

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-520168

(P2015-520168A)

(43) 公表日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00	C 4B064
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00	ZNA 4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C085
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く

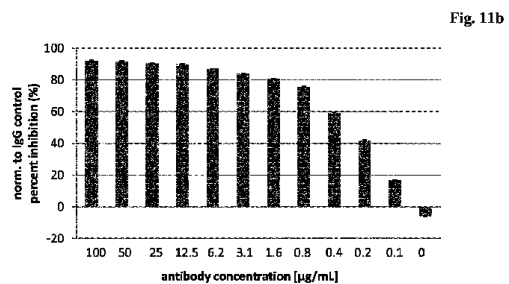
(21) 出願番号 特願2015-513157 (P2015-513157)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月22日 (2013. 5. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月14日 (2015. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/060529
 (87) 国際公開番号 W02013/174873
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 12169340.2
 (32) 優先日 平成24年5月24日 (2012. 5. 24)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 306021192
 エフ・ホフマン-ラ・ロシュ・アクチュエン
 ゲゼルシャフト
 スイス、ツェハー-4070バーゼル、グ
 レンツァッハーシュトラッセ124番
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 カストルディ, ラファエラ
 ドイツ国 81477 ミュンヘン, シ
 ュスターシュトラッセ 41
 (72) 発明者 ハース, アレクサンダー
 ドイツ国 82362 ヴァイルハイム,
 シュターレンヴェーク 4
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重特異性抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒトHER1、ヒトHER2、及びヒトHER3に結合する、二価、多重特異性抗体、特に二価、三重特異性抗体、及びそれらの製造及び使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含み、

抗体は二価、三重又は四重特異性抗体である、多重特異性抗体。

【請求項 2】

抗体は三重特異性抗体であり、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 3】

A) のもとで、第一抗原はヒト H E R 1、第二抗原はヒト H E R 3 及び第三抗原はヒト H E R 2 であり；又は

B) のもとで、第一抗原はヒト H E R 2、第二抗原はヒト H E R 1 及び第三抗原はヒト H E R 3 である、請求項 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 4】

抗体は二価、三重特異性抗体であり、

a) ヒト H E R 1 及びヒト H E R 3 に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、ヒト H E R 2 に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含む請求項 1 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 5】

抗体は、配列番号 4、9、13 及び 18 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 6】

A) のもとで、第一抗原はヒト H E R 1、第二抗原はヒト H E R 3 及び第三抗原はヒト c M E T であり；又は

B) のもとで、第一抗原はヒト c M E T、第二抗原はヒト H E R 1 及び第三抗原はヒト

10

20

30

40

50

HER3である、請求項3に記載の多重特異性抗体。

【請求項7】

抗体は四重特異性抗体であり、

a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含むことを特徴とする、請求項1に記載の多重特異性抗体。

【請求項8】

b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており；及び定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、請求項1から4、6及び7の何れか一項に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項9】

b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインVL及びVH(のみ)が互いに置換されている、請求項1から4、6及び7の何れか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項10】

b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、定常ドメインCL及びCH1(のみ)が互いに置換されている、請求項1から4、6及び7の何れか一項に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項11】

a)の完全長抗体の重鎖のCH3ドメイン及びb)の完全長抗体の修飾された重鎖のCH3ドメインの各々は抗体のCH3ドメイン間の元のインターフェイスを含むインターフェイス接触することを特徴とし；

前記インターフェイスは三重特異性又は四重特異性抗体の形成を促進するように改変され、その改変は：

i) 三重又は四重特異性抗体内の他の重鎖のCH3ドメインの元のインターフェイスで接触する一重鎖のCH3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、他の重鎖のCH3ドメインのインターフェイス内のキャビティの中に置くことができる、一重鎖のCH3ドメインのインターフェイス内の隆起を作成するように一重鎖のCH3ドメインが改変され、

30

及び

ii) 三重又は四重特異性抗体内の第一CH3ドメインの元のインターフェイスで接触する第二CH3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、その中に第一CH3ドメインのインターフェイス内の隆起を置くことができる、第二CH3ドメインのインターフェイス内のキャビティを作成するように他の重鎖のCH3ドメインが改変されることを特徴とする

請求項1から10の何れか一項に記載の多重特異性抗体。

40

【請求項12】

より大きな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)からなる群から選択され、及びより小さな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)からなる群から選択されることを特徴とする、請求項11に記載の多重特異性抗体。

【請求項13】

両方のCH3ドメインの間にジスルフィド架橋を形成することができるように、各CH3ドメインの対応する位置のアミノ酸としてシステイン(C)を導入することにより、両方のCH3ドメインが更に改変されることを特徴とする、請求項11又は12に記載の多

50

重特異性抗体。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 に記載の多重特異性抗体の調製のための方法であって、

a)

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V_L 及び V_H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C_L 及び C_H1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V_L 及び V_H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C_L 及び C_H1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V_L 及び V_H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C_L 及び C_H1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖をコードする核酸分子を含むベクターで宿主細胞を形質転換する工程；

b) 前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程；及び

c) 前記培養物から前記抗体分子を回収する工程

を含む方法。

【請求項 15】

請求項 1 から 13 に記載の多重特異性抗原結合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 16】

請求項 1 から 13 に記載の多重特異性抗原結合タンパク質をコードする核酸を含むベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 1 から 13 に記載の抗体の組成物、好ましくは薬学的又は診断用組成物。

【請求項 19】

請求項 1 から 13 に記載の抗体及び少なくとも一の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物。

【請求項 20】

癌の治療における使用のための、請求項 1 から 13 の何れか一に記載の抗体。

【請求項 21】

癌の治療のための医薬の製造のための、請求項 1 から 13 の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 22】

請求項 1 から 13 に記載の抗体の治療的有効量を患者に投与することを特徴とする、治療を必要とする患者の治療のための方法。

【請求項 23】

請求項 1 から 13 に記載の抗体の治療的有効量を患者に投与することを特徴とする、癌に罹患した患者の治療のための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、ヒトHER1、ヒトHER2、及びヒトHER3に結合する、新規な二価、多重特異性抗体、特に三重又は四重特異性抗体、特に二価、三重特異性抗体及びそれらの製造及び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

二つの異なる抗原に結合することができる二重特異性抗体などの操作されたタンパク質は、当該分野で公知である。そのような二重特異性結合タンパク質は、細胞融合、化学的接合、又は組換えDNA技術を用いて生成することができる。

【0003】

組換え二重特異性抗体の様々なフォーマット、例えばの融合による四価二重特異性抗体、例えばIgG抗体フォーマット及び一本鎖ドメインの融合による四価二重特異性抗体が最近開発されている(例えば、Coloma, M.J., et al., Nature Biotech. 15 (1997) 159-163; 国際公開第2001/077342号; 及びMorrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234を参照)。

【0004】

また、抗体のコア構造(IgA、IgD、IgE、IgG又はIgM)はもはや保持されない、二以上抗原に結合することが可能である、他の幾つかの新しいフォーマット、例えば、ダイアボディ、トリアボディ又はテトラボディ、ミニボディ、幾つかの一本鎖フォーマット(scFv、Bis-scFv)などが開発されている(Holliger, P., et al., Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., and Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

【0005】

全てのそのようなフォーマットは、抗体コア(IgA、IgD、IgE、IgG又はIgM)を更なる結合タンパク質(例えば、scFv)に融合させるか、又は例えば2つのFab断片又はscFvを融合させるか何れかのためにリンカーを使用する(Fischer, N., and Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。リンカーが二重特異性抗体の操作のための利点があることは明らかであるが、それらはまた、治療設定において問題を生じる場合がある。実際に、これらの外来ペプチドはリンカーそれ自体、又はタンパク質とリンカーとの間の接合部に対して免疫応答を誘発するかもしれない。更に、これらのペプチドの柔軟な性質は、それらのタンパク質分解切断をより受けやすくし、潜在的に抗体安定性の悪化、凝集及び免疫原性の増加につながる。更に、天然に生じる抗体に対して高度の類似性を維持することによってFc-部分を介して媒介される、例えば補体依存性細胞傷害(CDC)又は抗体依存性細胞傷害(ADCC)などのエフェクター機能を保持することを望む場合もある。

【0006】

従って、理想的には、ヒト配列からの偏差が最小であって、天然に生じる抗体(IgA、IgD、IgE、IgG又はIgMなど)に対して一般的な構造が非常に似ている二重特異性抗体の開発を目指すべきである。

【0007】

国際公開第2009/080251号、国際公開第2009/080252号、国際公開第2009/080253号、国際公開第2009/080254号及びSchaefer, et al., PNAS 108 (2011) 11187-11192は、二重特異性二価抗体に関する。

【0008】

国際公開第2008/027236号; 国際公開第2010/108127号及びBostrom, J., et al., Science 323 (2009) 1610-1614は、二重特異性を導入する可変重鎖及び軽鎖ドメインのVH及びVLを多様化する方法に関する。国際公開第2010/136172号は、三価又は四価であるが三重又は四重特異性抗体に関し、国際公開第2007/146959号はパン(pan)細胞表面受容体特異的治療薬に関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

この技術は、I g G 様構造及び I g G 様分子量を有し、3つ又は4つ抗原に対する、組換え、多重特異性抗体を容易に開発するための基礎として適切ではない。これまでのところ、さらに融合した結合ドメインを持たず、天然に生じる二価抗体に類似する構造を持つ、二価、三重又は四重特異性抗体を生成することは不可能であった。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び
b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

10

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び
b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び
b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

20

を含む、多重特異性抗体に関する。

【 0 0 1 1 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、抗体は二価、三重又は四重特異性抗体であることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、抗体は三重特異性抗体であり、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び
b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

30

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び
b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、

A) のもとで、第一抗原はヒト H E R 1、第二抗原はヒト H E R 3 及び第三抗原はヒト H E R 2 であり ; 又は

B) のもとで、第一抗原はヒト H E R 2、第二抗原はヒト H E R 1 及び第三抗原はヒト H E R 3 であることを特徴とする。

40

【 0 0 1 4 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、

A) のもとで、第一抗原はヒト H E R 1、第二抗原はヒト H E R 3 及び第三抗原はヒト c M E T であり ; 又は

B) のもとで、第一抗原はヒト c M E T、第二抗原はヒト H E R 1 及び第三抗原はヒト H E R 3 であることを特徴とする。

50

【 0 0 1 5 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、抗体は四重特異性抗体であり、
 a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメインV L及びV Hは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインC L
 及びC H 1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗
 体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖
 を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 6 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された
 重鎖において、可変ドメインV L及びV Hは互いに置換されており；及び定常ドメインC
 L及びC H 1は互いに置換されていることを特徴とする。

10

【 0 0 1 7 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された
 重鎖において、可変ドメインV L及びV H(のみ)が互いに置換されていることを特徴と
 する。

【 0 0 1 8 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された
 重鎖において、定常ドメインC L及びC H 1(のみ)が互いに置換されていることを特徴
 とする。

【 0 0 1 9 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、
 a)の完全長抗体の重鎖のC H 3ドメイン及びb)の完全長抗体の修飾された重鎖のC
 H 3ドメインの各々は抗体のC H 3ドメイン間の元のインターフェイスを含むインターフ
 ェイスで接触することを特徴とし；

20

前記インターフェイスは三重特異性又は四重特異性抗体の形成を促進するように改変さ
 れ、その改変は

i) 三重又は四重特異性抗体内の他の重鎖のC H 3ドメインの元のインターフェイスで
 接触する一重鎖のC H 3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによっ
 て、他の重鎖のC H 3ドメインのインターフェイス内のキャピティの中に置くことができ
 る、一重鎖のC H 3ドメインのインターフェイス内の隆起を作成するように一重鎖のC H
 3ドメインが改変され、

30

及び

i i) 三重又は四重特異性抗体内の第一C H 3ドメインの元のインターフェイスで接触
 する第二C H 3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによ
 って、その中に第一C H 3ドメインのインターフェイス内の隆起を置くことができる、第
 二C H 3ドメインのインターフェイス内のキャピティを作成するように他の重鎖のC H 3
 ドメインが改変されることを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、
 より大きな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニ
 ン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)からなる群から選択され、及びより小
 さな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン
 (T)、バリン(V)からなる群から選択されることを特徴とする。

40

【 0 0 2 1 】

一実施態様において、多重特異性抗体は、両方のC H 3ドメインの間にジスルフィド架
 橋を形成することができるように、各C H 3ドメインの対応する位置のアミノ酸としてシ
 ス테인(C)を導入することにより、両方のC H 3ドメインが更に改変されることを特
 徴とする。

50

【 0 0 2 2 】

本発明の更なる実施態様は、

a)

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターで宿主細胞を形質転換する工程 ;

b) 前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程 ; 及び

c) 前記培養物から前記抗体分子を回収する工程

を含む、本発明の多重特異性抗体を調製するための方法である。

10

20

【 0 0 2 3 】

本発明は更に、本発明の多重特異抗原結合タンパク質をコードする核酸を更に含む。

【 0 0 2 4 】

本発明は更に、本発明の多重特異抗原結合タンパク質をコードする核酸を含むベクターを更に含む。

【 0 0 2 5 】

本発明の更なる態様は、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖 ;

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖 ; 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞である。

30

40

【 0 0 2 6 】

本発明の更なる実施態様は、本発明の抗体の組成物、好ましくは本発明の抗体の薬学的組成物又は診断用組成物である。

【 0 0 2 7 】

本発明の更なる実施態様は、本発明の抗体及び少なくとも一の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物である。

【 0 0 2 8 】

50

本発明の更なる実施態様は、患者に本発明による抗体の治療的有効量を投与することを特徴とする、治療を必要とする患者の治療方法である。

【0029】

I g G様構造及びI g G様分子量を有する3つ又は4つの抗原に対する多特異性抗体が提供されるのはこれが初めてである。

【0030】

本発明によれば、所望されない副生成物と比較して、所望の多重特異性抗体の比率は、2つの完全長抗体アームの重鎖及び軽鎖の一对(HC/LC)のみにおける特定のドメインの置換(例えばVHドメイン及びVLドメインの置換/交換、又はCH1ドメイン及びCLドメインの置換/交換;又はVH及びCH1ドメインとVH及びVLドメインの両方の置換/交換)によって改善することができる。この方法では、生成物による所望されない機能不全につながる間違っただ重鎖との軽鎖の望ましくない誤対合(VH¹とVH²及び/又はVH²とVH¹の誤対合)は減少させることができる(図3参照)。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】可変及び定常ドメインを典型的な順序で含む重鎖及び軽鎖の2つの対により第一抗原1に特異的に結合する、CH4ドメインを持たない完全長抗体の模式構造。

【図2 a - d】軽鎖と重鎖の誤対合を防ぐための、完全長抗体軽鎖/重鎖のVL/VHドメイン及び/又はCL/CHドメインの置換により特徴づけられる、(CH3ドメインの更なるノブ・イントゥー・ホール(knob into hole)修飾を含まない又は含む)本発明による異なる三重又は四重特異性抗体の模式構造。図2 a: a)第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖(例えば、多様化したVH¹とVL¹を含む);及び b)定常ドメインCL及びCH1はお互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖(VH²とVL²を含む)を含む三重特異性抗体。図2 b: a)第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖(例えば、多様化したVH¹とVL¹を含む);及び b)可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖(VH²とVL²を含む)を含み、例示的なCH3修飾(「ノブ・イントゥー・ホール」)を両方の重鎖に含む三重特異性抗体。図2 c: a)第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖(VH¹とVL¹を含む);及び b)可変ドメインVL及びVHはお互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖(多様化したVH²とVL²を含む)を含み、例示的なCH3修飾(「ノブ・イントゥー・ホール」)を両方の重鎖に含む三重特異性抗体。図2 d: a)第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖(例えば、多様化したVH¹とVL¹を含む);及び b)可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖(例えば、多様化したVH²とVL²を含む)、を含む四重特異性抗体。

20

30

【図3】A:デュアル親和性の模式的概要-cross mabの原理。一のFabアーム上で一つの抗原を認識する重鎖、軽鎖の組合せのために、クロスオーバー技術が使用された。B:一のFabアーム上で二つの抗原を認識する重鎖、軽鎖の組合せのために、クロスオーバー技術が使用された。ジスルフィド安定化を含むノブ・イントゥー・ホールの技術(重鎖1:S354C、T366W、重鎖2:T366S、L368A、Y407V、Y349C)がどちらかの組合せのために使用することができる。

40

【図4】軽鎖と重鎖の誤対合(誤対合されたVH¹とVH²及び/又はVH²とVH¹を生じる)に起因する所望されない機能不全副生成物の模式的構造

【図5】A:重鎖コンストラクトのクローニングのために使用される真核細胞発現ベクターの模式図。B:軽鎖コンストラクトのクローニングのために使用される真核細胞ベクターの模式図。

50

【図6】A：VEGF-Her2-DAFの試験発現の分析用HPLCの結果プロテインA免疫沈降物質の生物学的反復1（A、C、E）及び生物学的反復2（B、D、F）（K：H＝トランスフェクトされたプラスミドのノブのホールに対する比率）。B：VEGF-Her2-DAFの発現のSDS-PAGE。2つの等価なサンプルはプロテインA免疫沈降物質の技術的反復の分析を表す（NR、非還元条件；赤、還元条件）。C：分析用HPLCにおいて溶出時間とサイズの相関を示すマーカータンパク質。

【図7】A：VEGF-Her2-DAF-xAng2の試験発現の分析用HPLCの結果プロテインA免疫沈降物質の生物学的反復1（A、C、E）及び生物学的反復2（B、D、F）（K：H＝トランスフェクトされたプラスミドのノブのホールに対する比率）。B：VEGF-Her2-DAF-xAng2の発現のSDS-PAGE。2つの等価なサンプルはプロテインA免疫沈降物質の技術的反復の分析を表す（NR、非還元条件；赤、還元条件）。

【図8】A：VEGF-Her2-DAF-xHer1-Her3DAFの試験発現の分析用HPLCの結果（A、B）生物学的反復1及び2B：VEGF-Her2-DAF-xHer1-Her3DAFの発現のSDS-PAGE。（A、B）はAに示された分析用HPLCの反復分析である。

【図9】KiH Her1-Her3DAF-xHer2発現のSDS-PAGE（NR、非還元条件；赤、還元条件）。

【図10】三重特異性抗体KiH Her1-Her3DAF-xHer2による増殖アッセイ。（A）A431は、三重特異性抗体又はコントロールIgG抗体の30µg/mlとインキュベートした。抗体の添加後の5日後に、ATP放出アッセイを実施した（Cell Titer Glow, Promega）。（B）A431は、示された抗体の30µg/mlとインキュベートした。抗体の添加後の5日後に、ATP放出アッセイを実施した（Cell Titer Glow, Promega）。

【図11】三重特異性抗体KiH Her1-Her3DAF-xHer2による増殖アッセイ。MDA-MB-175VII細胞は、三重特異性抗体KiH Her1-Her3DAF-xHer2又はコントロールIgG抗体の希釈系列でインキュベートした。抗体の添加後の5日後に、ATP放出アッセイを実施した（Cell Titer Glow, Promega）。

【図12】KiH Her1-Her3DAF-xHer2又はそれぞれの親抗体の結合反応速度論。（A、B、C）1回目と2回目の注入は、ErbB受容体外部ドメインの追加の順序を示す。

【図13】A431類表皮癌細胞における三重特異性Her1-HER3DAF-xHer2抗体によるADCCの誘導。単一パネルの画像幅は170.83µmである。上段はCMFDA標識腫瘍細胞に対応する（通常は緑チャンネルに表示される）。下段はPKH26標識ナチュラルキラー細胞に対応する（通常は赤チャンネルに表示される）。

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
b) 可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
b) 可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインV_L及びV_Hは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインC_L及びC_H1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖を含む、多重特異性抗体に関する。

【0033】

一実施態様において、多重特異性抗体は、抗体は三重特異性抗体であり、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインV_L及びV_Hは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインC_L及びC_H1は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインV_L及びV_Hは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインC_L及びC_H1は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖を含むことを特徴とする。

10

【0034】

一実施態様において、多重特異性抗体は、抗体は四重特異性抗体であり、

a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインV_L及びV_Hは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインC_L及びC_H1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖を含むことを特徴とする。

20

【0035】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインV_L及びV_Hは互いに置換されており；及び定常ドメインC_L及びC_H1は互いに置換されていることを特徴とする。

【0036】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインV_L及びV_H(のみ)が互いに置換されていることを特徴とする。

30

【0037】

一実施態様において、多重特異性抗体は、b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、定常ドメインC_L及びC_H1(のみ)が互いに置換されていることを特徴とする。

【0038】

本発明によれば、所望されない副生成物(他の抗原に特異的に結合する抗体の「誤った」重鎖と軽鎖の誤対合に起因する(図3参照))に比べて所望される多重特異性抗体の比率は、重鎖及び軽鎖の対(HC/LC)のみにおいて特定のドメインを置換することによって改善することができる。2つの完全長HC/LCの対の第一は、基本的に変更されないが、2つの完全長HC/LCの対の第二は、以下の置換によって修飾される：

40

- 軽鎖：第二抗原に特異的に結合する前記抗体の可変重鎖ドメインV_Hによる可変軽鎖ドメインV_Lの置換、及び/又は第二抗原に特異的に結合する前記抗体の定常重鎖ドメインC_H1による定常軽鎖ドメインC_Lの置換、及び

- 重鎖：第二抗原に特異的に結合する前記抗体の可変軽鎖ドメインV_Lによる可変重鎖ドメインV_Hの置換、及び/又は第二抗原に特異的に結合する前記抗体の定常軽鎖ドメインC_Lによる定常重鎖ドメインC_H1の置換。

【0039】

従って、本発明に従って得られた多重特異性抗体は、人工抗体であり、

A) a) 第一及び第二抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖；及び

50

b) 第三抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖であって、
 (第三抗原に特異的に結合する抗体の)前記軽鎖はV Lの代わりに可変ドメインV Hを含み、及び/又はC Lの代わりに定常ドメインC H 1を含み、
 (第三抗原に特異的に結合する抗体の)前記重鎖はV Hの代わりに可変ドメインV Lを含み、及び/又はC H 1の代わりに定常ドメインC Lを含み、
 又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖;及び
 b) 第二及び第三抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖であって、
 (第二及び第三抗原に特異的に結合する抗体の)前記軽鎖はV Lの代わりに可変ドメインV Hを含み、及び/又はC Lの代わりに定常ドメインC H 1を含み、
 (第二及び第三抗原に特異的に結合する抗体の)前記重鎖はV Hの代わりに可変ドメインV Lを含み、及び/又はC H 1の代わりに定常ドメインC Lを含み、
 又は

10

C) a) 第一及び第二抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖;及び
 b) 第三及び第四抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖及び重鎖であって、
 (第三及び第四抗原に特異的に結合する抗体の)前記軽鎖はV Lの代わりに可変ドメインV Hを含み、及び/又はC Lの代わりに定常ドメインC H 1を含み、
 (第三及び第四抗原に特異的に結合する抗体の)前記重鎖はV Hの代わりに可変ドメインV Lを含み、及び/又はC H 1の代わりに定常ドメインC Lを含む、
 人工抗体である。

20

【0040】

本発明の更なる態様において、所望されない副生成物と比較して所望される二価、多重特異性抗体の改善された比率は、三重又は四重特異性抗体内で第一及び第二抗原に特異的に結合する前記完全長抗体のC H 3ドメインの修飾により更に改善することができる。従って、本発明の好ましい一実施態様において、本発明による(重鎖及び修飾された重鎖の)前記三重又は四重特異性抗体のC H 3ドメインは、例えば、国際公開第96/027011号、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621;及びMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681に幾つかの例を挙げて詳細に説明されるノブ・イントゥ・ホール技術により改変することができる。この方法において、2つのC H 3ドメインの相互作用表面は、これら2つのC H 3ドメインを含有する両方の重鎖のヘテロダイマー化を増加させるために改変された。(2つの重鎖の)2つのC H 3ドメインの各々は、「ノブ」することができ、他方は「ホール」となる。ジスルフィド架橋の導入は、ヘテロダイマーを更に安定化し(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)、収率を増加させる。

30

【0041】

従って、本発明の一態様は、三重特異性又は四重特異性抗体は、

a) の完全長抗体の重鎖のC H 3ドメイン及びb) の完全長抗体の修飾された重鎖のC H 3ドメインの各々は抗体のC H 3ドメイン間の元のインターフェイスを含むインターフェイスで接触することを更に特徴とし;

40

前記インターフェイスは三重特異性又は四重特異性抗体の形成を促進するように改変され、その改変は、

i) 三重又は四重特異性抗体内の他の重鎖のC H 3ドメインの元のインターフェイスで接触する一重鎖のC H 3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、他の重鎖のC H 3ドメインのインターフェイス内のキャピティの中に置くことができる、一重鎖のC H 3ドメインのインターフェイス内の隆起を作成するように、一重鎖のC H 3ドメインが改変され、

及び

i i)

50

三重又は四重特異性抗体内の第一CH₃ドメインの元のインターフェイスで接触する第二CH₃ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、その中に第一CH₃ドメインのインターフェイス内の隆起を置くことができる、第二CH₃ドメインのインターフェイス内にキャビティを作成するように、他の重鎖のCH₃ドメインが改変されることを特徴とする。

【0042】

好ましくは、より大きな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)から選択される。

好ましくは、より小さな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)から選択される。

10

【0043】

本発明の一態様において、両方のCH₃ドメインの間にジスルフィド架橋を形成することができるように、各CH₃ドメインの対応する位置のアミノ酸としてシステイン(C)を導入することにより、両方のCH₃ドメインが更に改変される。

