特異性結合剤の型、疾患の重症度及び経過（多特異性結合剤が予防的又は治療的な目的のために投与されるか否かにかかわらず）、過去の治療、患者の臨床歴及び多特異性結合剤への応答、ならびに主治医の判断に依存しうる。多特異性結合剤は、患者に1回で又は一連の処置にわたり適切に投与される。数日間又はそれより長い反復投与のために、状態に依存し、処置は一般的に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されうる。そのような用量は、間欠的に、例えば1週間毎又は3週間毎に投与してもよい（例、患者が、抗体の約2から約20又は、例えば6用量を受けようにする）。初回より高い負荷用量、それに続く1つ又は複数のより低い用量を投与してもよい。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより簡単にモニターされる。

20

【0230】

VII. 製造品

【0231】

本明細書において報告する別の態様において、上に記載する障害の処置、防止、及び/又は診断のために有用な物質を含む製造品を提供する。製造品は、容器及び容器上の又はそれに関連付けられるラベル又は添付文書を含む。適切な容器は、例えばボトル、バイアル、シリンジなどを含む。容器は、種々の材料（例えばガラス又はプラスチックなど）から形成されうる。容器は、それ自体で、あるいは状態を処置、防止、及び/又は診断するために効果的な別の製剤と組み合わせた製剤を保持し、無菌アクセスポートを有しうる（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針により貫通可能なストッパーを有するバイアルでありうる）。ラベル又は添付文書は、製剤が、選ばれた状態を処置するために使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）その中に製剤を含む第1の容器（製剤は、本明細書において報告する多特異性結合剤を含む）；及び（b）その中に製剤を含む第2の容器（製剤は、さらなる治療用剤を含む）を含みうる。本明細書において報告する本実施形態における製造品は、製剤が、特定の状態を処置するために使用することができることを示す添付文書をさらに含みうる。あるいは、又は加えて、製造品は、医薬的に許容可能な緩衝液、例えば注射用の静菌水（BWF I）又はリン酸緩衝生理食塩水などを含む第2（又は第3）の容器をさらに含みうる。それは、商業的な及び使用者の見地から望ましい他の材料（他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む）をさらに含みうる。

30

40

【0232】

VIII. 改変

【0233】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかに従った多特異性結合剤は、下のセクション1～5において記載するように、単独で又は組み合わせて、特徴のいずれかを組み入れてもよい：

50

【 0 2 3 4 】

1 . 抗体親和性

【 0 2 3 5 】

特定の実施形態において、本明細書において提供する多特異性結合剤は、その標的のいずれについて 100 nM (例、 10^{-7} M 又はそれ以下、例、 $10^{-7}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$) の平衡解離定数 (K_D) を有する。

【 0 2 3 6 】

一実施形態において、 K_D はBIACORE (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定する。例えば、BIACORE (登録商標) 2000又はBIACORE (登録商標) 3000 (GE Healthcare Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使用したアッセイを、 ~ 10 応答単位 (RU) で固定化抗原CM5チップを用いて25 で実施する。一実施形態において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5、BIAcore Inc.) を、供給業者の指示に従って、N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及びN - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いて活性化する。抗原を、流速 $5\ \mu\text{L}/\text{分}$ の注射前に、 10 mM 酢酸ナトリウム ($\text{pH } 4.8$) を用いて $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ($\sim 0.2\ \mu\text{M}$) まで希釈し、約 10 応答単位 (RU) の共役タンパク質を達成する。抗原の注射に続き、 1 M エタノールアミンを注射し、未反応基を遮断する。動態測定のために、Fabの2倍連続希釈物 ($0.78\text{ nM} \sim 500\text{ nM}$) を、PBS中で 0.05% ポリソルベート (TWEEN 20 (商標)) 界面活性剤 (PBST) を用いて、25 で、流速約 $25\ \mu\text{L}/\text{分}$ で注射する。会合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) を、簡単な1対1のラングミュア結合モデル (BIAcore (登録商標) Evaluation Softwareバージョン3.2) を使用して、会合及び解離センサーグラムを同時に適合させることにより算出する。平衡解離定数 (K_D) を比率 k_{off} / k_{on} として算出する (例、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881を参照のこと)。オン速度が上の表面プラズモン共鳴アッセイにより $10^6\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ を上回る場合、次にオン速度を、25 でPBS ($\text{pH } 7.2$) 中の 20 nM の抗抗原抗体 (Fab形態) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm ; 発光 = 340 nm 、 16 nm バンドパス) における増加又は減少を測定する蛍光クエンチング技術を、分光計 (例えばストップフロー装備分光光度計 (Aviv Instruments) 又は8000シリーズSLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (ThermoSpectronic) など) において攪拌キュベットを用いて測定される増加濃度の抗原の存在において使用することにより決定することができる。

