

(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2013-545438

(P2013-545438A)

(43) 公表日 平成25年12月26日 (2013. 12. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 163 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-527629 (P2013-527629)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月7日 (2013. 5. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/065697
 (87) 国際公開番号 W02012/032181
 (87) 国際公開日 平成24年3月15日 (2012. 3. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/381, 789
 (32) 優先日 平成22年9月10日 (2010. 9. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513057348
 アルロズイネ, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9810
 2 シアトル エアスト スイテ 202
 エアストラケ アベニュー 1616
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ケネットフ グラブステイン
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9810
 2 シアトル エアスト スイテ 202
 エアストラケ アベニュー 1616
 アルロズイネ, インコーポレーテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体誘導体

(57) 【要約】

本発明は、特に、抗 IL-6 抗体又はその誘導体、及び抗 IL-23 抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクト、並びに治療におけるその使用に関する。本発明はまた、有用な抗 IL-6 抗体及び抗 IL-23 抗体に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 IL-6 抗体又はその誘導体、及び抗 IL-23 抗体又はその誘導体を含む、二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、モノクローナル抗体であるか、若しくはモノクローナル抗体に由来するものであり、かつ/又は前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、モノクローナル抗体であるか、若しくはモノクローナル抗体に由来するものである、請求項1記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体がヒトモノクローナル抗体である、請求項2記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体がキメラ抗体である、請求項2記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5】

前記キメラ抗体がヒト化フレームワーク領域を含む、請求項4記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6】

抗 IL-6 抗体の誘導体及び/又は抗 IL-23 抗体の誘導体を含み、ここで、該誘導体(複数可)が、可変領域全体、可変領域の重鎖(VH)、可変領域の軽鎖(VL)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dAb、又は相補性決定領域(CDR)を含み得る、請求項1~4のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 7】

前記誘導体がscFvである、請求項6記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 8】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体、及び/又は前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つの非天然アミノ酸を組み込むように修飾されている、請求項1~8のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 9】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列YIYTDX¹STX²YANWAKG(配列番号335)(式中、

X¹は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

X²は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

好ましくは、X¹は、セリン又はトレオニンであり、かつX²が、トリプトファン又はチロシンである)

を含むCDR2領域を含む、請求項1~8のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 10】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列RX¹STLX²S(配列番号336)(式中、X¹及びX²は、独立に、アラニン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、請求項1~9のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 11】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10~15からなる群から選択される、請求項1~10のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 12】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ

10

20

30

40

50

酸配列が、配列番号10～12からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項13】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号13～15からなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項14】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、配列番号10～15のアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項15】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号259を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項16】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号261を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項17】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体がscFvである、請求項1～16のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項18】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、
(i) 配列番号10～12からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖；及び
(ii) 配列番号13～15からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含むscFvである、請求項1～17のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項19】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、
(i) 配列番号259のアミノ酸配列を含む重鎖；及び
(ii) 配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むscFvである、請求項1～18のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項20】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する、請求項1～19のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項21】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項1～20のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項22】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上の保守的アミノ酸置換を含む、請求項21記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項23】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、配列番号10～15のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗IL-6抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、請求項1～22のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、13A8、9H4、9C8、8C8、18D4、及び 28D2 からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項 1～23 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 5】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 $YYAX^1WAX^2G$ (配列番号 337)

(式中

X^1 は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X^2 は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される)

を含む CDR2 領域を含む、請求項 1～24 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

10

【請求項 2 6】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 AX^1TLX^2S (配列番号 338)

(式中、

X^1 は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X^2 は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)

を含む CDR5 領域を含む、請求項 1～25 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 7】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 90～95 からなる群から選択される、請求項 1～26 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

20

【請求項 2 8】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 90～92 からなる群から選択される、請求項 1～27 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 9】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 93～95 からなる群から選択される、請求項 1～28 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

30

【請求項 3 0】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、配列番号 90～95 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～29 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 1】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号 267 を含む、請求項 1～30 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 2】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号 269 を含む、請求項 1～31 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 3】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が scFv である、請求項 1～32 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

40

【請求項 3 4】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号 90～92 からなる群から選択される配列を有する少なくとも 1 つの CDR を含む重鎖; 及び

(ii) 配列番号 93～95 からなる群から選択される配列を有する少なくとも 1 つの CDR を含む軽鎖

を含む scFv である、請求項 1～33 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト

。

50

【請求項 3 5】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号267を含む重鎖;及び

(ii) 配列番号269を含む軽鎖

を含む scFv である、請求項1～24のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 6】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号90～95からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する、請求項1～35のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

10

【請求項 3 7】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号90～95からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項1～35のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 8】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号90～95からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上の保守的アミノ酸置換を含む、請求項37記載の二価の二重特異性コンストラクト。

20

【請求項 3 9】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、配列番号90～95のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗 IL-23 抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、請求項1～38のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 0】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、31A12、34E11、35H4、49B7、及び16C6からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項1～39のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 1】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、IL-12を阻害することもできる(すなわち、抗 IL-23 /IL-12 抗体)、請求項1～24のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

30

【請求項 4 2】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 WX^1KG (配列番号358) (式中、 X^1 は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、又はトリプトファンであり、好ましくは、アラニン又はバリンである)を含むCDR2領域を含む、請求項41記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 3】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 $YAYX^1GDAFDP$ (配列番号339) (式中、 X^1 は、アラニン又はイソロイシンである)を含むCDR3領域を含む、請求項42記載の二価の二重特異性コンストラクト。

40

【請求項 4 4】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 $SDYFNX^1$ (配列番号340) (式中、 X^1 は、イソロイシン又はバリンである)を含むCDR3領域を含む、請求項42記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 5】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 QX^1SQX^2 (配列番号359) (式中、

X^1 は、アラニン又はセリンであり、かつ

X^2 は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

50

好ましくは、 X^2 は、セリン又はトレオニンである)
を含むCDR4領域を含む、請求項41～44のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 6】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 ASX^1LA (配列番号341)(式中、 X^1 は、リジン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、請求項41～45のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 7】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 $QSYDX^1NAGYG$ (配列番号342)(式中、 X^1 は、アラニン又はバリンである)を含むCDR6領域を含む、請求項41～46のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

10

【請求項 4 8】

前記抗IL-23/IL-12抗体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択される、請求項41～47のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 9】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～142からなる群から選択される、請求項41～48のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 0】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号143～145からなる群から選択される、請求項41～49のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

20

【請求項 5 1】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、配列番号140～145のアミノ酸配列を含む、請求項41～50のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 2】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号271を含む、請求項41～51のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 3】

前記抗IL-23抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号273を含む、請求項41～52のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

30

【請求項 5 4】

前記抗IL-p40抗体又はその誘導体がscFvである、請求項41～53のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 5】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、
(i) 配列番号140～142からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖;及び

(ii) 配列番号143～145からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖

を含むscFvである、請求項41～54のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

40

【請求項 5 6】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号271を含む重鎖;及び

(ii) 配列番号273を含む軽鎖

を含むscFvである、請求項41～55のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 7】

50

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する、請求項41～56のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 8】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項41～57のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 9】

10

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上の保存的アミノ酸置換を含む、請求項58記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6 0】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、配列番号140～145のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗 IL-23/IL-12抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、請求項41～59のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6 1】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、22H8、45G5、14B5、4F3、5C5、及び1H1からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項41～60のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

20

【請求項 6 2】

前記抗 IL-6抗体又はその誘導体と前記抗 IL-23抗体又はその誘導体の両方が、1以上の非天然アミノ酸を組み込んでいる、請求項1～61のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6 3】

前記抗 IL-6抗体又はその誘導体が、各々の抗体又はその誘導体中の非天然アミノ酸間のリンカーを介して、前記抗 IL-23抗体又はその誘導体に結合している、請求項62記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6 4】

30

リンカーがPEG分子である、請求項63記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 6 5】

アミノ酸配列 $YIYTDX^1STX^2YANWAKG$ (配列番号335)

(式中、

X^1 は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

X^2 は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

好ましくは、 X^1 は、セリン又はトレオニンであり、かつ X^2 が、トリプトファン又はチロシンである)

40

を含むCDR2領域を含む、抗 IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 6】

アミノ酸配列 RX^1STLX^2S (配列番号336)(式中、 X^1 及び X^2 は、独立に、アラニン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 7】

配列番号10～15又は20～25又は30～35又は40～45又は50～55又は60～65から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗 IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 8】

13A8、9H4、9C8、8C8、18D4、及び28D2、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択

50

される抗IL-6抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-6抗体若しくはその誘導体。

【請求項69】

配列番号259のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項67記載の抗IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項70】

アミノ酸配列YYAX¹WAX²G(配列番号337)

(式中、

X¹は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X²は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される)

を含むCDR2領域を含む、IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項71】

アミノ酸配列AX¹TLX²S(配列番号338)

(式中、

X¹は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X²は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)

を含むCDR5領域を含む、IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項72】

配列番号90~95又は100~105又は110~115又は120~25又は130~135から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項73】

31A12、34E11、35H4、49B7、及び16C6、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択される抗IL-23抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-23抗体若しくはその誘導体。

【請求項74】

配列番号267記載のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号269記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項72記載の抗IL-23抗体又は誘導体。

【請求項75】

アミノ酸配列WX¹KG(配列番号358)(式中、X¹は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、又はトリプトファンであり、好ましくは、アラニン又はバリンである)を含むCDR2領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項76】

アミノ酸配列YAYX¹GDAFDP(配列番号339)(式中、X¹は、アラニン又はイソロイシンである)を含むCDR3領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項77】

アミノ酸配列SDYFNX¹(配列番号340)(式中、X¹は、イソロイシン又はバリンである)を含むCDR3領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項78】

アミノ酸配列QX¹SQX²(配列番号359)

(式中、

X¹は、アラニン若しくはセリンであり、かつ

X²は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

好ましくは、X²は、セリン若しくはトレオニンである)

を含むCDR4領域を含み;かつ/又は

アミノ酸配列ASX¹LA(配列番号341)(式中、X¹は、リジン若しくはトレオニンである)を含むCDR5領域を含み;かつ/又は

アミノ酸配列QSYDX¹NAGYG(配列番号342)(式中、X¹は、アラニン若しくはバリンである

10

20

30

40

50

)を含むCDR6領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 7 9】

配列番号140～145又は150～155又は160～165又は170～175又は180～185又は190～195から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 8 0】

22H8、45G5、14B5、4F3、5C5、及び1H1、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択される、抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体。

【請求項 8 1】

配列番号271記載のアミノ配列を含む重鎖、及び配列番号273記載のアミノ配列を含む軽鎖を含む、請求項79記載の抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 8 2】

PEG化されている、請求項65～81のいずれか一項記載の抗IL-6若しくは抗IL-23(抗IL-23/IL-12抗体を含む)、又はそれらの誘導体。

【請求項 8 3】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの一部をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8 4】

請求項1～81のいずれか一項記載の抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8 5】

請求項83又は84記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドの核酸配列が、大腸菌(*E. coli*)での発現に最適化されている、前記ポリヌクレオチド。

【請求項 8 6】

請求項83～85のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8 7】

請求項86記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8 8】

栄養要求性である、請求項87記載の宿主細胞。

【請求項 8 9】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトを産生する方法であって:

(i)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている抗IL-6抗体又はその誘導体を提供すること;

(ii)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている、抗IL-23抗体又はその誘導体(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)を提供すること;

(iii)これら2つが各部分の非天然アミノ酸間の連結によって結合されるように、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体を、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体と反応させること

を含む、前記方法。

【請求項 9 0】

前記修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体と修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体の間の連結がリンカー部分を含み、ここで、該リンカー部分の一方の末端が、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合されており、かつ該リンカー部分のもう一方の末端が、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合されている、請求項89記載の方法。

【請求項 9 1】

前記リンカー部分が、PEG、水溶性ポリマー、ポリビニルアルコール、多糖、ポリアルキレンオキシド、ヒドロキシエチルデンブロン、又はポリオール、好ましくはPEGを含む、

10

20

30

40

50

請求項90記載の方法。

【請求項 9 2】

前記非天然アミノ酸が、連結の前のアジド、アルキン、アルケン、歪んだシクロオクチン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、又はアリール、アルキル、若しくはビニルハライド、ケトン、アルデヒド、シアノ、ヒドラジン、ケタール、アセタール、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ニトリル酸化物、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アリールスルホネート、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸基を含む、請求項89～91のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 3】

前記非天然アミノ酸が、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、p-ブromoフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン、又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、trans-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、又はビニルグリシン、ピロリジン、N- σ -o-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン(AzZLys)、N- σ -プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、N- σ -2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン(BocLys)、N- σ -アリルオキシカルボニル-L-リジン(AlocLys)、N- σ -アセチル-L-リジン(AcLys)、N- σ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZLys)、N- σ -シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン(CycLys)、N- σ -D-プロリル-L-リジン、N- σ -ニコチノイル-L-リジン(NicLys)、N- σ -N-Me-アントラニロイル-L-リジン(NmaLys)、N- σ -ピオチニル-L-リジン、N- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -メチル-L-リジン、N- σ -ジメチル-L-リジン、N- σ -トリメチル-L-リジン、N- σ -イソプロピル-L-リジン、N- σ -ダンシル-L-リジン、N- σ -o,p-ジニトロフェニル-L-リジン、N- σ -p-トルエンスルホニル-L-リジン、N- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、N- σ -フェニルビルバミド-L-リジン、N- σ -ビルバミド-L-リジンである、請求項89～92のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 4】

第一の部分を第二の部分と結合させる反応が、[3+2]環状付加若しくはアジド-アルキン環状付加反応、シュタウディングーライゲーション、ヘック反応、園頭反応、鈴木反応、スティルカップリング、檜山/デンマーク反応、オレフィンメタセシス、ディールス-アルダー反応、又はヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、若しくはヒドロキシルアミンとのカルボニル縮合である、請求項89～93のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 5】

請求項89～94のいずれか一項記載の方法であって：

- (i) 少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている抗IL-6抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；
 - (ii) 少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている抗IL-23抗体又はその誘導体(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；
 - (iii) 該宿主細胞が、修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体、及び修飾された抗IL-23抗体又はその誘導体を発現するような条件下で、該宿主細胞を成長させること、
 - (iv) 該抗IL-6抗体又はその誘導体、及び該抗IL-23抗体又はその誘導体を単離すること；
 - (v) 該抗IL-6抗体又はその誘導体が、各部分の非天然アミノ酸間の連結によって該抗IL-23抗体又はその誘導体と結合されるように、該抗IL-6抗体又はその誘導体を該抗IL-23抗体又はその誘導体と反応させること
- を含む、前記方法。

【請求項 9 6】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトに含めるのに好適な親抗体を選択する方法であって：

- (i) IL-6又はIL-23に特異的なB細胞を選択する工程；
- (ii) 該B細胞の個別の試料を(例えば、96細胞ウェルプレートのウェルに)分注する工程；
- (iii) 該B細胞を培養する工程；
- (iv) 抗体を含む上清を、各々の分注試料から個別に回収する工程；
- (v) 各々の分注試料由来の上清を(例えば、ELISAを用いて)IL-6又はIL-23結合についてアッセイする工程；
- (vi) 該各々の分注試料由来の上清をIL-6又はIL-23活性の阻害についてアッセイする工程；
- (vii) 高レベルのIL-6若しくはIL-23活性の阻害及び/又は強いIL-6若しくはIL-23結合を示したウェルから抗体を選択する工程；並びに
- (viii) 任意に、IL-23分注試料由来の上清をIL-12活性の阻害についてアッセイする工程；並びに
- (ix) 高レベルのIL-12活性及び/又は強いIL-12結合をさらに示すIL-23抗体を親抗体として選択する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 97】

治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト又は請求項65～82のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 98】

T_H17媒介性疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与する工程を含む、前記方法。

20

【請求項 99】

T_H17によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 100】

前記T_H17によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項 101】

T_H22媒介性疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 102】

T_H22細胞によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

30

【請求項 103】

前記T_H22細胞によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項 104】

T_H17細胞とT_H1細胞の両方によって媒介される疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 105】

前記T_H17細胞とT_H1細胞の両方によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

40

【請求項 106】

前記T_H17細胞とT_H1細胞の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項 107】

T_H17媒介性疾患を治療する方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 108】

50

T_H17 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項109】

T_H17 媒介性疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項110】

T_H22 媒介性疾患を治療する方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

10

【請求項111】

T_H22 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項112】

T_H22 媒介性疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項113】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

20

【請求項114】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項115】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項116】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項107、110、又は113のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項117】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項108、111、又は114のいずれか一項記載の組合せ。

【請求項118】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項109、112、又は115のいずれか一項記載の使用。

【請求項119】

前記 T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患が、炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IRS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される、請求項98、101、104、107、110、113、又は116のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項120】

炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IRS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項99、102、又は105のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

50

【請求項 1 2 1】

炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療で使用するのための、請求項108、111、114、又は117のいずれか一項記載の組合せ。

【請求項 1 2 2】

前記薬剤が、炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療用のものである、請求項100、103、106、109、112、115、又は118のいずれか一項記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、新規の抗体誘導体、それを調製する方法、それを含む組成物、及び治療におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(序論)

20

(二重特異性抗体)

単一特異性抗体、例えば、天然に存在するIgGは、それらが、2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖から作られているので、2つの同一の抗原結合パラトープを有する。二重特異性抗体は、通常異なる抗原又はエピトープに向けられた、2つの異なる結合パラトープを有する改変された免疫グロブリン誘導体である。

【0 0 0 3】

組換え二重特異性抗体(「二重特異性体」)は、例を挙げると、癌療法、炎症性疾患、及び血栓溶解療法における使用の可能性がある種々の異なる用途のために開発されている。癌療法において、これらの用途には、エフェクター分子(プロドラッグ変換酵素、放射性同位体、補体成分)、エフェクター細胞(CTL、NK細胞)の再標的化、及びプロドラッグ又は化学療法剤の送達が含まれる。炎症との関連において、二重特異性体は、2種以上のサイトカインを阻害するために開発されている。最近の研究では、細胞内二重特異性抗体(イントラボディ)(Kontermann及びMullerの文献(1999))としてのそれらの使用が検証された。ある研究では、細胞内で発現されたダイアボディを用いて、2つの細胞表面受容体の機能的発現を阻害した(Jendreykoらの文献(2003))。

30

【0 0 0 4】

二重特異性体は、疾患関連抗原に対して強くかつ選択的な結合を有さなければならず、また、種々の技術、例えば、抗体ヒト化、トランスジェニックヒト化マウスの使用、又は脱免疫化によって非免疫原性となるように設計される。二重特異性抗体の大規模な開発は、十分な品質の、かつインビボでの前臨床研究及び臨床研究に十分な量の材料を産生することが難しいために妨げられている。従来、効率的な二重特異性抗体産生は、安定で均一な二重特異性タンパク質の形成を可能にする新規の構造フォーマットと高レベル産生をもたらす効率的な発現系の両方を必要としている。原核生物系及び/又は真核生物系で二重特異性抗体を作製するために、主として、抗原結合ドメインの遺伝子融合を伴う、種々の手法が使用されている。化学的コンジュゲーションを用いるいくつかの限定的な試みも試験されている。

40

【0 0 0 5】

保存条件下での組換え二重特異性抗体の安定性、並びにインビボでのこれらの分子の安定性及び半減期は、臨床応用に強い影響を有する極めて重要なパラメータである。二重特異性体は、該分子が分解される前に治療的利益を誘導するのを可能にする程度に十分安定

50

でなければならない。いくつかの研究は、タンデムなscFv分子、及びダイアボディが、生理的条件下で不活化され、試験した抗体コンストラクトによって様々な半減期を有することを示した。抗体分子の安定性を改善する1つの手法は、VHドメインとVLドメインの解離を阻害するためにVH-VL境界面の間にシステイン架橋を導入しているジスルフィド安定化分子の作製である。しかしながら、大腸菌(E-coli)では、これらのジスルフィド安定化二重特異性ダイアボディについて、生産収率の著しい低下が報告されている。したがって、治療用途に好適である改善された安定性、半減期、及び収率を有するさらなる二重特異性コンストラクトに対する必要性がある。

【0006】

(インターロイキン及びTH媒介性応答におけるその役割)

10

CD4⁺ T-ヘルパー (T_H) リンパ球は、適応免疫において不可欠な役割を果たす不均一な細胞集団を表す。これらの細胞には、病原体からの防御に当たるエフェクター細胞、及び自己抗原に対するエフェクター応答から保護する調節性T細胞(Treg)が含まれる。T_Hという用語は、これらの細胞が、B細胞が抗体を産生するのを助けるのに極めて重要であるという観察に由来した。他方、CD4⁺ T細胞は、CD8⁺ T細胞が、いわゆる細胞性免疫のキラーエフェクター細胞に分化するのを助けるのに関与していることも分かった。CD4⁺ T細胞は、それ自体、遅延型過敏症などの免疫反応における免疫エフェクター細胞であることができ、該免疫反応において、これらの細胞は、マクロファージの活性化を主に特徴とする炎症反応を誘導する。