【0044】

好ましい一実施態様では、三重特異性又は四重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH₃ドメインにT366W変異及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにT366S、L368A、Y407V変異を含む。例えば「ノブ鎖」のCH₃ドメインにY349C変異を、及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにE356C変異又はS354C変異を導入することにより、CH₃ドメイン間に付加的鎖間ジスルフィド架橋を使用することもできる(Merchant, A. M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681)。従って、別の好ましい実施態様において、前記三重特異性又は四重特異性抗体は、2つのCH₃ドメインの一方でY349C、T366W変異を、及び2つのCH₃ドメインの他方でE356C、T366S、L368A、Y407V変異を含み、又は前記三重特異性又は四重特異性抗体は、2つのCH₃ドメインの一方でY349C、T366W変異を、及び2つのCH₃ドメインの他方でS354C、T366S、L368A、Y407V変異を含む(一方のCH₃ドメインにおける付加的なY349C、及び他方のCH₃ドメインにおける付加的なE356C又はS354C変異は鎖間ジスルフィド架橋を形成する)(番号付けはカバットのEUIンデックスに常に従う)。しかしまた、欧州特許第1870459号(A1)に記載されているように、他のノブ・イン・ホール技術を代替的あるいは追加的に使用することができる。前記三重特異性又は四重特異性抗体のための好ましい例は、「ノブ鎖」のCH₃ドメインにおけるR409D; K370E変異、及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにおけるD399K; E357K変異である(番号付けはカバットのEUIンデックスに常に従う)。

20

30

別の好ましい実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は「ノブ鎖」のCH₃ドメインにおいてT366W突然変異を、及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにおいてT366S、L368A、Y407V変異を、そして更に「ノブ鎖」のCH₃ドメインにおいてR409D; K370E変異を、及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにおいてD399K; E357K変異を含む。

40

【0045】

別の好ましい実施態様において、前記三重特異性又は四重特異性抗体は、2つのCH₃ドメインの一方でY349C、T366W変異を、及び2つのCH₃ドメインの他方でE354C、T366S、L368A、Y407V変異を含み、又は前記三重特異性又は四重特異性抗体は、2つのCH₃ドメインの一方でY349C、T366W変異を、及び2つのCH₃ドメインの他方でS354C、T366S、L368A、Y407V変異を含み、及び追加的に「ノブ鎖」のCH₃ドメインにおいてR409D; K370E変異を、及び「ホール鎖」のCH₃ドメインにおいてD399K; E357Kを含む。

【0046】

一実施態様において、多重特異性抗体は、

50

A)のもとで、第一抗原は、ヒトHER1であり、第二抗原はヒトHER3であり、及び第三抗原はヒトHER2であり；又は

B)のもとで、第一抗原は、ヒトHER2であり、第二抗原はヒトHER1であり、及び第三抗原はヒトHER3であることを特徴とする。

【0047】

一実施態様において、多重特異性抗体は、配列番号4、9、13及び18のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0048】

一実施態様では、多重特異性抗体は、二価、三重特異性抗体であり、

a) ヒトHER1及びヒトHER3に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、ヒトHER2に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖を含む。

【0049】

一実施態様において、ヒトHER1、ヒトHER3、及びヒトHER2に特異的に結合するそのような二価、三重特異性抗体は、配列番号4、9、13、18のアミノ酸配列を含む。

【0050】

一実施態様において、ヒトHER1、ヒトHER3、及びヒトHER2に特異的に結合するそのような二価、三重特異性抗体は、配列番号4、9、13、18のアミノ酸配列を含み、抗体は以下の特性により特徴づけられる：

i) 抗体は、 37 で表面プラズモン共鳴によって測定された $KD1.7E-08$ [M]の親和性でヒトHER1(外部ドメインECD)に結合し；及び

ii) 抗体は、 37 で表面プラズモン共鳴によって測定された $KD4.4E-09$ [M]の親和性でヒトHER2(外部ドメインECD)に結合し；及び

iii) 抗体は、 37 で表面プラズモン共鳴によって測定された $KD1.8E-09$ [M]の親和性でヒトHER2(外部ドメインECD)に結合し；及び

iv) 抗体は、ヒトHer1及びヒトHer2に同時に結合することができ、又はヒトHer3及びヒトHer2に同時に結合することができる。

【0051】

一実施態様において、ヒトHER1、ヒトHER3、及びヒトHER2に特異的に結合するそのような二価、三重特異性抗体は、配列番号4、9、13、18のアミノ酸配列を含み、抗体は以下の特性の一以上により特徴づけられる：

i) 抗体は、 $50\mu g/mL$ の濃度で85%以上MDA-MB-175乳癌細胞の増殖を阻害する；

ii) 抗体は、 $30\mu g/mL$ の濃度で50%以上A431類表皮癌細胞(HER1を発現する)の増殖を阻害する；及び

iii) 抗体はA431類表皮癌細胞でADCCを誘導し、それによって2.5時間以内におよそ100%の癌細胞を除去する。

【0052】

一実施態様において、ヒトHER1、ヒトHER3、及びヒトHER2に特異的に結合するそのような二価、三重特異性抗体は、配列番号4、9、13、18のアミノ酸配列を含み、及び抗体はAsn297(番号づけはカバットによる)で、糖鎖内のフコースの量が65%以下である(別の実施態様において、糖鎖内のフコースの量が5%から65%の間であり、一実施態様では20%と40%の間である)糖鎖によりグリコシル化される。

【0053】

一実施態様において、多重特異性抗体は、A)のもとで、第一抗原はヒトHER1、第

10

20

30

40

50

二抗原はヒトHER3及び第三抗原はヒトcMETであり；又はB)のもとで、第一抗原はヒトcMET、第二抗原はヒトHER1及び第三抗原はヒトHER3であることを特徴とする。

【0054】

一実施態様において、多重特異性抗体は、配列番号4、9、13及び19のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0055】

用語「完全長抗体」は、2本の抗体重鎖及び2本の抗体軽鎖からなる抗体を意味する(図1参照)。完全長抗体の重鎖は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖ドメイン1(CH1)、抗体ヒンジ領域(HR)、抗体重鎖定常ドメイン2(CH2)、抗体重鎖定常ドメイン3(CH3)から成るポリペプチドであり(VH-CH1-HR-CH2-CH3と略される)、及びサブクラスのIgE抗体の場合、任意で抗体重鎖定常ドメイン4(CH4)から成るポリペプチドである。好ましくは、完全長抗体の重鎖はN末端からC末端の方向にVH、CH1、HR、CH2及びCH3からなるポリペプチドである。完全長抗体の軽鎖は、VL-CLと略される、N末端からC末端方向に、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体軽鎖定常ドメイン(CL)から成るポリペプチドである。抗体軽鎖定常ドメイン(CL)は(カッパ)又は(ラムダ)とすることができる。完全長抗体鎖は、CLドメイン及びCH1ドメインとの間の(即ち、軽鎖と重鎖の間の)及び完全長抗体重鎖のヒンジ領域間ポリペプチド間のジスルフィド結合を介して一緒に連結される。典型的な完全長抗体の例は、IgG(例えばIgGの1及びIgG2)、IgM、IgA、IgD、及びIgE)のような天然の抗体である。本発明の完全長抗体は、単一の種、例えば、ヒトとすることができ、又はそれらはキメラ化抗体又はヒト化抗体とすることができる。

【0056】

本発明の完全長抗体は、各々がVH及びVLの対によって形成される、2つの抗原結合部位を含み、その両方ともa)一つの単一抗原又はb)2つの異なる抗原のどちらかに特異的に結合する(下記参照)。前記完全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端は、前記重又は軽鎖のC末端の最後のアミノ酸を表す。

【0057】

二つの異なる抗原(例えば、第一及び第二抗原、又は第三及び第四抗原)に特異的に結合する完全長抗体(又は完全長抗体の軽鎖及び重鎖)は、例えば、二重特異性を導入するように完全長抗体の可変重鎖及び軽鎖ドメインのVH及びVLを多様化することによって得られ、その技術は、国際公開第2008/027236号；国際公開第2010/108127号及びBostrom, J., et al., Science 323 (2009) 1610-161(それらは全て参照により本明細書に組み込まれる)に記載される。例えば第一抗原及び第二抗原に結合する二重特異性を持つ得られたVH及びVLは本発明に係る多重特異性抗体の一方のアームに使用することができ、一方他方のアームは、第三抗原(又は第三及び第四抗原)に特異的である。多様化したVL及びVHは、同時又は互いに排他的に第一エピトープ及び二エピトープに結合することができ、そして、VEGF/HER2、VEGF-A/HER2、HER2/DR5、VEGF-A/PDGF、HER1/HER2、CD20/BR3、VEGF-A/VEGF-C、VEGF-C/VEGF-D、TNFアルファ/TGF-ベータ、TNFアルファ/IL-2、TNFアルファ/IL-3、TNFアルファ/IL-4、TNFアルファ/IL-5、TNFアルファ/IL6、TNFアルファ/IL8、TNFアルファ/IL-9、TNFアルファ/IL-10、TNFアルファ/IL-11、TNFアルファ/IL-12、TNFアルファ/IL-13、TNFアルファ/IL-14、TNFアルファ/IL-15、TNFアルファ/IL-16、TNFアルファ/IL-17、TNFアルファ/IL-18、TNFアルファ/IL-19、TNFアルファ/IL-20、TNFアルファ/IFNアルファ、TNFアルファ/CD4、VEGF/IL-8、VEGF/MET、VEGFR/MET receptor、HER2/Fc、HER2/HER3；HER1/HER2、HER1/HER3、EGFR/HER4、

TNFアルファ/IL-3、TNFアルファ/IL-4、IL-13/CD40L、IL4/CD40L、TNFアルファ/ICAM-1、TNFR1A/IR、TNFR1/IL-6R、及びTNFR1/IL-18からなる群から例えば選択することができる。

【0058】

本明細書で使用される用語「結合部位」又は「抗原結合部位」は、リガンド（例えば抗原又はその抗原断片）が実際に結合し、抗体から由来する（又は二重特異性完全長抗体の場合、2つのリガンド、例えば第一及び第二抗原が結合する）抗体分子の領域を意味する。抗原結合部位は、VH/VLの抗体重鎖可変ドメイン（VH）の対を含む。

【0059】

所望の抗原に特異的に結合する抗原結合部位は、(a)その抗原に対する既知の抗体に由来してもよいし、又は(b)とりわけ、抗原タンパク質もしくは抗原核酸もしくはそれらの断片の何れかを使用したデノボ免疫感作法により、もしくはファージディスプレイにより入手された新たな抗体もしくは抗体断片に由来してもよい。例えば第一及び第二抗原に特異的に結合する、所望される二重特異性抗体のケースでは、第一抗原に結合する得られた抗体のVH及びVLは、国際公開第2008/027236号；国際公開第2010/108127号及びBostrom, J., et al., Science 323 (2009) 1610-1614（それらは全て参照により本明細書に組み込まれる）で説明したように修飾され/多様化する必要がある。

本発明の抗原結合部位は、様々な程度に、抗原に対する結合部位の親和性に寄与する、6個の相補性決定領域(CDR)を含有している。3個の重鎖可変ドメインCDR(CDRH1、CDRH2、及びCDRH3)並びに3個の軽鎖可変ドメインCDR(CDRL1、CDRL2、及びCDRL3)が存在する。CDR及びフレームワーク領域(FR)の範囲は、これらの領域が配列間の可変性に従って定義されている、アミノ酸配列のコンパイルされたデータベースとの比較により決定される。また本発明の範囲内に含まれるものは、より少ないCDR（即ち、結合特異性は3つ、4つ又は5つのCDRにより決定される）で構成される機能性抗原結合部位である。

【0060】

抗体特異性は、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を指す。天然の抗体は、例えば、単一特異性である。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原結合特異性を有する抗体である。従って三重特異性抗体は、3つの異なる抗原結合特異性を有する本発明による抗体である。本発明による四重特異性抗体は、4つの異なる抗原結合特異性を有する抗体である。

【0061】

抗体が一以上の特異性を有する場合、認識されるエピトープは、単一の抗原又は一以上の抗原に関連付けることができる。

【0062】

本明細書で使用する用語「単一特異性」抗体は、各々が同じ抗原の同じエピトープに結合する一以上の結合部位を有する抗体である。

【0063】

本出願の中で使用する用語「価」は、抗体分子における指定された数の結合部位の存在を示す。例えば天然抗体又は本発明の完全長抗体は、2つの結合部位を有し二価である。一実施態様では、本発明による多重特異性抗体は二価である。一実施態様では、本発明による多重特異性抗体は二価、三重特異性又は二価、四重特異性である。

【0064】

本発明の完全長抗体は、一以上の免疫グロブリンクラスの免疫グロブリン定常領域を含む。免疫グロブリンクラスには、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEアイソタイプが含まれ、IgG及びIgAの場合には、それらのサブタイプが含まれる。好ましい実施態様において、本発明の全長抗体は、IgGタイプの抗体の定常ドメイン構造を有する。

【0065】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される場合の「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一のアミノ酸組成の抗体分子の調製物をさす。

【0066】

用語「キメラ抗体」とは、一般的には、組換えDNA技術により調製される、一起源又は種に由来する可変領域、即ち、結合領域と、異なる起源又は種に由来する定常領域の少なくとも一部とを含む抗体をさす。マウス可変領域及びヒト定常領域を含むキメラ抗体が好ましい。本発明に包含される「キメラ抗体」の他の好ましい形態は、特にC1qの結合及び/又はFc受容体(FcR)の結合に関して、本発明に係る特性を生成するために、定常領域が元の抗体のものから修飾又は変更されたものである。そのような「キメラ」抗体はまた「クラススイッチ抗体」と称される。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメント及び免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む、発現された免疫グロブリン遺伝子の生成物である。キメラ抗体を生産するための方法は、今は当該技術分野においてよく知られている一般的な組換えDNA及び遺伝子トランスフェクション技術を含む。例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; 米国特許第5,202,238号及び第5,204,244号を参照。

10

【0067】

用語「ヒト化抗体」は、フレームワーク又は「相補性決定領域」(CDR)が、親免疫グロブリンのものと比較して、異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むように修飾された抗体を意味する。好ましい実施態様では、マウスCDRが、「ヒト化抗体」を調製するためのヒト抗体のフレームワーク領域に移植される。例えば、Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327;及びNeuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270を参照。

20

【0068】

本発明に包含される「ヒト化抗体」の別の形態は、特にC1qの結合及び/又はFc受容体(FcR)の結合に関して、本発明に係る特性を生成するために、定常領域が元の抗体のものから更に修飾又は変更されたものである。

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列から由来する可変及び定常領域を有する抗体を含むことを意図している。ヒト抗体は当該技術分野において周知である(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。

30

またヒト抗体は、免疫時に、内在性免疫グロブリン産生の欠損下において、ヒト抗体の選択、又は全レパートリーを生成可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)で産生可能である。このような生殖系列変異マウスにおける、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移動により、抗原曝露でヒト抗体が産生される(例えば、Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照)。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーで産生することができる(Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。ヒトモノクローナル抗体の調製について、ColeらとBoernerらの技術も利用可能である(Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985) p. 77;及びBoerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。本発明に係るキメラ及びヒト化抗体について既に述べたように、本発明で使用される「ヒト化抗体」はまた、とりわけC1q結合及び/又はFcR結合に関して、例えば「クラススイッチ」即ちFc部分の変化又は変異(例えばIgG1からIgG4及び/又はIgG1/IgG4変異)によって、本発明に係る特性を生み出すために、定常領域で修飾された抗体を含む。

40

【0069】

本発明で使用される場合、用語「組換えヒト抗体」は、宿主細胞に形質移入された組換え発現ベクターを使用して発現したヒト免疫グロブリン遺伝子又は抗体用にトランスジェニックである動物(例えばマウス)から、又はNS0又はCHO細胞等の宿主細胞から単

50

離された抗体等、組換え手段により調製、発現、生成又は単離された全てのヒト抗体を含むことを意図している。このような組換えヒト抗体は、再配列された形態で、可変及び定常領域を有する。本発明の組換えヒト抗体は、インビボ体細胞突然変異を受ける。よって、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及びVL配列から誘導され、関連しているが、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しないであろう配列である。

【0070】

本明細書で使用される「可変ドメイン」（軽鎖の可変ドメイン（VL）、重鎖の可変ドメイン（VH））は、抗体を抗原に結合させることに直接関与する軽鎖及び重鎖の対のそれぞれを示す。可変軽鎖及び重鎖のドメインは、同じ一般構造を有し、各ドメインは、配列が広く保存され、3個の「高頻度可変領域」（又は相補性決定領域、CDR）によって連結される、4個のフレームワーク（FR）領域を含む。フレームワーク領域は、シートコンフォメーションをとり、CDRは、シート構造を連結するループを形成しうる。各鎖のCDRは、フレームワーク領域によって三次元構造に保持され、もう一方の鎖由来のCDRと共に抗原結合部位を形成する。抗体の重鎖及び軽鎖CDR3領域は、本発明に係る抗体の結合特異性／親和性に特に重要な役割を果たし、よって本発明の更なる目的を提供する。

10

【0071】

用語「超可変領域」又は「抗体の抗原-結合部分」とは、本明細書において使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基を含んでなる。「フレームワーク」又は「FR」領域は、本明細書において定義されるように超可変領域残基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は、N末端からC末端に向かって、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含んでなる。各々の鎖上のCDRはそのようなフレームワークアミノ酸により分離される。特に、重鎖のCDR3は、ほとんど抗原結合に寄与する領域である。CDR及びFR領域は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991)の標準的な定義に従って決定される。

20

【0072】

本明細書において使用される場合、用語「結合」又は「特異的に結合」とは、インビトロにおけるアッセイ、好ましくは精製した野生型抗原を用いたプラズモン共鳴アッセイ（BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden）における抗体のエピトープへの抗原結合タンパク質の結合を指す。結合の親和性は、用語 k_a （抗体／抗原複合体からの抗体結合に関する速度定数）、 k_D （解離定数）、及び K_D （ k_D / k_a ）によって定義される。一実施態様において、結合又は特異的に結合は、 10^{-8} mol/l 以下、好ましくは 10^{-9} M から 10^{-13} mol/l の結合親和性（ K_D ）を意味する。

30

【0073】

従って、本発明による抗原タンパク質は、 10^{-8} mol/l 以下、好ましくは 10^{-9} M から 10^{-13} mol/l の結合親和性（ K_D ）で、特異的である各抗原に対して特異的に結合している。

40

【0074】

用語「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質に対して特異的に結合できるいずれかのポリペプチド決定基を包含する。ある実施態様においては、エピトープ決定基は、分子、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリン又はスルホニルなどの化学的活性表面群を包含し、そしてある実施態様においては、特定の三次元構造特性及び／又は比電荷特性を有することができる。エピトープは、抗原結合タンパク質により結合される抗原の領域である。

【0075】

ある実施態様において、抗体は、それがタンパク質及び／又は高分子の複雑な混合物中のその標的抗原を優先的に認識する場合、抗原に特異的に結合すると言われる。

50

【0076】

更なる実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、前記完全長抗体は、ヒトIgG 1サブクラスのものであり、又は変異L234A及びL235Aを有するヒトIgG 1サブクラスのものであることを特徴とする。更なる実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、前記完全長抗体は、ヒトIgG 2サブクラスのものであることを特徴とする。更なる実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、前記完全長抗体は、ヒトIgG 3サブクラスのものであることを特徴とする。更なる実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、前記完全長抗体は、ヒトIgG 4サブクラスのものであり、又は更なる変異S228P及びL235Eを有するヒトIgG 4サブクラスのものであることを特徴とする。一実施態様において、本発明の多重特異性抗体は、前記完全長抗体は、ヒトIgG 1サブ

10

【0077】

現在では、本発明の多重特異性抗体は、生物学的又は薬理的活性、薬物動態学的特性又は毒性などの特性が改善されていることが見出されているこれらは、例えば、癌などの疾患の治療のために使用することができる。

【0078】

用語「定常領域」は、本明細書中で使用される場合、可変領域以外の抗体のドメインの和を意味する。定常領域は、抗原の結合に直接的にかかわらないが、様々なエフェクター機能を示す。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に依存して、抗体は以下のクラス：

20

IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMに分類され、そしてそのいくつか、例えばIgG 1、IgG 2、IgG 3、及びIgG 4、IgA 1及びIgA 2などは、サブクラスに更に分類されることもできる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 κ 、 λ 、 μ 、及び δ と呼ばれる。全部で5つの抗体クラスで見ることができる軽鎖定常領域(CL)は、 κ (カッパ)及び λ (ラムダ)と呼ばれる。

【0079】

用語「ヒト起源由来の定常領域」は、本願で使用される場合、サブクラスIgG 1、IgG 2、IgG 3、又はIgG 4のヒト抗体の定常重鎖領域及び/又は定常軽鎖カッパ又はラムダ領域を意味する。そのような定常領域は、当技術分野の現状において周知であり、例えば、Kabat, E.A.によって説明されている(例えばJohnson, G. and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Aca

30

【0080】

IgG 4サブクラスの抗体はFc受容体(FcRIIIa)結合の減少を示すが、別のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。しかしながら、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(Fc糖鎖の喪失)、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434、又は/及びHis435は、変更される場合には、Fc受容体結合の減少も与える残基である(Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; 欧州特許第0307434号)。

40

【0081】

一実施態様において、本発明による抗体は、IgG 1抗体と比較してFcR結合が低減されている。従って、全長親抗体は、FcR結合に関して、IgG 4サブクラスのもの、あるいはS228、L234、L235及び/又はD265に突然変異を伴う、及び/又はPVA236突然変異を含むIgG 1又はIgG 2サブクラスのものである。一実施態様では、全長親抗体内の突然変異は、S228P、L234A、L235A、L235E、及び/又は、PVA236である。他の実施態様では、全長親抗体内の突然変異は、IgG 4ではS228PそしてとIgG 1ではL234AとL235Aにある。

【0082】

50

抗体の定常領域は、A D C C (抗体依存性細胞毒性)及びC D C (補体依存性細胞毒性)に直接関与する。補体活性化(C D C)は、大部分のI g G抗体サブクラスの定常領域への補体C 1 q因子の結合により開始する。抗体へのC 1 qの結合は、いわゆる結合部位で所定のタンパク質-タンパク質相互作用により起きる。そのような定常領域の結合部位は、当技術分野の現状において公知であり、例えばLukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Bunkhouse, R. and Cobra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thomason, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idiocias, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hearer, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; 及び欧州特許第0307434号により記載されている。そのような定常領域の結合部位は、例えばアミノ酸L 234、L 235、D 270、N 297、E 318、K 320、K 322、P 331、及びP 329(付番は常にK a b a tのE Uインデックスに準じる)を特徴とする。

「E U番号付けシステム」又は「E U指標(カバットによる)」は、免疫グロブリン重鎖定常領域の残基を参照するときに通常使用される(例えばKabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991に報告されたE U指標は参照により本明細書に明示的に援用される))。

【0083】

用語「抗体依存性細胞傷害性(A D C C)」は、エフェクター細胞の存在下、本発明の抗体によるヒト標的細胞の溶解を意味する。A D C Cは、エフェクター細胞の存在下、例えば新鮮に単離されたP B M C又はパフィーコートからの精製エフェクター細胞、例えば単球又はナチュラルキラー(N K)細胞又は永続的に増殖するN K細胞株の存在下で本発明の抗体で抗原発現細胞の調製物を処理することにより好ましくは測定される。

【0084】

用語「補体依存性細胞傷害性(C D C)」は、ほとんどのI g G抗体サブクラスのF c領域への補体因子C 1 qの結合により開始されるプロセスを示す。抗体へのC 1 qの結合は、いわゆる結合部位で所定のタンパク質-タンパク質相互作用により起きる。このようなF c部分の結合部位は最先端の技術で知られている(上記参照)。このようなF c部分の結合部位は、例えば、アミノ酸L 234, L 235, D 270, N 297, E 318, K 320, K 322, P 331, 及びP 329により特徴付けられている(K a b a t, E . AのE U指標に従い番号付け)。通常、サブクラスI g G 1、I g G 2及びI g G 3の抗体は、C 1 q及びC 3結合を含む補体活性を示すが、I g G 4は補体系を活性化させず、C 1 q及び/又はC 3に結合しない。

【0085】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能は、Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 及び米国特許第6,602,684号において説明したように、それらのオリゴ糖成分を操作することによって高めることができるI g G 1型抗体は、最も一般的に使用される治療用抗体であり、各C H 2ドメインのA s n 297で保存されたN-結合型糖鎖付加部位を持つ糖タンパク質である。A s n 297に付着した2つの複雑な二分岐オリゴ糖は、C H 2ドメインの間に埋葬され、ポリペプチド主鎖との広範な接触を形成し、そしてそれらの存在は、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(A D C C)などのエフェクター機能を媒介するために抗体にとって必須である(Lifely, M., R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及び国際公開第99/54342号は、チャニーズハムスター卵巣(C H O)細胞において、二分岐オリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI I I(「G N T I I I」)の過剰発現が、抗体のインビトロA D C C活性を有意に増加させることを示した。A s n 297の糖鎖の変化又はその除

去は、Fc RととC1qの結合にも影響を及ぼす (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147)。

【0086】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能を増強する方法は、例えば、国際公開第2005/018572号、国際公開第2006/116260号、国際公開第2006/114700号、国際公開第2004/065540号、国際公開第2005/011735号、国際公開第2005/027966号、国際公開第1997/028267号、米国特許出願公開第2006/0134709号、米国特許出願公開第2005/0054048号、米国特許出願公開第2005/0152894号、国際公開第2003/035835号、国際公開第2000/061739で報告されている。