【 0 2 3 7 】

2 . キメラ及びヒト化結合部位

【 0 2 3 8 】

特定の実施形態において、本明細書において提供する多特異性結合剤は、キメラ抗体又はヒト化抗体の抗体結合部位を含む。

【 0 2 3 9 】

特定のキメラ抗体が、例えば、US 4,816,567; 及びMorrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855において記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサルなどから由来する可変領域) 及びヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが、親抗体のものから変化されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

【 0 2 4 0 】

特定の実施形態において、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトへの免疫原性を低下させるためにヒト化される。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例、CDR (又はその部分) が非ヒト抗体から由来し、FR (又はその部分) がヒト抗体配列から由来する1つ又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は場合により、ヒト定常領域の少なくとも部分も含むであろう。一部の実施形態において、ヒト化抗体における一部のFR残基が、非ヒト抗体 (

例、HVR残基が由来する抗体)からの対応する残基で置換され、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善する。

【0241】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法が、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633において概説されており、例えば、Riechmann, I., et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 86 (1989) 10029-10033; US 5,821,337、US 7,527,791、US 6,982,321、及びUS 7,087,409; Kashmiri, S.V., et al., *Methods* 36 (2005) 25-34 (特異性決定領域(SDR)移植を記載); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (「リサーチフェシング」を記載); Dall'Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (「FRシャッフリング」を記載); Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68; 及びKlimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (FRシャッフリングへの「ガイド付き選択」アプローチを記載)においてさらに記載されている。

10

【0242】

ヒト化のために使用されうるヒトフレームワーク領域は、「ベストフィット」方法を使用して選択されるフレームワーク領域(例、Sims, M.J., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308を参照のこと); 軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列から由来するフレームワーク領域(例、Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及びPresta, L.G., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632を参照のこと); ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域(例、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633を参照のこと); 及びFRライブラリーのスクリーニングから由来するフレームワーク領域(例、Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684及びRosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618を参照のこと)を含むが、これらに限定しない。

20

【0243】

3. ヒト抗体結合部位

【0244】

特定の実施形態において、本明細書において提供する多特異性結合剤は、ヒト抗体の抗体結合部位を含む。

30

【0245】

ヒト抗体を、当技術分野において公知の種々の技術を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374及びLonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459において記載されている。

【0246】

ヒト抗体は、恐らくは、抗原攻撃に应答して、ヒト可変領域を伴うインタクトなヒト抗体又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することにより調製される。そのような動物は、典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は部分を含み、それらは、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換する、あるいは染色体外に存在する、又は動物の染色体中にランダムに組み込まれる。そのようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125を参照のこと。また、XENOMOUSE (商標) 技術を記載するUS 6,075,181及びUS 6,150,584; HUMAB (登録商標) 技術を記載するUS 5,770,429; K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載するUS 7,041,870、及びVELOCIMOUSE (登録商標) 技術を記載するUS 2007/0061900を参照のこと。そのような動物により生成されたインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と

40

50

組み合わせることによりさらに改変してもよい。

【0247】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法により作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス - ヒト異種骨髄腫細胞株が記載されている(例、Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; 及びBoerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95を参照のこと)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562に記載されている。追加の方法は、例えば、US 7,189,826 (ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する)及びNi, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (ヒト - ヒトハイブリドーマを記載する)において記載される方法を含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)がまた、Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937及びVollmers, H.P. and Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191に記載されている。

10

【0248】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーより選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することにより生成してもよい。そのような可変ドメイン配列を次に、所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーよりヒト抗体を選択するための技術を以下に記載する。

20

【0249】

4. ライブラリー由来の抗体結合部位

【0250】

本明細書において報告する多特異性結合剤は、所望の活性又は活性を伴う抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離された抗体の抗体結合部位を含みうる。