【0007】

20

20年前、2つのTヘルパー細胞サブセットが記載された。T_H1細胞はIFN γ を産生し、その主な役割は、細胞内微生物からの防御であり、一方、T_H2細胞は、IL-4、IL-5、及びIL-13を産生し、従来、アトピー及び喘息と関連付けられている。T_H1細胞及びT_H2細胞の発達は、T細胞で発現されるTボックスを含む特定の転写因子(Tbet)、並びにT_H1細胞の場合、転写のシグナルトランスデューサー及びアクチベーター(STAT)4、並びにT_H2細胞の場合、GATA結合タンパク質(GATA)-3及びSTAT6の制御下にある。

【0008】

T_H1分化は、主に、IL-12及びIFN γ によって促進されるが、IL-4(IL-12の非存在下)によって、T_H2分化が促進される。CD4⁺ T細胞において、IL-12シグナル伝達は、抗原提示とともに、細胞分化をTヘルパー(T_H)1表現型の方向にシフトさせると考えられており、炎症促進性サイトカインであるインターフェロンガンマ(IFN- γ)の強い産生と関連している。

30

【0009】

最近記載されたTヘルパー細胞の第三のサブセットであるT_H17細胞は、粘膜境界面に大量に存在し、そこで、該T_H17細胞は、病原性の細菌及び真菌による感染を食い止めている。これらの細胞は、好中球増加、組織の再構築及び修復、並びに抗微生物タンパク質の産生に関与するサイトカインである、IL-17A(IL-17とも呼ばれる)、IL-17F、及びIL-22を産生する。T_H17の分化については見解が少し分かれており:現在の一致した見解は、IL-1及びIL-6が、TGF- β とともに、初期のT_H17分化を誘導するということである。IL-21が、IL-2と同様に、T_H17の成長因子として働くと報告されている。IL-6とTGF- β の組合せは、T_H17系譜の分化を決定する際の重要な転写因子であるオーファン核受容体、レチノイド関連オーファン受容体(ROR) γ t及びROR α 、並びにIL-23Rを誘導する。STAT3は、ROR γ t及びROR α のIL-6誘導性発現、並びにIL-17産生を調節する。STAT3活性化とは対照的に、STAT1活性化は、T_H17細胞の発達を阻害する。IL-6は、STAT3とSTAT1の両方を活性化するが、STAT3活性化が維持される一方で、STAT1活性化はT_H17細胞で抑制されることが示されている。IL-23は、ヒトT_H17細胞の維持及び活性化に関係があるとされている。

40

【0010】

IL-22は、当初、完全に分化したT_H17細胞に特徴的なサイトカインとしてマウス及びヒトにおいて記載された。しかしながら、最近、ヒト皮膚ホーミングメモリーT細胞の異なるサブセットは、IL-22を産生するが、IL-17もIFN γ も産生しないことが示された。現在T_H22細胞と命名されているIL-22産生T細胞の分化は、IL-6及びTNFの存在下でのナイーブT

50

細胞の刺激によるか、又は形質細胞様樹状細胞の存在によって促進することができ、RORCとは無関係であるように思われる。ヒト T_H22 細胞集団は、ケモカイン受容体CCR6と皮膚ホーミング受容体CCR4及びCCR10とを共発現しており、これにより、これらの細胞が皮膚の恒常性及び病理において重要であり得るといふ仮説が導かれた。

【0011】

T_H1 細胞が、長い間、多発性自己免疫疾患における主要なエフェクターであると考えられていた一方で、 T_H2 細胞は、アトピー及び喘息に関与することが知られている。最近になって、 T_H17 細胞は、マウス及びヒトにおける多くの自己免疫及び他の炎症性疾患の原因であると示唆されている。過去に T_H1 細胞と関連付けられた疾患状態、例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE、多発性硬化症のモデル)、コラーゲン誘導関節炎、及びいくつかの形態の大腸炎の多くは、IL-23依存的 T_H17 細胞又は他のIL-17産生リンパ球様細胞型によって引き起こされることが示された。 T_H17 細胞機能とTreg細胞機能の不均衡は、これらの疾患のいくつかにおいて中心的なものであり得る。

10

【0012】

多くの研究によって、腸炎症及び自己免疫の動物モデルにおける T_H17 細胞の役割が解析されているが、クローン病の患者における T_H17 細胞の役割を調査している研究はごくわずかしかない。クローン病患者の固有層で T_H17 細胞のマスター転写因子であるレチノイド関連オファン受容体- γ (ROR γ t)を発現するT細胞の数の増加が見られる。2つの独立した研究により、その T_H17 細胞は、ヒト末梢血中、並びに健常個体及びクローン病患者由来の腸内で示された(Acosta-Rodriguezらの文献(2007);Annunziatoらの文献(2007))。これら2つの研究により、これらの細胞が、ROR γ t、IL23R、及びCCR6の発現を特徴とする一方で、該細胞は、 T_H1 細胞に特徴的であるケモカイン受容体のCXCR3を欠くことが示された。

20

【0013】

Annunziatoら(2007)の研究により、IL17AとIFN γ の両方も発現するT細胞集団を含む腸内のIL-17A産生T細胞が示され、該細胞集団を、著者らは「 T_H17/T_H1 」細胞と命名した。Acosta-Rodriguezら(2007)は、CCR6 $^+$ CCR4 $^+$ 発現によって特徴付けることができる T_H17 細胞を同定したが、CCR6 $^+$ CXCR3 $^+$ 発現 T_H1 細胞もまた、IL17AとIFN γ の両方を産生するサブセットを含んでいた。さらに、ごく最近の研究結果により、CD161がヒト T_H17 細胞の新規の表面マーカーであることが示唆され、これらの細胞のCD161 $^+$ CD4 $^+$ T細胞前駆細胞からの排他的な起源が示されている。 T_H1 細胞と T_H17 細胞の相互作用、及び T_H17 細胞に対するIFN γ の役割は、以前に想定されていたよりも複雑であり、クローン病及び他の自己免疫疾患に対するこれらの細胞系譜の具体的な寄与を明らかにするためにはさらなる解析を必要とする可能性がある。

30

【0014】

IL6遺伝子によってコードされるタンパク質であるIL-6は、炎症促進性サイトカインと抗炎症性サイトカインの両方として作用するインターロイキンである。それは、T細胞及びマクロファージによって分泌されて、例えば、感染中及び外傷後に、免疫応答を刺激し、抗炎症性サイトカインとしてのIL-6の役割は、TNF-アルファ及びIL-1に対するその阻害的効果、並びにIL-1ra及びIL-10の活性化によって媒介される。

40

【0015】

IL-23は、一方が、p40(別のサイトカインIL-12と共有される)と呼ばれ、もう一方が、p19(IL-23A遺伝子によってコードされるIL-23アルファサブユニット)と呼ばれる、2つのサブユニットからなるヘテロ二量体サイトカインである(図10A参照)。IL-23のこの2つのサブユニットは、ジスルフィド架橋によって連結されている。IL-23は、感染に対する炎症応答の重要な部分である。それは、マトリックスメタロプロテアーゼMMP9の上方調節を促進し、血管形成を増大させ、CD8 $^+$ T細胞浸潤を低下させる。

【0016】

クローン病及び潰瘍性大腸炎は、炎症性腸疾患(IBD)の2つの主要な疾患実体である。クローン病は、米国において100,000人に6.3人の年間平均発生率を有する。その正確な原因は未だ完全には理解されていないが、その発病は、遺伝的に感受性の強い個体における免

50

疫応答の亢進によって特徴付けられると提案されている。長年、クローン病は、主に、 T_H1 細胞によって媒介され、一方、潰瘍性大腸炎は、 T_H2 様型の炎症であると考えられてきた。これは、クローン病における $IFN\gamma$ 及びインターロイキン12(IL-12)などの T_H1 サイトカインのレベルの増加、並びに潰瘍性大腸炎におけるIL-13などの特定の T_H2 サイトカインの発現の増加によって裏付けられている。

【0017】

ウステキヌマブ(CNT01275; Stelara(商標); Centocor社, Malvern, PA)は、IL-12及びIL-23の共通のp40サブユニットに特異的に結合し、IL-12及びIL-23と細胞表面IL-12R β 1受容体との相互作用を阻害し、それにより、IL-12又はIL-23媒介性シグナル伝達カスケードを妨げるヒト免疫グロブリンG1カップ(IgG1 κ)モノクローナル抗体である。

10

【0018】

トシリズマブ(Actemra)は、IL-6受容体に対するヒト化組換えIgG1 κ モノクローナル抗体である。トシリズマブは、関節リウマチの治療用に、2010年1月8日にFDAによって認可された。

【0019】

しかしながら、 T_H17 及び T_H22 細胞媒介性応答が役割を果たす疾患を治療するさらに効果的な療法に対する必要性が依然としてある。さらに、これらの疾患に關与する免疫学的応答の複雑さを考慮すると、複数の経路(例えば、 T_H17 及び T_H1)に作用する療法に対する必要性がある。

【0020】

20

そのような療法を二重特異性コンストラクト(例えば、IL-6及びIL-23に対して(かつ任意に、IL-12に対しても)特異的であるコンストラクト)の形態で提供することは、重大な課題である。そのような二価の二重特異性コンストラクトは、特異的抗原結合ドメイン及び中和ドメインを必要とするだけでなく、安定であり、インビボでの長い平均滞留時間及び効力を有する必要もある。二重特異性抗体を作出するために多くの努力がなされてきたが、これまでの努力は全て、長いインビボ滞留時間を有するそのような安定な分子を作出することができなかった。さらに、遺伝子融合法によって二重特異性体を作出する多くの努力は、安定でかつ親和性が高い、製造の容易な分子の作出に成功していない。本明細書に記載の二重特異性コンストラクトは、これらの問題を初めて解決するものである。

【0021】

30

T_H17 細胞を標的とする二重特異性抗体は、IL23及びIL17Aを標的とすることによって開発された(Mabry R.らの文献(2009))。

【0022】

本発明者らは、有用な二重特異性抗体を提供することを目的としている。

【0023】

本発明者らの新規の手法は、原核生物系における非常に効率的なscFvの産生、及び部位特異的化学的コンジュゲーション法を用いて、大量の二重特異性タンパク質を作製し、代替的な二重特異性抗体作製法を悩ませている問題の多くを回避している。重要な工程は、ポリペプチド鎖に化学的に付加される柔軟なリンカーを再フォールディング前に使用することであり、それにより、各々のscFvが、他方とは独立に再フォールディングし、機能的な二重特異性コンストラクトを生じることが可能になる。

40

【0024】

本発明者らの方法は、PEGなどのリンカーの標的タンパク質への共有結合的かつ部位特異的な結合のための反応部位として機能する非天然アミノ酸のインビボでの部位特異的組込みの使用を含む(その内容の全体が引用により本明細書中に組み込まれている、WO 2007/130453号を参照されたい)。

【0025】

本方法の利点は、scFvをリンカーにコンジュゲートさせるために用いられる化学反応が、20種の天然アミノ酸と直交性であるということである。

【0026】

50

非天然アミノ酸をポリペプチド中に組み込む別の方法は、US7632024号(Choら)に記載されている。

【0027】

本発明によれば、単鎖可変断片(scFv)は、容易に大量に産生され、また、容易に精製することができる。B細胞クローニング、及びウサギ抗原特異的モノクローナル抗体のレスキュー、その後の機能スクリーニングによって、質の高い抗体の同定が可能になる。その後、該抗体をヒト化し、scFvに変換する。

【0028】

本発明者らは、特異的標的、すなわち、ヒトIL-6、ヒトIL-23、及びヒトIL-12に対するいくつかのヒト化モノクローナル抗体を同定した。

10

【0029】

さらに、本発明者らは、抗体断片を作製し、炎症性疾患及び自己免疫疾患を含め、 T_H1 細胞及び/又は T_H17 細胞の障害が有益である治療で使用されるべき、IL-6及びIL-23又はIL-6及びIL12/23を標的とする二重特異性ScFv分子を作製するためにそれらを改変した。

【0030】

Aliahmadiらの文献((2009) Eur J Immunol 39, 1221-1230)には、単離されたヒトIL-23 p19サブユニットに対するヤギポリクローナル血清と抗IL-6モノクローナル抗体の組合せを伴う特定の実験が記載されている。

【発明の概要】

【0031】

20

(発明の概要)

本発明は、抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクト、そのようなコンストラクトを作製する方法、並びに治療におけるそのようなコンストラクトの使用を提供する。

【0032】

本発明の二価の二重特異性コンストラクトの抗体は、単離されたモノクローナル抗体であってもよく、好ましくは、それらは、単離されたヒトモノクローナル抗体である。

【0033】

本発明の二価の二重特異性コンストラクトの抗体は、キメラ抗体であってもよい。好ましい実施態様では、本発明の抗体又はその誘導体のフレームワーク領域は、ヒト化されている。

30

【0034】

本発明の抗体誘導体は、可変領域全体、可変領域の重鎖(VH)、可変領域の軽鎖(VL)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dAb、又は相補性決定領域(CDR)を含むことができる。本発明の抗体誘導体は、それらが由来する抗体の抗原結合活性を完全に保持するか、又は実質的に保持する。好ましい実施態様では、該抗体誘導体はscFvである。

【0035】

本発明はさらに、抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体、そのような抗体又はその誘導体を作製する方法、並びに治療における単独又は組合せでのそのような抗体又はその誘導体の使用を提供する。

40

【0036】

本発明の抗体及び抗体誘導体(二重特異性コンストラクトを含む)を、1以上の非天然アミノ酸を組み込むように修飾することができる。

【0037】

ある実施態様では、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、13A8抗体のCDR領域由来の特定のモチーフを含むことができる。したがって、本発明は：

アミノ酸配列YIYTDX¹STX²YANWAKG

(式中、

X¹は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンからなる群から選択され；かつ

50

X²は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

好ましくは、X¹は、セリン若しくはトレオニンであり、かつX²が、トリプトファン若しくはチロシンである);(配列番号335)を含むCDR2領域、並びに/又はアミノ酸配列RX¹STLX²S

(式中、

X¹及びX²は、独立に、アラニン若しくはトレオニンである)(配列番号336)を含むCDR5領域

を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体を提供する。

【0038】

10

ある実施態様では、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、そのアミノ酸配列が、配列番号10~15からなる群から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は6つのCDR領域を含むことができる。該CDR領域は、可変領域の重鎖(VH)のCDR(すなわち、配列番号10~12)から、及び/又は可変領域の軽鎖(VL)のCDR(すなわち、配列番号13~15)から選択することができる。特定の実施態様では、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、配列番号10~15のアミノ酸配列の全てを含むことができる。

【0039】

該抗IL-6抗体又はその誘導体は、抗IL-6抗体又はその誘導体のVH及び/又はVL全体を含むことができる。特定の実施態様では、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、抗IL-6抗体のVH、配列番号259の配列を有するVH、及び/又は抗IL-6抗体のVL、及び配列番号261の配列を有するVLを含むことができる。

20

【0040】

好ましい実施態様では、該二価の二重特異性コンストラクトは、配列番号10~12のアミノ酸配列の少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域を含む重鎖、及び配列番号13~15のアミノ酸配列の少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域を含む軽鎖を含むscFvである抗IL-6抗体又はその誘導体を含む。ある実施態様では、該scFvは、配列番号259のアミノ酸配列、及び配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。

【0041】

本発明はまた、抗IL-6抗体若しくはその誘導体、又は配列番号10~15に対する言及が、それぞれ、配列番号20~25、30~35、40~45、50~55、及び60~65に対する言及に置き換えられる抗体28D2、18D4、8C8、9H4、及び9C8に基づく上の節による抗IL-6抗体若しくはその誘導体を含む、二価の二重特異性コンストラクトを提供する。28D2に基づく抗IL-6抗体及び誘導体の場合、配列番号259及び261に対する言及を、配列番号263及び265に対する言及に置き換えることができる。

30

【0042】

本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号10~15からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体を有する二価の二重特異性コンストラクトを包含する。同様に、本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号10~15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体を有する二価の二重特異性コンストラクトを包含する。ある実施態様では、該CDR領域は、配列番号10~15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を含む。

40

【0043】

本発明はまた、配列番号10~15のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗IL-6抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0044】

ある実施態様では、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、13A8、9H4、9C8、8C8、18D4、及

50

び28D2からなる群から選択されるか、又は該群に由来する。

【0045】

別の実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、31A12抗体のCDR領域由来の特定のモチーフを含むことができる。したがって、本発明は：

アミノ酸配列YYAX¹WAX²G

(式中、

X¹は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X²は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される)；(配列番号337)を含むCDR2領域、並びに/又は

アミノ酸配列AX¹TLX²S

(式中、

X¹は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X²は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)(配列番号338)を含むCDR5領域

を含む、抗IL-23抗体又はその誘導体を提供する。

【0046】

本明細書で使用されるように、CDR1はVH CDR1を指し、CDR2はVH CDR2を指し、CDR3はVH CDR3を指し、CDR4はVL CDR1を指し、CDR5はVL CDR2を指し、CDR6はVL CDR3を指す。

【0047】

別の実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、そのアミノ酸配列が、配列番号90~95からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は6つのCDR領域を含むことができる。該CDR領域は、可変領域の重鎖(VH)のCDR(すなわち、配列番号90~92から、及び/又は可変領域の軽鎖(VL)のCDR(すなわち、配列番号93~95)から選択することができる。特定の実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、配列番号90~95のアミノ酸配列の全てを含むことができる。

【0048】

該抗IL-23抗体又はその誘導体は、抗IL-23抗体又はその誘導体のVH及び/又はVLの全体を含むことができる。特定の実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、抗IL-23抗体のVH、配列番号267の配列を有するVH、及び/又は抗IL-23抗体のVL、配列番号269の配列を有するVLを含むことができる。

【0049】

好ましい実施態様では、該二価の二重特異性コンストラクトは、配列番号90~92のアミノ酸配列を有する少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域を含む重鎖、及び配列番号93~95のアミノ酸配列を有する少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域を含む軽鎖を含むscFvである、抗IL-23抗体又はその誘導体を含む。ある実施態様では、該scFvは、配列番号267のアミノ酸配列、及び配列番号269のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。

【0050】

本発明はまた、抗IL-23抗体若しくはその誘導体、又は配列番号90~95に対する言及が、それぞれ、配列番号100~105、110~115、120~25、及び130~135に対する言及に置き換えられる抗体49B7、16C6、34E11、及び35H4に基づく上の節による抗IL-23抗体若しくはその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0051】

本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号90~95からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23抗体又はその誘導体を有する二価の二重特異性コンストラクトを包含する。同様に、本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号90~95からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを包含する。ある実施態様では、該CDR領域は、配列

10

20

30

40

50

番号90～95からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を含む。

【0052】

本発明はまた、配列番号90～95のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗IL-6抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0053】

ある実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、31A12、34E11、35H4、49B7、及び16C6からなる群から選択されるか、又は該群に由来する。そのような抗体は、IL-23のp19サブユニットに結合する可能性が高い。

10

【0054】

別の実施態様では、該抗IL-23抗体又はその誘導体は、IL-12に結合することもできる。理論に束縛されることを望まないが、そのような抗体は、IL-23とIL-12の両方によって共有されるp40サブユニットに結合する可能性が高い。そのような抗体は、本明細書において、抗IL-23/IL-12抗体と呼ばれる。

【0055】

抗体が、p40に結合し、IL-23を阻害し、さらにIL-12を阻害することも除外されず-そのような抗体は、「抗IL-23抗体」の範囲内に含まれる。

【0056】

ある実施態様では、本発明は、45G5又は22H8抗体のCDR領域由来の特定のモチーフを含み得る、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を提供する。したがって、本発明は、IL-12とIL-23の両方を阻害し、以下のものを含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を提供する：

20

アミノ酸配列の配列WX¹KG(式中、X¹は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、若しくはトリプトファンであり、好ましくは、アラニン若しくはバリンである)(配列番号358)を含むCDR2領域;並びに/又はアミノ酸配列YAYX¹GDAFDP(式中、X¹は、アラニン若しくはイソロイシンである);(配列番号339)を含むCDR3領域、並びに/又は

アミノ酸配列SDYFNX¹(式中、X¹は、イソロイシン若しくはバリンである);(配列番号340)を含むCDR3領域、並びに/又は

30

アミノ酸配列QX¹SQX²(式中、

X¹は、アラニン若しくはセリンであり、かつ

X²は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

好ましくは、X²は、セリン若しくはトレオニンである)を含むCDR4領域;並びに/又は(配列番号359)