10

【0087】

本発明の好ましい一実施態様において、三重又は四重特異性抗体は(それがIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4サブクラスの、好ましくはIgG1又はIgG3サブクラスのFc部分を含む場合)Asn297で、糖鎖の中のフコースの量が65%未満である糖鎖によりグリコシル化されている(Kabatに従う番号付け)。別の実施態様において、前記糖鎖の中のフコースの量は5%から65%の間、好ましくは20%から40%の間である。別の実施態様において、前記糖鎖の中のフコースの量は0%の間である。本発明による「Asn297」はFc領域の位置がおよそ297に位置したアミノ酸のアスパラギンを意味する。抗体の軽微な配列多様性に基づいて、Asn297はまた、位置297の上流又は下流の幾つかのアミノ酸で、即ち、位置294と300の間に配置することができる(通常は+3以下のアミノ酸)。本発明によるグリコシル化抗体の一実施態様において、IgGサブクラスはヒトIgG1サブクラスのもの、変異L234A及びL235Aを持つヒトIgG1サブクラスのもの又はIgG3サブクラスのものである。更なる実施態様において、前記糖鎖の内部において、N-グリコリルノイラミン酸(NGNA)は1%以下であり、及び/又はN末端の-1, 3-ガラクトースの量は1%以下である。糖鎖は、好ましくはCHO細胞において組換え発現される抗体のAsn297に付着したN結合型グリカンの特性を示す。

20

30

【0088】

「糖鎖がCHO細胞で組換え的に発現した抗体のAsn297に結合したN-結合グリカンの特徴を示す」なる用語は、本発明の完全長親抗体のAsn297の糖鎖が、フコース残基を除き、未修飾のCHO細胞で発現した同様の抗体のもの、例えば国際公開第2006/103100号で報告されているものと同様の構造及び糖残基配列を有することを示す。

【0089】

この出願で使用される「NGNA」なる用語は、糖残基N-グリコシル-ノイラミン酸を示す。

40

【0090】

ヒトIgG1又はIgG3のグリコシル化は、コアフコシル化された二分岐複合オリゴ糖のグリコシル化が最大2つのGal残基で終結している場合、Asn297で生じる。IgG1又はIgG3のサブクラスのヒト定常重鎖領域は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991), and by Rueggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527により詳しく報告されている。これらの構造は、末端Gal残基の量に応じて、G0、G1(-1, 6-又は-1, 3-)、又はG2グリカン残基と命名される(Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53)。抗体のFc

50

部分のCHO型グリコシル化は、例えば、Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207により記載されている。非糖修飾されたCHO宿主細胞で組換えにより発現している抗体は、通常、少なくとも85%の量で、Asn297でフコシル化されている。完全長親抗体の修飾されたオリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体であり得る。好ましくは二分された、還元され/フコシル化されていないオリゴ糖はハイブリッドである。別の実施態様において、還元され/フコシル化されていないオリゴ糖は複合体である。

【0091】

本発明によれば、「フコースの量」は、MALDI-TOF質量分析により測定され平均値として計算される、Asn297に結合した全糖鎖構造（例えば複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造）の総和に関連した、Asn297での前記糖の量を意味する。フコースの相対量は、MALDI-TOFにより、N-グリコシダーゼF処理した試料（例えば、複合体、ハイブリッド、及びオリゴ及び高マンノース構造のそれぞれ）において同定された全ての糖構造に関連したフコース含有構造の割合である。

10

【0092】

本発明に係る抗体は、組換え手段によって生成される。従って、本発明の一態様は、本発明による抗体をコードする核酸であり、更なる態様は、本発明による抗体をコードする前記核酸を含む細胞である。組換えによる産生のための方法が広く先端技術で知られており、原核細胞及び真核細胞におけるタンパク質の発現を含み、その後の抗体の単離、及び通常は薬学的に許容される純度までの精製を伴う。宿主細胞で前述のように抗体を発現するために、それぞれの修飾された軽鎖と重鎖が、標準的な方法により発現ベクターに挿入される。発現は、CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母、又は大腸菌細胞などの適当な原核生物又は真核生物宿主細胞中で行われ、抗体は細胞（上清又は溶解後の細胞）から回収される。抗体の組換えによる生成のための一般的な方法は、最新技術分野において周知であり、例えば、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) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880の総説に記載されている。

20

【0093】

本発明による三重又は四重抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどによって培養培地から適切に分離される。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、従来の手順を用いて配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、DNAとRNAの供給源として機能することができる。一度単離されると、DNAは、発現ベクターに挿入することができ、これらは次いで、本来ならば免疫グロブリンタンパク質を生成しないHEK293細胞、CHO細胞、又はミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクトされ、宿主細胞中で組換えモノクローナル抗体の合成を得る。

30

【0094】

抗原結合タンパク質のアミノ酸配列変異体（又は変異体）は、抗体のDNAに適当なヌクレオチド変化を導入することによって、又はヌクレオチド合成によって調製される。しかしながら、そのような修飾は、例えば、ごく限られた範囲で上述したように行うことができる。例えば、修飾は、例えば、IgGのアイソタイプ及び抗原結合など上述したような抗体の特性を変化させないが、組換えによる生成収率、タンパク質安定性を改善したり、精製を容易にすることができる。

40

【0095】

本出願で使用される用語「宿主細胞」は、本発明に係る抗体を生成するように操作することができる細胞性システムの任意の種類を意味する。一実施態様において、HEK293細胞及びCHO細胞が宿主細胞として使用される。本明細書で使用される場合、「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」は互換的に使用され、すべてのそのような名称は子孫を含む。よって、「形質転換体」及び「形質転換細胞」なる用語には、初代被験体細胞、

50

及び移動の回数に関係なくそこから得られた培養物も含まれる。また、全ての子孫は、意図的な又は不慮の突然変異により、DNA量において、厳密には同一でない可能性もあると理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされた場合、同じ機能又は生物活性を有する変異子孫も含まれる。区別される標記を意図している場合は、文脈から明らかにはずである。

【0096】

NS0細胞における発現は、例えば、Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270により説明される。一過性発現は、例えばDurocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30(2002)E9により説明される。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及びNorderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87により説明される。好適な一過性発現系 (HEK293) は、Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 and by Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199により説明される。

10

【0097】

原核生物に適している制御配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0098】

核酸は、それは、他の核酸配列と機能的な関係で配置されたとき、「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関するタンパク質前駆体として発現される場合、ポリペプチドのDNAに操作可能に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に操作可能に連結されている；又はリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に操作可能に連結されている。一般に、「作動可能に結合」とは、連結するDNA配列が近接しており、及び分泌リーダーの場合には、近接しておりかつリーディングフレームにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

20

30

【0099】

抗体の精製は、細胞成分又は他の汚染物質、例えば他の細胞の核酸又はタンパク質を、アルカリ/SDS処理、塩化セシウムバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、及び当該技術分野で周知のその他を含む標準的な技術によって除去するために行われる。Ausubel, F., et al., (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照。タンパク質精製のために異なる方法、例えば微生物のタンパク質による親和性クロマトグラフィー（例えば、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（例えば陽イオン交換（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（-メルカプトエタノール及び他のSHリガンドによるなど）、疎水性相互作用又は芳香族吸着クロマトグラフィー（フェニル-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によるなど）、金属キレート親和性クロマトグラフィー（Ni(II)-及びCu(II)親和性材料によるなど）、サイズ排除クロマトグラフィー、及び電気泳動的方法（例えばゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など）が十分に確立され広範に使用されている（Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102）。

40

【0100】

本発明の一つの態様は、本発明に係る抗原結合タンパク質を含む薬学的組成物である。本発明の別の態様は、薬学的組成物の製造のための、本発明に係る抗原結合タンパク質の

50

使用である。本発明の更なる態様は、本発明に係る抗原結合タンパク質を含む薬学的組成物の製造のための方法である。別の態様において、本発明は、例えば、薬学的担体と共に調製される本発明に係る抗原結合タンパク質を含む薬学的組成物を含む組成物を提供する。

【0101】

本発明の一実施態様は、癌の治療のための、本発明に係る抗原結合タンパク質である。

【0102】

本発明の別の態様は、癌の治療のための前記薬学的組成物である。

【0103】

本発明の別の態様は、癌の治療のための医薬の製造のための、本発明に係る抗原結合タンパク質の使用である。

10

【0104】

本発明の別の態様は、治療を必要とする患者に、本発明に係る抗原結合タンパク質を投与することによる、癌に罹患している患者の治療方法である。

【0105】

本明細書で使用される場合、「薬学的担体」には、任意及び全ての溶媒、分散用媒体、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延化剤で、生理学的に適合性であるものが含まれる。好ましくは、担体は静脈内、筋肉内、大脳内、皮下、非経口、脊髄、又は表皮投与（例えば、注射又は注入による）に適している。

【0106】

本発明の組成物は、当該技術で知られているの種々の方法で投与することができる。当業者に理解されているように、投与の経路及び/又は方式は、所望する結果に応じて変えられるであろう。投与のある種の経路により、本発明の化合物を投与するため、その不活性化を防止するための物質で化合物をコーティングする、又はその不活性化を防止するための物質と化合物とを一緒に投与する必要があるかもしれない。例えば、化合物は適切な担体、例えばリポソーム、又は希釈剤において、被験者に投与されてもよい。薬学的に許容可能な希釈剤には、生理食塩水又は水性緩衝液が含まれる。薬学的担体には、滅菌水溶液又は分散液、及び無菌の注射可能な溶液又は分散液を即時調製するための滅菌パウダーが含まれる。薬学的に活性な物質のためのこうした媒体及び薬剤の使用は、当該技術で知られている。

20

30

【0107】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」及び「非経口的に投与」なる語句は、経腸及び局所投与以外の投与方式、通常は注射による投与を意味し、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び注入が含まれる。

【0108】

本明細書で使用される場合、「癌」なる用語は、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺癌、非小細胞肺（NSCL）癌、気管支肺胞上皮細胞肺癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部の癌、皮膚又は眼球内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、胃腸癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓又は尿管の癌、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞癌、胆道癌、中枢神経系（CNS）の腫瘍、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣腫、随芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、及びユーイング肉腫を指し、上述した任意の癌の抵抗性バージョン、又は上述した癌の一又は複数の組合せを含む。

40

【0109】

これらの組成物は、アジュバント、例えば保存料、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤をさらに含有可能である。微生物存在の防止は、上掲の滅菌手段、及び種々の抗菌及び抗真菌剤

50

、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、スコルビン酸等により確実にする。また、等張剤、例えば糖類、塩化ナトリウムなどを、組成物に含有せしめることもまた望ましい。加えて、注射可能な薬学的形態の長時間にわたる吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことによりもたすことができる。

【0110】

選択された投与経路にかかわらず、適切な水和形態、及び/又は本発明の薬学的組成物で使用される本発明の化合物は、当業者に知られている一般的な方法により、薬学的に許容可能な剤形に処方される。

【0111】

本発明の薬学的組成物における活性成分の実際の投与レベルは、患者に対して毒性がなく、特定の患者に対する所望する治療的応答、組成物、及び投与方式を達成するのに効果的な活性成分の量が得られるように変えうる。選択された投与レベルは、使用される本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排出速度、処置時間、他の薬剤、使用される特定の組成物と組合せて使用される化合物及び/又は物質、年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態、処置される患者の以前の病歴、及び医療でよく知られている要因を含む、種々の薬物動態学的要因に依存するであろう。

【0112】

組成物は滅菌されていなければならない。組成物がシリンジにより送達可能である程度に、流動的でなければならない。水に加えて、担体は、好ましくは等張の緩衝生理食塩水である。

【0113】

適切な流動性は、例えばレシチン等のコーティング剤を使用することにより、又は分散液の場合は必要な粒径を維持することにより、そして界面活性剤を使用することにより、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、多価アルコール類、例えばマンニトール又はソルビトール、及び塩化ナトリウムを、組成物に含有せしめることが好ましい。

【0114】

本明細書で使用される場合、用語「形質転換」は、宿主細胞へのベクター/核酸の転写のプロセスを指す。手ごわい細胞壁障壁が無い細胞を宿主細胞として用いる場合には、トランスフェクションは、例えば、Graham and Van der Eb, *Virology* 52(1978)546により説明されるようにリン酸カルシウム沈殿法により行われる。しかし、核注入による、又はプロトプラスト融合によるなど、細胞にDNAを導入するための他の方法を用いてもよい。実質的な細胞壁構造を含む原核細胞又は細胞が使用される場合、例えばトランスフェクションの一つの方法は、Cohen, F.N, et al., *PNAS* 69(1972)7110)によって記述された塩化カルシウムを用いたカルシウム処理である。

【0115】

本明細書で使用される「発現」とは、核酸がmRNAに転写されるプロセス、及び/又は転写されたmRNA(これも転写産物とも呼ばれる)が、その後、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、遺伝子産物と総称して呼ばれる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来した場合、真核細胞における発現は、mRNAのスプライシングを含み得る。

【0116】

「ベクター」は、核酸分子で、特に自己複製し、これにより、挿入された核酸分子を宿主細胞へ及び/又は宿主細胞間で転送する。その用語は、主にDNA又はRNAを細胞へ挿入するため(例えば、染色体の統合)に機能するベクター、DNA又はRNAの複製のために主に機能するベクターの複製、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターを含む。また含まれるのは、説明したように一以上の機能を提供するベクターである。

【0117】

10

20

30

40

50

「発現ベクター」は、適当な宿主細胞に導入されると、転写されてポリペプチドに翻訳することができるポリヌクレオチドである。「発現系」は、通常、所望の発現産物を生じるために機能することができる発現ベクターからなる適切な宿主細胞を指す。

【0118】

本発明の更なる態様は、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
b) 重鎖のN末端はペプチドリンカーを介して軽鎖のC末端に連結される、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
b) 重鎖のN末端はペプチドリンカーを介して軽鎖のC末端に連結される、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
b) 重鎖のN末端はペプチドリンカーを介して軽鎖のC末端に連結される、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖

を含む多重特異性抗体である。

【0119】

本発明で使用される用語「ペプチドリンカー」は、好ましくは合成起源のものであるアミノ酸配列を持つペプチドを意味する。本発明に係るこれらのペプチドリンカーは、(第二抗原に特異的に結合する)第二完全長抗体の軽鎖のC末端を重鎖のN末端にペプチドリンカーを介して連結するために使用される。第二完全長抗体重及び軽鎖内のペプチドリンカーは、少なくとも30アミノ酸の長さ、好ましくは32~50アミノ酸の長さを有するアミノ酸配列のペプチドである。一つでは、ペプチドリンカーは、32~40アミノ酸の長さを有するアミノ酸配列のペプチドである。一実施態様では、前記リンカーは(GxS)nであり、G=グリシン、S=セリン、(x=3、n=8、9又は10及びm=0、1、2又は3)又は(x=4及びn=6、7又は8及びm=0、1、2又は3)、好ましくはx=4、n=6又は7及びm=0、1、2又は3、より好ましくはx=4、n=7及びm=2である。一実施態様では、前記リンカーは(G4S)6G2である。

【0120】

そのような多重特異性抗体の一実施態様は、実施例の表1：配列番号4、11及び13のアミノ酸配列を含む三重特異性Her1/Her3-scFab-IGF1Rに与えられる。

【0121】

以下の実施例、配列表及び図面は、本発明、添付の特許請求の範囲に記載されている真の範囲の理解を助けるために提供される。変更は、本発明の精神を逸脱することなく、記載された手順で行うことができることが理解される。

【0122】

アミノ酸配列の説明

配列番号1：HC/ノブ/Her2/VEGF

配列番号2：HC/ホール/Her2/VEGF

配列番号3：HC/ノブ/Her1/Her3

配列番号4：HC/ホール/Her1/Her3

配列番号5：HC/ホール/xAng2

配列番号6：HC/ノブ/xAng2

配列番号7：HC/ホール/xIGF1R

配列番号8：HC/ホール/xHer3

配列番号9：HC/ホール/xHer2

配列番号10：HC/ホール/xcMet

配列番号11：HC/ホール/scFabIGF1R

10

20

30

40

50

配列番号 12 : H C / ホール / x H e r 1 / H e r 3
 配列番号 13 : L C / H e r 1 / H e r 3
 配列番号 14 : L C / H e r 2 / V E G F
 配列番号 15 : L C / x A n g 2
 配列番号 16 : L C / x I G F 1 R
 配列番号 17 : L C / x H e r 3
 配列番号 18 : L C / x H e r 2
 配列番号 19 : L C / x c M e t
 配列番号 20 : L C / x H e r 1 / H e r 3

【 0 1 2 3 】

10

以下に、本発明の実施態様が一覧表示される：

1 . A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

20

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖
 を含む多重特異性抗体。

2 . 抗体は二価、三重又は四重特異性抗体であることを特徴とする、実施態様 1 に記載の多重特異性抗体。

3 . 抗体は三重特異性抗体であり、

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

30

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び
 b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖
 を含むことを特徴とする、実施態様 1 に記載の多重特異性抗体。

4 . A) のもとで、第一抗原はヒト H E R 1、第二抗原はヒト H E R 3 及び第三抗原はヒト H E R 2 であり；又は

40

B) のもとで、第一抗原はヒト H E R 2、第二抗原はヒト H E R 1 及び第三抗原はヒト H E R 3 である、実施態様 3 に記載の多重特異性抗体。

5 . 抗体は二価、三重特異性抗体であり、

a) ヒト H E R 1 及びヒト H E R 3 に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；
 及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、ヒト H E R 2 に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

を含む実施態様 1 に記載の多重特異性抗体。

50

6．抗体は、配列番号4、9、13及び18のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、実施態様5に記載の多重特異性抗体。

7．A)のもとで、第一抗原はヒトHER1、第二抗原はヒトHER3及び第三抗原はヒトcMETであり；又は

B)のもとで、第一抗原はヒトcMET、第二抗原はヒトHER1及び第三抗原はヒトHER3である、実施態様3に記載の多重特異性抗体。

8．抗体は四重特異性抗体であり、

a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖を含むことを特徴とする、実施態様1に記載の多重特異性抗体。

9．b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインVL及びVHは互いに置換されており；及び定常ドメインCL及びCH1は互いに置換されている、実施態様1から5、7及び8の何れかーに記載の多重特異性抗体。

10．b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、可変ドメインVL及びVH(のみ)が互いに置換されている、実施態様1から5、7及び8の何れかーに記載の多重特異性抗体。

11．b)のもとで修飾された軽鎖及び修飾された重鎖において、定常ドメインCL及びCH1(のみ)が互いに置換されている、実施態様1から5、7及び8の何れかーに記載の多重特異性抗体。

12．a)の完全長抗体の重鎖のCH3ドメイン及びb)の完全長抗体の修飾された重鎖のCH3ドメインの各々は抗体のCH3ドメイン間の元のインターフェイスを含むインターフェイスで接触することを特徴とし；

前記インターフェイスは三重特異性又は四重特異性抗体の形成を促進するように改変され、その改変は

i) 三重又は四重特異性抗体内の他の重鎖のCH3ドメインの元のインターフェイスで接触する一重鎖のCH3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、他の重鎖のCH3ドメインのインターフェイス内のキャピティの中に置くことができる、一重鎖のCH3ドメインのインターフェイス内の隆起を作成するように一重鎖のCH3ドメインが改変され、

及び

ii) 三重又は四重特異性抗体内の第一CH3ドメインの元のインターフェイスで接触する第二CH3ドメインの元のインターフェイス内で、

アミノ酸残基はより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それによって、その中に第一CH3ドメインのインターフェイス内の隆起を置くことができる、第二CH3ドメインのインターフェイス内のキャピティを作成するように他の重鎖のCH3ドメインが改変されることを特徴とする、実施態様1から11の何れかーに記載の多重特異性抗体。

13．より大きな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)からなる群から選択され、及びより小さな側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)からなる群から選択されることを特徴とする、実施態様12に記載の多重特異性抗体。

14．両方のCH3ドメインの間にジスルフィド架橋を形成することができるように、各CH3ドメインの対応する位置のアミノ酸としてシステイン(C)を導入することにより、両方のCH3ドメインが更に改変されることを特徴とする、実施態様12又は13に記載の多重特異性抗体。

15．a)

10

20

30

40

50

A) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

B) a) 第一抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第二抗原及び第三抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖；

又は

C) a) 第一抗原及び第二抗原に特異的に結合する完全長抗体の軽鎖及び重鎖；及び

b) 可変ドメイン V L 及び V H は互いに置換されており、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いに置換されている、第三抗原及び第四抗原に特異的に結合する完全長抗体の修飾された軽鎖及び修飾された重鎖

をコードする核酸分子を含むベクターで宿主細胞を形質転換する工程；

b) 前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程；及び

c) 前記培養物から前記抗体分子を回収する工程

を含む、実施態様 1 から 1 4 に記載の多重特異性抗体の調製のための方法。

16. 実施態様 1 から 1 4 に記載の多重特異性抗原結合タンパク質をコードする核酸。

17. 実施態様 1 から 1 4 に記載の多重特異性抗原結合タンパク質をコードする核酸を含むベクター。

18. 実施態様 1 7 に記載のベクターを含む宿主細胞。

19. 実施態様 1 から 1 4 に記載の抗体の組成物、好ましくは薬学的又は診断用組成物。

20. 実施態様 1 から 1 4 に記載の抗体及び少なくとも一の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物。

21. 癌の治療において使用のための、実施態様 1 から 1 4 の何れかーに記載の抗体。

22. 癌の治療のための医薬の製造のための、実施態様 1 から 1 4 の何れかーに記載の抗体の使用。

23. 実施態様 1 から 1 4 に記載の抗体の治療的有効量を患者に投与することを特徴とする、治療を必要とする患者の治療のための方法。

24. 実施態様 1 から 1 4 に記載の抗体の治療的有効量を患者に投与することを特徴とする、癌に罹患した患者の治療のための方法。

【実施例】

【0124】

材料と方法

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 に既述されるように、標準的な方法が DNA を操作するために使用された。分子生物学的試薬を、製造元の指示に従って使用した。

【0125】

DNA 及びタンパク質配列分析及び配列データ管理

ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の塩基配列に関する一般情報については、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health Publication No 91-3242, Bethesda (1991) に与えられる。抗体鎖のアミノ酸は E U 番号付けに従って番号付けされる (Edelman, G.M., et al., PNAS 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH Publication No 91-3242 (1991))。G C G (Genet

10

20

30

40

50

ics Computer Group, Madison, Wisconsin) ソフトウェアパッケージバージョン 10.2 及びインフォマックスのベクターNTIアドバンススイート (Infomax's Vector NTI Advance suite) のバージョン 8.0 が配列の作成、マッピング、解析、注解及び図解のために使用された。

【0126】

DNA配列決定

DNA配列は、Sequiseive (Vaterstetten, Germany) と Geneart AG (Regensburg, Germany) で行った二本鎖配列決定により決定した。

【0127】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、自動化された遺伝子合成による合成オリゴヌクレオチド及びPCR産物から、Geneart AG (Regensburg, Germany) により調製された。特異な制限酵素切断部位に隣接する遺伝子セグメントがpGA18 (amp^R) プラスミドにクローニングされた。プラスミドDNAを形質転換した細菌から精製し、UV分光法により濃度を決定した。サブクローニング遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。

【0128】

発現プラスミドの構築

ロシュ発現ベクターを、すべての抗体鎖の構築のために使用した。ベクターは、以下の要素からなる：

- 選択マーカーとしてのハイグロマイシン耐性遺伝子、
- エプスタイン-バーウイルス (EBV) の複製起点、oriP、
- 大腸菌でこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製起点
- 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、
- ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) からの前初期エンハンサー及びプロモーター、
- ヒト免疫グロブリン1ポリアデニル化 (「ポリA」) シグナル配列。

CH-CLクロスオーバーによる重鎖又は軽鎖並びにcrossmaabコンストラクトを含む免疫グロブリンは遺伝子合成により調製され、上記のようにpGA18 (amp^R) プラスミドにクローニングされた。可変重鎖コンストラクトは、cdsの上流の5' BamHI及びCH1ドメインに位置する3' KpnI制限部位を使用して方向性クローニングにより構築された。可変軽鎖コンストラクトはVL及びCLを含む遺伝子合成として発注され、cdsの上流の5' BamHI及びストップコドンの下流に位置する3' XbaI制限部位を使用して方向性クローニングにより構築された。Crossmaab抗体は完全なコード配列 (VL-CH1又はVH-CL-CH2-CH3) により、又はコード配列中のユニークな制限部位を有する部分的な遺伝子合成としての何れかで構築された。交差した軽鎖 (VL-CH1) の場合、5' BamHI及び3' XbaI制限部位を有するcds全体をカバーする遺伝子合成のみが発注された。また重鎖コンストラクトにおいては、重鎖ベクターのCH2ドメインの3' XhoI制限部位が5' BamHI制限部位による方向性クローニングのために用いられた。最終的な発現ベクターは、大腸菌細胞に形質転換し、発現プラスミドDNAを単離し (ミニプレップ)、制限酵素分析及びDNA配列決定に供した。正しいクローンを150mlのLB-Amp培地中で増殖させ、再びプラスミドDNAを単離し (マキシプレップ)、配列の完全性をDNA配列決定によって確認した。

【0129】

HEK293細胞における免疫グロブリン変異体の一過性発現

組換え免疫グロブリン変異体は、製造業者 (Invitrogen, USA) の指示に従ってFreeStyleTM 293発現システムを使用して、ヒト胎児腎臓293-F細胞の一過性トランスフェクションによって発現させた。小規模試験発現のため、 0.5×10^6 のHE