【0251】

例えば、種々の方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を保持する抗体について、そのようなライブラリーをスクリーニングするために、当技術分野において公知である。そのような方法は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al., *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37において概説されており、例えば、McCafferty, J. et al., *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. et al., *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; 及びLee, C.V. et al., *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132においてさらに記載されている。

30

【0252】

特定のファージディスプレイ方法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により別々にクローニングし、ファージライブラリーにおいてランダムに組み換え、それを次に、Winter, G., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455に記載されるように抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的には、一本鎖Fv(scFv)フラグメントとして又はFabフラグメントとして抗体フラグメントを呈示する。免疫化された供給源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構成する必要性を伴わず、免疫原に高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーを(例、ヒトから)クローニングし、Griffiths, A.D., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 725-734により記載されるように、任意の免疫化を伴わず、広範囲の非自己及びまた自己抗原に、抗体の単一供給源を提供することができる。最後に、天然ライ

40

50

ブラリーはまた、幹細胞から非再配列V遺伝子セグメントをクローニングし、高度可変CDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するためのランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより、Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 27 (1992) 381-388により記載されるように合成的に作製することができる。ヒト抗体ファミリーライブラリーを記載する特許公開は、例えば、US 5,750,373、及びUS 2005/0079574、US 2005/0119455、US 2005/0266000、US 2007/0117126、US 2007/0160598、US 2007/0237764、US 2007/0292936、及びUS 2009/0002360を含む。

【0253】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体フラグメントは、本明細書においてヒト抗体又はヒト抗体フラグメントと考えられる。

【0254】

5. 多特異性結合剤の変異体

【0255】

特定の実施形態において、本明細書において提供する多特異性結合剤のアミノ酸配列変異体が検討される。例えば、多特異性結合剤の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれうる。多特異性結合剤のアミノ酸配列変異体を、多特異性結合剤をコードするヌクレオチド配列中へ適当な改変を導入することにより、又はペプチド合成により調製してもよい。そのような改変は、例えば、多特異性結合剤のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又はその中への挿入、及び/又はその置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを作製し、最終的な構築物が所望の特性(例、抗原結合)を保持するという条件で、最終的な構築物に達することができる。

【0256】

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

【0257】

特定の実施形態において、1つ又は複数のアミノ酸置換を有する多特異性結合剤の変異体を提供する。置換変異誘発のための目的の部位は、HVR及びFRを含む。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下に以下の表に示す。より実質的な変化を、「例示的置換」の見出しの下に、以下の表中に提供し、アミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載する通りである。アミノ酸置換を目的の多特異性結合剤中に導入し、産物を、所望の活性(例、保持/改善された抗原結合、免疫原性の減少、又はADCCもしくはCDCの改善)についてスクリーニングしてもよい。

10

20

30

【表7】

表

本来の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

10

20

30

【0258】

アミノ酸を一般的な側鎖特性に従ってグループ化してもよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

【0259】

保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴いうる。

【0260】

置換変異体の1つの型は、親多特異性結合剤（例、ヒト化又はヒト抗体）の1つ又は複数の超可変領域の残基を置換することを含む。一般的には、さらなる試験のために選択された、結果として得られる変異体は、親多特異性結合剤と比べて、特定の生物学的特性（

50

例、親和性の増加、免疫原性の低下)における改変(例、改善)を有する、及び/又は、親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持する。例示的な置換変異体は、例えば、ファージディスプレイベースの親和性成熟技術(例えば、本明細書に記載されるものなど)を使用して便利に生成されうる親和性成熟された多特異性結合剤である。簡単には、1つ又は複数のHVR残基を変異させ、変異型多特異性結合剤をファージ上に呈示させ、特定の生物学的活性(例、結合親和性)についてスクリーニングする。