アミノ酸配列ASX¹LA(式中、X¹は、リジン若しくはトレオニンである)(配列番号341)を含むCDR5領域、並びに/又は

アミノ酸配列QSYDX¹NAGYG(式中、X¹は、アラニン若しくはバリンである)(配列番号342)を含むCDR6領域。

40

【0057】

ある実施態様では、該抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体は、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は6つのCDR領域を含むことができる。該CDR領域は、可変領域の重鎖(VH)のCDR(すなわち、配列番号140～142から、及び/又は可変領域の軽鎖(VL)のCDR(すなわち、配列番号143～145から選択することができる。特定の実施態様では、該抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体は、配列番号140～145のアミノ酸配列の全てを含むことができる。

【0058】

該抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体は、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体のVH及び/

50

又はVL全体を含むことができる。特定の実施態様では、該抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体は、抗IL-23/IL-12抗体のVH、配列番号271を有するVH、及び/又は抗IL-23/IL-12抗体のVL、配列番号273を有するVLを含むことができる。

【0059】

好ましい実施態様では、該二価の二重特異性コンストラクトは、配列番号140～142のアミノ酸配列を有する少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域、及び配列番号143～145のアミノ酸配列を有する少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つのCDR領域を含む軽鎖を含むscFvである、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む。ある実施態様では、該scFvは、配列番号271のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号273のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことができる。

10

【0060】

本発明はまた、抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体、又は配列番号140～145に対する言及が、それぞれ、配列番号150～155、160～165、170～175、180～185、及び190～195に対する言及に置き換えられる抗体45G5、1H1、4F3、5C5、及び14B5に基づく上の節による抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体を含む、二価の二重特異性コンストラクトを提供する。45G5に基づく抗IL-23/IL-12抗体及び誘導体の場合、配列番号271及び273に対する言及は、配列番号275及び277に対する言及に置き換えることができる。

【0061】

本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを包含する。同様に、本発明はまた、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む二価の二重特異性コンストラクトを包含する。ある実施態様では、該CDR領域は、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を含む。

20

【0062】

本発明はまた、配列番号140～145のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗IL-23/IL-12抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を有する二価の二重特異性コンストラクトを提供する。ある実施態様では、該エピトープは、IL-12とIL-23の両方に共通するp40サブユニット上に存在する。

30

【0063】

ある実施態様では、該抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体は、22H8、45G5、14B5、4F3、5C5、及び1H1からなる群から選択されるか、又は該群に由来する。

【0064】

二価の二重特異性コンストラクトの一部を形成し得る上記の抗IL-6抗体及びその誘導体は、単一の二価の二重特異性コンストラクト中で、上記の抗IL-23抗体又はその誘導体、(抗IL-23/IL-12抗体、及びその誘導体を含む)と独立に組み合わせることができることが理解される。そのようなコンストラクトでは、該抗IL-6抗体又はその誘導体と該抗IL-23抗体又はその誘導体は両方とも、非天然アミノ酸を組み込むことができ、該非天然アミノ酸によって、該抗IL-6抗体又はその誘導体は、該抗IL-23抗体又はその誘導体に連結される。

40

【0065】

本発明の二価の二重特異性コンストラクトはさらに、各々の抗体又はその誘導体中の非天然アミノ酸の間にリンカーを含むことができる。本発明の二価の二重特異性コンストラクトはさらに、ポリエチレングリコール分子(PEG)を含むことができる。PEG分子は、任意に、抗IL-6抗体又はその誘導体と抗IL-23抗体又はその誘導体、(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)の間のリンカーとしての役割を果たすことができる。好適には、他の水溶性ポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、多糖、ポリアルキレンオキシド、ヒド

50

ロキシエチルデンブロン、及びポリオールを用いることもできる。

【0066】

本明細書に記載の抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体、(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)は、それ自体有用である。本発明の別の態様では、本発明は、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの製造及び/又は併用療法において特別な有用性を有する、抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体、(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)を提供する。該抗IL-6及び抗IL-23又はそれらの誘導体、(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)を任意に修飾して、(例えば、PEG化によって)半減期を増大させることができる。抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体は、PEG基の連結を容易にするために非天然アミノ酸を組み込むことができる。

10

【0067】

本発明のある態様は、抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体(これは、例えば、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体であってもよい)を含む組合せ(個別投与、連続投与、又は個別投与用)を提供する。

【0068】

本発明はさらに、抗IL-6及び抗IL-23抗体誘導体(抗IL-23/IL-12抗体誘導体を含む)を含む二価の二重特異性コンストラクトを包含し、ここで、該抗体誘導体は、Fab、Fab'、F(ab)'、単鎖抗体(scFv)、カップポディ、ミニポディ、及びヤヌシンから選択される。

【0069】

したがって、本発明は、以下の抗体又はその誘導体を提供する：

20

請求項259記載のアミノ配列を含む重鎖、及び請求項261記載のアミノ配列を含む軽鎖を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体

請求項267記載のアミノ配列を含む重鎖、及び配列番号269のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、抗IL-23抗体又はその誘導体

請求項271記載のアミノ配列を含む重鎖、及び請求項273記載のアミノ配列を含む軽鎖を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【0070】

本発明の別の態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの一部をコードするポリヌクレオチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドは、本明細書に開示されるような、抗体又はその誘導体をコードすることができる。

30

【0071】

本発明はまた、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター、そのようなベクターを含む宿主細胞(任意に、該宿主細胞は栄養要求性である)、本明細書に開示されるような、抗体又はその誘導体のクローニング及び発現のためのオリゴヌクレオチドプライマーを提供する。本発明の特定のオリゴヌクレオチドプライマーは、200~258のいずれか1つに示されるヌクレオチド配列のうちの1つを含むオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

【0072】

本発明の別の態様では、二価の二重特異性コンストラクトを産生する方法が提供される。該方法は、以下のことを含むことができる：

(a)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体を提供すること；

40

(b)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾された抗IL-23抗体又はその誘導体を提供すること；

(c)これら2つが各部分の非天然アミノ酸間の連結によって結合されるように、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体を、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体と反応させること。

【0073】

該方法は、リンカー部分を含む連結によって、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体を、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体と結合させることを含むことができ、ここで、該リンカー部分の一方の末端は、該修飾された抗IL-6抗体又は

50

修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合され、リンカー部分のもう一方の末端は、修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合される。好適なリンカーの例は当技術分野で公知であり、短いペプチド配列を含む。本発明はまた、リンカーとしてのPEGの使用を提供する。したがって、ある実施態様では、該リンカー部分は、PEG分子であることができる。

【0074】

該方法は、

他の部分への連結の前のアジド、シアノ、ニトリル酸化物、アルキン、アルケン、歪んだシクロオクチン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、又はアリール、アルキル、若しくはビニルハライド、ケトン、アルデヒド、ケタール、アセタール、ヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アリールスルホネート、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸基:から選択される群を含む非天然アミノ酸の使用を含むことができる。特に、該非天然アミノ酸は、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、*p*-ブromoフェニルアラニン、*p*-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、*trans*-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、ビニルグリシン、ピロリジン、*N*- σ -*o*-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン(AzZLys)、*N*- σ -プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、*N*- σ -2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、*N*- σ -*tert*-ブチルオキシカルボニル-L-リジン(BocLys)、*N*- σ -アリルオキシカルボニル-L-リジン(AlocLys)、*N*- σ -アセチル-L-リジン(AcLys)、*N*- σ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZLys)、*N*- σ -シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン(CycLys)、*N*- σ -D-プロリル-L-リジン、*N*- σ -ニコチノイル-L-リジン(NicLys)、*N*- σ -*N*-Me-アントラニロイル-L-リジン(NmaLys)、*N*- σ -ピオチニル-L-リジン、*N*- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、*N*- σ -メチル-L-リジン、*N*- σ -ジメチル-L-リジン、*N*- σ -トリメチル-L-リジン、*N*- σ -イソプロピル-L-リジン、*N*- σ -ダンシル-L-リジン、*N*- σ -*o,p*-ジニトロフェニル-L-リジン、*N*- σ -*p*-トルエンスルホニル-L-リジン、*N*- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、*N*- σ -フェニルピルバミド-L-リジン、*N*- σ -ピルバミド-L-リジン;及び特に、他の部分への連結の前のアジド、アルキン、アルケン、又はアリール、アルキル、若しくはビニルハライド、ケトン、アルデヒド、ヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素基:から選択される基であることができる。特に、該非天然アミノ酸は、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、*p*-ブromoフェニルアラニン、*p*-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、*trans*-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、ビニルグリシンであることができる。

【0075】

該方法は、[3+2]環状付加/[3+2]双極性環状付加、又はクリック反応と一般に呼ばれるアジド-アルキン環状付加反応(これは、銅(I)、ルテニウム、他の金属によって触媒されるか、又は歪み及び/若しくは電子吸引基によって促進されることができる)、ヘック反応、園頭反応、鈴木反応、スティルカップリング、檜山/デンマーク反応、オレフィンメタセシス、ディールス-アルダー反応、ヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、又はヒドロキシルアミンとのカルボニル縮合を用いて、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体と、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体を結合させることを含むことができる。シュタウディンガーライゲーションも可能である。

【0076】

該方法はまた、以下のことを含む:

(a)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている、抗IL-6抗体又は

その誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；

(b)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組み込みによって修飾されている、抗IL-23抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；

(c)該宿主細胞が、該修飾された抗IL-6抗体若しくはその誘導体、又は該修飾された抗IL-23抗体若しくはその誘導体を発現するような条件下で、該宿主細胞を成長させること

(d)該抗IL-6抗体又はその誘導体、及び該抗IL-23抗体又はその誘導体を単離すること；

(e)該修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体が、各々の修飾された抗体又はその誘導体の非天然アミノ酸間の連結によって、該修飾された抗IL-23抗体又はその誘導体に結合されるように、該修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体を、該修飾された抗IL-23抗体又はその誘導体と反応させること。

10

【0077】

以下でさらに詳細に論じるように、該方法は、非天然アミノ酸(例えば、Aha)を、特定の選択されたアミノ酸がコードされる位置(通常、メチオニンがコードされる位置)に組み込むこと、並びに必要なならば、標的タンパク質のポリヌクレオチド配列を突然変異させて、非天然アミノ酸を組み込むことが望まれない位置のメチオニン(若しくは他の特定の選択されたアミノ酸)コドンを除くこと、及び/又は必要なならば、標的タンパク質のポリヌクレオチド配列を突然変異させて、非天然アミノ酸を組み込むことが望まれる位置に1以上の(通常、1つの)新しいメチオニン(若しくは他の特定の選択されたアミノ酸)コドン

20

を提供することによって、非天然アミノ酸(例えば、Aha)を含むこともできる。

【0078】

本発明の別の態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクトに含めるのに好適な親抗体を選択する方法であって、以下の工程を含む方法：

(i)IL-6又はIL-23に特異的なB細胞を選択する工程；

(ii)該B細胞の個別の試料を(例えば、96細胞ウェルプレートのウェルに)分注する工程；

(iii)該B細胞を培養する工程；

(iv)抗体を含む上清を、各々の分注試料から個別に回収する工程；

(v)各々の分注試料由来の上清を(例えば、ELISAを用いて)IL-6又はIL-23結合についてアッセイする工程；

30

(vi)該各々の分注試料由来の上清をIL-6又はIL-23活性の阻害についてアッセイする工程；

(vii)高レベルのIL-6若しくはIL-23活性の阻害及び/又は強いIL-6若しくはIL-23結合を示したウェルから抗体を選択する工程；並びに

(viii)任意に、IL-23分注試料由来の上清をIL-12活性の阻害についてアッセイする工程；並びに

(ix)高レベルのIL-12活性及び/又は強いIL-12結合をさらに示すIL-23抗体を親抗体として選択する工程。

【0079】

本発明の別の態様では、上記のような二価の二重特異性コンストラクトは、治療で使用するために提供される。通常、 T_H17 細胞の分化に關与する1以上の分子に結合するか、又は活性化された T_H17 細胞によって産生される1以上の分子に結合することによって、 T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、並びに/又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患を治療する際に使用される上記の二価の二重特異性コンストラクト。特定の実施態様では、そのような疾患には、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病が含まれる。

40

【0080】

本発明はまた、 T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、並びに/又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患を治療する際に使用するための、抗IL-6抗体及び抗IL-23抗体を含む併用療法を提供する。特に、そのような併用は、炎症性疾患及び自己免疫疾患の治療で使用するために提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0081】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、B細胞選択を示す。1枚のB細胞の96ウェルプレートの各ウェルを、B9細胞株増殖アッセイによるIL-6中和とELISAによるIL-6結合の両方についてアッセイした。比較のために、各アッセイの結果を並べている。

【図2】図2は、V領域レスキューからscFv作製までの実験プロセスの概略を示す。

【図3】図3A及びBは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒト及び霊長類IL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したような、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。図3C及びDは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒト及び霊長類IL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したように、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。図3Eは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒトIL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したように、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。

【図4】図4は、B細胞選択を示す。1枚のB細胞の96ウェルプレートの各ウェルをIL-23中和及びIL-23結合についてアッセイした。比較のために、各ウェルについての2つのアッセイの結果を並べている。

【図5】図5A～5Iは、選択された抗IL-23ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒトIL-23中和活性を示す。候補mAbを取得し、ヘテロ二量体組換えIL-23(eBio IL23)の中和について試験した。

【図6】図6A及び6Bは、霊長類及びヒトIL-23の中和活性を示す。いくつかのmAbのトランスフェクション上清を、ヘテロ二量体ヒトIL-23(パネルB)又は霊長類IL-23(パネルA)のどちらかの中和について、マウス脾細胞アッセイを用いて比較した。比活性の比較を可能にするために、Igレベルをトランスフェクション上清中で測定した。

【図7】図7Aは、IL-12及びIL-23の構造を示す。図7Bは、IL-12及びIL-23受容体、並びにそれらの会合メカニズムを示す。

【図8】図8Aは、いくつかのmAbのトランスフェクション上清を、ヒトIL-12の中和について、NK92細胞株アッセイを用いて比較したことを示す。図8Bは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Cは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Dは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Eは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8F～8Gは、選択されたmAbによるヒトIL-12の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1000pg/ml

のヒトIL-12の中和について試験した。図8H及び8Iは、選択されたmAbによる霊長類IL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1000pg/mlの霊長類IL-23の中和について試験した。

【図9】図9Aは、ウサギscFvを哺乳動物細胞で発現させたことを示す。該scFvを上清中でSDS PAGEにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したような200pg/mlのヒトIL-6の中和について試験した。図9Bは、9C8ヒト化を示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。様々なヒトフレームワーク配列を9C8のヒト化について比較した。該ヒト化mAbをHEK293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。トランスフェクション上清を、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。図9Cは、ヒト化抗IL-6 mAbを示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8及び18D4を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。該ヒト化mAbをHEK293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。トランスフェクション上清中のIgGを定量し、それらを、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。図9Dは、ヒト化抗IL-6 mAb及びscFvを示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。2つのヒト化9C8 scFvをウサギscFvから作製し、2つの異なるVHCDR1配列を比較した。該ウサギscFvをヒト化しないで直接発現させ、該ヒト化mAb、及びscFvをHEK293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。トランスフェクション上清を、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。

【図10】図10は、scFvフォーマットでのヒトV-領域フレームワーク上へのCDR移植のためのPCR戦略を示す。VL、軽鎖V-領域;L、リーダー(シグナルペプチド);FR、フレームワーク領域;CDR、相補性決定領域;矢印は、個々のプライマー及びPCR増幅におけるその方向性を示す;CDR特異的プライマーは、鎖及びCDR番号で表されており、HはVHであり、LはVLである;プライマーの方向性は、F(フォワード)及びR(リバース)でも表されている;VL-FR4とVH-FR1の間の曲線は、scFv構築のために付加される20aa(G4S)4リンカーを表す。

【図11】図11A及び11Bは、ヒト化scFv 13A8によるIL-6中和を示す。ヒト化13A8抗IL-6 scFvを哺乳動物細胞で発現させた。該scFvをNi親和性によって上清から精製した。ヒトIL-6(B)又は霊長類IL-6(A)の中和についての試験を、B9細胞増殖アッセイを用いて実施した。図11Cは、抗IL-6ヒト化scFvによるIL-6中和を示す:ヒト化9C8 scFv v3-1(多工程法から得たもの)及び28D2 scFvを哺乳動物細胞で発現させ、Niクロマトグラフィーで精製し、IL-6誘導性B9細胞増殖の阻害について比較した。

【図12】図12は、抗IL-23 31A12 scFvがIL-23を中和することを示す。31A12 mAbをヒト化scFvに変換し、親mAbとともに哺乳動物トランスフェクションで発現させた。両方を、600pg/mlのeBiosciences製のヒトIL-23の中和について、IL-17の誘導用のマウス脾細胞アッセイを用いて試験した。

【図13】図13は、ヒト化抗IL-23 45G5 scFvがヒトIL-23を中和することを示す:ヒト化45G5 scFvをキメラmAb 31A12及び22H8と比較した。全てのmAbを哺乳動物細胞で発現させ、精製し、1.2ng/mlのeBiosciences製のヒトIL-23の阻害について、IL-17誘導用のマウス脾細胞アッセイを用いて試験した。

【図14】図14A~14Dは、2つのMet残基を除去するように改変されたヒト化13A8 scFv哺乳動物発現コンストラクトの試験を示す。様々な二重突然変異体コンストラクト、及び親scFv(MM)をHEK細胞で発現させ、50pg/mlのヒトIL-6の阻害について、インビトロのB9バイオアッセイを用いて試験した。図14Eは、HEK293細胞で一過性に発現された、両方のMetが置換されているヒト化31A12 scFv(H34Lバージョンのみを示す)、及びMetを含む親scFvの

試験を示す。上清を、600pg/mlのeBiosciences製のIL-23の生物学的活性の阻害について、マウス脾細胞アッセイで試験した。図14F及び14Gは、H82 MetがL又はVのどちらかと置換され、両方ともH34Lと組み合わせられ、親45G5キメラmAb及びMetを含まない31A12 scFv(31A12-LL)と比較された、ヒト化45G5 scFvの試験を示す。全てをHEK293細胞で一過性に発現させた。scFv及びmAbを精製し、1200pg/mlのeBiosciences製のIL-23の生物学的活性の阻害について、マウス脾細胞アッセイで試験した。図14Hは、ヒト化抗IL-23 scFvがヒトIL-23を中和することを示す。野生型抗IL-23 scFv 22H8及び45G5を、示したような、H34のMetがV又はLのどちらかと置換された22H8 scFvと比較した。

【図15】図15は、N又はC末端に、又はGly/Serリンカー中にAhaを有する大腸菌28D2 scFvによるIL-6の中和を示す:N又はC末端に、又はGly/Serリンカー中に単一のMetコドン

10

を有する28D2コンストラクトを、大腸菌発酵で発現させ、MetをAhaに置換した。これらの精製scFvを、50pg/mlのヒトIL-6の中和について試験した。

【図16】図16Aは、20K線状PEGビスアルキンを用いた13A8cAhaのPEG化を示す。20K PEGビスアルキンを用いた13A8cAha PEG化反応のSDS PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:13A8cAhaのみ;レーン2:(-)対照-銅なし;レーン3:200mLの小規模反応混合物;レーン4:600mLの反応-遠心分離済み-試料上清。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化13A8cAhaの70%収率(レーン4)を示した。図16Bは、20K線状PEGビスアルキンを用いた31A12cAhaのPEG化を示す。20K PEGビスアルキンを用いた31A12cAha PEG化のSDS PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー;レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:小規模反応;レーン5:400mLの反応-遠心分離済み-試料上清。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化31A12cAhaの59%収率(レーン5)を示した。図16Cは、40K線状PEGビスアルキンを用いた13A8cAhaのPEG化を示す。13A8c-40KPEGの調製のSDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。走査型レーザーデンストメトリーは、51%収率を示した。図16Dは、20K線状PEGビスアルキンを用いた13A8L AhaのPEG化を示す。SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。走査型レーザーデンストメトリーは、60%収率を示した。図16Eは、20K線状PEGビスアルキンを用いた45G5cAhaのPEG化を示す。SDS PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:(-)対照-銅なし;レーン2:小規模反応;レーン3:小規模反応、トリアゾール配位子なし;レーン4:160mLの反応-遠心分離済み-試料上清;レーン6:分子量マーカー。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化45G5cの59%収率を示した。

20

【図17】図17Aは、28D2c-PEGを用いたIL-6中和を示す。異なる条件下で再フォールディングさせた2つの28D2c-30KPEGの試料をIL-6中和についてアッセイした。図17B及びCは、PEG-scFvの安定性を示す:31A12-PEGは、69 のTmを有する。13A8-PEGは、66 のTmを有する。これは、示したような溶液中でのこれらの分子の安定性に反映される。各々のscFv-PEGをPBS(又は示されている場合、Tween)中でインキュベートし、親scFv(哺乳動物発現から得たもの)と比べた効力についてアッセイする。13日間又は20日間の保存温度が示されている;3XFTは、3サイクルの凍結及び解凍を示す。