10

20

30

40

50

K 2 9 3 F 細胞 / m l の 3 0 m l を トランスフェクションの一日前に播種した。翌日、プラスミド DNA (培養体積の m l 当たり 1 μ g の DNA) が、 1 . 2 m l の O p t i - M E M (登録商標) I 低血清培地 (Reduced Serum Medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と混合され、続いて、 4 0 μ l の 2 9 3 F e c t i n ^{T M} トランスフェクション試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) が添加された。混合物を室温で 1 5 分間インキュベートし、細胞に滴下した。トランスフェクションの一日後、各フラスコに、 3 0 0 μ l の L - グルタミン (2 0 0 m M、Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 及び f e e d 7 (L - アスパラギン、H y P e p 1 5 1 0、クエン酸鉄 (I I I) アンモニウム、エタノールアミン、微量元素、D - グルコース、R D M I を含まないフリースタイル培地を含む) の 6 0 0 μ l が供給された。トランスフェクションの三日後、細胞濃度、培地中の細胞濃度、生存能力及びグルコース濃度を、自動化された細胞生存率分析器 (V i - C E L L ^{T M} X R、Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 及びグルコースメーター (A c c u - C H E K (登録商標) Sensor comfort, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて測定した。加えて、各フラスコに、L - グルタミンを 3 0 0 μ l、非必須アミノ酸溶液 (P A N ^{T M} Biotech, Aidenbach, Germany) を 3 0 0 μ l、ピルビン酸ナトリウムを 3 0 0 μ l (1 0 0 m M、Gibco, Invitrogen)、f e e d 7 を 1 . 2 m l 及びグルコース (D - (+) - グルコース溶液 4 5 %、シグマ) を 5 g / L、供給した。最後に、トランスフェクションの 6 日後、抗体は、周囲温度で 1 5 分間、X 3 R M u l t i f u g e (Heraeus, Buckinghamshire, England) で 3 5 0 0 r p m で遠心分離により回収し、上清を滅菌 S t e r i f l i p フィルターユニット (0 . 2 2 m m の M i l l i p o r e E x p r e s s P L U S P E S メンブラン、Millipore, Bedford, MA) を通して濾過し、さらに使用するまで - 2 0 で保存した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

二重特異性抗体及びコントロール抗体の精製

二価の三重特異性抗体は、プロテイン A - セファロース ^{T M} (GE Healthcare, Sweden) を使用する親和性クロマトグラフィー及びスーパーデックス 2 0 0 サイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製された。簡潔には、無菌ろ過した細胞培養上清を、P B S バッファー (1 0 m M の N a 2 H P O 4 , 1 m M の K H 2 P O 4 , 1 3 7 m M の N a C l 及び 2 . 7 m M の K C l , p H 7 . 4) で平衡化した H i T r a p プロテイン A H P (5 m l) カラムに適用した。非結合タンパク質は、平衡バッファーを用いて洗浄した。抗体及び抗体変異体は、0 . 1 M クエン酸バッファー、p H 2 . 8 で溶出し、タンパク質を含む画分は、0 . 1 m l の 1 M トリス、p H 8 . 5 で中和した。次いで、溶出したタンパク質画分をプールし、アミコンウルトラ遠心濾過装置 (M W C O : 3 0 K , M i l l i p o r e) で 3 m l の体積まで濃縮し、2 0 m M のヒスチジン、1 4 0 m M の N a C l、p H 6 . 0 で平衡化した、スーパーデックス 2 0 0 H i L o a d 1 2 0 m l 1 6 / 6 0 又は 2 6 / 6 0 ゲル濾過カラムにロードした。5 % 未満の高分子量凝集体を含有する精製二重特異性抗体及びコントロール抗体を含む画分がプールされ、- 8 0 で 1 . 0 m g / m l の一定分量として保存した。

【 0 1 3 1 】

タンパク質の定量

タンパク質は、プレパックされたポロス (登録商標) A プロテイン A カラム (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を装着し、自動化された U l t i m a t e 3 0 0 システム (Dionex, Idstein, Germany) を使用して、アフィニティークロマトグラフィーにより定量した。全てのサンプルはバッファー A (0 . 2 M の N a 2 H P O 4 \cdot [2 H 2 O]、p H 7 . 4) にロードされ、バッファー B (0 . 1 M のクエン酸、0 . 2 M の N a C l、p H 2 . 5) で溶出した。タンパク質濃度を決定するために、吸光係数 1 . 6 2 を全てのサンプルに使用した。

【 0 1 3 2 】

精製タンパク質の分析

精製されたタンパク質サンプルのタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて計算され

たモル吸光係数を用いて、280 nmでの光学密度(OD)を測定することによって決定した。二重特異性抗体及びコントロール抗体の純度及び分子量は、還元剤(5 mMの1,4-ジチオトレイトール)の存在下及び非存在下でのSDS-PAGE、及びクーマシーブリリアントブルーによる染色により分析された。NuPAGE(登録商標)Pre-Castゲルシステム(Invitrogen, USA)を、製造業者の取扱説明書に従って使用した(4-20%のトリスグリシン・ゲル)。二重特異性抗体とコントロール抗体サンプルの凝集体含量は、25で200 mMのKH₂PO₄, 250 mMのKCl, pH 7.0のランニングバッファー中で、Superdex 200分析的サイズ排除カラムを使用して高性能SECにより分析された。25 µgのタンパク質が流速0.5 ml/分でカラムに注入され、50分間にわたり均一濃度で溶出された。還元された二重特異性抗体軽鎖と重鎖のアミノ酸主鎖の完全性は、ペプチド-N-グリコシダーゼF(Roche Molecular Biochemicals)による酵素処理によるN-グリカンの除去後にナノエレクトロスプレー-Q-TOF質量分析法により検証された。

10

20

30

40

50

【0133】

小規模分析のための免疫沈降

30 µgのタンパク質を、5%のTween(登録商標)20を補充したPBS(PBS-T, pH 7.4, Fluka Analytical, Steinheim, Germany)で、すべてのサンプルについて同じ総反応容量に希釈した。126 µlのDynabeads(登録商標)プロテインA(Dynabeads(登録商標)当たり0.24 µgのヒトIgG結合能力, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)が加えられ、そしてその溶液を、磁気ビーズに結合されたプロテインAへのヒトIgG Fcの結合を可能にするために室温で20 rpmで90~120分間インキュベートした(1.4 mlの総反応容量)。ビーズを1 mlのPBS-Tで3回洗浄し、チューブの底の溶液を回収するために0.4 x gで30秒間遠心分離した。上清を廃棄し、タンパク質を溶出させるために、ダイナビーズは、100 mMのクエン酸、pHが3(クエン酸一水和物, Sigma)の30 µlと共にインキュベートした。その後、溶液を、2 Mのトリス、pH 9(Fisher Scientific)の3 µlで中和した。

【0134】

分析用HPLC

抗体は、TSK-GEL G3000SWゲル濾過カラム(7.5 mm ID x 30 cm, TosoHaas Corp., Montgomeryville, PA, USA)を装着したAgilent 1100 HPLC(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて分析した。18 µlの溶出したタンパク質をバッファーA 300 mMのNaCl、pH 7.5中の(0.05 MのK₂HPO₄/KH₂PO₄)中でカラムにロードし、サイズに基づいて分離した。

【0135】

還元及び非還元SDS-PAGE

溶出したタンパク質の7 µlを2 x サンプルバッファー(NuPAGE(登録商標) LDSサンプルバッファー, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と混合し、別の7 µlは10%の還元剤(NuPAGE(登録商標)サンプル還元剤, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を含む2 x サンプルバッファーと混合した。サンプルは10分間、70まで加熱し、プレキャストNuPAGE(登録商標)4-12%のBisTrisゲル(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)上でロードした。ゲルは、200 Vで125 mAで45分間流した。その後、ゲルは、ミリポア水で3回洗浄し、Simply BlueTM Safe Stainで染色した(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。ゲルを、ミリポア水で一晩脱色した。

【0136】

細胞株

A431は、4 mMのL-グルタミン、0.1 mMの非必須アミノ酸及び10%の熱不活性化ウシ胎児血清(Gibco)を補充したRPMI 1640培地(Gibco)中に維持された。MDA-MB175 V II細胞は、グルタマックス(Glutamax)を補充したDMEM/F12培地(Gibco)中に維持された。細胞株の増殖は、標準的な細胞培養ブ

ロトコルに従った。

【0137】

表面プラズモン共鳴

全ての実験はピアコア T100 (GE Healthcare)で行った。実験結果は、T100のコントロール及び評価ソフトウェアパッケージ (GE Healthcare, v2.03)を用いて分析した。アッセイフォーマットはCM-5チップ上での「マルチサイクルカインेटィクス」測定であった。分析される抗体は、アミン結合抗ヒトIgG-Fc抗体 (GE Healthcare BR-1008-39)を介して捕捉された。DAF及びペルツズマブを、基準対照として用いた。濃度系列を用いて、それぞれの抗原(ヒトHer1、HER2、及びHER3外部ドメイン)の7つの漸増濃度を別々に注入した。37℃で各MAbs<HerX>に結合するHerXの動力学的特性評価：標準的な動力学は、ピアコア評価ソフトウェアによる(C=0nm及びFC1=空白面に対する)二重参照によるラングミュア1:1結合モデルを用いた、観測された会合相及び解離相の表面プラズモン共鳴シグナルの時間経過のフィッティングによって評価した。ランニングバッファはPBS-Tであった。希釈バッファは、BSAを含有するPBST(c=1mg/mL)であった。

10

【0138】

フローセル2、3、及び4上でのMAb<HerX>の捕捉は、濃度はおよそc=1nMで、5µl/分、時間は72秒であった。分析物サンプル：HerXの7つの漸増濃度は180秒の結合時間のために50µl/分の流速で注入した(c=1.23-900nM、希釈係数3)。解離時間：1800秒。各濃度は重複して分析した。

20

【0139】

最終的な再生は、各サイクル後に(ベンダーが推奨する)3MのMgCl₂を使用して、120秒の接触時間及び50µl/分の流速で実施した。同時結合の分析：Her2/Her3、Her3/Her2又はHer1/Her2は、それぞれ180秒の接触時間で二重注入モードを使用して連続的に注入した。抗原濃度は、それぞれの抗原において、動力学実験において観察された飽和状態で選択された。コントロールとして、同一の抗原の第二回目の注入は応答レベルを上げず、平衡に達したことを示している。25℃の温度が解離を最小化するために選択された。各組み合わせにおいて三重に測定された。流速は30mL/分、2回の注入による二重注入で、各々は180秒。

30

【0140】

本発明の様々な多重特異性抗体は、概念を評価するために設計された(下記表1参照)。典型的にはそれらはノブ・イントゥー・ホール修飾をCH3ドメイン内に(それぞれの配列に見られるように)含む。

【0141】

表 1 : 本発明による多重特異性抗体の設計 : 数字は、配列表に記載の配列番号を示す (xは、軽鎖及び重鎖において、C H1及びCLが交換されたことを示す)。

#	二重特異性 Her2/Vegf (KiHを有する)	三重特異性Her2/Vegf xAng2(ホール)	三重特異性Her2/Vegf xAng2(ノブを有する)	三重特異性Her2/Vegf xIGF1R	三重特異性Her2/Vegf xHer3	四重特異性Her2/Vegf xHer1/3
HC1	1	1	2	1	1	1
HC2	2	5	6	7	8	12
LC1	14	14	14	14	14	14
LC2	-	15	15	16	17	20

10

表1 (続き):数字は、配列表に記載の配列番号を示す。

20

#	二重特異性親Her1/Her3 (KiHを有する)	三重特異性Her1/Her3 xcMet	三重特異性Her1/Her3 xHer2	三重特異性Her1/Her3 xAng2(ホール)	三重特異性Her1/Her3 xAng2(ノブ)	三重特異性Her1/Her3 scFab-IGF1R
HC1	3	4	4	3	4	4
HC2	4	10	9	5	2	11
LC1	13	13	13	13	13	13
LC2	-	19	18	15	15	-

30

【 0 1 4 2 】

実施例 1 :

ノブ・イントゥー・ホール V E G F - H e r 2 D A F (二重親和性抗体) の分析 V E G F - H e r 2 - D A F は以前に記載されている (Bostrom, J., et al., Science 323 (2009) 1610-1614)。ノブ・イントゥー・ホール技術は V E G F - H e r 2 - D A F の発現を妨害しないという証拠を提供するため、我々は、この抗体の重鎖の「ノブ・イントゥー・ホール」(K I H) のアミノ酸交換を設計した (重鎖 1 : T 3 6 6 W、重鎖 2 : T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V)。更に、ジスルフィド架橋が、この抗体の C H 3 ドメインに導入された (重鎖 1 : S 3 5 4 C、重鎖 2 : Y 3 4 9 C)。

40

【 0 1 4 3 】

最初の実験では、ホール重鎖に対する三つの異なるノブ重鎖の比率 (K : H 比率) がトランスフェクトされた (配列番号 : 1、2、14) : K : H = 1 : 1、K : H = 1 . 2 : 1 及び K : H = 1 . 5 : 1。表 2 において、試験発現の上清中の I g G の収量が示されている。

【 0 1 4 4 】

表 2 : VEGF-Her2-DAF試験発現の全IgG収量に対する百分率で表記される完全抗体、凝集体及び不完全抗体の割合（各ピークの面積率を經由して計算）。

	K:H=1:1		K:H=1.2:1		K:H=1.5:1	
	反復1	反復2	反復1	反復2	反復1	反復2
抗体	94.1	90.0	80.5	83.3	68.3	76.0
凝集体	5.9	10.0	9.1	4.3	5.9	4.1
不完全抗体	-	-	10.3	12.4	25.8	19.9

10

【 0 1 4 5 】

VEGF - の Her 2 - DAF の場合、親の K : H = 1 . 5 : 1 の比率が最高の I g G 濃度を示し、その後に比率 K : H = 1 : 1 及び K : H = 1 . 2 : 1 (ホール重鎖に対するノブ重鎖) が続いた。K : H = 1 . 2 : 1 の比では、第二の反復が非常に低い I g G 濃度を含有していた。これは恐らく、発現の第一の反復で使用した細胞と比較して、細胞のこのバッチの低い生存能力によるものであった。VEGF - の Her 2 - DAF の試験発現の分析用 HPLC (表 2 、 図 6 a) 及び還元及び非還元 SDS - PAGE (図 6 b) は、ノブ重鎖が増加した K : H の比に比べて K : H = 1 : 1 の比において最少の副産物及び所望される完全抗体の最大量を示した。ノブ鎖の増加は不完全抗体の増加と相関する。試験発現の分析を加速するたじめに、全ての SDS - PAGE は、滅菌ろ過及び免疫沈降によって精製されただけの上清を用いて行った。サイズ排除クロマトグラフィーは省略した。完全抗体のサイズは、146 kDa であり、重鎖グリコシル化に起因して見かけ上高い分子量が観察される。分析 HPLC において、主要ピークは約 8 . 8 分で溶出し、完全抗体の予想サイズに対応する (図 6 c) 。従って、我々は、ノブ・イントゥー・ホールを持つ VEGF - の Her 2 - DAF を成功裏に作り出すことができる。

20

【 0 1 4 6 】

実施例 2 :

K i H V E G F - H e r 2 D A F - x A n g 2 の分析

VEGF - Her 2 - DAF の分析は「ノブ・イントゥー・ホール」(K i H) の概念は、VEGF - Her 2 - DAF フォーマットを妨害しなかったことを示した後で、我々は、一つの抗体中に DAF と cross mab フォーマットを取り入れることにより三重特異性抗体を作成することを目的とした (図 3 a 、 b) 。3 つのノブ重鎖のホール重鎖に対する比率 (K : H 比率) が 1 : 1 、 1 . 2 : 1 及び 1 . 5 : 1 (配列番号 1 、 5 、 1 4 、 及び 1 5) で発現される VEGF - Her 2 - DAF - x Ang 2 抗体は、この目的を達成するためであった。漸増するノブ鎖により、上清中の I g G の収率は減少する傾向を示した (表 3) 。

30

40

【 0 1 4 7 】

表 3 : VEGF-Her2-DAF-xAng2試験発現の全IgG収量に対する百分率で表記される完全抗体、凝集体及び完全抗体の割合（各ピークの面積率を經由して計算）。

	K:H=1:1		K:H=1.2:1		K:H=1.5:1	
	反復1	反復2	反復1	反復2	反復1	反復2
抗体	63.4	75.8	74.6	79.9	79.0	80.9
凝集体	11.7	8.8	11.3	7.9	13.5	8.6
不完全抗体	24.8	15.4	14.1	12.2	7.5	10.5

10

【 0 1 4 8 】

分析用 H P L C 及び S D S - P A G E の分析は、K : H = 1 . 5 : 1 が、副生成物に対する生成物の最良の比率を与えることを明らかにした。分析用 H P L C で観察されるように、ノブ鎖をコードするプラスミドの量が増加すると、より少ない不完全抗体をもたらした（図 7 a 及び表 3）。K : H = 1 : 1 及び K : H = 1 . 2 : 1 の比率の非還元 S D S - P A G E において（図 7 b）、5つのバンドは、完全抗体、一つの軽鎖が欠けている抗体、対をなす2つの重鎖、半分の抗体、及び恐らく二つの対合した軽鎖（それぞれ 1 4 6 k D a、1 2 2 k D a、1 0 0 k D a、7 3 k D a 及び 4 6 k D a であり、グリコシル化を含まない）を示す。特徴付けは、理論的分子量に基づいている。分析 H P L C は、凝集体（6 . 6 分）、完全抗体（8 . 8 分）及び推定される軽鎖二量体（1 0 . 5 分及び図 7 a）に対応するピークによりこの知見を確認する。発現された V E G F - H e r 2 - D A F 並びに V E G F - H e r 2 - D A F - x A n g 2 は、一過性の表現にあり、通常の抗体の範囲内の収量を与えた（表 4）。

20

【 0 1 4 9 】

表 4 : プロテイン A 沈澱及びHPLC定量により決定されるIgG濃度。

30

サンプル名	ノブ： ホールの 比率	濃度[$\mu\text{g}/\text{ml}$]		
		反復1	反復2	平均値 \pm 標準偏差
VEGF-Her2-DAF親	1:1	123.53	115.81	119.67 \pm 3.86
	1.2:1	106.22	(17.48)	106.22
	1.5:1	140.49	140.06	140.23 \pm 0.25
VEGF-Her2-DAF-x Ang2	1:1	87.05	72.11	79.58 \pm 7.47
	1.2:1	78.93	66.47	72.70 \pm 6.23
	1.5:1	63.78	63.04	63.41 \pm 0.37

40

【 0 1 5 0 】

実施例 3 :

K i H H e r 2 - V E G F D A F - x H e r 1 - H e r 3 D A F の分析

更に、一つの抗体フォーマット内に2つの二重親和性抗体を組み合わせたことが可能である。このアプローチで、2つの F a アームと通常の I g G 主鎖を持つ四重特異性抗体を生成することが本質的に可能である。ノブ・イントゥー・ホール技術が重鎖を区別するために使用され、H e r 1 - H e r 3 二重親和性 F a b アームは、重鎖と軽鎖の間の C H 1 - C L 交換によって交差された（配列番号：1、12、14、20）。K : H の固定比率

50

1.2 : 1 が重鎖のために、1 : 1 の比率が軽鎖のために使用された。還元ゲルにおいて、二つの異なる軽鎖を区別することができる (約 25 kDa)。重鎖は、還元条件下でおよそ 50 kDa に一緒に移動する。非還元条件下で、僅かな染みが完全長抗体のバンドで観察可能であり (約 150 kDa)、第二の顕著なバンドが約 110 kDa に見える (図 8 a、b)。分析用 HPLC は均質なバンドを明らかにしたので、これは不完全なジスルフィド架橋形成を示すかもしれない。さらに、これは、事前のサイズ排除精製を伴わない、上清の免疫沈降であったことは注目すべきである。生の発現値の平均は、二つの独立した生物学的発現において、59.7 及び 111.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0151】

実施例 4 :

K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 の分析

別の例で、我々は、ErbBファミリーのメンバーHER1 (EGFR)、HER2 (ErbB2) 及びHER3 (Her3) に結合することができる三重特異性抗体を生成した。ノブ・イントゥー・ホール技術が重鎖を区別するために使用され、Her2のFabアームは、重鎖と軽鎖の間のCH1-CL交換によって交差された (配列番号: 4、9、13、18)。K:Hの固定比率1.2:1が重鎖のために、1:1の比率が軽鎖のために使用された。還元ゲルにおいて、二つの異なる軽鎖を区別することができる (約 25 kDa)。二つの独立した発現における、この抗体の発現収量の平均は、91.7 及び 99.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0152】

実施例 5 :

K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 による増殖アッセイ

類表皮癌細胞株A431は、高レベルのEGFRを発現するだけでなく、HER2及びHER3もA431類表皮癌細胞で発現される。とりわけEGFRの阻害は、この細胞株における増殖に影響を与えることが知られている。三重特異性抗体K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 (配列番号: 4、9、13、18) のとりわけEGFRの部分の有効性を評価するため、治療用抗体又はコントロールIgG (JI、#015-000-003) 抗体の存在下又は非存在下で、この細胞株を用いて増殖アッセイを行った。96ウェル細胞培養プレートのウェルあたり4000細胞を、1%のウシ胎児血清 (FCS) を補充した100 μL の増殖培地中に播種した。翌日、治療用抗体を含む20 μL の低血清 (1% FCS) 培地を加え、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体の最終濃度を得た。細胞を更に5日間増殖させ、その際にATP放出アッセイ (Cell Titer Glow, Promega) を行った。発光はプレートリーダー (TECAN) で記録した。三重特異性抗体は、この細胞株で53.6 + / - 2.7% の顕著な抗増殖効果を有していた (図 10)。

実施例 6 :

K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 による増殖アッセイ

乳癌細胞株MDA-MB-175 V I I は、ErbBファミリーメンバーのHer2及びHER3を発現し、自己分泌ヘレグリンループを保有する。三重特異性抗体のHer2及びHer3部分の有効性を評価するために、この細胞株を用いて増殖アッセイを行った。96ウェル細胞培養プレートのウェルあたりに20000細胞を、10%のFCSを補充した100 μL の増殖培地中に播種した。翌日、治療用抗体を含む完全増殖培地20 μL が、最終抗体濃度が希釈系列に匹敵する方法で添加された (図 11)。更に5日間の継続増殖の後に、ATP放出アッセイを実施した (Cell Titer Glow, Promega)。発光はプレートリーダー (Tecan) で記録した。三重特異性抗体は用量依存的に増殖を阻害し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で92.1 + / - 0.3% の最大阻害に達した。

【0153】

実施例 7 (図 12 a、b、c も参照) :

K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 の結合反応速度論

三重特異性抗体K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 (配列番号: 4、9、13、及び18) 又はそれぞれの親抗体の結合反応速度論は表面プラズモン共鳴によって

10

20

30

40

50

測定した。この目的のために、HEK-293Fで生成されたErbb受容体細胞外ドメイン(ECD)を精製し、親和性及び同時結合特性を決定するための分析物として使用した。親和性データは、Her1 ECD、Her2 ECD及びHer3 ECDへの結合において、KiH Her1-Her3 DAF-x Her2及び親のDAF及びペルツズマブで同等の速度論的プロファイルを示した(表5)。

【0154】

表5：37°Cで表面プラズモン共鳴によって測定される結合反応速度論

リガンド	分析物	ka [1/M*s]	kd [1/s]	t 1/2 [min]	KD [M]
Her1-Her3 DAF-xHer2	hu HER1 ECD	1.2E+06	2.0E-02	0.6	1.7E-08
Her1-Her3 DAF-xHer2	hu HER2 ECD	1.9E+05	8.6E-04	13.5	4.4E-09
Her1-Her3 DAF-xHer2	hu HER3 ECD	2.4E+06	4.4E-03	2.6	1.8E-09
DAF	hu HER1 ECD	1.4E+06	2.1E-02	0.6	1.4E-08
ペルツズマブ	hu HER2 ECD	2.0E+05	1.0E-03	11.2	5.0E-09
DAF	hu HER3 ECD	2.0E+06	3.7E-03	3.1	1.9E-09

10

20

【0155】

次に我々は、抗原は、受容体外部ドメインの連続した注入によって同時に拘束されることができるとどうかという問に対処した。要約すると、我々はKiH Her1-Her3 DAF-x Her2が、Her1/Her2又はHer3/Her2の抗原の組合せに同時に結合できることを実証する。逆の順序で注入された場合、Her2とHer3との組み合わせにおいて、KiH Her1-Her3 DAF-x Her2はまた、抗原注入の順序から独立して両方の抗原に結合することができることが示された。ペルツズマブは、予想通り、Her2のみに結合する。DAF抗体は、予想通り、Her1又はHer3の何れかに結合する(図12a、b、c)。