【0261】

変化(例、置換)は、例えば、多特異性結合剤の親和性を改善させるために、HVRにおいて作製してもよい。そのような変化は、HVR「ホットスポット」、即ち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で変異を受けるコドンによりコードされる残基(例、Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196を参照のこと)、及び/又は抗原に接触する残基において作製してもよく、結果として得られる変異体VHもしくはVLを結合親和性についてテストする。二次ライブラリーから構築し、それより再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al. in *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37において記載されている。親和性成熟の一部の実施形態において、多様性は、種々の方法(例、エラーブローンPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的変異誘発)のいずれかによる成熟のために選ばれた可変遺伝子中に導入される。二次ライブラリーを次に作る。このライブラリーを次にスクリーニングし、所望の親和性を伴う任意の多特異性結合剤の変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、HVR特異的アプローチを含み、それにおいて、いくつかのHVR残基(例、一度に4~6残基)がランダム化される。抗原結合に含まれるHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して特異的に同定されうる。特にCDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的化される。

【0262】

特定の実施形態において、置換、挿入、又は欠失は、そのような変化によって抗原に結合する多特異性結合剤の能力が実質的に低下しない限り、1つ又は複数のHVR内で生じうる。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的变化(例、本明細書において提供する保存的置換)をHVR中に作製してもよい。そのような変化は、例えば、HVR中の抗原接触残基の外でありうる。上に提供する変異体VH及びVL配列の特定の実施形態において、各々のHVRのいずれかが変化されない、あるいは、1つ、2つ、又は3つ未満のアミノ酸置換を含む。

【0263】

変異誘発のために標的化されうる多特異性結合剤の残基又は領域の同定のための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれ、Cunningham, B.C. and Wells, J. A., *Science* 244 (1989) 1081-1085により記載される通りである。この方法において、残基又は標的残基の群(例、荷電残基、例えばarg、asp、his、lys、及びgluなど)を同定し、中性又は負に荷電したアミノ酸(例、アラニン又はポリアラニン)により置換され、多特異性結合剤と抗原との相互作用が影響されているか否かを決定する。さらなる置換をアミノ酸位置に導入し、初期置換への機能的感受性を実証してもよい。あるいは、又は加えて、多特異性結合剤と抗原の間での接触点を同定するための抗原-多特異性結合剤複合体の結晶構造を使用することができる。そのような接触残基及び隣接残基は、置換のための候補として標的化又は除去してもよい。変異体をスクリーニングし、それらが所望の特性を含むか否かを決定してもよい。

【0264】

アミノ酸配列の挿入は、1つの残基から100又はそれ以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ及び/又はカルボキシ末端融合体、ならびに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を伴う多特異性結合剤を含む。多特異性結合剤分子の他の挿入変異体は、酵素(例、ADEPT用)又はポリペプチドへの多特異性結合剤のN又はC末端への融合体を含む。

【0265】

以下の実施例、配列、及び図面を提供し、本発明の理解を助け、その真の範囲を添付の特許請求の範囲において示す。本発明の精神から逸脱することなく、示した手順において改変を作製することができることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0266】

【図1】眼の異なる区画における異なる構築物の半減期；1：FAB-PEG、2：FAB-HBD、3：FAB、4：FAB-COLL-I、5：FAB-COLL-II、6：FAB-COLL-III；上のバー：硝子体、中のバー：網膜、下のバー：脈絡膜。

【図2】異なる構築物への眼の異なる区画（組織）の曝露；1：FAB-COLL-I、2：FAB-COLL-II、3：FAB-COLL-III、4：FAB、5：FAB-HBD、6：FAB-PEG。左のバー：硝子体、中のバー：網膜、右のバー：脈絡膜。

10

【0267】

材料及び方法

【0268】

組換えDNA技術

【0269】

標準的方法を使用し、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載される通りにDNAを操作した。分子生物学的試薬を、製造業者の指示に従って使用した。

20

【0270】

遺伝子合成

【0271】

所望の遺伝子セグメントを、Geneart（ドイツ、レーゲンスブルク）での所与の仕様に従って順序付けた。

【0272】

DNA配列決定

【0273】

DNA配列は、MediGenomix GmbH（ドイツ、マルティンスリート）又はSequiserve GmbH（ドイツ、ファーターシュテッテン）で実施した二本鎖配列決定により決定した。

30

【0274】

DNA及びタンパク質の配列分析ならびに配列データ管理

【0275】

GCG（Genetics Computer Group, ウィスコンシン州マディソン）のソフトウェアパッケージバージョン10.2及びInfomaxのVector NT1 Advance suite version 8.0を、配列の作成、マッピング、分析、注釈、及び例証のために使用した。