30

【図18】図18Aは、13A8c-PEG-31A12c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー、レーン2:13A8-PEGのみ、レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:1000mLの反応。図18Bは、13A8n-PEG-45G5c二重特異性体の調製を示す:SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:大規模反応1、レーン3:大規模反応2。図18Cは、13A8c-PEG-22H8c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー、レーン2:13A8c-PEGのみ、レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:1150mLの反応。図18Dは、13A8c-40KPEG-31A12cAhaの調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:MWマーカー、レーン2:13A8c-40KPEG、レーン3:反応混合物の直接試料、レーン4:最終処理混合物の試料、6uLの投入量、レーン5:最終処理混合物の試料、12uLの投入量。レーン6:銅なしでの反応、レーン8:31A12cAhaのみ。収率(2つの投入物の平均)=56%、生成物対一価物の比率は4.5:1。図18Eは、13A8L-PEG-31A12c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1 二重特異性体を形成させるための31A12-20KPEG + 13A8LAhaの反応。反応収率は37%であることが分かった。

40

50

【図 1 9】図19Aは、IL-6及びIL-23の中和に対する31A12c-PEG-13A8cの機能的活性を示す。scFvのみと比較した二重特異性体対IL-6及びIL-23の生体活性。A:二重特異性体の13A8 scFv部分の抗IL-6活性。19B:二重特異性体の31A12c scFv部分の抗IL-23活性も測定した。EC50を力価測定により算出した。

【図 2 0】図20Aは、皮下投与された28D2c scFvのラットPKを示す。ラットを1mg/kgの抗IL-6 scFv 28D2cで皮下処置した。示された時間で採血し、ラットの血漿中の28D2の存在を、抗IL-6中和アッセイを用いて測定した。図20Bは、皮下投与された31A12c-PEG-13A8c二重特異性体のラットPKを示す:ラットを1mg/kgの31A12c-PEG-13A8c二重特異性体で皮下処置した。示された時間で採血し、ラットの血漿中の二重特異性体の存在を、抗IL-6中和アッセイを用いて測定した。比較のために、図20Bからの28D2 scFvのPKデータがここに含まれている。

10

【図 2 1】図21は、13A8n-PEG-31A12c二重特異性体の生体活性を示す。該二重特異性体による50pg/mlのIL-6の中和をB9パイオアッセイで測定した。比較のために、哺乳動物13A8 scFvタンパク質が含まれている。

【図 2 2】図22は、IL-6及びIL-23に対する13A8n-PEG-45G5の機能的活性を示す。二重特異性体対IL-6及びIL-23の生体活性が示されている。13A8n-PEG-45G5二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(22A)及び1200pg/ml(22B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株パイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

【図 2 3】図23は、IL-6及びIL-23に対する13A8c-PEG-22H8cの活性を示す。IL-6及びIL-23に対する13A8c-PEG-22H8cの生体活性が示されている。13A8c-PEG-22H8c二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(A)及び1200pg/ml(B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株パイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

20

【図 2 4】図24は、IL-6及びIL-23に対する13A8c-40KPEG-31A12cの活性を示す。IL-6及びIL-23に対する13A8c-40KPEG31A12cの生体活性が示されている。該二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(A)及び1200pg/ml(B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株パイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

【図 2 5】図25Aは、ラットにおける皮下投与後の13A8c-40KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-20KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-PEG、及び裸のscFv(28D2)の血清レベル(B9アッセイで測定した場合)を示す。図25Bは、ラットにおける皮下投与後の13A8c-40KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-20KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-PEG、及び裸のscFv(28D2)の血清レベルの薬物動態解析の結果を示す。

30

【図 2 6】図26Aは、 $T_H17/22$ 細胞のインビトロ分極を示す。 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を含む、様々なヒトT細胞サブセットを、インビボ系とインビトロ系の両方で発生させることができる。図26Bは、インビトロでのヒトTh17の発達を示す:ヒトPBMCを、示したように、単独又はLPS及びTGF β の存在下のどちらかで、抗CD3/28で7日間インビトロで刺激した。その後、それらを、示したように、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17及びRORCについて染色した。図26Cは、 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を培養PBMCから発生させることができることを示す。 T_H17 は混合リンパ球反応物中に見られ、一方、 T_H17 及び T_H22 は、抗CD3で刺激したPBMCで見られる。PBMCを抗CD3/28 + IL-1 β + LPS又は同種異系PBMC + ペプチドグリカンで5日間刺激し、その後、PMA + イオノマイシンで再刺激し、細胞内のIL-17及びIL-22について染色した。

40

【図 2 7】図27は、選択されたscFvを用いたインビトロでのTh17及びTh22発生の阻害を示す。ヒトPBMCを、示されたscFvの存在下、抗CD3 + 抗CD28及びLPS + IL-1 + TGF β 中で5日間培養した。5日後、該細胞をPMA + イオノマイシンで再刺激し、CD4、IL-17、及びIL-22産生細胞の%をフローサイトメトリーで決定した。

【図 2 8】図28は、混合リンパ球反応を示す。単独で使用されたか、又は組み合わせて使用された抗IL-6 scFv及び抗IL-23 scFvの T_H17 分化に対する阻害効果が示されている。示

50

された抗IL-6 scFv及び抗IL-23 scFvを、同種異系PBMCによる刺激の間、PBMC培養物に添加した。5日後、該細胞を洗浄し、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17について染色した。

【図 2 9】図29は、二重特異性抗IL-6/IL-23抗体の T_H17 分化に対する有益な阻害効果を示す。抗IL-6及び抗IL-23 mAb(13A8及び31A12)、並びに31A12c-20KPEG-13A8c二重特異性体を単独で又は組み合わせて試験した。該mAb又は該二重特異性体を、同種異系PBMCによる刺激の間、PBMC培養物に添加した。添加された結合ドメインのモル濃度が示されている。5日後、該細胞を洗浄し、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17について染色した。

【図 3 0】図30は、 $T_H17/22$ 細胞のインビボ分極を示す。 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を含む、様々なヒトT細胞サブセットを、インビボ系とインビトロ系の両方で発生させることができる。

【図 3 1】図31Aは、IL-6に対するアンタゴニストとIL-23に対するアンタゴニストの組合せによるヒト化scid/huマウスの処置を示す。ヒト免疫細胞を移植するのに成功したNSGマウスに、ヒト同種異系皮膚を移植し、100mgの13A8c-PEG抗IL-6及び31A12c-PEG抗IL-23(scFv-PEG)を2日おきに投与した。皮膚移植の30日後、脾臓を摘出し、単一細胞懸濁液をPMA/イオノマイシンで刺激し、細胞内サイトカインについてアッセイした。CD3+/CD4+細胞を、IL-17及びIL-22産生について、フローサイトメトリーで解析した。図31Bは、IL-6に対するアンタゴニストとIL-23に対するアンタゴニストの組合せで処置したヒト化scid/huマウスの脾臓由来のCD3+/CD4+細胞における細胞内サイトカイン発現を示す。先の図に記載したように、皮膚同種移植片を有する処置NSGマウス及び未処置NSGマウス由来の脾細胞、CD3+/CD4+細胞を、細胞内IL-17及びIL-22について、フローサイトメトリーで解析した。データは、抗IL-6及び抗IL-23で処置した動物におけるIL-17及びIL-22陽性CD4+ T細胞の全集団の顕著な低下を示している。該データは、TH17細胞又はTH22細胞の示されたサブセットに従って、処置マウス又は未処置マウスの平均及びSEMとしてプロットされている。

【図 3 2】図32は、Sci/hu同種移植モデルでのTh17及びTh22分化の阻害に対する13A8cPEG-31A12c二重特異性体の効果を示す：ヒト免疫系が樹立された成獣scidマウスに同種異系ヒト皮膚を移植した。EOD処置の4週間後、示したように、脾細胞をインビトロで活性化し、サイトカインを、各々のヒトCD4 T細胞において、多重パラメータフローサイトメトリーにより測定した。各々の点は、個々の処置マウス又は対照マウスを示し、各々のマウスは、(示された各々のサイトカインについて)3回示されている。単一特異的scFv抗IL23は31A12cPEGであり；二重特異性scFv抗IL6 IL23は13A8c-20KPEG-31A12cである。未処置マウスにはプラセボを投与した。13A8c-20KPEG-31A12cは、IL-17(図32A、* $p < 0.05$)及びIL-22(図32B、 $p < 0.05$)産生CD4⁺ヒトT細胞の阻害によって測定したとき、Th17細胞の分化を有意に低下させた。他の全てのパネルは、一般的な白血球マーカーを測定したものであり、13A8c-20KPEG-31A12cが、TH17/22細胞以外の白血球に対して一般に免疫抑制性であるわけではないことを示している。

【図 3 3】図33は、13A8c-20KPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体(B)で処置したマウスと比べたプラセボ処置マウス(A)の表皮の切片の組織学的解析を示し、この解析において、13A8c-20KPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体は、乾癬の組織学的特徴、特に、表皮厚を有意に低下させる。

【図 3 4】図34は、scid/hu同種移植モデルを用いた6回の実験が遂行されたことを示し、処置期間中、内容を知らされなかった(blinded)病理学者によって判定された臨床スコアが図34Aにまとめられている(臨床スコア)。組織学的切片の解析は、乾癬の最も意味のあるマトリクスの非常に定量的な測定を可能にし、特に、客観的尺度である表皮厚が図34Bに示されている(定量的表皮厚)。二重特異性scFvは、乾癬の臨床スコア及び表皮厚の低下に対する極めて有意かつ強力な効果を有する。

【図 3 5】図35Aは、耳の過形成マウスモデルの読出しを示す：マウスに、0、1、2、及び3日目に、20 μ Lの容量の右耳へのrhIL-23の皮内注射(1 μ g)を投与した。対照として、対側耳にPBSを注射した。耳の厚さを4日目に測定した。1つ目のパネルは、PBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物についての

10

20

30

40

50

、PBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の厚さの増加を示す。図35Bは、マウスを、-1日目及び2日目に、ビヒクル又は13A8c-20KPEG-31A12c(100ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物又は13A8c-20KPEG-31A12cで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。図35Cは、マウスを、-1日目にのみ、ビヒクル又は13A8c-20KPEG-31A12c又は13A8c-40KPEG-31A12c(100ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物、13A8c-20KPEG-31A12cで処置した動物、又は13A8c-40KPEG-31A12cで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。図35Dは、マウスを、-1日目及び2日目に、ビヒクル又は13A8c-40KPEG-31A12c(100ug i.p.)又はウステキヌマブ(288ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物、13A8c-40KPEG-31A12cで処置した動物、又はウステキヌマブで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。

10

20

30

40

50

【図36】図36Aは、ELISAプレートにコーティングされたIL-12に対する抗IL-23キメラ抗体の結合を示す。抗IL-6抗体(13A8)は、陰性対照として含まれている。1つ目のパネルでは、ヒトIL-12が、プレートにコーティングされている。22H8が強い結合を示すのに対し、31A12及び49B7は、より弱いけれども、依然として陽性の結合を示す。2つ目のパネルでは、サルIL-12(マカク)が、プレートにコーティングされている。この場合、49B7、31A12、及び22H8は全て、マカクIL-12に対する強い結合を示す。3つ目のパネルでは、プレートが、ヒトIL-12 p40サブユニットでコーティングされている。22H8は強い結合を示し、49B7及び31A12は、p40サブユニットに対するより弱い結合を示す。図36Bは、NK92細胞バイオアッセイにおけるマカクIL-12誘導性インターフェロン γ 分泌の中和を示す。31A12と22H8は両方とも、マカクIL-12の強い阻害を示す。図36Cは、NK92細胞バイオアッセイにおけるヒトIL-12誘導性インターフェロン γ 分泌の中和を示す。この場合、マカクIL-12とは対照的に、ヒトIL-12は、31A12によっても49B7によっても中和されない。22H8は、マカクIL-12とヒトIL-12の両方を中和する。

【発明を実施するための形態】

【0082】

(発明の詳細な説明)

(二重特異性コンストラクト)

本明細書では、特に、IL-6及びIL-23に結合し、それらの活性を調節する二価の二重特異性コンストラクトが記載される。IL-6とIL-23は両方とも、 T_H17 細胞の分化及び活性化において役割を果たすことが知られている。活性化 T_H17 細胞はさらに、種々の下流経路を通じて免疫応答を媒介することに関与する。これら2つのサイトカインは、 T_H17 分化の異なる段階で機能しており、IL-6は、 T_H17 経路のT細胞コミットメントのごく初期に作用し、IL-23は、コミットした T_H17 細胞に対して作用する。したがって、本発明は、 T_H17 活性化経路の2つの異なる点を阻害し、かつ(例えば、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、及び間質細胞における) T_H17 産物によって媒介される下流の炎症応答の一部に対してさらなる阻害効果を有する新規の二価の二重特異性コンストラクトを提供する。IL-6とIL-23の両方を標的とすることによって、該二重特異性分子は、 T_H17 経路内の複数の点で T_H17 媒介性応答を阻害することができ、また、対応する単一特異性抗体単独よりも大きい効力で作用する可能性がある。当業者は、二価の二重特異性抗体の作製に関わる不確実性を考慮して、その成分抗体の機能的特徴を保持するか、又は改善された機能的特徴を有する安定な二価の二重特異性コンストラクトの産生の成功が、意外かつ予想外の結果を表すものであることを理解するであろう。

【0083】

さらに、本発明の二価の二重特異性コンストラクトは、 T_H22 細胞活性化を調節する(例えば、阻害する)ことができる。 T_H22 は、最近同定された(Eyerichらの文献(2009))、独特のTヘルパー細胞サブセットを表し、該細胞サブセットは、炎症過程及び創傷治癒過程に関与し、特に、皮膚炎症に関係があるとされている(Nogalesらの文献(2009))。その活性化及びその後の作用のメカニズムは、引き続き調査の対象となっているが、細胞それ自体は、IL-17でもインターフェロン γ でもなく、IL-22及びTNF- α の分泌によって特徴付けられる。 $Th22$ 細胞は、完全には特徴付けられていないが、乾癬患者から単離することができ、他のT細胞サブセットで見られるものとは異なる遺伝子発現プロファイルを表す。IL-22発現は、IL-23依存的であると報告されている(Kreymborgらの文献(2007))。ここで実施された研究は、 $Th22$ 細胞が、成長刺激をIL-21に依存する $Th17$ 細胞とは対照的に、IL-2依存的であることをさらに示唆している。

10

【0084】

本発明の抗体及び二価の二重特異性コンストラクトは、IL-23、又はIL-23とIL-12の両方のどちらかに特異的であることができる。したがって、本発明は、IL-23に結合し、IL-12分子も標的とする抗体及び二価の二重特異性コンストラクトのサブセットを提供する。理論に束縛されることを望まないが、抗IL-23抗体のこのサブセット(本明細書では、抗IL-23/IL-12抗体と呼ばれる)は、IL-12とIL-23の両方に共通するp40サブユニットに結合することができると考えられる(例えば、図10参照)。IL-23のp40サブユニットを標的とするものは、IL-23に加えて、IL-12を阻害すると考えられる。さらに、p40に対する抗体は、IL-12活性を阻害することなく、IL-23活性を弱めるエピトープに結合することができる。対照的に、IL-23のp19サブユニットを標的とする抗体は、IL-12に結合するとは考えられない。IL-12は、 T_H1 媒介性の免疫応答に関与し、したがって、これらの特定の二価の二重特異性コンストラクトは、 T_H17 細胞媒介性の免疫応答だけでなく、 T_H1 細胞媒介性の応答を調節する際にも有用であり得る。これは、その病因に対して T_H1 媒介性の側面と T_H17 媒介性の側面の両方を有する状態を治療するのに特に有利であり得る。

20

【0085】

したがって、ある実施態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクトは、抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体を含む。

【0086】

別の実施態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクトは、抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む。

30

【0087】

本発明の二価の二重特異性コンストラクト特定の例は、インビトロ法とインビボ法の両方を用いて、IL-23活性とIL-6活性の両方を調節する際のその有用性についてアッセイすることができる。特に、以下で詳述されているアッセイを用いることができる。

【0088】

二価の二重特異性コンストラクトの成分、並びにその同定及び製造手段は、以下でさらに論じられている。

【0089】

(親抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体の作製)

40

本発明の二価の二重特異性コンストラクトにおいて、抗体、及びその誘導体が基にしている初期抗体を、標準的な実験技術によって同定することができる。これらの抗体は、本明細書において、親抗体と呼ばれる。

【0090】

(親抗体の選択)

ある実施態様では、親抗体は、IL-6、IL-23、又はIL-12に結合するその能力に基づいて選択される。親抗体の結合は、そのKd値を決定することによって測定することができる。別の実施態様では、親抗体は、IL-6、IL-23、又はIL-12の活性を調節するその能力に基づいて選択される。好ましい実施態様では、親抗体は、IL-6、IL-23、又はIL-12に結合するその能力、及びIL-6、IL-23、又はIL-12の活性を調節するその能力に基づいて選択される

50

。親抗体は、IL-6、IL-23、若しくはIL-12の生物学的活性を阻害するその能力について選択され得るか、又はそれらは、IL-6、IL-23、若しくはIL-12の生物学的活性を促進するその能力について選択され得る。好ましくは、親抗体は、IL-6、IL-23、及びIL-12を阻害するその能力について選択される。

【0091】

(親抗体の供給源)

ある実施態様では、親抗体又はその誘導体は、同一の又は別々の動物種から得ることができる。

【0092】

親抗体は、例えば、霊長類、齧歯類、ウサギ目、核脚下目、又は軟骨魚類で産生される抗体から得ることができる。

10

【0093】

親抗体は、トランスジェニック動物から得ることができる。例えば、それらは、ヒト免疫系を有するように遺伝子改変されているトランスジェニックマウス、例えば、Xenomouse(登録商標)から得ることができる。そのようなトランスジェニック動物で産生される抗体は、外因性の免疫系によって産生される抗体の特徴を有することができ、例えば、Xenomouse由来の抗体は、ヒト抗体とみなすことができる。

【0094】

親抗体の1つ又は複数が齧歯類から得られる場合、齧歯類は、有利には、マウス又はラットである。

20

【0095】

抗体がウサギ目から得られる場合、ウサギ目は、有利には、ウサギである。

【0096】

親抗体の1つ又は複数が核脚下目から得られる場合、それらは、ラクダ、ラマ、又はヒトコブラクダから得られる。これらの種は、単一の可変ドメインのみの高親和性抗体を産生することが知られているので、そのような「ラクダ科」抗体のこうした使用は有利であり得る。核脚下目抗体が使用される場合、VHHドメイン又はその修飾変異体を使用することが有利である。

【0097】

親抗体の1つ又は複数が軟骨魚類から得られる場合、軟骨魚類は、有利には、サメである。

30

【0098】

親抗体の1つ又は複数が霊長類から得られる場合、霊長類は、有利には、サル又は類人猿である。

【0099】

(抗体の不活化)

親抗体は、標準的な実験技術によって不活化することができる。したがって、本発明は、本発明による二価の二重特異性コンストラクトへの組込みに好適である親抗体から作製されるモノクローナル抗体を提供する。

【0100】

40

(特定の抗体の組合せ)

本発明はまた、抗体及び/又はその誘導体の組合せを含む組成物を提供する。該組成物は、IL-6抗体又はその誘導体、及びIL-23抗体又はその誘導体を含む。IL-23抗体又はその誘導体は、IL-12にも結合することができる。

【0101】

抗体、及びその誘導体の好ましい組合せは、下で定義されるIL-6抗体のうちのいずれか1つを、下で定義される抗IL-23又は抗IL-23/IL-12抗体のうちのいずれか1つと組み合わせたものを含む。

【0102】

そのような組合せを含む組成物は、単独で投与されたときの個々の抗体よりも大きい活

50

性を有すると考えられる。抗体又はその誘導体の特に好ましい組合せは、抗IL-6抗体の13A8、又は13A8に基づく誘導体、及び抗IL-23抗体の31A12、又は31A12に基づく誘導体である。抗体のこの組合せは、どちらかの抗原のみと比べて、より大きい T_H17 細胞活性の阻害を提供する。該組合せは、当技術分野で公知の抗体よりも大きい T_H17 細胞阻害活性を有する。さらに、それは、有利に低い用量でこの阻害活性を示す。

【0103】

抗体又はその誘導体の特に好ましい組合せは、PEG化IL-6抗体又はその誘導体を、PEG化IL-23抗体又はその誘導体と組み合わせたものを含む。IL-23抗体又はその誘導体は、IL-12にも結合する(すなわち、IL-23/IL-12抗体である)ことができる。