30

【0156】

実施例8(図13も参照)：

A431類表皮癌細胞におけるKiH Her1-Her3 DAF-x Her2抗体による腫瘍細胞の死滅及びADCCの誘導。

三重特異性KiH Her1-Her3 DAF-x Her2抗体(配列番号：4、9、13、及び18)のADCCのプロセスと腫瘍細胞死滅をイメージングするため、A431類表皮癌細胞を、ガラスカバーガラス上で増殖させ、緑色の生存率マーカー(CMFD A)で標識した。次に、赤の膜染色(PKH26)で染色したNK92ナチュラルキラー細胞が、HerのメンバーであるHer1、Her2及びHer3に対して指向される抗体KiH Her1-Her3 DAF-x Her2と共に腫瘍細胞上に添加された。イメージングは、CO2と湿度を供給する加熱されたステージ上で、63x/1.2NA水浸レンズを使用するLEICA SP5x白色光レーザー共焦点顕微鏡で実施した。抗体/NK細胞を添加して数分以内に、キラー細胞が腫瘍を攻撃し始める。これは、Fc RII(CD16)受容体を介して腫瘍結合した抗体と相互作用することによって媒介される。緑色蛍光(=生存率マーカー)の喪失によって証明されるように、腫瘍細胞の急速な

40

50

溶解をもたらす細胞溶解性顆粒（パーフォリン及びグランザイムを放出する）がいかにして腫瘍細胞表面に向けて動員されるかをはっきりと見ることができる。注目すべきは、抗体の三重結合形態によって媒介される激しく急速な攻撃である。2.5時間以内に、実質的に全ての腫瘍塊が除去されている。結果を図13に示す。

【0157】

実施例9

糖操作型、アフコシル化された三重特異性KiH Her1 - Her3 DAF - x Her2抗体（フコースの量は5%と65%の間）及び1 μ g/mlのspecLysis%によるKPL-4又はA431腫瘍細胞のインビトロのADCC

抗体KiH Her1 - Her3 DAF - x Her2（配列番号：4、9、13、18）の糖操作型、アフコシル化バージョンが、HEK293細胞又はCHO細胞において、幾つかのプラスミド、あるものは抗体発現のため、一つは融合GnTIIIポリペプチド発現のため（GnT - III発現ベクター）、そして一つはマンノシダーゼII発現のため（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）による、4（抗体ベクター）：1（GnT - III発現ベクター）：1（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）の比率での同時トランスフェクションにより調製される。

【0158】

完全抗体の重鎖及び軽鎖のDNA配列は、哺乳動物発現ベクター（重鎖及び軽鎖について1つずつ）に、MPSVプロモーターの制御下及び合成ポリA部位の上流にサブクロニングされ、各ベクターは、EBV OriP配列を有した。抗体は、リン酸カルシウムトランスフェクション法を使用して抗体の重鎖及び軽鎖の発現ベクターを用いて、HEK293 - EBNA細胞又はCHO細胞を同時トランスフェクトすることによって産生された。指数関数的に増殖しているHEK293 - EBNA細胞は、リン酸カルシウム法によりトランスフェクトされる。糖鎖操作抗体の産生において、細胞は、幾つかのプラスミド、あるものは抗体発現のため、一つは融合GnTIIIポリペプチド発現のため（GnT - III発現ベクター）、そして一つはマンノシダーゼII発現のため（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）による、4（抗体ベクター）：1（GnT - III発現ベクター）：1（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）の比率での同時トランスフェクションにより調製される。細胞を、10%のFCSを補填したDMEM培養培地を使用してTフラスコ中で付着単層培養として増殖させ、それらが50及び80%集密になったときにトランスフェクトした。T150フラスコのトランスフェクションでは、FCS（最終10%v/vで）を補填した25mlのDMEM培養培地に形質移入の24時間前に1500万細胞を播種し、細胞を5%CO₂大気のインキュベーター中に37°Cで一晩置く。産生される全ての抗体において、DNA、CaCl₂及び水の溶液は、188 μ gの総プラスミドベクターDNA（幾つかのプラスミド、あるものは抗体発現のため、一つは融合GnTIIIポリペプチド発現のため（GnT - III発現ベクター）、そして一つはマンノシダーゼII発現のため（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）を4（抗体ベクター）：1（GnT - III発現ベクター）：1（ゴルジマンノシダーゼII発現ベクター）の比率で）、最終容積が938 μ lまでの水及び938 μ lの1MのCaCl₂溶液を混合することによって調製されるこの溶液に、1876 μ lの50mMのHEPES、280mMのNaCl、1.5mMのNa₂HPO₄溶液（pH7.05）を加え、直ぐに10秒間混合し、室温で20秒間静置した。懸濁液を、2%のFCSを補充した46mlのDMEMで希釈し、既存の培地の代わりに2つのT150フラスコに分けた。

【0159】

細胞を約17から20時間、37°C、5%CO₂でインキュベートし、ついで培地を25mlのDMEM、10%FCSに置換する。条件培養培地を210 \times gでの15分の遠心分離によってトランスフェクションから7日後に収集し、溶液を滅菌濾過（0.22 μ mフィルター）し、0.01%w/vの最終濃度のアジ化ナトリウムを加え、4°Cに維持した。

【0160】

10

20

30

40

50

分泌されたアフコシル化抗体は、精製され、抗体のFc領域に結合したオリゴ糖を例えばMALDI/TOF-MSにより分析した(例えば、国際公開第2008/077546号に記載される)。この分析のためにオリゴ糖が酵素的にPNGアゼF消化によって抗体から放出され、抗体はPVD膜上に固定化されるか又は溶液中のどちらかである。放出オリゴ糖を含む得られた消化溶液は、MALDI TOF-MS分析のために直接調製されるか、又はMALDI TOF-MS分析のためのサンプル調製に先立ち、EndoHグリコシダーゼで更に消化される。Asn297における糖鎖内のフコースの分析した量は65-5%の間にある。

【0161】

標的細胞(KPL4乳癌細胞又はA431類表皮癌細胞、RPMI1640+2mMのL-アラニル-L-グルタミン+10%FCsで培養)は指数増殖期にトリプシン/EDTA(Gibco #25300-054)により収集される。洗浄工程及び細胞数と生存率をチェックした後に、必要なアリコートは、カルセインを用いて、細胞インキュベーター中で37で30分間標識される(Invitrogen #C3100MP; 1バイアルを、5mlの培地に、5ミオ細胞に対して50µlのDMSOに再懸濁させた)。その後、AIM-V培地で細胞を3回洗浄し、細胞数及び生存率をチェックし、細胞数を0.3Mio/mlに調節した。

10

【0162】

その間に、エフェクター細胞としてのPBMC(末梢血単核細胞)を、製造者のプロトコル(洗浄工程を400gで1x、350gで2x、各10分)に従い、密度勾配遠心分離(Histopaque-1077、Sigma #H8889)により調製した。細胞数及び生存率をチェックし、細胞数を15Mio/mlに調節した。

20

【0163】

100µlのカルセイン染色された標的細胞を、丸底96ウェルプレートに配し、50µlに希釈し、アフコシル化抗体(Mab205.10.1、Mab205.10.2、Mab205.10.3、以下を参照)を添加し、50µlのエフェクター細胞を添加した。いくつかの実施態様では、標的細胞をRedimune(登録商標)NFリキッド(ZLB Behring)と、10mg/mlのRedimune濃度で混合した。

【0164】

抗体なしに標的とエフェクター細胞を同時培養することにより決定される自発的な溶解がコントロールとなり、最大溶解が、標的細胞のみの1%のトリトン-X-100溶解により決定される。プレートを、加湿された細胞インキュベーターにおいて37で4時間インキュベートした。

30

【0165】

標的細胞の死滅を、製造者の使用説明書に従い、細胞傷害検出キット(LDH検出キット、Roche #1644793)を使用し、ダメージを受けた細胞から放出されるLDH(乳酸デヒドロゲナーゼ)を測定することにより評価した。簡単に述べると、各ウェルからの100µlの上清を、透明な平底の96ウェルプレートにおいて、キットからの100µlの基質と混合した。基質の色調反応のVmax値を、少なくとも10分、490nmにてELISAリーダーで測定した。特定の抗体媒介性死滅のパーセンテージを、次のようにして算出した： $(A - SR) / (MR - SR) \times 100$ 、ここでAは特定の抗体濃度におけるVmaxの平均であり、SRは自然放出のVmaxの平均であり、MRは最大放出のVmaxの平均である。

40

【0166】

付加的な読み取りとして、インタクトな標的細胞のカルセイン保持を、ホウ酸塩バッファー(5mMのホウ酸ナトリウム+0.1%のトリトン)において、残存している標的細胞を溶解させ、蛍光プレートリーダーにおけるカルセイン蛍光を測定することによって評価した。

【0167】

実施例10:

インビボ抗腫瘍効果

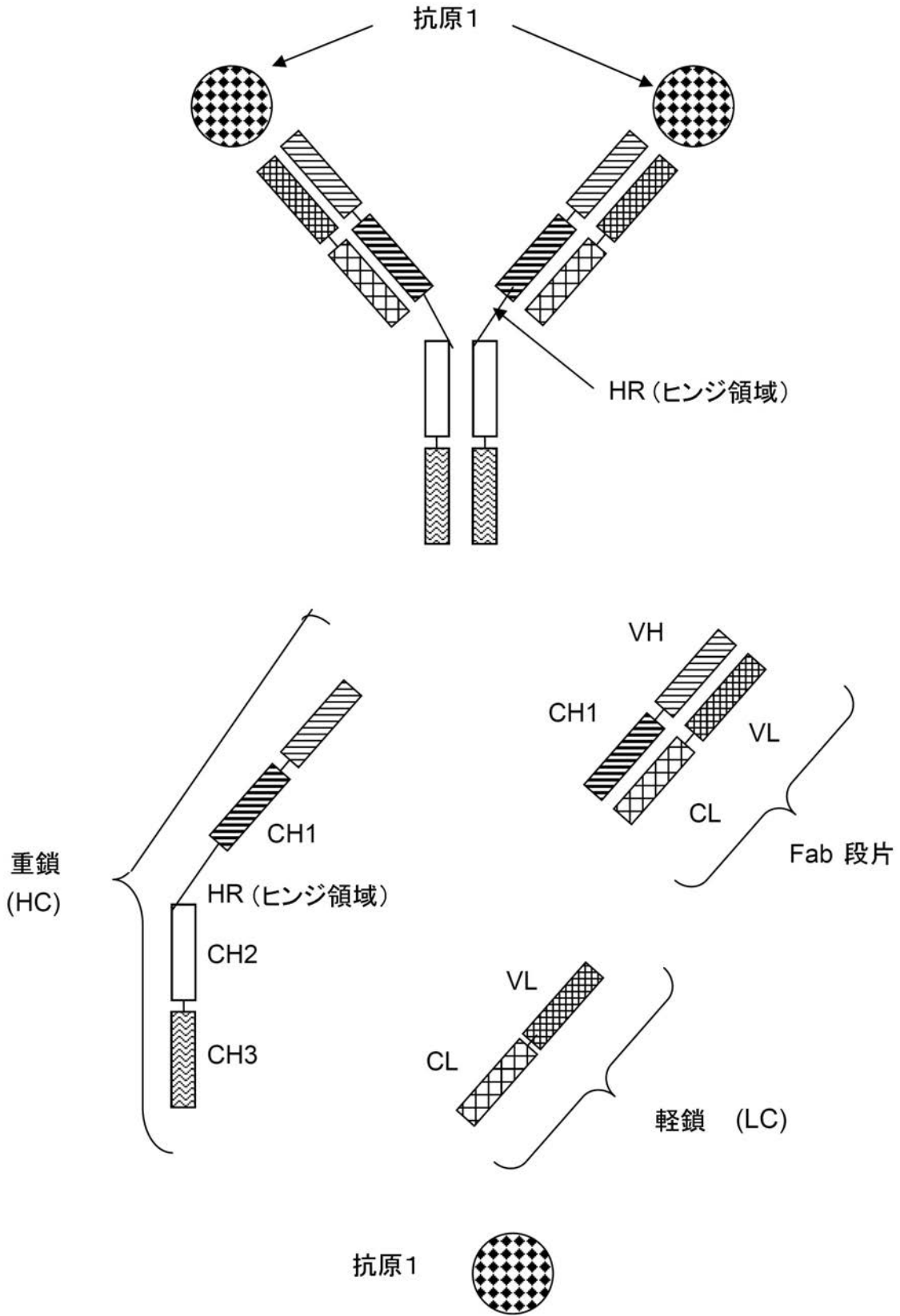
50

抗体 K i H H e r 1 - H e r 3 D A F - x H e r 2 (配列番号 4、9、13 及び 18) のインビボでの抗腫瘍効果は、S C I D ベージュ又はヌードマウスに移植した様々な腫瘍起源 (例えば、肺癌、S C C H N、乳房及び膵臓癌) の細胞及びフラグメントベースモデルで検出することができる。一例は、A 4 3 1 類表皮癌細胞異種移植モデルである。

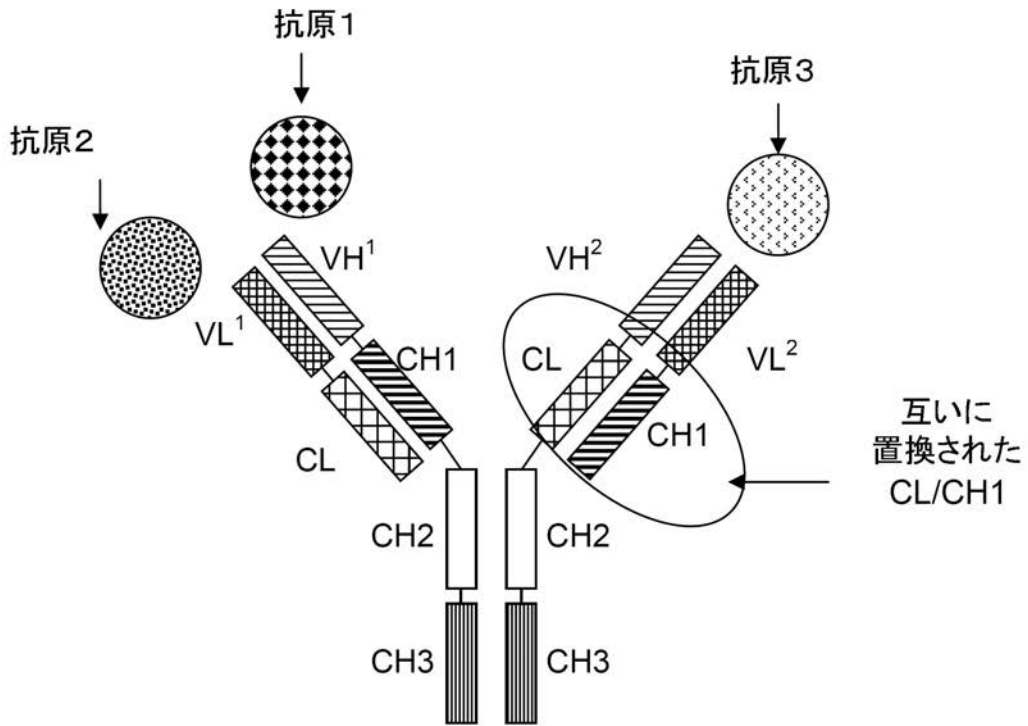
【 0 1 6 8 】

A 4 3 1 類表皮癌細胞は、細胞表面上で H E R 1 及びまた H E R 2 及び H E R 3 を発現する。A 4 3 1 細胞は、対数増殖期に標準的な細胞培養条件下で維持される。1 0 0 0 万個の細胞が S C I D ベージュマウスに移植される。腫瘍が確立され、1 0 0 - 1 5 0 m m³ のサイズに達した後に治療が開始される。マウスは、例えば、2 0 m g / k g の抗体 / マウスの負荷用量、その後、1 0 m g / k g の抗体 / マウスを毎週一回により治療される。腫瘍体積は週に 2 回測定され、平行して動物の体重がモニターされる。