【0276】

発現ベクター

【0277】

記載する抗体の発現のために、CMV-イントロンAプロモーターを伴う又は伴わないcDNA組織化あるいはCMVプロモーターを伴うゲノム組織化のいずれかに基づく一過性発現（例、HEK293-Fにおける）用の発現プラスミドを使用した。

40

【0278】

抗体遺伝子の転写単位を以下のエレメントで構成した：

- 5'末端での固有の制限部位、
- ヒトサイトメガロウイルスからの前初期エンハンサー及びプロモーター、
- cDNA組織化の場合におけるイントロンA配列、
- ヒト免疫グロブリン遺伝子の5'非翻訳領域、
- 免疫グロブリン重鎖シグナル配列をコードする核酸、

50

- cDNAとしての又は免疫グロブリンエクソン - イントロン組織化を伴うゲノム組織化におけるヒト抗体鎖（野生型又はドメイン交換を伴う）をコードする核酸、
- ポリアデニル化シグナル配列を伴う3'非翻訳領域、及び
- 3'末端での固有の制限部位。

【0279】

抗体発現カセットの他に、ベクターは以下を含んだ：

- 大腸菌においてこのプラスミドの複製を可能にする複製の起点、
- 大腸菌においてアンピシリン耐性を付与するラクタマーゼ遺伝子、及び
- 真核細胞における選択可能なマーカーとしての、ハツカネズミからのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子。

10

【0280】

抗体鎖をコードする核酸を、PCR及び/又は遺伝子合成により生成し、一致した核酸セグメントの接続による（例、それぞれのベクターにおいて固有の制限部位を使用）公知の組換え方法及び技術により組み立てた。サブクローン化した核酸配列をDNA配列決定により検証した。一過性トランスフェクションのために、より多量のプラスミドを、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り調製した。

【0281】

細胞培養技術

【0282】

標準的な細胞培養技術を、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.において記載される通りに使用した。

20

【0283】

二特異性抗体は、下に記載する通り、懸濁液中で成長するHEK293-F細胞中でのそれぞれの発現プラスミドの一過性同時トランスフェクションにより発現させた。

【0284】

実施例1

【0285】

発現及び精製

30

【0286】

HEK293-Fシステムにおける一過性トランスフェクション

【0287】

融合構築物を、製造者の指示に従ってHEK293-Fシステム（Invitrogen）を使用し、それぞれのプラスミドを用いた一過性トランスフェクションにより作製した。簡単には、振盪フラスコ中又は攪拌発酵槽中のいずれかで、無血清FreeStyle（商標）293発現培地（Invitrogen）中で、懸濁液中で成長するHEK293-F細胞（Invitrogen）を、それぞれの発現プラスミド及び293フェクチン（商標）又はフェクチン（Invitrogen）の混合物を用いてトランスフェクトした。2L振盪フラスコ（Corning）について、HEK293-F細胞を、600ml中に 1×10^6 個細胞/mLの密度で播種し、120rpm、8%CO₂でインキュベートした。翌日、細胞を、A)重鎖又は改変重鎖、及び等モル比の対応する軽鎖をそれぞれコードする600µgの全プラスミドDNA（1µg/ml）を伴う20mLのOpti-MEM（Invitrogen）ならびにB)20mlのOpti-MEM + 1.2mLの293フェクチン又はフェクチン（2µL/mL）の約4.2mL混合物を用いて、約 1.5×10^6 個細胞/mLの細胞密度でトランスフェクトした。グルコース消費量に従い、グルコース溶液を、発酵の過程の間に加えた。分泌された抗体を含む上清を5~10日後に収集し、抗体を上清から直接精製した、又は上清を凍結及び保存した。