【0104】

(抗体のヒト化)

二価の二重特異性コンストラクトの抗体は、ヒトに投与されたとき、それらが免疫原性の低いものとなるように改変に供することができる。そのような改変は、キメラ化、ヒト化、CDR-移植、脱免疫化、及び/又は最も近いヒト生殖系列配列に対応するフレームワーク領域アミノ酸の突然変異(生殖系列化)として一般に知られている技術のうちの1つ又は複数を含むことができる。抗体をそのような改変に供することは、もし改変に供さなければ、宿主免疫応答を誘発することになる抗体を、宿主免疫系にとって、より又は完全に「見えないもの」にし、結果として、そのような免疫応答が起こらないか、又は低減するという利点を有する。したがって、この実施態様によって記載されているように改変されている抗体は、いかなるそのような改変(複数可)も受けていない対応する抗体よりも長い期間、免疫応答関連の副作用を低下させて、又は該副作用を全く伴わずに、投与可能であり続ける。当業者は、抗体が望まない宿主免疫応答を誘発するのを防ぐために、抗体を改変しなければならないかどうか、又は抗体をどの程度改変しなければならないかを決定する方法を理解しているであろう。

【0105】

したがって、本発明は、ヒト化抗体、又はキメラ抗体が、1以上の生物体由来のアミノ酸配列を含むか、又は合成アミノ酸配列を含むように改変されているヒト化抗体、又はキメラ抗体を提供する(例えば、本発明によるヒト化抗体又はキメラ抗体は、齧歯類から得られたCDR領域に接続されたヒトフレームワーク領域を含むことができる)。

【0106】

(関心対象の特定の抗体)

したがって、本発明によれば、特定のヒト化抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体が提供される。これらの抗体は、両方ともIL-6、IL-23、又はp40に結合し、かつその生物学的活性を調節する(例えば、阻害する)能力を示した親抗体に基づいている。さらに、本発明によって提供される特定の抗体は、不死化及びヒト化の後に、これらの能力を保持するか、又は実質的に保持する。

【0107】

関心対象の特定のヒト化抗体としては、以下のものが挙げられる：

抗IL-6抗体：

13A8(配列番号259のVH及び配列番号261のVLを含む)；

9H4(配列番号46のVH及び配列番号48のVLを含む)；

9C8(配列番号56のVH及び配列番号58のVLを含む)；

8C8(配列番号36のVH及び配列番号38のVLを含む)；

18D4(配列番号26のVH及び配列番号28のVLを含む)；並びに

28D2((配列番号16のVH及び配列番号18のVLを含む)。

抗IL-23抗体：

31A12(配列番号267のVH及び配列番号269のVLを含む)；

34E11(配列番号116のVH及び配列番号118のVLを含む)；

35H4(配列番号126のVH及び配列番号128のVLを含む)；

49B7(配列番号96のVH及び配列番号98のVLを含む)；並びに

10

20

30

40

50

16C6(配列番号106のVH及び配列番号108のVLを含む)。

抗IL-23/IL-12抗体:

45G5(配列番号275のVH及び配列番号277のVLを含む);

14B5(配列番号186のVH及び配列番号188のVLを含む)

4F3(配列番号166のVH及び配列番号168のVLを含む)

5C5(配列番号176のVH及び配列番号178のVLを含む)

22H8(配列番号271のVH及び配列番号273のVLを含む);並びに

1H1(配列番号156のVH及び配列番号158のVLを含む)

【0108】

特定の好ましいヒト化抗体は、ヒト化形態の13A8、31A12、及び22H8である。

【0109】

(抗体変異体)

本発明はまた、例えば、二価の二重特異性コンストラクトの成分として、抗体変異体を提供する。該抗体は、結合親和性、及びIL-6、IL-23、又はIL-12の生物学的活性を調節する能力を保持するか、又は実質的に保持する(例えば、変異体抗体のKd値は、その親抗体と比べて少なくとも80%であり、生物学的活性を調節するその能力は、本明細書に開示されるアッセイによって決定したとき、その親抗体の能力の少なくとも80%である)。

【0110】

変異体抗体又はその誘導体は、重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを突然変異させて、抗体の結合特性を改変することによって得ることができる。例えば、突然変異を、CDR領域の1つ又は複数をコードする核酸分子中で生成させ、IL-6若しくはIL-23に対する抗体のKdを増減させるか、IL-6、IL-23、若しくはIL-12の生物学的活性を調節する抗体の能力を増減させるか、又は抗体の結合特異性を改変することができる。部位特異的突然変異誘発を用いてそのような突然変異を導入する技術は、当技術分野で周知である。

【0111】

さらなる変異体抗体又はその誘導体は、重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを突然変異させて、等電点(pI)を改変し、最終製剤のpH3~7.5の範囲でのタンパク質安定性を高めて、ジスルフィド結合シャッフリングを回避することによって得ることができる。例えば、配列番号332、31A12のpI最適化(この場合、以下のアミノ酸:Q26R、L56R、K109-G110insR、及びQ142Kが改変された);配列番号334、13A18のpI最適化(この場合、以下のアミノ酸:Q26R、L56R、K112-G113insR、及びQ145Kが改変された)を参照されたい。さらに、安定性は、重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインを突然変異させて、溶液中での生成物の凝集を低下させることによって高めることができ、例えば、溶解性を高め、生成物の凝集を低下させると予想される、配列番号331、31A12のF12S突然変異、及びpI最適化とF12S突然変異が組み合わされた、配列番号333、31A12を参照されたい。

【0112】

別の実施態様では、核酸分子を、フレームワーク領域のうちの1つ又は複数において突然変異させることができる。突然変異をフレームワーク領域又は定常ドメイン中で生成させ、抗IL-6又は抗IL-23抗体の半減期を増大させることができる。フレームワーク領域又は定常ドメイン中の突然変異を生成させて、別の分子への共有結合若しくは非共有結合のための部位を提供するように抗体の免疫原性を改変するか、又は補体結合のような特性を改変することもできる。

【0113】

したがって、本発明によれば、突然変異を、単一の突然変異抗体中のフレームワーク領域、定常ドメイン、及び可変領域の各々において生成させることができる。或いは、突然変異を、単一の突然変異抗体中のフレームワーク領域、可変領域、又は定常ドメインのうちの1つでのみ生成させることができる。

【0114】

(配列バリエーション)

ある実施態様では、本発明は、突然変異前の抗IL-6抗体との少なくとも90%の配列同一

10

20

30

40

50

性を有する変異体抗IL-6抗体を提供する。好ましくは、変異体抗IL-6抗体は、突然変異前の抗IL-6抗体との少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。

【0115】

ある実施態様では、本発明は、突然変異前の抗IL-23抗体との少なくとも90%の配列同一性を有する変異体抗IL-23抗体を提供する。好ましくは、変異体抗IL-23抗体は、突然変異前の抗IL-23抗体との少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。

【0116】

ある実施態様では、本発明は、突然変異前の抗IL-23/IL-12抗体との少なくとも90%の配列同一性を有する変異体抗IL-23/IL-12抗体を提供する。好ましくは、変異体抗IL-23/IL-12抗体は、突然変異前の抗IL-23/IL-12抗体との少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。

【0117】

(付加、欠失、置換)

一実施態様では、突然変異前の抗IL-6抗体と比べた変異体抗IL-6抗体のVH領域又はVL領域のどちらかにおいて10個以下のアミノ酸変化がある。

別の実施態様では、突然変異前の抗IL-23抗体と比べた変異体抗IL-23抗体のVH領域又はVL領域のどちらかにおいて10個以下のアミノ酸変化がある。

別の実施態様では、突然変異前の抗IL-23/IL-12抗体と比べた変異体抗IL-23/IL-12抗体のVH領域又はVL領域のどちらかにおいて10個以下のアミノ酸変化がある。

【0118】

より好ましい実施態様では、変異体抗IL-6抗体、変異体抗IL-23抗体、又は変異体抗IL-23/IL-12抗体のVH領域又はVL領域のどちらかにおいて、5個以下のアミノ酸変化、より好ましくは、3個以下のアミノ酸変化がある。別の実施態様では、突然変異前の抗IL-6抗体と比べた変異体抗IL-6抗体、突然変異前の抗IL-23抗体と比べた変異体抗IL-23抗体、又は突然変異前の抗IL-23/IL-12抗体と比べた変異体抗IL-23/IL-12抗体のいずれかの定常ドメインにおいて、15個以下のアミノ酸変化があり、より好ましくは、10個以下のアミノ酸変化、さらにより好ましくは、5個以下のアミノ酸変化がある。

【0119】

(抗体誘導体)

抗体誘導体は、当業者に公知の技術及び方法を用いて作製することができる。本発明による抗体誘導体は、それらが由来している抗体の結合親和性、及び該抗体のIL-6、IL-23、又はp40の生物学的活性を調節する能力を保持するか、又は実質的に保持する。抗体誘導体の例としては、本明細書に開示される抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体に由来するFab、Fab'、F(ab)'、及びscFvコンストラクト、カップポディ、ミニポディ、並びにヤヌシンが挙げられる。

【0120】

(Fab、Fab'、F(ab)')

本発明のある実施態様では、抗IL-6抗体又は変異体抗IL-6抗体のFab、Fab'、F(ab)'断片が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23抗体又は変異体抗IL-23抗体のFab、Fab'、F(ab)'断片が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23/IL-12抗体又は変異体抗IL-23/IL-12抗体のFab、Fab'、F(ab)'断片が提供される。

【0121】

(単鎖抗体(scFv))

本発明のある実施態様では、抗IL-6抗体又は変異体抗IL-6抗体のscFv誘導体が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23抗体又は変異体抗IL-23抗体のscFv誘導体が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23/IL-12抗体又は変異体抗IL-23/IL-12抗体のscFv誘導体が提供される。

【0122】

単鎖抗体(scFv)を作出するために、VH配列及びVL配列を、VL領域及びVH領域が柔軟なリンカーで接続された、連続的な単鎖タンパク質として発現することができるように、VH及びVLをコードするDNA断片を、柔軟なリンカーをコードする別の断片に機能的に連結させる(例えば、Birdらの文献((1988) Science 242: 423-426);Hustonらの文献((1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883);McCaffertyらの文献(Nature(1990) 348: 552-554)を参照されたい)。単鎖抗体は、単一のVH及びVLのみが使用される場合、一価となり得るし、2つのVH及びVLが使用される場合、二価となり得るし、又は3以上のVH及びVLが使用される場合、多価となり得る。

10

【0123】

ある実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-6抗体由来の可変領域の1つ又は複数を用いて調製される。別の実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-6抗体由来の1以上のCDR領域を用いて調製される。

【0124】

一実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-23抗体由来の可変領域の1つ又は複数を用いて調製される。別の実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-23抗体由来の1以上のCDR領域を用いて調製される。

【0125】

一実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-23/IL-12抗体由来の可変領域の1つ又は複数を用いて調製される。別の実施態様では、単鎖抗体は、抗IL-23/IL-12抗体由来の1以上のCDR領域を用いて調製される。

20

【0126】

好ましい実施態様では、抗IL-6単鎖抗体は、上記のヒト化抗IL-6抗体に由来する。

好ましい実施態様では、抗IL-23単鎖抗体は、上記のヒト化抗IL-23抗体に由来する。

好ましい実施態様では、抗IL-23/IL-12単鎖抗体は、上記のヒト化抗IL-23/IL-12抗体に由来する。

【0127】

ある実施態様では、単鎖抗体の軽鎖及び重鎖は、以下のアミノ酸配列を有するリンカー部分によって接続されている

30

【化1】

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号327),

GGGGSGGGSGGGGS (配列番号328),

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号329)

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号330)

。

【0128】

本発明のリンカー部分は、3~5回反復される配列GGGGS、又は非整数反復のGGGGS配列であることができ、例えば、配列番号330を参照されたい。

40

【0129】

ある実施態様では、本発明の単鎖抗体は、PEGに共有結合されている。

【0130】

(カップボディ、ミニボディ、及びヤヌシン(Janusin))

別の実施態様では、他の修飾抗体は、抗IL-6抗体、抗IL-23抗体、又は抗IL-23/IL-12抗体をコードする核酸分子を用いて調製することができる。例えば、「カップボディ」(ILIらの文献(Protein Eng 10: 949-57(1997)))、「ミニボディ」(Martinらの文献(EMBO J 13: 5303-9(1994)))、又は「ヤヌシン」(Trauneckerらの文献(EMBO J 10: 3655-3659(1991)))

50

)及びTrauneckerらの文献(「ヤヌシン:二重特異性試薬のための新しい分子設計(Janusin: new molecular design for bispecific reagents)」Int J Cancer Suppl 7: 51-52(1992))は、標準的な分子生物学的技術を用いて調製することができる。

【0131】

(相補性決定領域(CDR))

相補性決定領域(CDR)は、抗原受容体(例えば、免疫グロブリン及びT細胞受容体)の可変(V)ドメインに見られる、柔軟なループの形状の比較的短いアミノ酸配列である。免疫グロブリンとT細胞受容体の両方のCDRは、それらの特異性を決定し、特異的リガンドと接触するこれらの分子の部分である。CDRは、該分子の最も変化しやすい部分であり、これらの分子の多様性の一因となり、免疫グロブリン及びT細胞受容体が、巨大な抗原レパートリーを認識するのを可能にする。したがって、本発明の二価の二重特異性コンストラクトを構成する抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体中のこれらの領域は、抗体の特異性を決定する上で重要な役割を果たしており、特定の共通したCDR領域を有する抗体は、同一又は同様の抗原特異性を有すると考えられる。したがって、本発明の一態様では、抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体は、それらが基にしている抗体のCDR領域を含む。

10

【0132】

CDR領域の中には、抗体特異性に関して他よりも重要な役割を果たすと考えられるものがあることに留意するべきである。特に、VHドメインの少なくとも3番目の相補性決定領域(CDR)は、CDR領域全ての結合の特異性及び親和性において主要な役割を果たすことが知られているので、二価の二重特異性コンストラクトに含める抗体又はその誘導体を設計する際に、これらを用いることが有利であることが多い。したがって、本発明は、親抗体のCDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、及びCDR6のうちの少なくとも1つを含むように本発明の二価の二重特異性コンストラクトを構成する抗体及び抗体誘導体を提供する。好ましくは、該二価の二重特異性コンストラクトを構成する抗体及び抗体誘導体は、少なくともCDR3を含む。

20

【0133】

ある実施態様では、突然変異した抗IL-6抗体は、突然変異前の抗IL-6抗体と比べて変化していない少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を有する。変化していないCDRは、CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、又はCDR6であることができる。

30

【0134】

別の実施態様では、突然変異した抗IL-23抗体は、突然変異前の抗IL-23抗体と比べて変化していない少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を有する。変化していないCDRは、CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、又はCDR6であることができる。

【0135】

ある実施態様では、突然変異した抗IL-23/IL-12抗体は、突然変異前の抗IL-6抗体と比べて変化していない少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を有する。変化していないCDRは、CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、又はCDR6であることができる。

【0136】

(CDRのアミノ酸配列内のモチーフ)

40

個々のCDRの場合にも、特定の抗体又はその誘導体の特異性を決定する際に特に重要である特定の領域(本明細書ではモチーフと呼ばれる)があることが当業者によって理解されるであろう。これらの領域の特異性は、いくつかの因子、例えば、その立体構造及び該領域内での荷電アミノ酸残基の場所によって決定され得る。当業者は、エピトープマッピング、及び同じ標的に結合することが知られている抗体の配列を比較することを含む、当技術分野で公知の技術によって、これらのモチーフを同定することができる。したがって、本発明は、特定のモチーフを有するCDRを含む抗体又はその誘導体を提供する。

【0137】

ある実施態様では、該CDRは、以下の抗体のCDR領域から取られた少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの連続するアミノ酸を含む：

50

【化 2】

13A8 (配列番号 10-15 のCDR);
 9H4 (配列番号 50-55 のCDR);
 9C8 (配列番号 60-65 のCDR);
 8C8 (配列番号 40-45 のCDR);
 18D4 (配列番号 30-35 のCDR);
 28D2 (配列番号 20-25 のCDR);
 31A12 (配列番号 90-95 のCDR);
 34E11 (配列番号 120-125 のCDR);
 35H4 (配列番号 130-135 のCDR);
 49B7 (配列番号 100-105 のCDR);
 16C6 (配列番号 110-115 のCDR);
 45G5 (配列番号 150-155 のCDR);
 14B5 (配列番号 190-195 のCDR);
 4F3 (配列番号 170-175 のCDR);
 5C5 (配列番号 180-185 のCDR);
 22H8 (配列番号 140-145 のCDR);及び
 1H1 (配列番号 16-165 のCDR);

10

20

30

。

【 0 1 3 8 】

別の実施態様では、該CDRは、上述のCDRから取られた置換された連続するアミノ酸配列を含む。特に、該モチーフは、アミノ酸の内容及び位置が、配列中の他のアミノ酸と比べて固定されており、かつ1つ又は2つのアミノ酸が、置換前のCDRの対応するアミノ酸と比べて置換され得る、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5、又は少なくとも6つの残基を含むことができる。好ましくは、該置換は、保存的な置換である。そのようなモチーフの例は、22H8抗IL-23/IL-12抗体のCDR2領域内に見出すことができる。該モチーフは、以下の式によって記載することができる：

40

アミノ酸配列の配列WX¹KG(式中、X¹は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、又はトリプトファンであり、好ましくは、アラニン又はバリンである);

【 0 1 3 9 】

本発明の抗IL-23/IL-12抗体のCDRに見られる共通モチーフの他の例としては、以下のも

50

のが挙げられる:

アミノ酸配列YAYX¹GDAFDP(式中、X¹は、アラニン若しくはイソロイシンである);(配列番号339)を含むCDR3領域中のモチーフ

並びに/又は

アミノ酸配列SDYFNX¹(式中、X¹は、イソロイシン若しくはバリンである);(配列番号340)を含むCDR3領域中のモチーフ、並びに/又は

アミノ酸配列QX¹SQX²

(式中、

X¹は、アラニン若しくはセリンであり、かつ

X²は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

好ましくは、X²は、セリン若しくはトレオニンである)を含むCDR4領域中のモチーフ;並びに/又は

アミノ酸配列ASX¹LA(式中、X¹は、リジン若しくはトレオニンである);(配列番号341)を含むCDR5領域中のモチーフ、並びに/又は

アミノ酸配列QSYDX¹NAGYG(式中、X¹は、アラニン若しくはバリンである)(配列番号342)を含むCDR6領域中のモチーフ。

【0140】

本発明のIL-23抗体のCDRに見られる共通モチーフの例としては、以下のものが挙げられる:

アミノ酸配列YYAX¹WAX²G

(式中、

X¹は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X²は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される);(配列番号337)を含むCDR2領域中のモチーフ、並びに/又は

アミノ酸配列AX¹TLX²S

(式中、

X¹は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X²は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)(配列番号338)を含むCDR5領域中のモチーフ。

【0141】

本発明のIL-6抗体のCDRに見られる共通モチーフの例としては、以下のものが挙げられる:

アミノ酸配列YIYTDX¹STX²YANWAKG

(式中、

X¹は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンからなる群から選択され;かつ

X²は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

好ましくは、X¹は、セリン若しくはトレオニンであり、かつX²は、トリプトファン若しくはチロシンである);(配列番号335)を含むCDR2領域中のモチーフ、並びに/又は

アミノ酸配列RX¹STLX²S(式中、X¹及びX²は、独立に、アラニン若しくはトレオニンである)(配列番号336)を含むCDR5領域中のモチーフ。

【0142】

(非天然アミノ酸を組み込むための修飾)

本発明は、抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体への非天然アミノ酸残基の組込みを提供して、抗IL-6抗体又はその誘導体の、抗IL-23又は抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体への付着点を提供する。当業者は、例えば、アジドホモアラニン(Aha)を含む、いくつかの潜在的に好適な非天然アミノ酸を認識している。さらなる非天然アミノ酸としては、アジドノルロイシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフ

10

20

30

40

50

チル)アラニン、p-エチニル-フェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシ-フェニルアラニン、m-エチニル-フェニルアラニン、6-エチニル-トリプトファン、5-エチニル-トリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロル-3-イル)プロパン酸(propanic acid)、p-プロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン(idiophenylalanine)、p-アジドフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-プロモインドイル(bromoindoyl))アラニン、3-(5-プロモインドリル)アラニン、ホモアリルグリシン、ホモプロパルギルグリシン、及びp-クロロフェニルアラニンが挙げられる。好ましい実施態様では、非天然アミノ酸はAhaである。