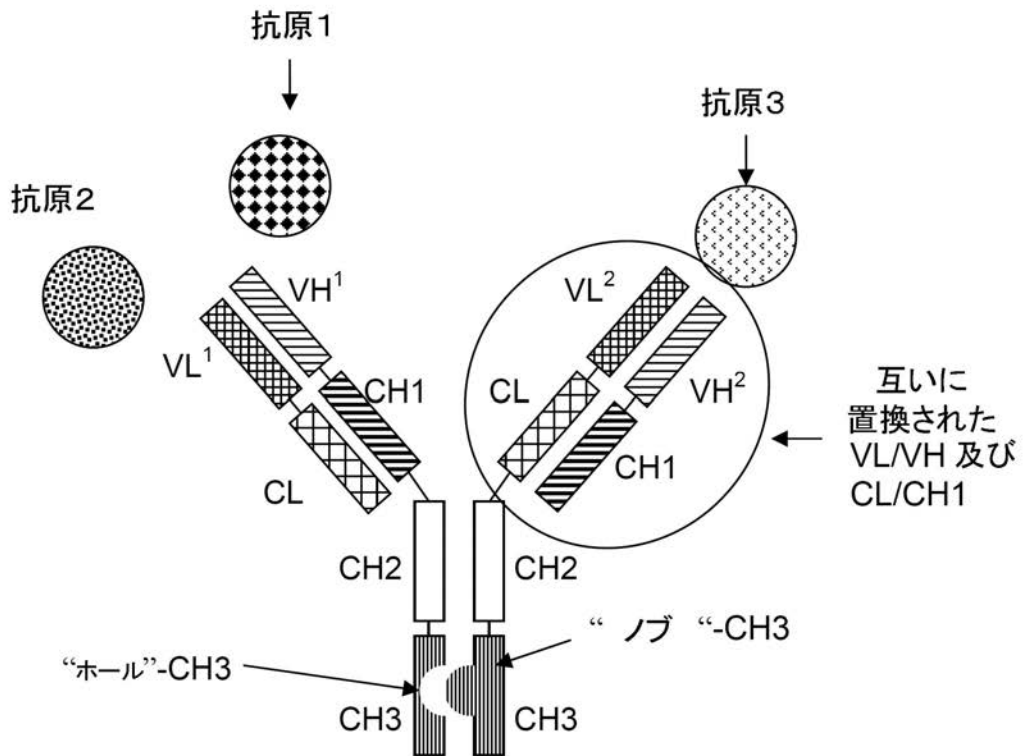
【 図 1 】



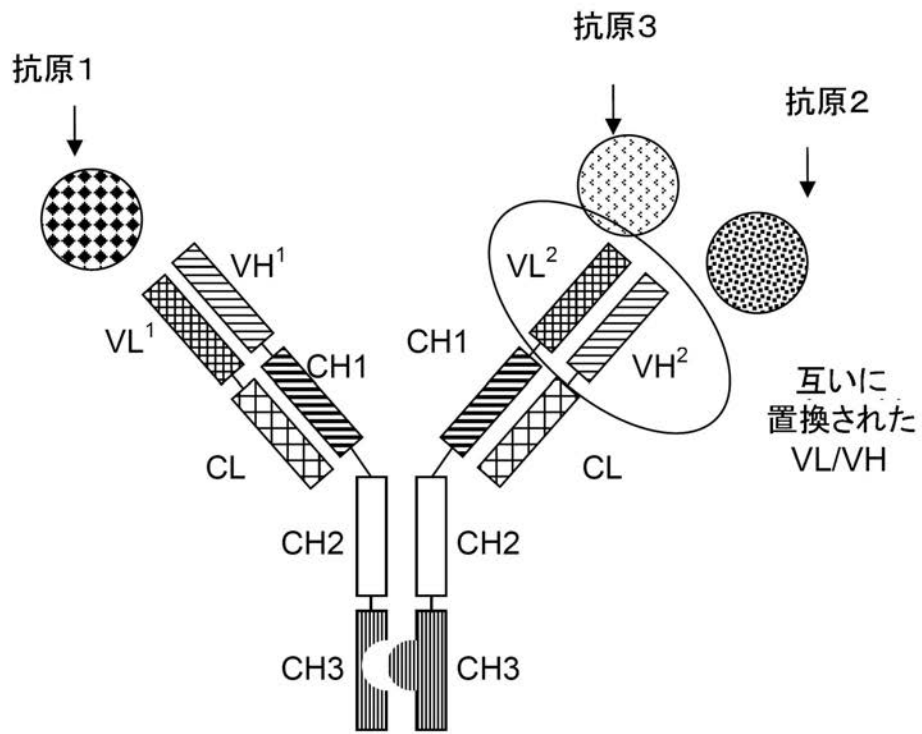
【図 2 a】



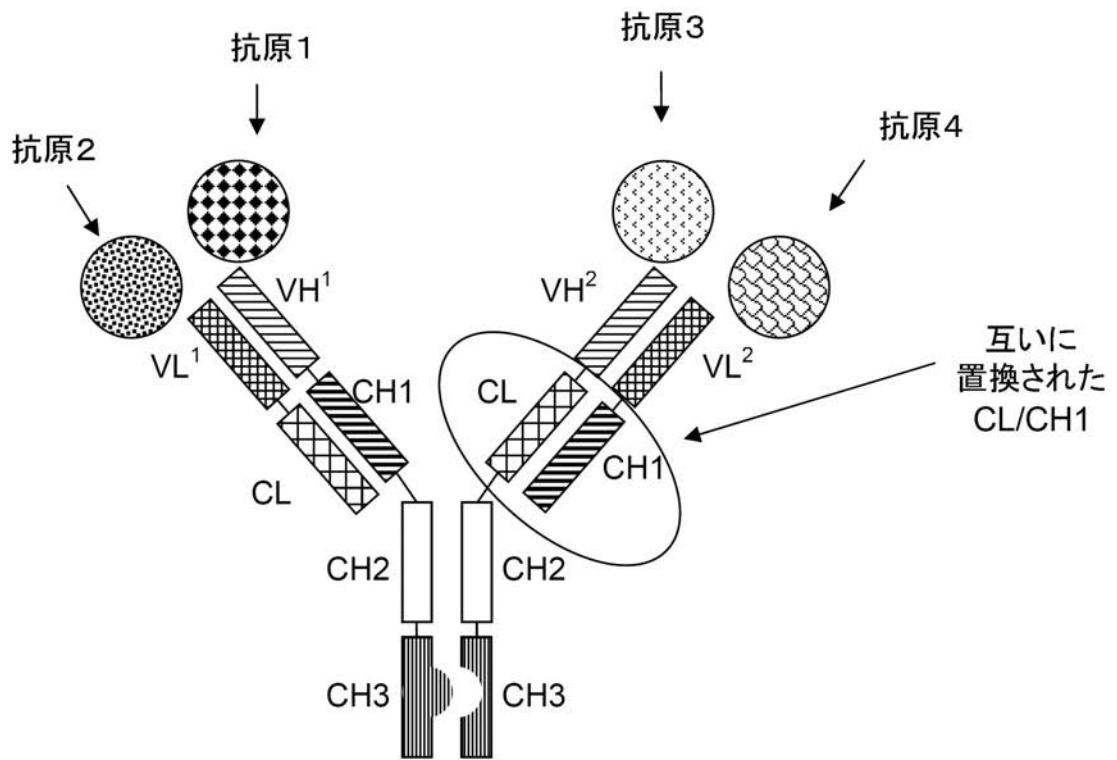
【図 2 b】



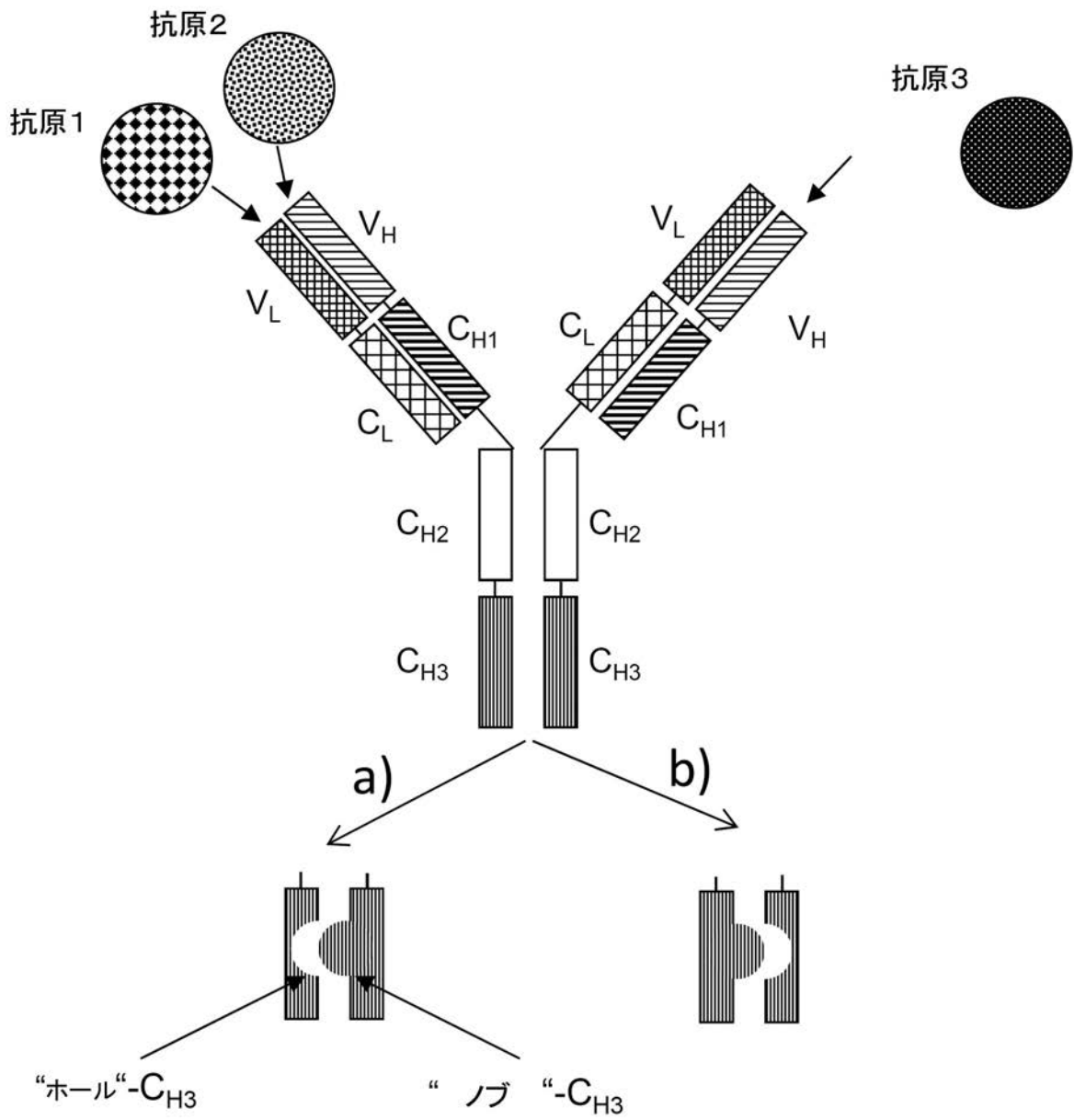
【図 2 c】



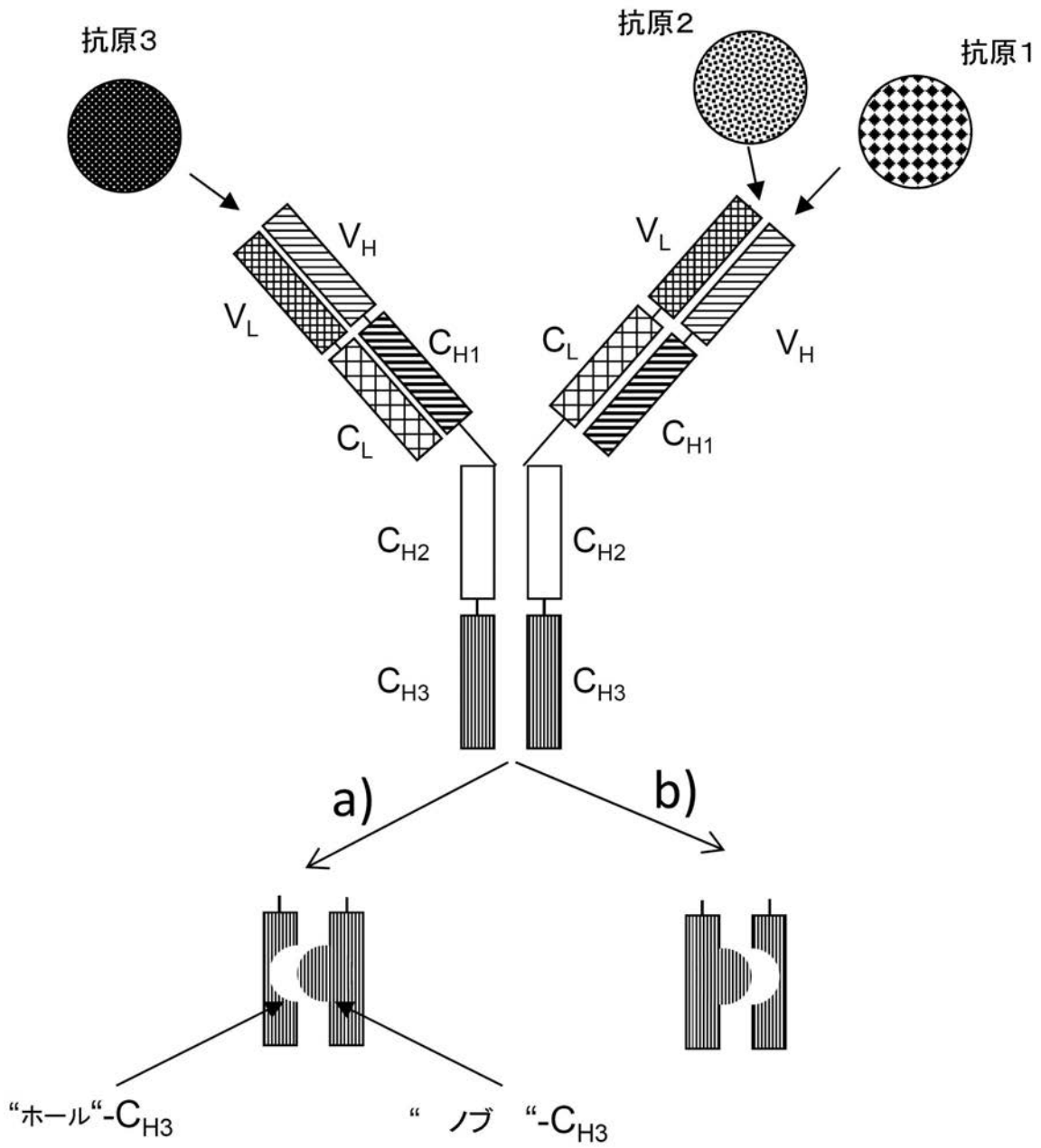
【図 2 d】



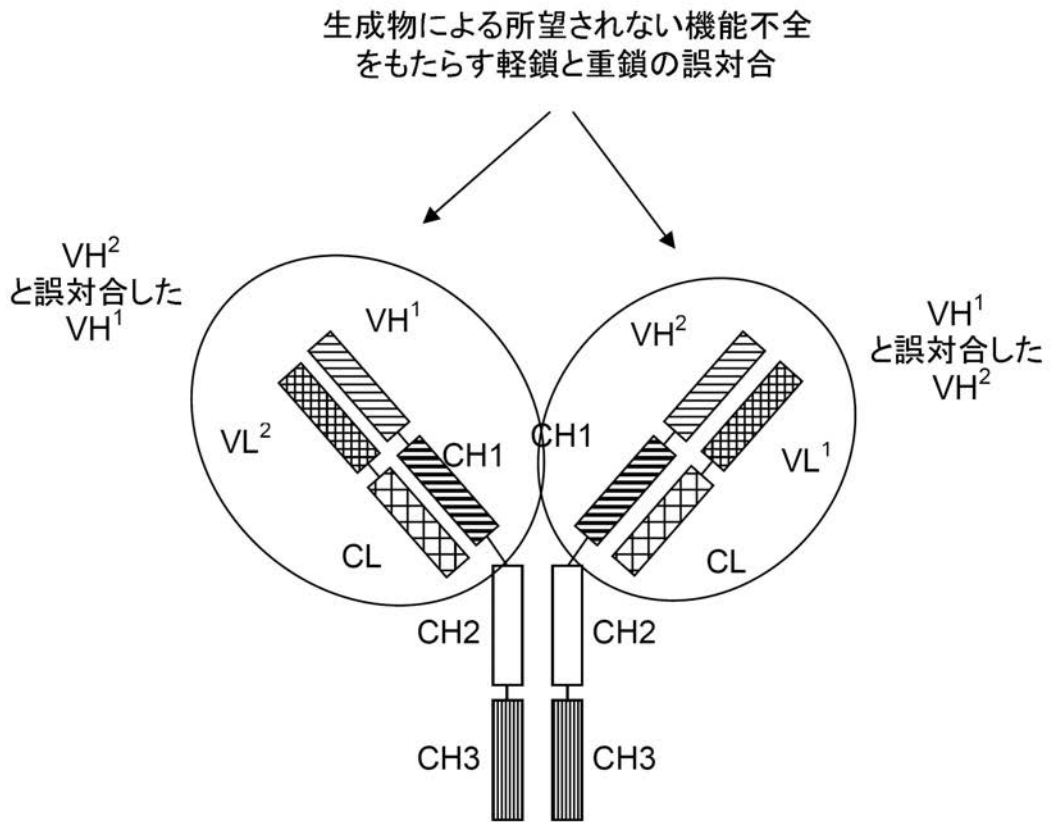
【図 3 a】



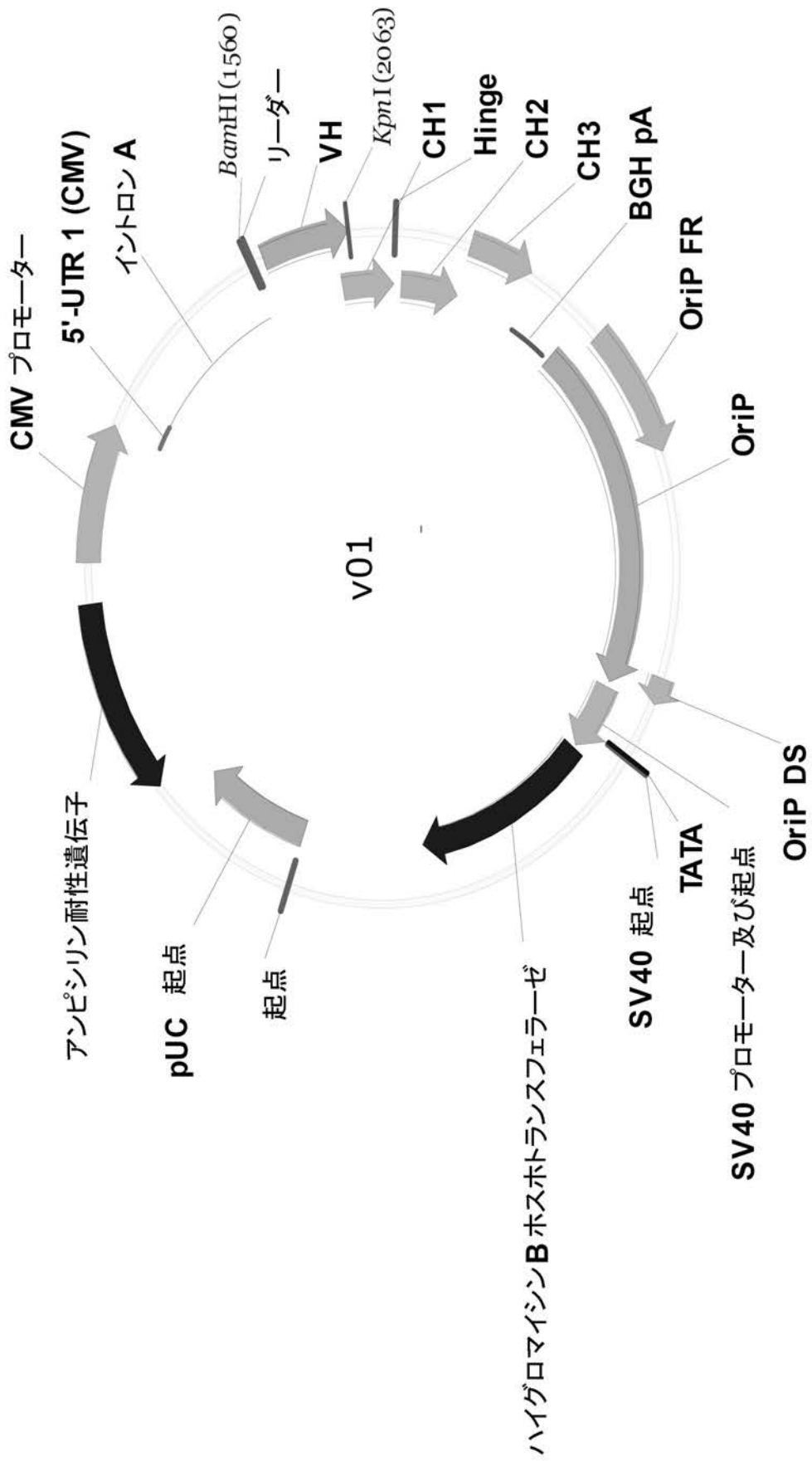
【図 3 b】



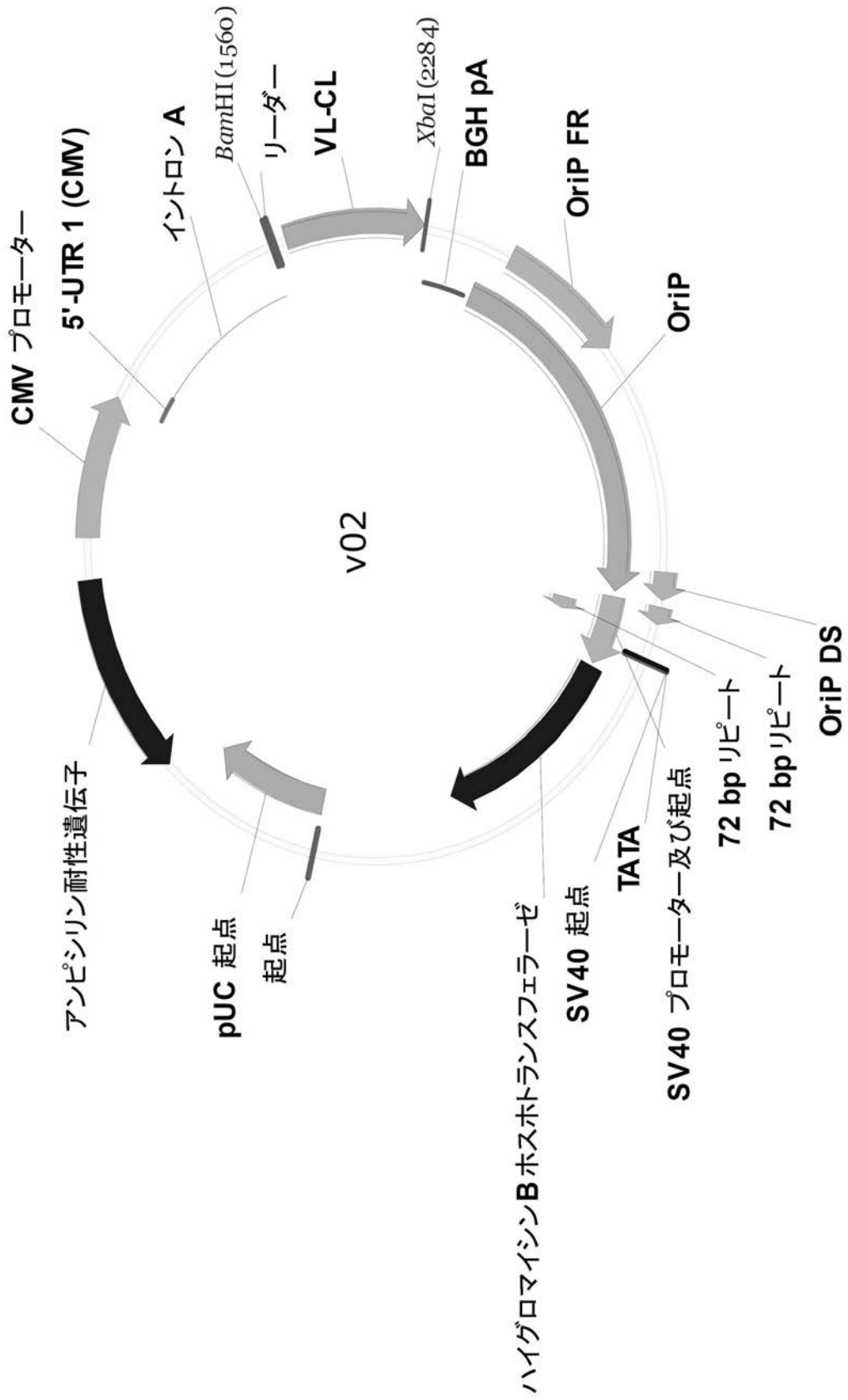
【 図 4 】



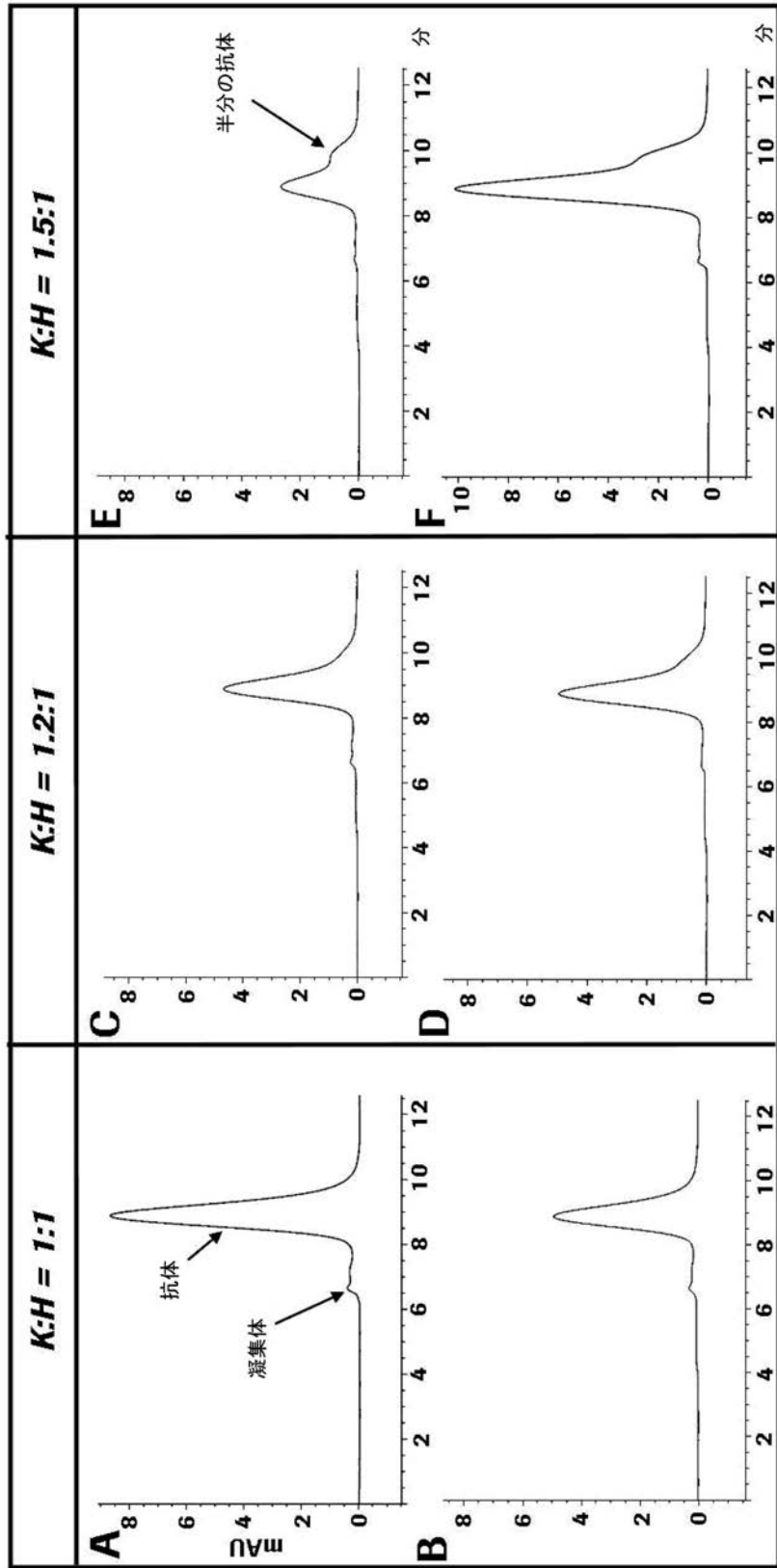
【 図 5 a 】



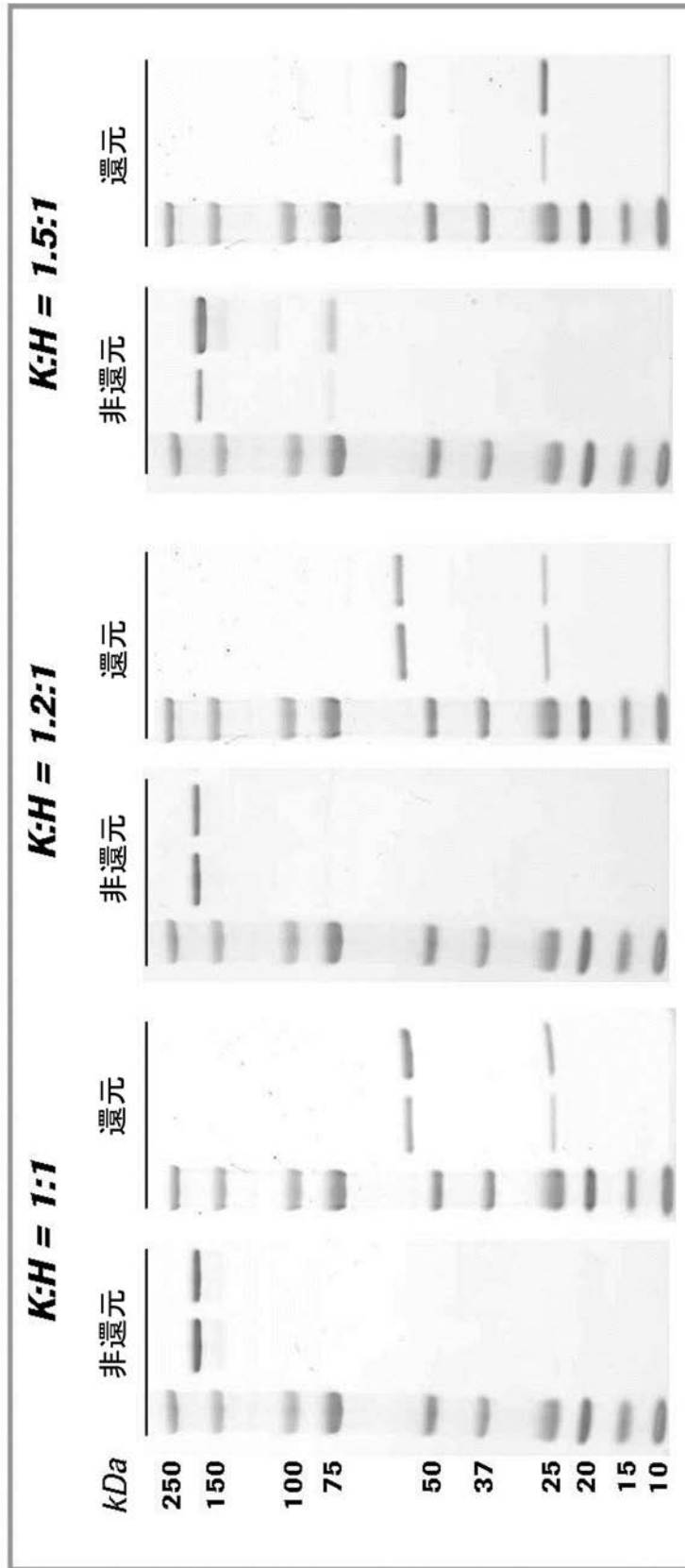
【 図 5 b 】



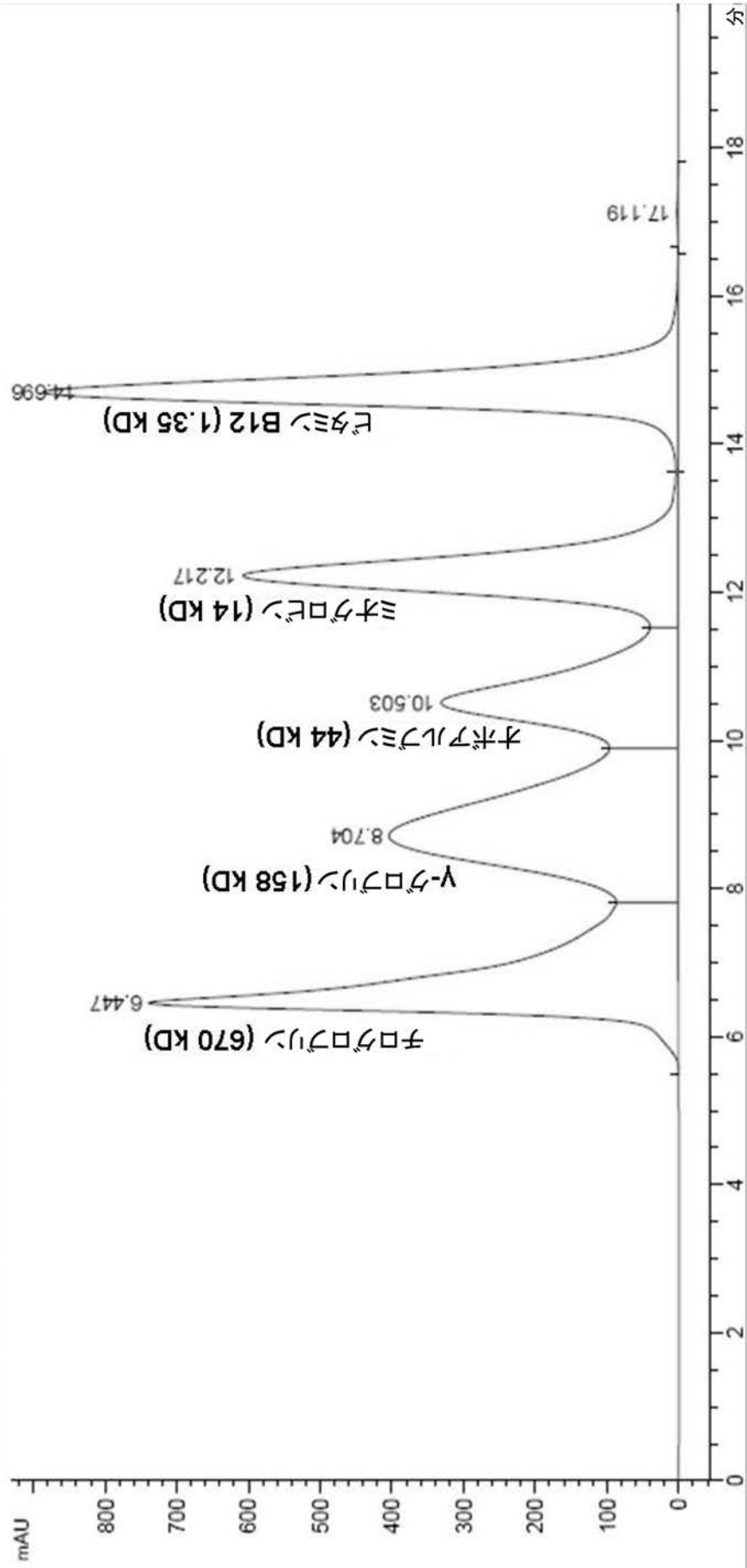
【 図 6 a 】



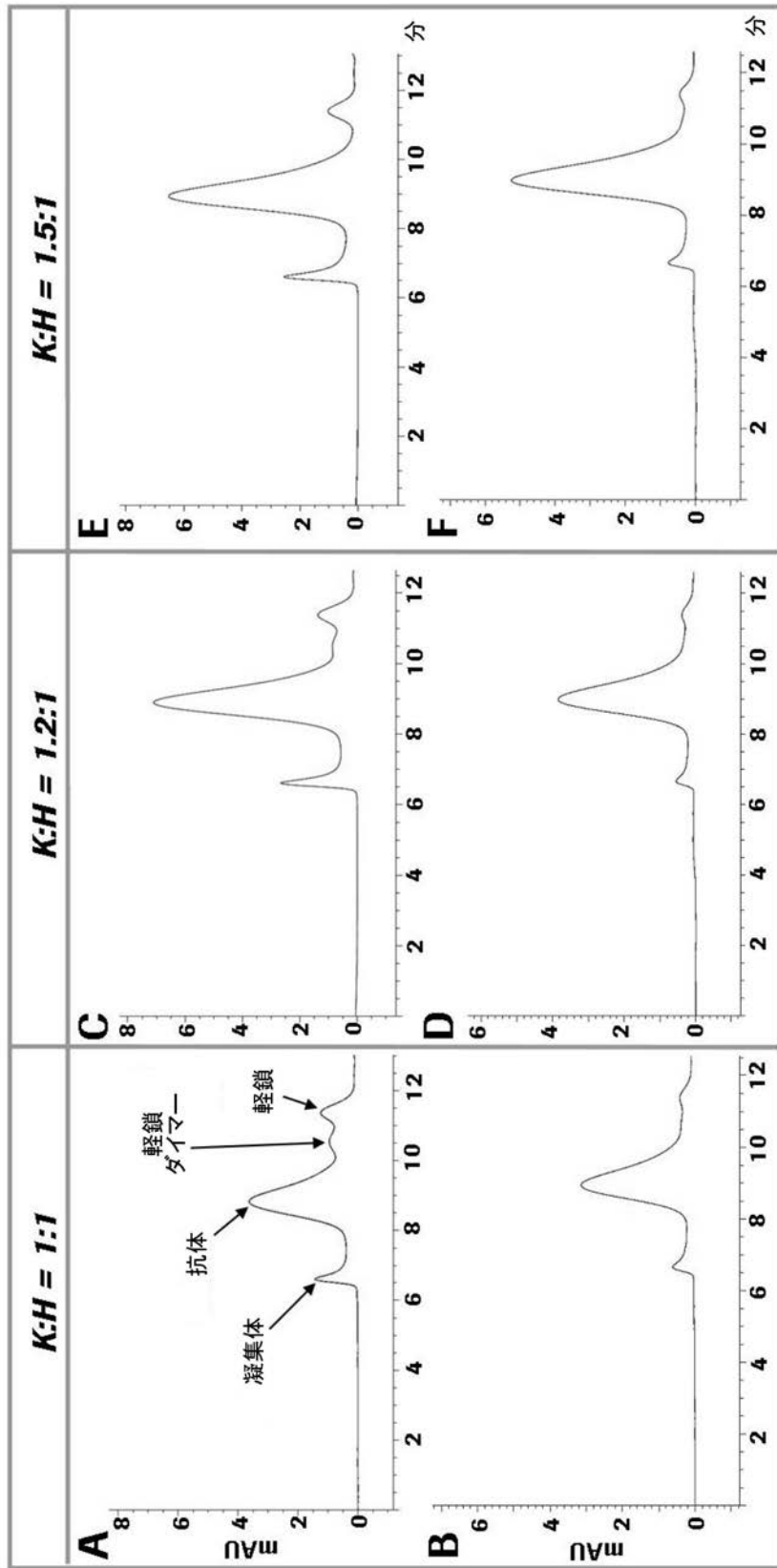
【 図 6 b 】



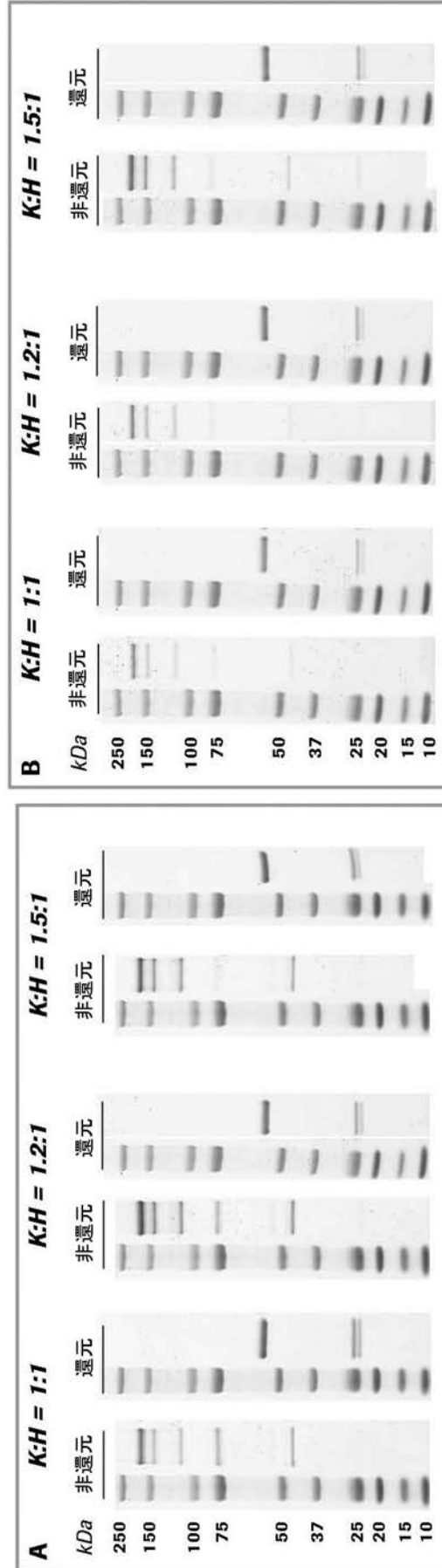
【 図 6 c 】



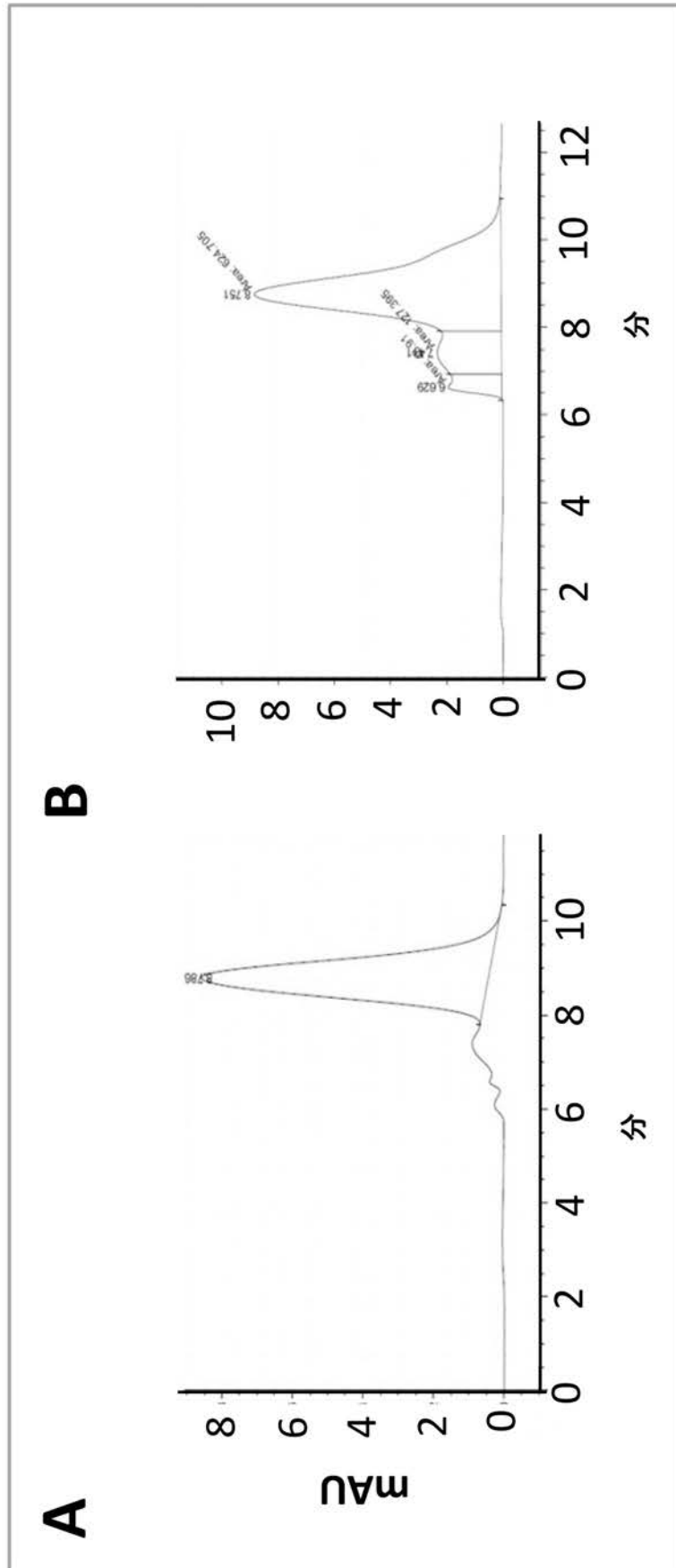
【 図 7 a 】



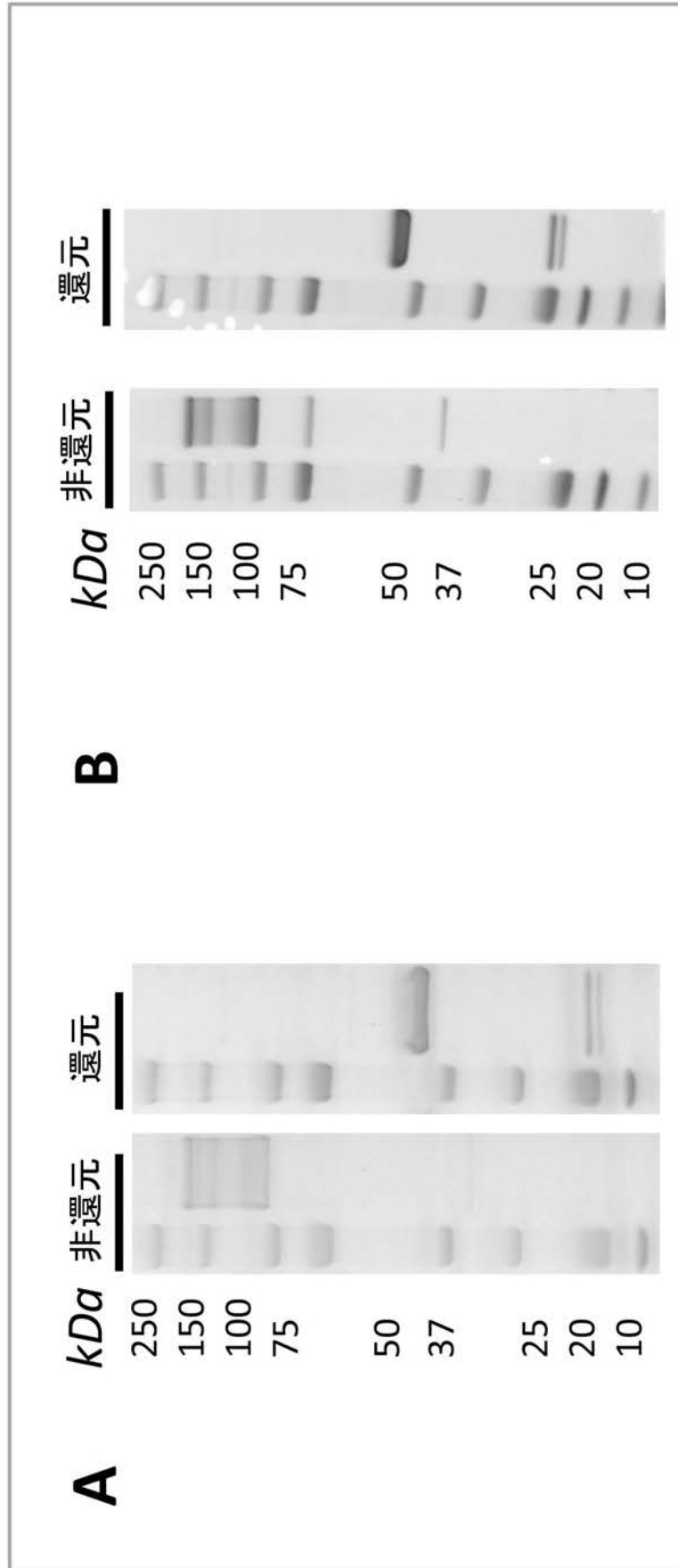
【 図 7 b 】



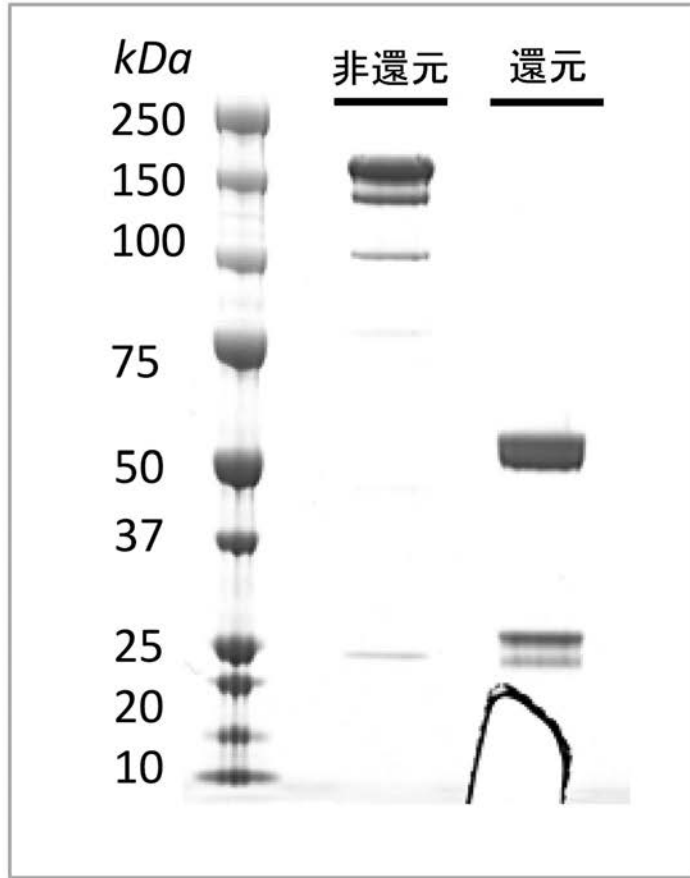
【 図 8 a 】



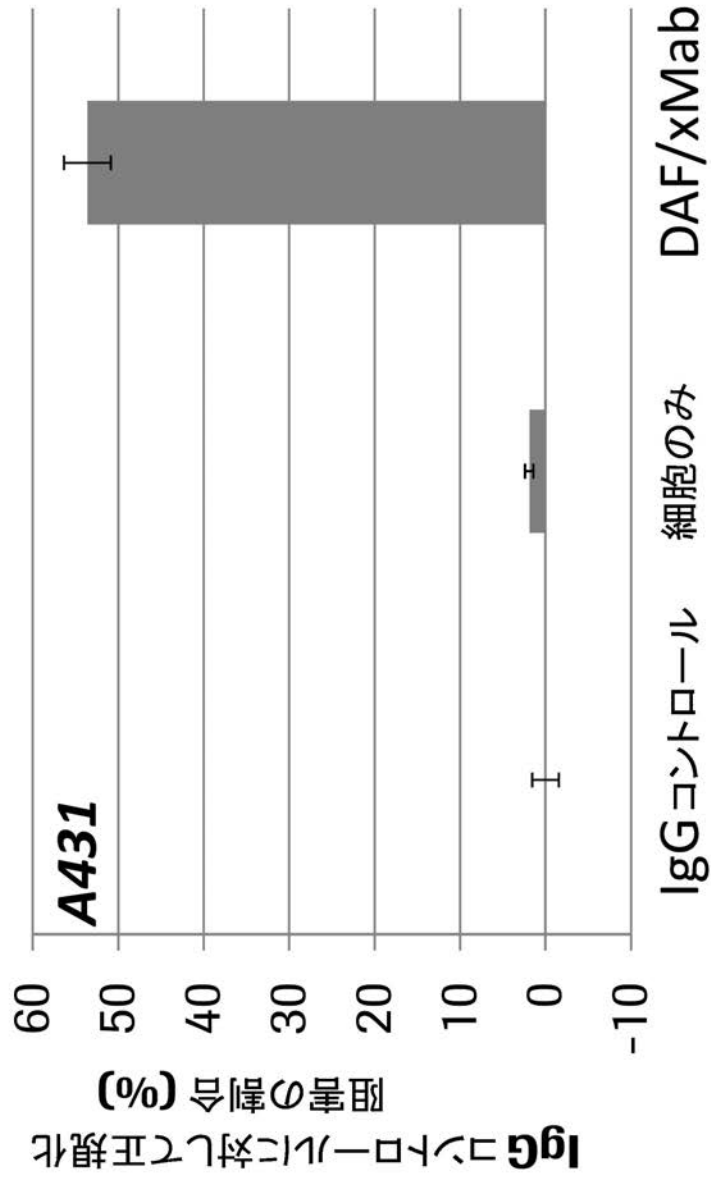
【 図 8 b 】



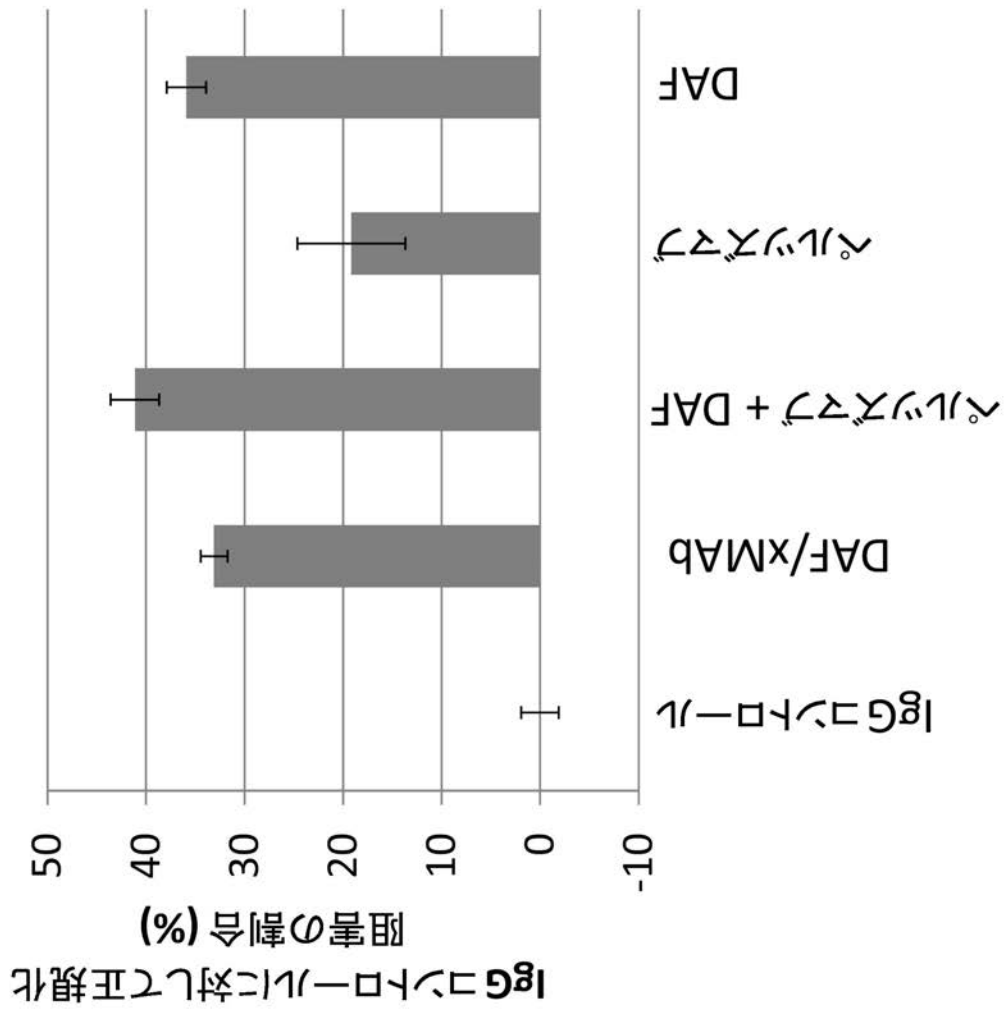
【 図 9 】



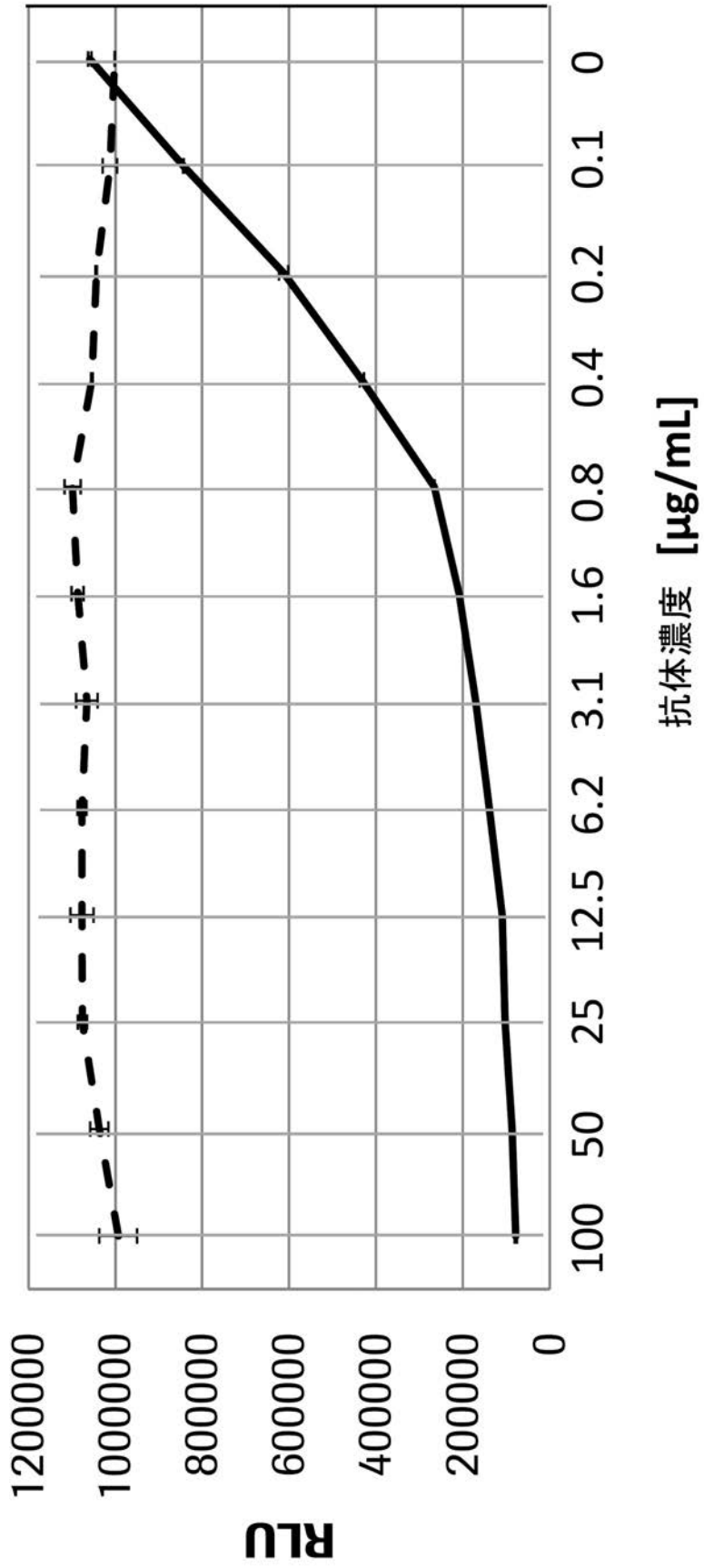
【図 10 a】



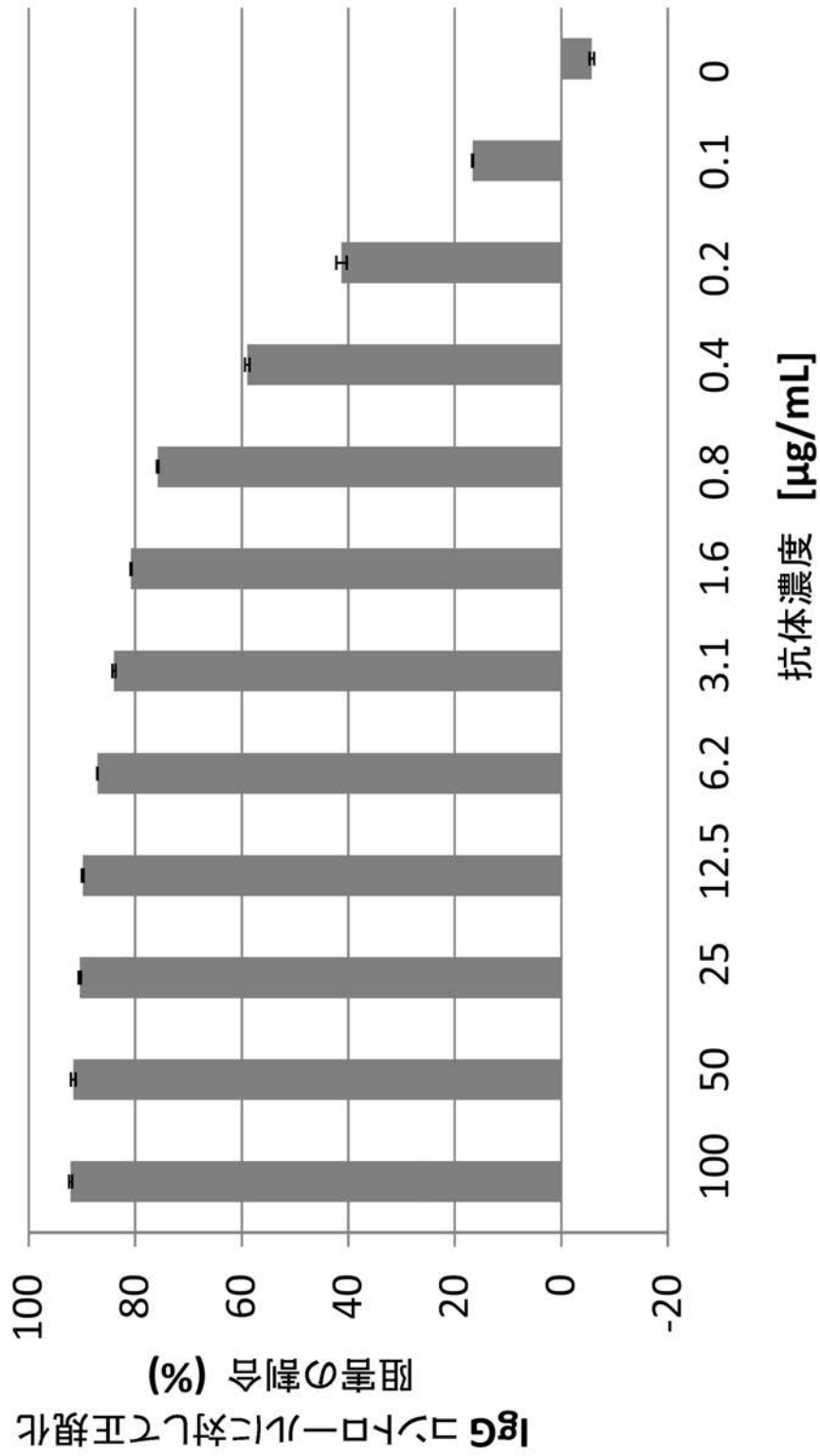
【図 10b】



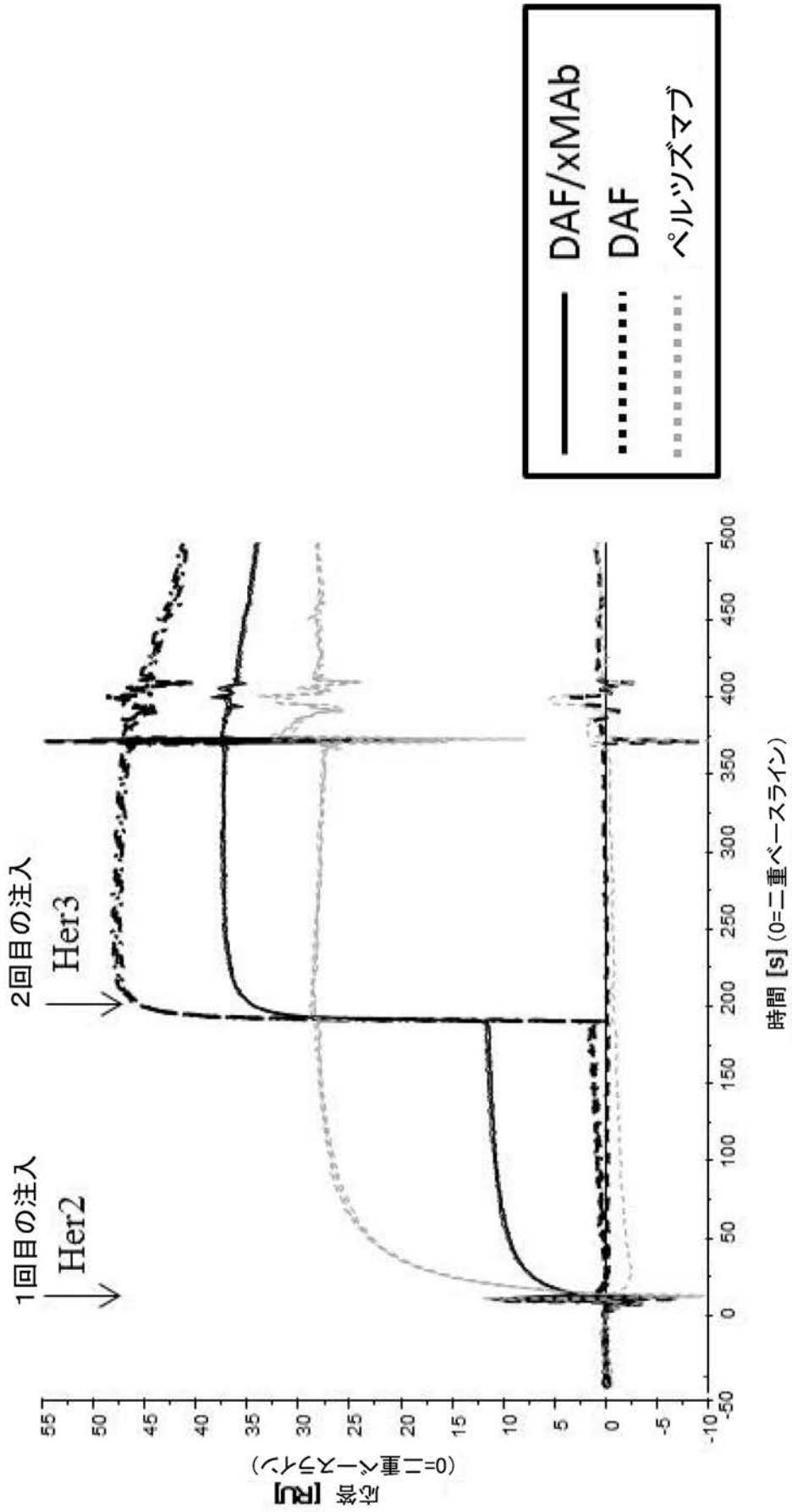
【 図 1 1 a 】



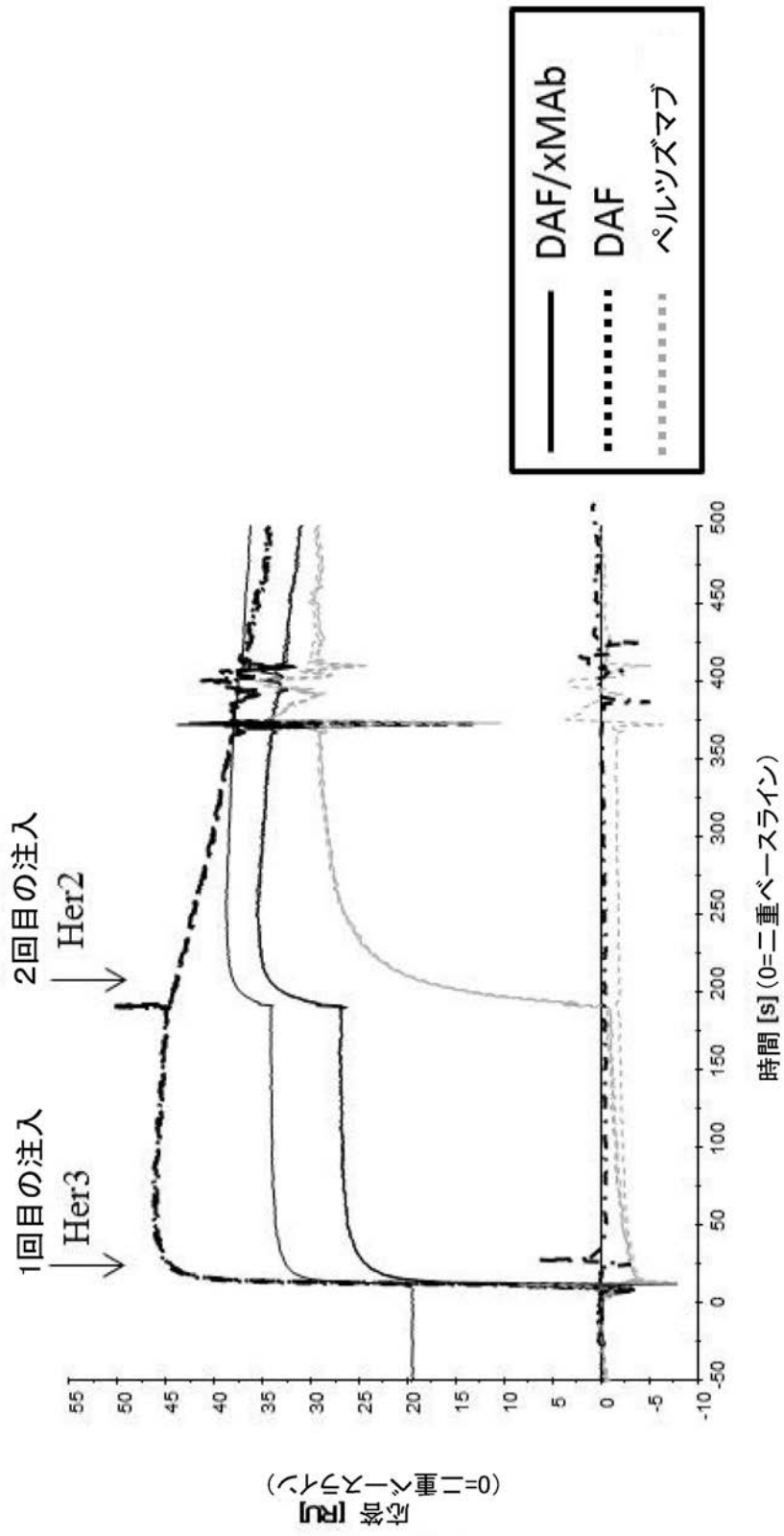
【 図 1 1 b 】



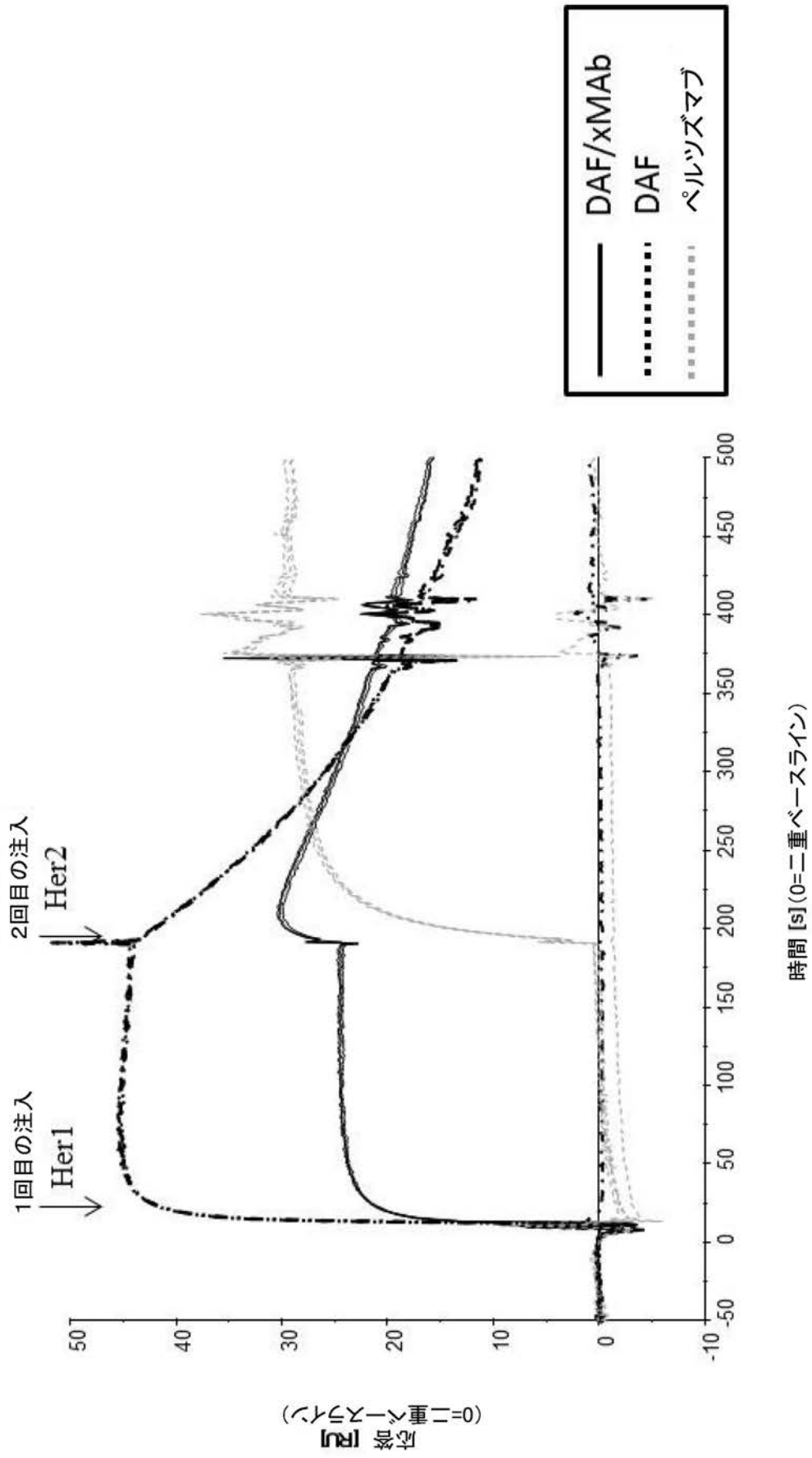
【図 12 a】



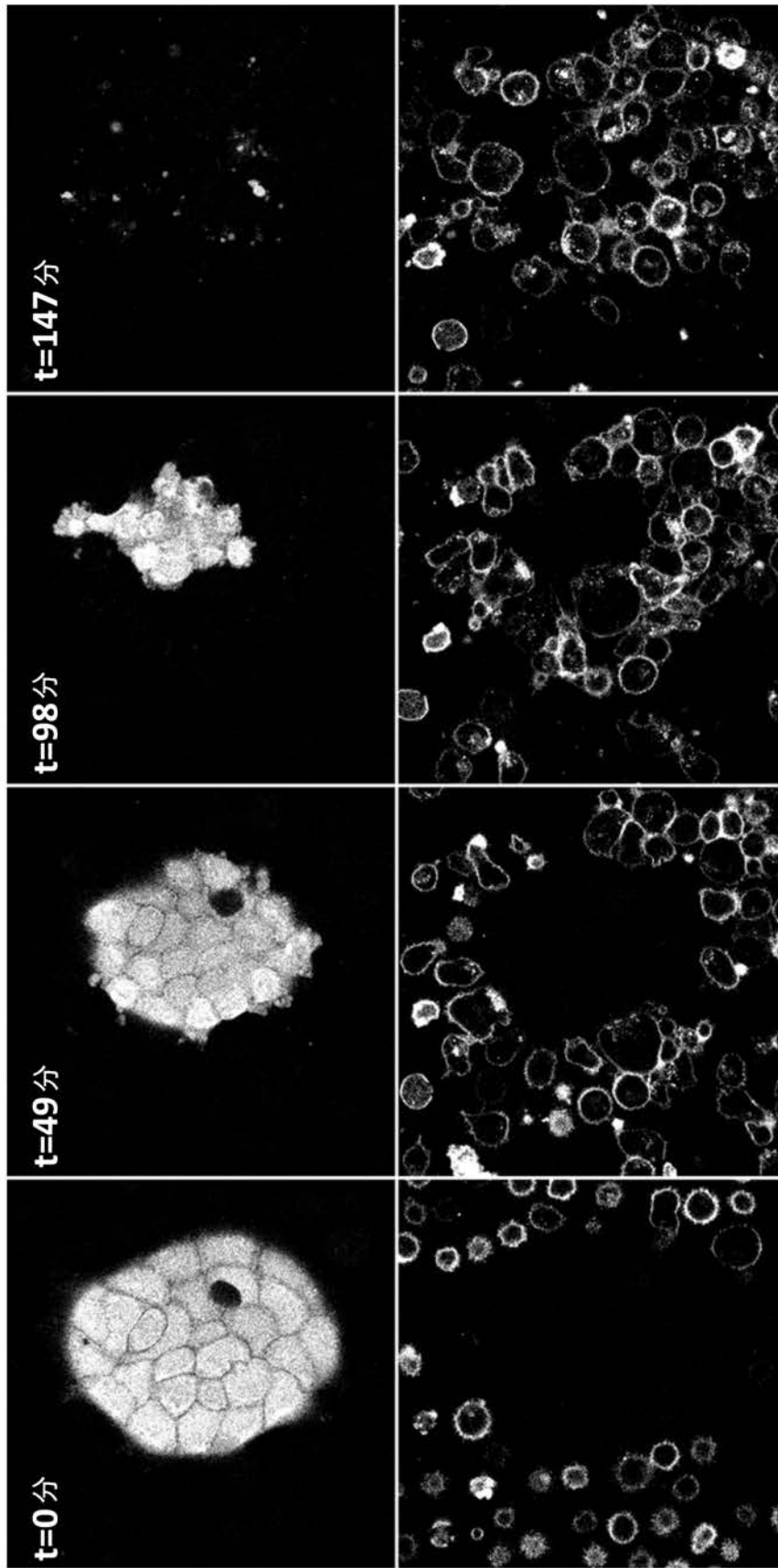
【図 1 2 b】



【 図 1 2 c 】



【 図 1 3 】



A431 腫瘍細胞

ナチユルキラ一細胞

【 配 列 表 】

2015520168000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/060529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/46 C07K16/32 C07K16/28 C07K16/22 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/027236 A2 (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; BOSTROM JENNY M [US]) 6 March 2008 (2008-03-06) cited in the application The whole document, in particular p.3, 2 and p.11, 2 ----- -/--	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 July 2013		29/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Chapman, Rob

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/060529

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOSTROM JENNY ET AL: "Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 323, no. 5921, 20 March 2009 (2009-03-20), pages 1610-1614, XP002560553, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1165480 the whole document	1-23
Y	----- WO 2009/080251 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; KLEIN CHRISTIAN [DE]; SCHAEFER WOLFGANG [DE]) 2 July 2009 (2009-07-02) cited in the application The whole document, in particular claim 1 and fig.2	1-23
Y	----- WO 2009/080252 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; KLEIN CHRISTIAN [DE]; SCHAEFER WOLFGANG [DE]) 2 July 2009 (2009-07-02) cited in the application The whole document, in particular claim 1 and fig.2	1-23