40

【0288】

精製

【0289】

50

ポリペプチド含有培養上清を濾過し、2つのクロマトグラフィー工程により精製した。抗体を、PBS (1mM KH_2PO_4 、10mM Na_2HPO_4 、137mM NaCl 、2.7mM KCl)、pH 7.4を用いて平衡化したHiTrap KappaSelect (GE Healthcare)を使用した親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。未結合タンパク質を、平衡緩衝液を用いて洗浄することにより除去し、融合ポリペプチドを、100mMクエン酸緩衝液、pH 2.9を用いて回収し、溶出直後に1Mトリス塩基、pH 9.0を用いてpH 6.0に中和した。HiLoad 26/60 Superdex 75 (商標) (GE Healthcare)でのサイズ排除クロマトグラフィーを第2の精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーを、20mMヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl 、pH 6.0中で実施した。ポリペプチド含有溶液を、Biomax-SKメンブレン (Millipore、マサチューセッツ州ビレリカ)を備えたUltra free-CL遠心フィルターユニットを用いて濃縮し、-80 で保存した。

10

【0290】

ポリペプチドのタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を使用し、280nmで光学密度(O.D.)を測定することにより決定した。

【0291】

ポリペプチド分子の純度及び完全性を、Protein Express Chip及びHT Protein Express Reagents Kitを伴うLabChip GX II (PerkinElmer)を使用してCE-SDSにより分析した。

【0292】

凝集物含量を、泳動緩衝液として200mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、250mM KCl 、pH 7.0を使用したBiosuite High Resolution SEC、250A、5 μm 分析サイズ排除カラム (Waters GmbH)を使用した高性能SECにより決定した。

20

【0293】

還元ポリペプチドのアミノ酸骨格の完全性を、ノイラミニダーゼ、O-グリカナーゼ、及びペプチド-N-グリコシダーゼF (Roche Applied Science)の組み合わせを用いた酵素処理によるN-グリカンの除去後に、Nano Electrospray QTOF質量分析により検証した。

【0294】

実施例2

【0295】

ヒト及びブタコラーゲンIIへの結合

30

【0296】

ヒトII型コラーゲン (Millipore CC052) 及びブタII型コラーゲン (USBiological C7510-31) への抗コラーゲン抗体の結合動態を、BIAcore T200機器 (GE Healthcare)を使用し、表面プラズモン共鳴により調べた。全ての実験を、泳動緩衝液及び希釈緩衝液としてHBS-P (10mM His 、140mM NaCl 、0.05% Tween 20 pH 7.4)を使用し、25 で実施した。II型コラーゲンを、標準アミンカップリング化学を使用し、Series S CM5センサーチップ (GE Healthcare)上に固定化した。抗コラーゲン抗体を、表面上に1.23~900nM (1:3希釈系列)の濃度で180秒間にわたり注入した (会合相)。解離相を、泳動緩衝液を用いて洗浄することにより600秒間にわたりモニターした。表面を、0.85% H_3PO_4 を60秒間にわたり注入することにより再生した。バルク屈折率差を、模擬表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注射を差し引いた (二重参照)。得られた曲線を、BIA評価ソフトウェアを使用して1:1ラングミュア結合モデルに適合させた。

40

【0297】

実施例3

【0298】

ミニブタ薬物動態試験

【0299】

雌ミニブタ (各々7~8kg)に、IVT注射により1.25nmolの各々の薬物を投与し

50

た。目的の初期濃度は、各々の分子について眼中で500nMであった。硝子体、網膜、及び脈絡膜のサンプルを適用後の3つの終了時点(168、336、及び672時間)で回収した。

【0300】

実施例4

【0301】

薬物動態学的パラメータの決定

【0302】

ミニブタの血清、房水、硝子体液、及び眼組織(網膜、脈絡膜、強膜、虹彩、水晶体、毛様体)を、エレクシス装置(Roche Diagnostics GmbH)を使用したECLIA法を用いて分析した。

10

【0303】

簡単には、試験サンプル(キャリブレータ、品質管理、又は試験サンプル)、第一検出抗体mAb<H-Fab(カッパ)>M-1.7.10-IgG-Bi、第二検出抗体mAb<H-Fab(CH1)>M-1.19.31-IgG-Ru、及びSA-ビーズを検出容器に段階的に加え、各々の工程で9分間にわたりインキュベートする。最後に、SA-ビーズ結合複合体を測定セルにより検出し、これによって反復するSA-ビーズのカウントに番号が付けられる。カウントは試験サンプル中の分析物濃度に比例する。