【0143】

当業者はまた、付着部位を制御するために、これらの非天然アミノ酸が、付着が起こるべき位置にしか配置されないように、抗体又はその誘導体のアミノ酸配列を改変する必要があることを理解するであろう。ある実施態様では、非天然アミノ酸は、本明細書に開示されるような抗体又はその誘導体のN-末端に配置することができる。ある実施態様では、非天然アミノ酸は、本明細書に開示されるような抗体又はその誘導体のC-末端に配置することができる。ある実施態様では、非天然アミノ酸は、本明細書に開示されるようなscFvのVH部分とVL部分の間のリンカー領域中に(例えば、配列番号327内に)配置することができる。ある実施態様では、二価の二重特異性コンストラクトに組み込まれるべき単一の付着点が各々の抗体中にある。抗体若しくはその誘導体、scFv、及び/又は本発明の二価の二重特異性コンストラクトの部分の例としては、配列番号287~312が挙げられる。

【0144】

ある実施態様では、非天然アミノ酸の組み込みは、メチオニン(Met)の代わりに非天然アミノ酸(例えば、Aha)を組み込んでいる栄養要求性宿主細胞内で抗体を発現させることによって達成される。そこを単一の付着部位とするために、抗体ヌクレオチド配列を改変して、所望の付着部位に配置されない任意の天然に存在するメチオニンのコドンを除く必要がある。これは、それらを他のアミノ酸(通常、天然アミノ酸)のコドンと置換することによって達成することができる。1~2個のメチオニン残基が、免疫グロブリンVH領域のフレームワーク領域及びCDR内にはよく見られ、VL領域内にはあまり見られないので、これらの残基の好適な置換を見出す必要があり、該残基内では、該好適な置換は、所望のタンパク質の発現、安定性、又は機能(例えば、結合若しくは標的中和活性)に影響を及ぼすことなく生じる。その後、このメチオニン不含scFvを、メチオニン要求性細菌株での発現用に最適化し、精製し、再フォールディングさせ、生物学的活性について試験することができる。任意に、2以上の非天然アミノ酸(例えば、Aha)の組み込みを可能にするために、2以上のメチオニンコドンに配列中に残すことができる。

【0145】

メチオニンが所望の付着部位に元々存在しない場合、化学反応性のある付着部位を有する非天然アミノ酸の挿入部位として働く単一の(又は任意に2以上の)メチオニンコドンを導入することができる。

【0146】

非天然アミノ酸を含むように修飾された抗体を、1以上の別々の実体に付着させることができる。これらの実体には、リンカー基及び/又は他の同様に修飾された抗体が含まれる。好適なリンカーの例は、当技術分野で公知であり、短いペプチド配列を含む。本発明はまた、リンカーとしてのPEGの使用を提供する。したがって、ある実施態様では、非天然アミノ酸を組み込んでいる抗IL-6抗体又はその誘導体を、PEGリンカー基に共有結合させることができ、このPEGリンカー基をさらに、非天然アミノ酸を組み込んでいる抗IL-23若しくは抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体に付着させる。その後、そのような二重特異性、PEG化コンストラクトを精製し、再フォールディングさせて、安定で、生物学的活性のある治療タンパク質を得ることができる。

【0147】

好適には、非天然アミノ酸を含むように修飾された本発明における抗体又はその誘導体を、直接(例えば、リンカー基を使用することなく)、他の抗体若しくはその誘導体、色素

、薬物、又は毒素を含むが、これらに限定されない、他の同様に修飾された分子に結合させることができる。

【0148】

(標識及び誘導体化)

本発明の二価の二重特異性コンストラクト又は抗体を誘導体化するか、又は別の分子に結合させることができる。一般に、二価の二重特異性コンストラクトは、成分抗体又はその誘導体の結合及び生物学的活性が誘導体化又は標識によって悪影響を受けないように、誘導体化される。

【0149】

例えば、本発明の二価の二重特異性コンストラクトを、(化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合、又は他の方法によって)1以上の他の分子実体、例えば、検出剤、細胞傷害剤、医薬品、及び/又は抗体若しくは抗体部分と別の分子との会合を媒介することができるタンパク質若しくはペプチド(例えば、ストレプトアビジンコア領域若しくはポリヒスチジンタグ)に機能的に結合させることができる。

【0150】

1つのタイプの誘導体化された二価の二重特異性コンストラクトは、標識された二価の二重特異性コンストラクトである。本発明の二価の二重特異性コンストラクトを誘導体化し得る有用な検出剤としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル(naphthalenesulfonyl)クロライド、フィコエリスリン、ランタニド燐光体を含む、蛍光化合物が挙げられる。二価の二重特異性コンストラクトは、検出に有用である酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどで標識することもできる。二価の二重特異性コンストラクトが検出可能な酵素で標識されている場合、それは、該酵素が用いるさらなる試薬を添加して、識別され得る反応生成物を産生することによって検出される。

【0151】

例えば、作用剤の西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素及びジアミノベンジジンの添加は、検出可能である、着色された反応生成物を生じさせる。二価の二重特異性コンストラクトを、ビオチンで標識し、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接的な測定によって検出することもできる。二価の二重特異性コンストラクトを、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対の配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)で標識することもできる。いくつかの実施態様では、標識を様々な長さのスペーサーアームによって付着させて、潜在的な立体障害を低下させる。

【0152】

二価の二重特異性コンストラクトは、放射性標識アミノ酸で標識することもできる。放射性標識は、診断目的と治療目的の両方のために用いることができる。放射性標識二価の二重特異性コンストラクトは、診断的に、例えば、対象におけるIL-6及び/又はIL-23レベルを決定するために用いることができる。さらに、放射性標識二価の二重特異性コンストラクトは、 T_H17 経路によって媒介される疾患を治療するために治療的に用いることができる。放射性標識の例としては、以下の放射性同位体又は放射性核種が挙げられるが、これらに限定されない- 3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 。放射性同位体は、キレート化部分、例えば、DOTAによる誘導体化によって、抗体又は二重特異性体に結合させることもできる。有用なイメージング用及び治療用放射性同位体のいくつかは、これらのキレート剤に強く結合する。

【0153】

二価の二重特異性コンストラクトは、化学基、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、メチル若しくはエチル基、又は炭水化物基で誘導体化することもできる。これらの基は、抗体の生物学的特徴を改善するために、例えば、血清半減期を増大させるために、又は組織結合を増大させるために有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0154】

(抗体/誘導体の発現)

本発明の二価の二重特異性コンストラクト、並びに該二価の二重特異性コンストラクトを構成する抗体、及びその誘導体を、従来の組換え技術を用いて発現させることができる。さらに、該コンストラクト、並びに/又は抗体、及びその誘導体が非天然アミノ酸を含む場合、WO 2007/130453号に記載されているような組換え法を用いることができる。該二価の二重特異性コンストラクト、並びに該抗体、及びその誘導体を発現させるために用いられるヌクレオチド配列、ベクター、宿主細胞などは、本発明の目的である。

【0155】

(ポリヌクレオチド)

ある実施態様では、本発明は、二価の二重特異性コンストラクト、並びに上で定義したような二価の二重特異性コンストラクトを構成する抗体、及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を提供する。

【0156】

したがって、本発明は、(1)本発明によるモノクローナル抗体、(2)本発明によるヒト化抗体、(3)本発明による(1)及び(2)に基づく変異体抗体、(4)本発明による(1)～(3)の抗体の誘導体、並びに(5)本発明による二価の二重特異性コンストラクトをコードするヌクレオチド配列を包含する。

【0157】

ある実施態様では、ヌクレオチド配列は、抗IL-6抗体の部分をコードする。そのような配列の例は、13A8と表されたIL-6抗体のVH及びVL領域のヌクレオチド配列である、配列番号7及び9に与えられている。

【0158】

ある実施態様では、ヌクレオチド配列は、抗IL-23抗体の部分をコードする。そのような配列の例は、31A12と表された抗IL-23抗体のVH及びVL領域のヌクレオチド配列である、配列番号87及び89に与えられている。

【0159】

ある実施態様では、ヌクレオチド配列は、抗IL-23/IL-12抗体の部分をコードする。そのような配列の例は、22H8と表された抗IL-23/IL-12抗体のVH及びVL領域のヌクレオチド配列である、配列番号137及び139に与えられている。

【0160】

ある実施態様では、該二価の二重特異性コンストラクトは、単一の産物として発現させることができる。

【0161】

(プロモーター)

ある実施態様では、本発明のヌクレオチド配列は、プロモーター配列に機能的に連結されている。好適なプロモーターの例としては、T5/Lacプロモーター、:T7/Lac又は修飾されたT7/lacプロモーター、Trc又はtacプロモーター、ファージpL又はpR温度誘導性プロモーター、tetAプロモーター/オペレーター、araBAD(pBAD)プロモーター、rhaPBADプロモーター、及びlac UV5プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。他の好適なプロモーターは、Terpe, K.の文献(2006)(Appl Microbiol Biotechnol 72:211222)から特定することができる。好ましい実施態様では、プロモーターは、T5/Lacプロモーターである。

【0162】

(ベクター)

ある実施態様では、本発明は、任意に、プロモーター配列に機能的に連結された本発明のヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0163】

(宿主細胞)

ある実施態様では、本発明は、本発明のベクターでトランスフェクトされ、該ベクター

10

20

30

40

50

内に含まれるヌクレオチド配列を発現することができる宿主細胞を提供する。任意に、該宿主細胞は、特定の天然アミノ酸の代わりに非天然アミノ酸(例えば、Metの代わりにAHA)を組み込むことができる栄養要求性細胞である。該宿主細胞は、原核生物細胞又は真核生物細胞であることができる。好適な真核生物細胞としては、酵母細胞、哺乳動物細胞、及び昆虫細胞が挙げられる。好ましくは、該宿主細胞は、原核生物、特に、大腸菌B384であり、これはメチオニン要求性細胞である。或いは、該細胞は哺乳動物細胞であり、より好ましくは、それらはヒト細胞であり、さらにより好ましくは、それらは、ヒト胚性腎細胞(例えば、HEK293若しくはHEK 293c18細胞)又はCHO細胞である。

【0164】

(プライマー)

本発明のある実施態様では、抗IL-6、抗IL-23抗体、及び抗IL-23/IL-12抗体、並びにこれらの誘導体のクローニング及び発現のためのプライマーが提供される。これらのプライマーは、10~40ヌクレオチドで長さが様々であり、好ましくは、それらは、長さが15~30ヌクレオチドである。当業者は、本明細書に開示される抗体、及びその誘導体の核酸配列の開示を考慮して、好適なプライマー配列を決定することができるであろう。関心対象の特定のプライマー配列は、配列番号200~258に与えられており、これらは、本明細書に開示される抗体及びscFvのクローニング及び発現に有用である。

【0165】

(非天然アミノ酸の組み込み)

部分をペプチドにコンジュゲートさせることを可能にする非天然アミノ酸の使用は、WO 2007/130453号に開示されている。そのようなタンパク質工学も以下で論じられる。

【0166】

タンパク質工学プロセスの第一の工程は、通常、所望の化学的特性を有する1組の非天然アミノ酸を選択することである。非天然アミノ酸の選択は、所定の化学的特性、及び標的分子又は標的タンパク質中に行なわれることが意図される修飾によって決まる。非天然アミノ酸は、選択されれば、販売元から購入するか、又は化学合成することができる。任意の数の非天然アミノ酸を標的分子内に組み込むことができ、その数は付着させるべき所望の化学的部分の数に応じて様々であり得る。化学的部分は、非天然アミノ酸の全て又はごく一部に付着させることができる。さらに、所望の結果に応じて、同じ又は異なる非天然アミノ酸を分子内に組み込むことができる。ある実施態様では、少なくとも2つの異なる非天然アミノ酸を分子内に組み込み、1つの化学的部分、例えば、PEGを一方の非天然アミノ酸残基に付着させ、一方、別の化学的部分、例えば、細胞傷害剤を他方の非天然アミノ酸に付着させる。

【0167】

多種多様な非天然アミノ酸を本発明の方法で用いることができる。通常、本発明で有用な非天然アミノ酸は、20種の天然アミノ酸では得ることができない追加の特徴を提供するように選択又は設計される。例えば、非天然アミノ酸は、例えば、それらが組み込まれる、タンパク質を含む、分子の生物学的特性を修飾するように任意に設計又は選択される。例えば、以下の特性が、分子、例えば、タンパク質に非天然アミノ酸を含めることによって任意に修飾される:毒性、生体分布、溶解性、安定性、例えば、熱、加水分解、酸化に対する安定性、酵素分解に対する抵抗性など、精製及び処理の容易さ、構造的特性、分光学的特性、化学的及び/又は光化学的特性、触媒活性、ワクチンとして機能する能力、酸化還元電位、半減期、他の分子と、例えば、共有結合的又は非共有結合的に反応する能力など。

【0168】

本明細書で使用されるように、「非天然アミノ酸」は、セレノシステイン、及び遺伝子にコードされた以下の20種の α -アミノ酸:アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン以外の任意のアミノ酸、修飾アミノ酸、又はアミノ

10

20

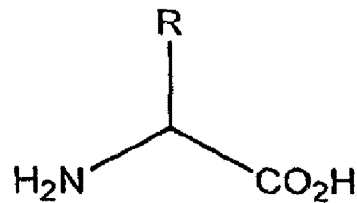
30

40

50

酸類似体を指す。α-アミノ酸の一般構造は、式Iによって示される：

【化3】



式 I

10

。

【0169】

非天然アミノ酸は、通常、式I(式中、R基は、20種の天然アミノ酸で使用されているものの以外の任意の置換基である)を有する任意の構造である。20種の天然アミノ酸の構造については、例えば、L. Stryer 著、生化学(Biochemistry)、第3版 1988, Freeman and Company, New Yorkなどの、任意の生化学の教科書を参照されたい。本明細書に開示される非天然アミノ酸は、上記の20種のα-アミノ酸以外の天然に存在する化合物であってもよいことに留意されたい。本明細書に開示される非天然アミノ酸は、通常、側鎖のみが天然アミノ酸と異なるので、該非天然アミノ酸は、それらが天然に存在するタンパク質で形成されるのと同じ様式で、例えば、天然又は非天然の、他のアミノ酸とアミド結合を形成する。しかしながら、非天然アミノ酸は、それらを天然アミノ酸と区別する側鎖基を有する。例えば、式IのRは、任意に、アルキル-、アリール-、アリールハライド、ビニルハライド、β-シリルアルケニルハライド、β-シリルアルケニルスルホネート、アルキルハライド、アセチル、ケトン、アジリジン、ニトリル、ニトロ、ニトリルオキシド、ハライド、アシル-、ケト-、アジド-、ケタール、アセタール、ヒドロキシル-、ヒドラジン、シアノ-、ハロ-、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオエーテル、エポキシド、スルホン、ボロン酸、ボロン酸エステル、ボラン、フェニルボロン酸、チオール、セレン-、スルホニル-、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式-、ピリジル、ナフチル、ベンゾフェノン、拘束された環、例えば、シクロオクチン、シクロプロペン、ノルボルネンチオエステル、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ、カルボン酸、α-ケトカルボン酸、α若しくはβ不飽和酸及びアミド、グリオキシカルアミド、若しくはオルガノシラン、ピロン、テトラジン、ピリダジン、ヒドラジド(hydrzaide)、ヒドラジン、アルコキシアミン、アリールスルホネート、アリールハライド、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール基など、又はそれらの任意の組合せを含む。

20

30

【0170】

非天然アミノ酸の具体例は、限定されないが、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β-セリン、β-O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc-α-トレオニン、α-GalNAc-L-トレオニン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、ピロリジン、N-σ-o-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン(AzZLys)、N-σ-プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、N-σ-2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、N-σ-tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン(BocLys)、N-σ-アリルオキシカルボニル-L-リジン(AlocLys)、N-σ-アセチル-L-リジン(AcLys)、N-σ-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZLys)、N-σ-シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン(CycLys)、N-σ-D-プロリル-

40

50

L-リジン、N- σ -ニコチノイル-L-リジン(NicLys)、N- σ -N-Me-アントラニロイル-L-リジン(NmaLys)、N- σ -ピオチニル-L-リジン、N- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -メチル-L-リジン、N- σ -ジメチル-L-リジン、N- σ -トリメチル-L-リジン、N- σ -イソプロピル-L-リジン、N- σ -ダンシル-L-リジン、N- σ -o,p-ジニトロフェニル-L-リジン、N- σ -p-トルエンスルホニル-L-リジン、N- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、N- σ -フェニルピルバミド-L-リジン、N- σ -ピルバミド-L-リジン、以下に、又は本明細書の別所に記載されているものなどを含み;かつ例えば、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、 β -O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc- α -トレオニン、 α -GalNAc-L-トレオニン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-ブromoフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、及びイソプロピル-L-フェニルアラニンから選択される。

10

【0171】

アリール置換は、様々な位置、例えば、オルト、メタ、パラで、1以上の官能基をアリール環上に配置させて生じることができる。関心対象の他の非天然アミノ酸としては、光活性化可能なクロスリンカーを含むアミノ酸、スピン標識アミノ酸、色素標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規の官能基を有するアミノ酸、親水性、疎水性、極性、又は水素結合する能力が改変されたアミノ酸、共有結合的又は非共有結合的に他の分子と相互作用するアミノ酸、フォトケージ化された及び/又は光異性化可能なアミノ酸、ピオチン又はピオチン類似体を含むアミノ酸、グリコシル化アミノ酸、例えば、糖置換セリン、他の炭水化物修飾アミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポリエチレングリコール若しくはポリエーテル、多価アルコール、又は多糖を含むアミノ酸、メタセシスを受けることができるアミノ酸、環状付加を受けることができるアミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学切断可能及び/又は光切断可能なアミノ酸、天然アミノ酸と比べて伸張した側鎖、例えば、炭素が約5個よりも多いか又は約10個よりも多い、例えば、ポリエーテル又は長鎖炭化水素を有するアミノ酸、炭素結合糖含有アミノ酸、酸化還元活性アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、薬物部分を含むアミノ酸、並びに1以上の毒性部分を含むアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

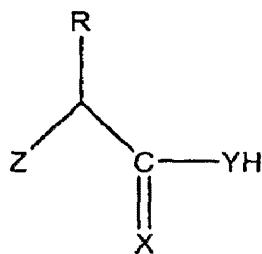
20

30

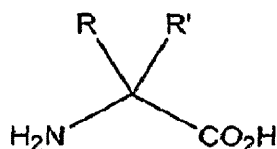
【0172】

新規の側鎖を含む非天然アミノ酸に加えて、非天然アミノ酸は、任意に、例えば、式II及びIII;

【化4】



式 II



式 III

40

(式中、Zは、通常、OH、NH₂、SH、NH₂O--、NH--R'、R'NH--、R'S--、又はS--R'--を含み; X及びYは、同じもの又は異なるものであることができ、通常、S、N、又はOを含み、R及びR'は、任意に同じもの又は異なるものであり、通常、式Iを有する非天然アミノ酸について上で記載されたR基の構成成分の同じリスト、並びに水素又は(CH₂)_x又は天然アミノ酸

50

側鎖から選択される)の構造によって示されるような、修飾された骨格構造も含む。例えば、本明細書に開示される非天然アミノ酸は、任意に、式II及びIIIによって示されるようなアミノ又はカルボキシ基に置換を含む。このタイプの非天然アミノ酸としては、 α -ヒドロキシ酸、 α -チオ酸、 α -アミノチオカルボキシレート、又は例えば、20種の天然アミノ酸若しくは非天然の側鎖に対応する側鎖を有する、 α - α -ジ置換アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。それらには、 β -アミノ酸又は γ -アミノ酸、例えば、置換された β -アラニン及び γ -アミノ酪酸も含まれるが、これらに限定されない。さらに、 α -炭素における置換又は修飾には、任意に、L又はD異性体、例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-O-チロシン、アミノ酪酸などが含まれる。他の構造的代替物としては、環状アミノ酸、例えば、プロリン類似体、並びに3-、4-、6-、7-、8-、及び9-員環プロリン類似体が挙げられる。いくつかの非天然アミノ酸、例えば、アリールハライド(p-ブromo-フェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニンは、エチンとの多目的なパラジウム触媒型クロスカップリング反応、又はアリールハライドと多種多様なカップリングパートナーとの間の炭素-炭素、炭素-窒素、及び炭素-酸素結合の形成を可能にするアセチレン反応を提供する。

【0173】

例えば、多くの非天然アミノ酸は、天然アミノ酸、例えば、チロシン、グルタミン、フェニルアラニンなどに基づくものである。チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、及びメタ置換チロシンが挙げられ、ここで、該置換チロシンは、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C6-C20直鎖又は分岐状炭化水素、飽和又は不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基などを含む。さらに、多重置換アリール環も企図される。グルタミン類似体としては、 α -ヒドロキシ誘導体、 β -置換誘導体、環状誘導体、及びアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なフェニルアラニン類似体としては、メタ置換フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されず、ここで、その置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アセチル基などを含む。