Y	----- WO 2009/080253 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; KLEIN CHRISTIAN [DE]; SCHAEFER WOLFGANG [DE]) 2 July 2009 (2009-07-02) cited in the application The whole document, in particular claim 1 and fig.2	1-23
A	----- CUESTA A M ET AL: "Multivalent antibodies: when design surpasses evolution", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 28, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 355-362, XP027102411, ISSN: 0167-7799 [retrieved on 2010-05-04] the whole document	1-23
A	----- SIMON T ET AL: "Antibody domain mutants demonstrate autonomy of the antigen binding site", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 4, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 1051-1056, XP002492563, ISSN: 0261-4189 the whole document	1-23
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/0660529

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORRISON S L ET AL: "Variable Region Domain Exchange Influences the Functional Properties of IgG", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 160, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2802-2808, XP003001892, ISSN: 0022-1767 the whole document	1-23
X	WO 2010/136172 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; CROASDALE REBECCA [DE]; KLEIN CHRISTIAN [CH];) 2 December 2010 (2010-12-02) cited in the application The whole document in particular, Fig.3 B,C,D	1-23
T	S. METZ ET AL: "Bispecific antibody derivatives with restricted binding functionalities that are activated by proteolytic processing", PROTEIN ENGINEERING DESIGN AND SELECTION, vol. 25, no. 10, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 571-580, XP055069821, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzs064 the whole document	
T	R. CASTOLDI ET AL: "Molecular characterization of novel trispecific ErbB-cMet-IGF1R antibodies and their antigen-binding properties", PROTEIN ENGINEERING DESIGN AND SELECTION, vol. 25, no. 10, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 551-560, XP055041659, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzs048 the whole document	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/060529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2008027236 A2	06-03-2008	DK 2059533 T3	25-02-2013		
		EP 2059533 A2	20-05-2009		
		EP 2471816 A1	04-07-2012		
		ES 2399075 T3	25-03-2013		
		US 2008069820 A1	20-03-2008		
		WO 2008027236 A2	06-03-2008		
		WO 2009080251 A1	02-07-2009	AR 069776 A1	17-02-2010
AU 2008340692 A1	02-07-2009				
CA 2709345 A1	02-07-2009				
CN 101896504 A	24-11-2010				
EP 2231709 A1	29-09-2010				
JP 2011506509 A	03-03-2011				