Bi = ビオチン、Ru = ルテニウム標識、SA = ストレプトアビジン

【0304】

20

分析前に、硝子体液及び眼組織サンプルを、Magana Lyser Homogenisator (Roche Diagnostics GmbH) を使用してプロテアーゼ阻害剤を含む組織抽出緩衝液(10mM Tris、137mM NaCl、1% Triton、10%グリセリン)中で機械的に溶解した。

【0305】

3つのコラーゲン結合剤共役物FAB-COLL-I、-II、及び-IIIについてのアッセイ較正範囲は、4.92ng/mL~3000ng/mL(アッセイ濃度)の間であった。

【0306】

血清サンプルを1:10~1:20に希釈して有効な結果を得た。標準曲線、品質管理、及びサンプル希釈を、ミニブタ血清を含むアッセイ緩衝液中で行い、10%のマトリックス濃度をもたらした。49.2ng/mL未満の実験用血清サンプルに「BLQ」と注釈を付けた。

30

【0307】

房水、硝子体液、及び眼組織サンプルを希釈せずに測定し、1:50まで希釈して有効な結果を得た。標準曲線、品質管理、及びサンプル希釈を、マトリックスを伴わないアッセイ緩衝液中で行った。4.92ng/mL未満の実験的房水、硝子体液、及び眼組織サンプルに「BLQ」と注釈を付けた。

【0308】

実施例5

【0309】

拡散パラメータの決定

40

【0310】

試験溶液(ミニブタの硝子体液)を-80で保存した。

【0311】

Dig-3-cme-eda-Cy5をDMF中に溶解し、30%DMF/希釈緩衝液中で1mM Dig-Cy5に調整した。作業用ストックを、PBS/0.2%BSA/1.5%DMF中の50µMのDig-Cy5溶液として調製した。PBSをpH7.3~7.5で、LONZA(#17-516F)で購入し、0.2%BSAを添加した(画分V)。測定を384ウェルガラスボトムアッセイプレート(MMI、#60200)中で行う。

【0312】

50

1つのサンプルを氷上で解凍した。液体は高度に粘性があり、透明である。サンプルを、短く切った1000 μLチップを用いて慎重に10回上下にピペティングした。それは穏やかに泡立つ。100 μLのアリコート（短く切った200 μLチップを使用）をドライアイス上で凍結させ、-80 で保存する。

【0313】

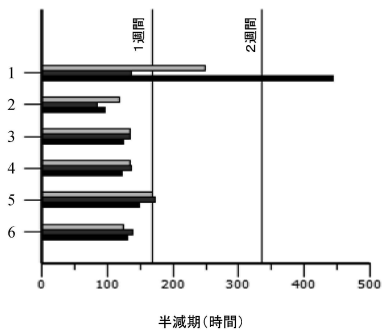
他のサンプルを同様に解凍し液化した。3つ全てのサンプルのバルク量をプールし、分注し、サンプル名「all」で、-80 で保存する。一部の本来のアリコートを参照サンプルとして保存する。

【0314】

FCS測定は、C-Apochromat 40x N. 1.2水浸レンズ（Carl Zeiss、ドイツ、イエナ）を備えたAxiovert 100Mに接続したConfoCor 2 FCSユニットを用いて実施した。この装置では、Cy 5を633ヘリウム - ネオンレーザーで励起した。Cy 5により放出された赤色蛍光を、LP 650ロングパスフィルターを用いて検出した。測定を、典型的には、10秒間に10回の取得設定で実施した。蛍光変動は、適当な適合形式と自己相関した。データ分析によって、均質溶液中の蛍光粒子の輝度、挙動、及び拡散時間を決定することが可能になる。

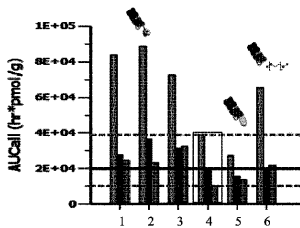
10

【図1】



【図2】

Figure 2



【配列表】

0006921943000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 コベツキー, エアハルト
ドイツ国、68305 マンハイム、ザントホーファー・シュトラッセ 116、ツェーノオー・
ロシュ・ダイアグノスティックス・ゲーエムベーハー

審査官 大西 隆史

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0220634 (US, A1)
国際公開第2015/108998 (WO, A1)
特表2013-542722 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 51/12

A61P 1/00 - 43/00

C07K 1/00 - 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)