【0174】

非天然アミノ酸の具体例としては、o、m、及び/又はp型のアミノ酸又はアミノ酸類似体(非天然アミノ酸)が挙げられるが、これらに限定されず、これには、ホモアリルグリシン、シス-又はトランス-クロチルグリシン、6,6,6-トリフルオロ-2-アミノヘキサン酸、2-アミノヘプタン酸(2-aminopheptanoic acid)、ノルバリン、ノルロイシン、O-メチル-L-チロシン、o-、m-、又はp-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨードフェニルアラニン、o-、m-、又はp-ブromoフェニルアラニン、2-、3-、又は4-ピリジルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン(idiophenylalanine)、ジアミノ酪酸、アミノ酪酸、ベンゾフラニルアラニン、3-ブromo-チロシン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブromoインドリル)アラニン、3-(5-ブromoインドリル)アラニン、p-クロロフェニルアラニン、p-エチニル-フェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシ-フェニルアラニン、m-エチニル-フェニルアラニン、6-エチニル-トリプトファン、5-エチニル-トリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロル-3-イル)プロパン酸、アジドノルロイシン、アジドホモアラニン、p-アセチルフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、ホモプロパルギルグリシン、p-エチル-フェニルアラニン、p-エチニル-フェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシ-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-ヨード(idio)-チロシン、O-プロパルギル-チロシン、ホモグルタミン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、3-ニトロ-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルア

ラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、m-アセチル-L-フェニルアラニン、セレノメチオニン、テルロメチオニン、セレノシステイン、アルキルフェニルアラニン、O-アリル-L-チロシン、O-(2-プロピニル)-L-チロシン、p-エチルチオカルボニル-L-フェニルアラニン、p-(3-オキソブタノイル)-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、ホモプロパルギルグリシン、アジドホモアラニン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモ-L-フェニルアラニン、ジヒドロキシ-フェニルアラニン、ジヒドロキシル-L-フェニルアラニン、p-ニトロ-L-フェニルアラニン、m-メトキシ-L-フェニルアラニン、p-ヨード-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、及びイソプロピル-L-フェニルアラニン、トリフルオロロイシン、ノルロイシン、4-、5-、又は6-フルオロ-トリプトファン、4-アミノトリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、ピオシチン、アミノオキシ酢酸、m-ヒドロキシフェニルアラニン、m-アリルフェニルアラニン、m-メトキシフェニルアラニン基、 β -GlcNAc-セリン、 α -GalNAc-トレオニン、p-アセトアセチルフェニルアラニン、パラ-ハロ-フェニルアラニン、セレノ-メチオニン、エチオニン、S-ニトロソ-ホモシステイン、チア-プロリン、3-チエニル-アラニン、ホモ-アリル-グリシン、トリフルオロイソロイシン、トランス及びシス-2-アミノ-4-ヘキセン酸、2-ブチニル-グリシン、アリル-グリシン、パラ-アジド-フェニルアラニン、パラ-シアノ-フェニルアラニン、パラ-エチニル-フェニルアラニン、ヘキサフルオロロイシン、1,2,4-トリアゾール-3-アラニン、2-フルオロ-ヒスチジン、L-メチルヒスチジン、3-メチル-L-ヒスチジン、 β -2-チエニル-L-アラニン、 β -(2-チアゾリル)-DL-アラニン、ホモプロパルギルグリシン (HPG)、並びにアジドホモアラニン (AHA) などが含まれる。種々の非限定的な非天然アミノ酸の構造は、例えば、その内容全体が引用により本明細書中に組み込まれている、US 2003/0108885 A1号の図29、30、及び31に提供されている。

【0175】

チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、及びメタ置換チロシンが挙げられ、ここで、該置換チロシンは、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C6-C20直鎖又は分岐状炭化水素、飽和又は不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基などを含む。さらに、多重置換アリール環も企図される。本発明のグルタミン類似体としては、 α -ヒドロキシ誘導体、 β -置換誘導体、環状誘導体、及びアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。フェニルアラニン類似体の例としては、メタ-置換フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されず、ここで、その置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アセチル基などを含む。リジン類似体としては、N- σ 置換されたもの、例えば、ピロリジン、N- σ -o-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン (AzZLys)、N- σ -プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、N- σ -2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン (BocLys)、N- σ -アリルオキシカルボニル-L-リジン (AlocLys)、N- σ -アセチル-L-リジン (AcLys)、N- σ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン (ZLys)、N- σ -シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン (CycLys)、N- σ -D-プロリル-L-リジン、N- σ -ニコチノイル-L-リジン (NicLys)、N- σ -N-Me-アントラニロイル-L-リジン (NmaLys)、N- σ -ピオチニル-L-リジン、N- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -メチル-L-リジン、N- σ -ジメチル-L-リジン、N- σ -トリメチル-L-リジン、N- σ -イソプロピル-L-リジン、N- σ -ダンシル-L-リジン、N- σ -o,p-ジニトロフェニル-L-リジン、N- σ -p-トルエンシルホニル-L-リジン、N- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、N- σ -フェニルピルバミド-L-リジン、N- σ -ピルバミド-L-リジンが挙げられる。

【0176】

さらに、他の例としては、任意に(限定されないが)、チロシニアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；トレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アル

10

20

30

40

50

キニル(alkynyl)、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、ケタール、アセタール、歪んだシクロオクチン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、ニトリル酸化物、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アルコキシアミン、アリールスルホネート、アリールハライド、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸、若しくはアミノ置換アミノ酸、又はそれらの任意の組合せ;光活性化可能なクロスリンカーを有するアミノ酸;スピン標識アミノ酸;蛍光アミノ酸;新規の官能基を有するアミノ酸;共有結合的又は非共有結合的に別の分子と相互作用するアミノ酸;金属結合アミノ酸;金属含有アミノ酸;放射性アミノ酸;フォトケージ化アミノ酸;光異性化可能なアミノ酸;ビオチン又はビオチン類似体含有アミノ酸;グリコシル化又は炭水化物修飾されたアミノ酸;ケト含有アミノ酸;ポリエチレングリコールを含むアミノ酸;ポリエーテルを含むアミノ酸;重原子置換アミノ酸;化学切断可能又は光切断可能なアミノ酸;伸張した側鎖を有するアミノ酸;毒性基を含むアミノ酸;糖置換アミノ酸、例えば、糖置換セリンなど;炭素結合糖含有アミノ酸;酸化還元活性アミノ酸; α -ヒドロキシ含有酸;アミノチオ酸含有アミノ酸; α , α ジ置換アミノ酸; β -アミノ酸;並びに環状アミノ酸が挙げられる。

10

【0177】

通常、ある実施態様のために本明細書で利用される非天然アミノ酸は、20種の天然アミノ酸では得ることができない追加の特徴を提供するように選択又は設計することができる。例えば、非天然アミノ酸は、例えば、それらが組み込まれるタンパク質の生物学的特性を修飾するように任意に設計又は選択される。例えば、以下の特性が、タンパク質に非天然アミノ酸を含めることによって任意に修飾される:毒性、生体分布、溶解性、安定性、例えば、熱、加水分解、酸化に対する安定性、酵素分解に対する抵抗性など、精製及び処理の容易さ、構造的な特性、分光学的特性、化学的及び/又は光化学的特性、触媒活性、酸化還元電位、半減期、他の分子と、例えば、共有結合的又は非共有結合的に反応する能力など

20

【0178】

アミノ酸類似体の他の例としては、任意に(限定されないが)、チロシニアミノ酸の非天然類似体;グルタミンアミノ酸の非天然類似体;フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体;セリニアミノ酸の非天然類似体;トレオニンアミノ酸の非天然類似体;アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル(alkynyl)、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、ケタール、アセタール、歪んだシクロオクチン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、ニトリル酸化物、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アルコキシアミン、アリールスルホネート、アリールハライド、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸、若しくはアミノ置換アミノ酸、又はこれらの任意の組合せ;光活性化可能なクロスリンカーを有するアミノ酸;スピン標識アミノ酸;蛍光アミノ酸;新規の官能基を有するアミノ酸;共有結合的又は非共有結合的に別の分子と相互作用するアミノ酸;金属結合アミノ酸;金属含有アミノ酸;放射性アミノ酸;フォトケージ化アミノ酸;光異性化可能なアミノ酸;ビオチン又はビオチン類似体含有アミノ酸;グリコシル化又は炭水化物修飾されたアミノ酸;ケト含有アミノ酸;ポリエチレングリコールを含むアミノ酸;ポリエーテルを含むアミノ酸;重原子置換アミノ酸;化学切断可能又は光切断可能なアミノ酸;伸張した側鎖を有するアミノ酸;毒性基を含むアミノ酸;糖置換アミノ酸、例えば、糖置換セリンなど;炭素結合糖含有アミノ酸;酸化還元活性アミノ酸; α -ヒドロキシ含有酸;アミノチオ酸含有アミノ酸; α , α ジ置換アミノ酸; β -アミノ酸;並びにプロリン以外の環状アミノ酸が挙げられる。

30

40

【0179】

50

本発明の方法で使用するのに好適な非天然アミノ酸としては、アミノ酸側鎖に付着したサッカリド部分を有するものも挙げられる。一実施態様では、サッカリド部分を有する非天然アミノ酸としては、Man、GalNAc、Glc、Fuc、又はGal部分を有するセリン又はトレオニンアミノ酸が挙げられる。サッカリド部分を含む非天然アミノ酸の例としては、例えば、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、 β -O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc- α -トレオニン、 α -GalNAc-L-トレオニン、O-Man-L-セリン、テトラ-アセチル-O-Man-L-セリン、O-GalNAc-L-セリン、トリ-アセチル-O-GalNAc-L-セリン、Glc-L-セリン、テトラアセチル-Glc-L-セリン、fuc-L-セリン、トリ-アセチル-fuc-L-セリン、O-Gal-L-セリン、テトラ-アセチル-O-Gal-L-セリン、 β -O-GlcNAc-L-トレオニン、トリ-アセチル- β -GlcNAc-L-トレオニン、O-Man-L-トレオニン、テトラ-アセチル-O-Man-L-トレオニン、O-GalNAc-L-トレオニン、トリ-アセチル-O-GalNAc-L-トレオニン、Glc-L-トレオニン、テトラアセチル-Glc-L-トレオニン、fuc-L-トレオニン、トリ-アセチル-fuc-L-トレオニン、O-Gal-L-トレオニン、テトラ-アセチル-O-Gal-L-セリン、 β -N-アセチルグルコサミン-O-セリン、 α -N-アセチルガラクトサミン-O-トレオニン、蛍光アミノ酸、例えば、ナフチル又はダンシル又は7-アミノクマリン又は7-ヒドロキシクマリン側鎖を含むもの、光切断可能又は光異性化可能なアミノ酸、例えば、アゾベンゼン又はニトロベンジルCys、Ser、又はTyr側鎖を含むもの、p-カルボキシ-メチル-L-フェニルアラニン、ホモグルタミン、2-アミノオクタン酸、p-アジドフェニルアラニン、p-ベンゾイルフェニルアラニン、p-アセチルフェニルアラニン、m-アセチルフェニルアラニン、2,4-ジアミノ酪酸(DAB)などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明には、上記のものの非保護形態及びアセチル化形態が含まれる。(例えば、「ペプチドのリモデリング及び糖コンジュゲーション(Remodeling and Glycoconjugation of Peptides)」というタイトルのWO 03/031464 A2号;及び「サッカリド組成物、その合成のための方法及び装置(Saccharide Composition, Methods and Apparatus for their synthesis)」というタイトルの米国特許第6,331,418号;Tang及びTirrellの文献(J. Am. Chem. Soc.(2001)123: 11089-11090);並びにTangらの文献(Angew. Chem. Int. 編,(2001)40:8も参照されたく、これらは全て、引用によりその全体が本明細書中に組み込まれる)。

【0180】

上に提供された非天然アミノ酸の多くは、例えば、Sigma Aldrich(USA)から市販されている。市販されていないものは、任意に、US 2004/138106 A1号(引用により本明細書中に組み込まれる)の実施例に提供されているように、又は当業者に公知の標準的な方法を用いて合成される。有機合成技術については、例えば、Fessenden及びFessenden著、有機化学(Organic Chemistry)(1982, 第2版, Willard Grant Press, Boston Mass.);March著、最先端有機化学(Advanced Organic Chemistry)(第3版, 1985, Wiley and Sons, New York);及びCarey及びSundberg著、最先端有機化学(Advanced Organic Chemistry)(第3版, パートA及びB, 1990, Plenum Press, New York)、並びにWO 02/085923号を参照されたく、これらは全て、引用により本明細書に組み込まれる。

【0181】

例えば、メタ-置換フェニルアラニンは、WO 02/085923号(例えば、この刊行物の図14参照)に概略が示されているような手順で合成される。通常、NBS(N-ブロモスクシンイミド)をメタ-置換メチルベンゼン化合物に添加すると、メタ-置換臭化ベンジルが得られ、次に、これをマロネート化合物と反応させると、メタ置換フェニルアラニンが得られる。メタ位に使用される典型的な置換基としては、ケトン、メトキシ基、アルキル、アセチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、3-アセチル-フェニルアラニンは、NBSを3-メチルアセトフェノンの溶液と反応させることによって作製される。さらなる詳細については、下記の実施例を参照されたい。同様の合成を用いて、3-メトキシフェニルアラニンを生成させる。その場合の臭化ベンジルのメタ位のR基は--OCH₃である(例えば、引用によりその全体が本明細書中に組み込まれる、Matsoukasらの文献(J. Med. Chem., 1995, 38, 4660-4669)を参照されたい)。

【0182】

場合によっては、非天然アミノ酸の設計は、シンセターゼ、例えば、末端枝突然変異体 (external mutant) tRNAをアミノアシル化するために使用される末端枝突然変異体 tRNAシンセターゼの活性部位に関する既知情報によってバイアスがかけられる。例えば、アミドの窒素で置換された誘導体(1)、 γ 位のメチル基(2)、及びN-Cy-環状誘導体(3)を含む、3つのクラスのグルタミン類似体が提供される。重要な結合部位残基が酵母GlnRSと相同である大腸菌GlnRSのx線結晶構造に基づいて、類似体を、グルタミンの側鎖の10シェル以内の残基の側鎖突然変異の配列を補完するように設計し、例えば、活性部位Phe233の小さい疎水性アミノ酸への突然変異を、GlnのCy位での立体的嵩高さの増加によって補完することができる。

【0183】

例えば、N-フタロイル-L-グルタミン酸1,5-無水物(WO 02/085923号の図23の化合物番号4)を任意に用いて、アミドの窒素に置換基を有するグルタミン類似体を合成する。(例えば、King及びKiddの文献(J. Chem. Soc., 3315-3319, 1949);Friedman及びChatterjiの文献(J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752, 1959);Craigらの文献(J. Org. Chem. 53, 1167-1170, 1988);並びにAzoulayらの文献(Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5, 1991)を参照されたく、これらは全て、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。該無水物は、通常、アミンをフタルイミドとしてまず保護した後、酢酸中で還流することによって、グルタミン酸から調製される。次に、該無水物をいくつかのアミンで開裂させると、該アミドで様々な置換基が得られる。ヒドラジンによるフタロイル基の脱保護により、WO 2002/085923号の図23に示されるような遊離アミノ酸が得られる。

【0184】

γ -位における置換は、通常、グルタミン酸のアルキル化によって達成される。(例えば、引用により本明細書に組み込まれる、Koskinen及びRapoportらの文献(J. Org. Chem. 54, 1859-1866, 1989)を参照されたい)。例えば、WO 02/085923号の図24の化合物番号5によって示されているような保護アミノ酸を、任意に、アミノ部分を9-ブロモ-9-フェニルフルオレン(PhfIBr)でまずアルキル化し(例えば、引用により本明細書に組み込まれる、Christie及びRapoportらの文献(J. Org. Chem. 1989, 1859-1866, 1985)を参照されたい)、その後、酸部分を、O-tert-ブチル-N,N'-ジイソプロピルイソウレアを用いてエステル化することによって調製する。 $\text{KN}(\text{Si}(\text{CH}_3)_3)_2$ を添加すると、メチルエステルの α -位で位置選択的に脱プロトン化されて、エノラートが形成され、次に、これを、任意に様々なアルキルヨウ化物でアルキル化する。t-ブチルエステル及びPhfI基を加水分解すると、所望の γ -メチルグルタミン類似体(引用により本明細書に組み込まれるWO 02/085923号の図24の化合物番号2)が得られた。

【0185】

WO 02/085923号の図25の化合物番号3によって示されているようなN-Cy環状類似体を、任意に、以前に記載されているように、Boc-Asp-Ot-Buから4工程で調製する。(例えば、各々、引用により本明細書に組み込まれる、Bartonらの文献(Tetrahedron Lett. 43, 4297-4308, 1987)、及びSubasingheらの文献(J. Med. Chem. 35 4602-7, 1992)を参照されたい)。N-t-Boc-ピロリジノン、ピロリジノン、又はオキサゾリドンのアニオンを生成させた後、図25に示されているような化合物7を添加すると、マイケル付加生成物が得られる。その後、TFAで脱保護すると、遊離アミノ酸が得られる。

【0186】

トリフルオロロイシン(TfI)及びヘキサフルオロロイシン(HfI)は、当技術分野で公知の様々な方法によって合成することができる。例えば、5',5',5'-トリフルオロ-DL-ロイシンは、まず、市販のトリフルオロメチルクロトン酸をエタノールで希釈し、それを触媒の存在下で水素化することによって段階的に合成することができる。次に、混合物を還流し、エステルを蒸留することができる。次に、 α -オキシイミノ-5',5',5'-トリフルオロイソカプロン酸を、還流及び蒸留によって誘導し、その後、5',5',5'-トリフルオロ-DL-ロイシンを再結晶化させることができる。同様に、(S)-5,5,5,5',5',5'-ヘキサフルオロロイシンは、ヘキサフルオロアセトン及びプロモピルビン酸エチルから多工程で調製するこ

10

20

30

40

50

とができ、該多工程には、パン酵母によるか、又はオキサザボロリジン触媒を用いるカテコールボランによる、 α -ケトエステルのカルボニル基の高度にエナンチオ選択的な還元が含まれる。(さらなる詳細については、例えば、Rennert, Ankerの文献(Biochem. 1963, 2, 471);Zhangらの文献(Helv. Chim. Acta 1998, 81, 174-181)、Rの文献(Prot Sci. 7: 419-426(1998)); Hendricksonらの文献(Annual Rev. Biochem. 73: 147-176(2004));米国特許出願第20030108885号及び第20030082575号、並びに同時係属の米国仮出願第60/571,810号を参照されたく、これらは全て、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。本開示の新規な点の1つは、フッ素化非天然アミノ酸(複数可)が組み込まれた、ロイシン-ジッパードメインを多く含む分子の熱安定性及び化学的安定性の増大に関する。

【0187】

同様に、ホモプロパルギルグリシン(HPG)及びアジドホモアラニン(AHA)を、公表されている方法によって合成することができる。例えば、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる、Mangoldらの文献(Mutat. Res., 1989, 216, 27)による。

【0188】

(二重特異性コンストラクトの合成)

(二重特異性体を形成させる一般的方法)

ある実施態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクトは、下記のことを含む、以下の方法によって作製することができる：

(i)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組み込みによって修飾されている抗IL-6抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；
(ii)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組み込みによって修飾されている抗IL-23抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；

(iii)該宿主細胞が、該修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体、及び該修飾された抗IL-23抗体又はその誘導体を発現するような条件下で、該宿主細胞を成長させること、

(iv)該抗IL-6抗体又はその誘導体、及び該抗IL-23抗体又はその誘導体を単離すること；

(v)該抗IL-6抗体又はその誘導体が、各部分の非天然アミノ酸間の連結によって該抗IL-23抗体又はその誘導体と結合されるように、該抗IL-6抗体又はその誘導体を該抗IL-23抗体又はその誘導体と反応させること。

【0189】

本発明の二重特異性コンストラクトは、当技術分野で公知の方法によって作製することもできる。これらには、体細胞ハイブリダイゼーション、化学的カップリング、及び組換え技術が含まれる。