KR 20100087396 A	04-08-2010				
PE 13402009 A1	03-09-2009				
RU 2010129539 A	27-01-2012				
TW 200927171 A	01-07-2009				
US 2009232811 A1	17-09-2009				
WO 2009080251 A1	02-07-2009				
WO 2009080252 A1	02-07-2009			AR 071547 A1	30-06-2010
				AU 2008340693 A1	02-07-2009
		CA 2709023 A1	02-07-2009		
		CN 101903404 A	01-12-2010		
		CO 6280542 A2	20-05-2011		
		CR 11460 A	16-08-2010		
		EC SP10010270 A	30-07-2010		
		EP 2225279 A1	08-09-2010		
		JP 2011506510 A	03-03-2011		
		KR 20100085189 A	28-07-2010		
		MA 31904 B1	01-12-2010		
		NZ 585627 A	28-10-2011		
		PE 11722009 A1	03-08-2009		
		RU 2010129549 A	27-01-2012		
		TW 200932269 A	01-08-2009		
		US 2009162359 A1	25-06-2009		
		US 2012164726 A1	28-06-2012		
		US 2012225071 A1	06-09-2012		
		WO 2009080252 A1	02-07-2009		
		WO 2009080253 A1	02-07-2009	AR 069775 A1	17-02-2010
AU 2008340694 A1	02-07-2009				
CA 2709430 A1	02-07-2009				
CN 101903406 A	01-12-2010				
CO 6280543 A2	20-05-2011				
CR 11465 A	16-08-2010				
EC SP10010297 A	30-07-2010				
EP 2225280 A1	08-09-2010				
JP 2011505848 A	03-03-2011				
KR 20100087394 A	04-08-2010				
KR 20130016397 A	14-02-2013				
MA 31925 B1	01-12-2010				
NZ 585774 A	28-10-2011				
PE 11692009 A1	03-08-2009				
RU 2010129540 A	27-01-2012				
TW 200932271 A	01-08-2009				
US 2009162360 A1	25-06-2009				
WO 2009080253 A1	02-07-2009				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/060529

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010136172 A1	02-12-2010	AR 076797 A1	06-07-2011
		AU 2010252284 A1	17-11-2011
		CA 2761233 A1	02-12-2010
		CN 102448985 A	09-05-2012
		EP 2435473 A1	04-04-2012
		JP 2012528092 A	12-11-2012
		KR 20120012838 A	10-02-2012
		PE 05402012 A1	09-05-2012
		SG 176219 A1	29-12-2011
		TW 201100543 A	01-01-2011
		US 2010322935 A1	23-12-2010
		WO 2010136172 A1	02-12-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A

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

(72) 発明者 クライン, クリティアン

スイス国 ツェーハー - 8 9 0 6 ボンシュテッテン, クリュツァッハーヴェ - ク 4 1

(72) 発明者 シェーファー, ヴォルフガング

ドイツ国 6 8 1 9 9 マンハイム, タンホイザーリング 1 9 0

(72) 発明者 サストマン, クラウディオ

ドイツ国 8 1 3 7 3 ミュンヘン, ペンツベルガー シュトラーセ 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03
 DA06 EA04 GA11 GA18 HA01 HA08 HA11
 4B064 AG26 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CE10 CE14 DA01 DA05
 DA13 DA14
 4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA01
 BD15 BD50 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 AA16 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC23 DD23 DD62
 DD81 EE01
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 CA41 DA75 DA76 EA20 EA22 EA50
 EA51 FA72 FA74 GA15 GA21 GA31