【0190】

体細胞ハイブリダイゼーションは、2つのハイブリドーマの融合、及び得られるクアドローマによって分泌される二重特異性体の精製を含む。2つの異なる方法が記載されている：(1)2つの樹立されたハイブリドーマの融合によって、クアドローマが作製される(Milstein及びCuelloの文献(1983);Sureshらの文献(1986))、並びに(2)1つの樹立されたハイブリドーマと、第二の抗原で免疫化されたマウスに由来するリンパ球との融合によって、トリオーマが作製される(Nolan及びKennedyの文献(1990))。bsMAbの開発のための体細胞ハイブリダイゼーションは、ハイブリドーマを調製する方法と類似した方法を含む。しかしながら、1つの細胞内での2つの異なる重鎖及び2つの異なる軽鎖の産生及びランダムな会合は、かなり大きな割合の非機能的分子のアセンブリを生じさせる。必要とされる特異性を有する二重特異性体を精製するために、複雑な精製技術が開発される必要があり、このため、臨床使用のための大規模製造がほとんど不可能になる。それでもなお、本発明は、体細胞ハイブリダイゼーションを用いて製造される上に開示されたような二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0191】

当技術分野で知られているような抗体の化学的カップリングは、約40年前に初めて実施された。第一の二重特異性ポリクローナル抗体は、2つの異なるポリクローナル抗体を化

10

20

30

40

50

学的にカップリングすることによって産生された(Nisonoff及びRiversの文献(1961))。この化学的操作は、その内部重鎖ジスルフィド結合での2つの異なる抗体の解離、及び化学的コンジュゲーションによる2つの半分の分子の架橋を含んでいた。bsMAbを調製するために、 ϵ -アミノ基又はヒンジ領域チオール基との反応性がある多数の二官能性試薬が用いられている。これらのクロスリンカーは、ホモ二官能性試薬又はヘテロ二官能性試薬という2つのカテゴリーに分類することができる。ホモ二官能性試薬は、内部重鎖ジスルフィド結合の還元によって生成される遊離チオールと反応する。5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)又はo-フェニレンジマレイミド(O-PDM)は、MAbのFab'断片上のチオール基を活性化することができる。DTNBが、2つのFab'間のジスルフィド結合を再生するように作用するのに対し、O-PDMは、2つのFab'間のチオエーテル結合を形成するように作用する。通常、O-PDMのチオエーテル結合は、DTNBによって再生されるジスルフィド結合よりも安定であることができる。ヘテロ二官能性試薬は、タンパク質上に、それが第二のタンパク質と反応することを可能にする反応基を導入することができる。N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)は、第一級アミノ基と反応させて、遊離チオール基を導入するために用いられている。SPDPは、クラス又はアイソタイプを問わず、抗体及びFab'断片を含む、露出したアミノ基を有する任意の2つのタンパク質を組み合わせることができる。しかしながら、この手法は、分子のランダムな架橋を引き起こし、そのため、パッチ間のばらつき、並びに望ましくない効果、例えば、タンパク質変性、及び/又は抗体活性の喪失を示す。それでもなお、本発明は、化学的カップリングを用いて製造される上に開示されたような二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

10

20

【0192】

組換え技術を用いて、二重特異性抗体を作製することもできる。遺伝子改変によって得られるそのような二重特異性抗体は、化学的架橋又は2つのハイブリドーマクローンの融合によって作製される従来の二重特異性抗体に優るいくつかの利点を示し、これには、二重特異性体の大きさ及び親和性に対するより大きな制御が含まれる。可変ドメインのみを構成単位として用いることによって、組換え抗体は、抗体のFc領域を欠如し、そのため、Fc媒介性の免疫エフェクター機能を誘導しない。多種多様な異なる組換え二重特異性抗体フォーマットが過去何年にもわたって開発されている。それらのうち、タンデム単鎖Fv分子及びダイアボディ並びにそれらの様々な誘導体は、組換え二重特異性抗体の構築のための最も広く用いられているフォーマットである。1つの共通のテーマとして、これらの分子の構築は、異なる抗原を認識する2つの単鎖Fv(scFv)断片(ペプチドリinkerを介して連結された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の可変領域)から始まる。タンデムscFv分子(taFv)は、2つのscFv分子を追加のペプチドリinkerと単に接続しただけの単純なフォーマットを表す。これらのタンデムscFv分子中に存在する2つのscFv断片は、別々のフォールディング実体を形成する。したがって、様々なリンカーを用いて、2つのscFv断片を接続することができ、最大63残基の長さを有するリンカーが報告されている。親scFv断片は、通常、細菌内で可溶性形態で発現させることができるが、タンデムscFv分子は細菌内で不溶性の凝集体を形成することがよく観察される。したがって、可溶性のタンデムscFv分子を産生するために、再フォールディングプロトコル又は哺乳動物発現系の使用がルーチンに適用される。このようにして、本発明は、上で詳述したような組換え技術を用いて製造される上に開示されたような二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

30

40

【0193】

上に示したような好ましい製造方法では、非天然アミノ酸は、連結の前のアジド、シアノ、ニトリル酸化物、アルキン、アルケン、歪んだシクロオクチン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、又はアリール、アルキル、若しくはビニルハライド、ケトン、アルデヒド、ケタール、アセタール、ヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アリールスルホネート、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸基を含む。非天然アミノ酸は、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、p-プロモフェ

50

ニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、trans-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、又はビニルグリシン、ピロリジン、N- σ -o-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン(AzZLys)、N- σ -プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、N- σ -2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン(BocLys)、N- σ -アリルオキシカルボニル-L-リジン(AlocLys)、N- σ -アセチル-L-リジン(AcLys)、N- σ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZLys)、N- σ -シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン(CycLys)、N- σ -D-プロリル-L-リジン、N- σ -ニコチノイル-L-リジン(NicLys)、N- σ -N-Me-アントラニロイル-L-リジン(NmaLys)、N- σ -ビオチニル-L-リジン、N- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -メチル-L-リジン、N- σ -ジメチル-L-リジン、N- σ -トリメチル-L-リジン、N- σ -イソプロピル-L-リジン、N- σ -ダンシル-L-リジン、N- σ -o,p-ジニトロフェニル-L-リジン、N- σ -p-トルエンシルホニル-L-リジン、N- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、N- σ -フェニルピルバミド-L-リジン、N- σ -ピルバミド-L-リジンであってもよい。

10

【0194】

例えば、上で示したような好ましい製造方法において、非天然アミノ酸は、連結の前のアジド、アルキン、アルケン、又はアリール、アルキル、又はビニルハライド、ケトン、アルデヒド、ヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素基を含む。非天然アミノ酸は、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、p-プロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン、又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、trans-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、又はビニルグリシンであってもよい。

20

【0195】

上に示したような好ましい製造方法では、第一の部分を第二の部分にカップリングさせるための反応は、[3+2]双極性環状付加若しくはクリック反応、ヘック反応、菌頭反応、鈴木反応、スティルカップリング、檜山/デンマーク反応、オレフィンメタセシス、ディールス-アルダー反応、又はヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、若しくはヒドロキシルアミンとのカルボニル縮合である。

30

【0196】

(二価の二重特異性コンストラクト及び抗体のPEG化)

当技術分野で公知の組換え二重特異性抗体の短所の1つは、体内でのその短い循環時間である。ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、及びタンデムscFv分子は、50~60kDaの分子量を有しており、このため、溢出、タンパク質分解、及び腎排出によるこれらの実体の循環からの迅速なクリアランスが生じることがある。これらの実体の例示的な初期半減期($t_{1/2\alpha}$)は30分未満である。組換え抗体の薬物動態を改善するために、いくつかの手法が取られている。1つの手法は、これらの分子のサイズを増大させることである。100~115kDaの分子量を有する二量体単鎖ダイアボディ分子は、可変ドメインを接続するリンカーの長さを変えることによって作製することもできる。他の手法は、二重特異性体と、長い半減期を有する血清タンパク質との会合に依存している。これらには、二重特異性抗体と、ヒト血清アルブミン(HSA)、HSA結合ペプチド、又は本来長い半減期を有するホルモンに由来するペプチドとの融合が含まれる。そのような方法を、本発明の二価の二重特異性コンストラクトに適用することができる。しかしながら、本発明は、ポリエチレングリコールポリマー(PEG)の使用を提供するものでもあり、該使用は、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの半減期を延長する上で特に有利であることが本明細書で初めて示されている。

40

【0197】

PEGは、最終的な二重特異性生成物において望ましく、かつscFvに固有の問題を解決す

50

るいくつかの化学的特性を有する。PEG化は、タンパク質溶解性を改善し、scFv安定性を増大させ、それにより、scFvの凝集及び沈殿を低下させるはずである。さらに、PEGなどの、長くて柔軟なリンカーは、2つの抗体断片の物理的隔離を増大させ、それらが互いに独立に再フォールディングするのを可能にする。これは、遺伝子融合によって連結された二重特異性抗原結合ドメインの再フォールディングでよく起こる問題の1つ、(すなわち、2つの成分抗体間の無制御でかつ望ましくない架橋)を解決する。

【0198】

PEGポリマーは、従来、リジン、システイン、及びヒスチジン残基などの反応性部位を介して生体分子に共有結合される。しかしながら、最適な安定性を達成するために、標的分子に付着させるポリマーの量は、厳しく制御される必要がある。PEGポリマーとタンパク質中の反応性部位とのコンジュゲーションは、PEG修飾タンパク質の不均一な混合物を生じさせることが多く、これにより、最適でない安定化及び半減期増大、並びにPEG反応性部位がタンパク質活性にとって重要である(例えば、それらが、受容体結合部位又はその近くに位置する)場合、ポリマー修飾タンパク質の生体活性の潜在的な損失がもたらされることがある。本発明は、特定の場所に非天然アミノ酸を含むように二価の二重特異性コンストラクトの成分抗体を改変し、PEGをこれらの非天然アミノ酸と反応させることによって、この問題に対する解決を提供する。

10

【0199】

PEGリンカーの使用は、使用し得る化学合成の多用途性のために、上で詳述されたものに対してさらにより多くの利点を提供する。PEGは、scFvタンパク質に組み込まれる任意の非天然アミノ酸との相補的反応パートナーとなるように容易に官能化することができる。PEGは、多価タンパク質ハイブリッドの構築を可能にする複数のコンジュゲーション部位を有するように官能化することもできる。PEG官能化は、所望のコンジュゲーション化学反応に応じてホモ二官能性又はヘテロ二官能性PEGを用いて行なうことができる。さらに、PEGの構造は、薬物動態及び生体活性に影響を及ぼし得る線状又は分岐状のバリエーションに合わせることができる。

20

【0200】

これらのPEG化二価の二重特異性コンストラクトの調製を以下でさらに論じる。

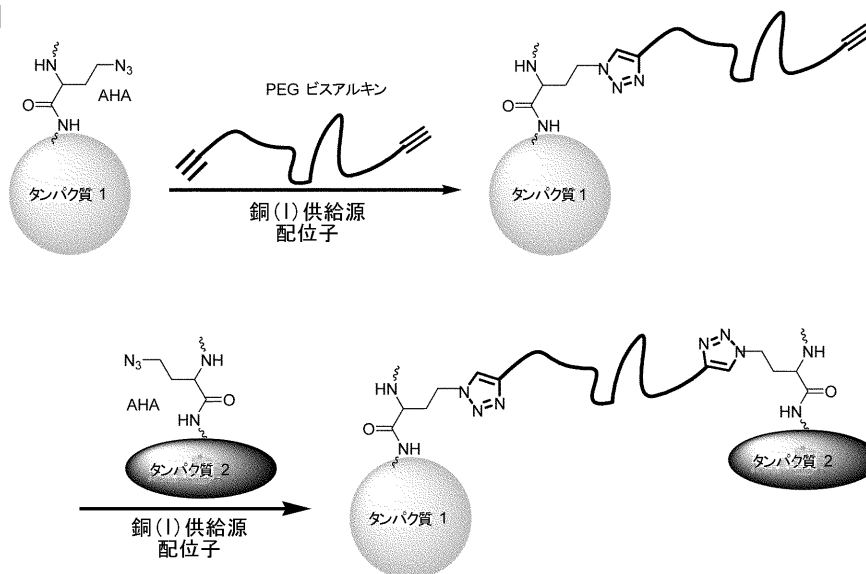
【0201】

二重特異性scFvは、2つの異なるscFv抗原結合ドメインをリンカーによって互いにコンジュゲートさせることによって構築することができる。この戦略は、各scFvが二官能性リンカーにコンジュゲートされる2工程プロセスで実現される。二重特異性コンジュゲートを含む2つのscFvは、各々、特異的なコンジュゲーション部位の役割を果たす位置で少なくとも1つの非天然アミノ酸(例えば、Aha)を含む。リンカーは、ホモ二官能性又はヘテロ二官能性であることができ、かつscFvに含まれる非天然アミノ酸(Aha)と反応性がある相補的官能基(例えば、アルキン)を含むことができる。その後、以下の反応スキームを適用して、二重特異性scFvを作製することができる(下のスキーム1)。

30

【化 5】

スキーム 1



10

【0202】

scFvをリンカーにコンジュゲートさせるために用いられる化学反応は、20種の天然アミノ酸に対して直交性である。scFv-PEGコンジュゲート及び二重特異性体の調製において、ここでは、アジド-アルキン銅媒介性の環状付加を用いる。典型的なシーケンスにおいて、アジドホモアラニン(Aha)を含むscFvを、アルキンで官能化された過剰量のホモ二官能性PEGリンカーと反応させる。限界過剰のPEGでの主要生成物は一価のPEG化scFvであり、その後、これを精製する。PEGリンカーの遊離のペンダントアルキンは、Ahaを含む第二のscFvとの第二の銅媒介性アジド-アルキン環状付加を経て、二重特異性体を生じさせる。

20

【0203】

アジド-アルキン銅媒介性の環状付加(Meldal及びTorneの文献(2008)、Kolbらの文献(2001))、並びにアルケン-アリールハライドパラジウム媒介性のヘック反応は、標的タンパク質へのポリマー、毒素、又はペプチドの部位特異的コンジュゲーションに広く適用されている。銅媒介性の環状付加反応は、全ての天然アミノ酸と完全に直交性であり、そのため、非天然アジド又はアルキン含有部分を導入することができない限り、この化学反応を用いて、生物学的分子を修飾することができない。これが行なわれるとき、該化学反応は、そのアジド又はアルキンの位置でしか起こらない。アジド及びアルキンは、天然アミノ酸の類似体としてタンパク質中に導入され、バイオコンジュゲーションのための特異的な位置を提供することができる。

30

【0204】

別所に注記したように、抗IL-6及び抗IL-23又はそれらの誘導体(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)をPEG化を介して任意に修飾し、半減期を増大させることができる。抗IL-6及び抗IL-23又はそれらの誘導体のPEG化は、同様の方法によって達成することができる。

40

【0205】

好適には、本発明の二重特異性コンストラクト及び抗体において有用なPEG基及びPEGリンカーは、2~100kDa、例えば、5~60kDa、例えば、10~40kDa、例えば、約20kDa又は約40kDaの重量を有する。PEG基及びリンカーは、直鎖であっても分岐状であってもよい。

【0206】

(医薬組成物)

別の態様に従って、本発明は、本発明の二価の二重特異性コンストラクト及び医薬として許容し得る担体を含む医薬組成物及びキットを提供する。いくつかの実施態様では、該医薬組成物又はキットはさらに、別の成分、例えば、イメージング試薬又は治療剤を含む

50

。好ましい実施態様では、該医薬組成物又はキットは、診断法又は治療法で用いられる。

【0207】

医薬組成物は、例えば、水性製剤、例えば、従来の賦形剤、例えば、塩化ナトリウム、糖、アミノ酸、界面活性剤などを含む水溶液であってもよい。

【0208】

医薬組成物はまた、水又は食塩水の添加による再構成に好適な凍結乾燥製品であってもよい。

【0209】

(治療方法)

別の態様に従って、本発明は、治療における本発明の二価の二重特異性コンストラクトの使用を提供する。特に、本発明は、 T_H17 、 T_H22 、及び T_H1 媒介性疾患、並びにこれらの T_H 細胞の組合せによって媒介される疾患の治療を提供する。 10

【0210】

本発明の二価の二重特異性コンストラクトを用いて治療し得るそのような疾患の例としては、炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IRS)、エリテマトーデス、及び糖尿病が挙げられる。

【0211】

T_H17 媒介性疾患のさらなる例としては、筋萎縮性側索硬化症又はALS(ルーゲーリック病)、強直性脊椎炎、アスペルガー障害、背部痛、バレット食道、双極性障害、心不整脈、セリアック病、慢性疲労症候群(CFS/CFIDS/E)、慢性ライム病(ボレリア症)、クローン病、尿崩症、I型糖尿病、II型糖尿病、認知症、鬱病、てんかん、線維筋痛(FM)、胃食道逆流性疾患(GERD)、橋本甲状腺炎、過敏性腸症候群(IRS)、間質性膀胱炎(IC)、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、腎臓結石、レフグレン症候群、エリテマトーデス、躁病、多種化学物質過敏症(MCS)、片頭痛、モルジェロンズ病、多発性硬化症、重症筋無力症、ニューロパシー、強迫神経症(OCD)、変形性関節炎、パニック発作、パーキンソン病、リウマチ性多発筋痛、体位性起立性頻脈症候群(Postural orthostatic, tachycardia syndrome)(POTS)、前立腺炎、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー症候群/レイノー現象、反応性関節炎(ライター症候群)、レストレスレッグ症候群、反射性交感神経性ジストロフィー(RSD)、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、副鼻腔炎(inusitis)、季節性情動障害(SAD)、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、及びめまいが挙げられる。さらなる疾患としては、敗血症又は出血熱によるサイトカインストーム、胆汁性肝硬変、スチール病、COPD、グレイブス眼症、腹膜炎(periondritis)、ベーチェット病、喘息、アトピー性皮膚炎、汗腺膿瘍、巨細胞性動脈炎、及び心臓線維症が挙げられる。 20 30

【0212】

T_H22 媒介性疾患のさらなる例としては、慢性炎症性疾患、例えば、湿疹、強皮症、喘息、及びCOPDが挙げられる。

【0213】

したがって、ある実施態様では、本発明は、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H17 媒介性疾患の治療方法を提供する。 40

【0214】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 によって媒介される疾患の治療用の本発明の二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0215】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明の二価の二重特異性コンストラクトの使用を提供する。

【0216】

別の実施態様では、本発明は、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療方法を提供する。

【0217】

別の実施態様では、本発明は、 T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療用の本発明の二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0218】

別の実施態様では、本発明は、両方の T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明の二価の二重特異性コンストラクトの使用を提供する。

【0219】

別の実施態様では、本発明は、本発明の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療方法を提供する。

【0220】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 と T_H1 の両方によって媒介される疾患の治療用の本発明の二価の二重特異性コンストラクトを提供する。

【0221】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 と T_H1 の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明の二価の二重特異性コンストラクトの使用を提供する。

【0222】

別の実施態様では、本発明は、本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H17 媒介性疾患の治療方法を提供する。

【0223】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 媒介性疾患の治療用の本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せを提供する。

【0224】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 媒介性疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの使用を提供する。

【0225】

したがって、ある実施態様では、本発明は、本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療方法を提供する。

【0226】

別の実施態様では、本発明は、 T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療用の本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せを提供する。

【0227】

別の実施態様では、本発明は、 T_H22 細胞によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの使用を提供する。

【0228】

したがって、ある実施態様では、本発明は、本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、 T_H17 と T_H1 の両方によって媒介される疾患の治療方法を提供する。

【0229】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 と T_H1 の両方によって媒介される疾患の治療用の本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せを提供する。

【0230】

別の実施態様では、本発明は、 T_H17 と T_H1 の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための本発明による抗IL-6及び抗IL-23抗体又はそれらの誘導体の組合せの使用を提供する。

【0231】

本発明はまた、その原因に対して T_H17 成分と T_H22 成分の両方を有する疾患の治療方法を提供する。さらに、本発明によって治療されるべき疾患の原因は、 T_H17 細胞、 T_H22 細胞、

10

20

30

40

50

及びT_H1細胞の3つ全てが関係し得る。

【0232】

上記の実施態様の各々において、抗IL-23抗体又はその誘導体は、抗IL-23/IL-12抗体であってもよい。

【0233】

(投薬計画)

本発明の別の態様では、本発明(the present invention)による治療で使用するための二価の二重特異性コンストラクト、抗体、及び抗体組合せは、当技術分野で現在利用可能な治療と比べて同じ治療効果を達成しながらも、有利に低い用量で患者に投与することができる。この低用量は、本明細書に開示される抗体のより高い活性によって促進されることができ、かつ副作用の発生を低下させる可能性がある。

10

【0234】

或いは、より大きい活性が望ましい場合、本発明による治療で使用するための二価の二重特異性コンストラクト、抗体、及び抗体組合せは、当技術分野で現在利用可能な治療と比べて等しいか又はそれより高い用量で患者に投与することができる。そのようなより高い投薬量は、患者への二価の二重特異性コンストラクト、抗体、及び抗体組合せの投与の頻度の低下を促進することができる。

【0235】

ある実施態様では、本発明の二価の二重特異性コンストラクト、抗体、及び抗体組合せは、月1回、月2回、週1回、週2回、1日1回、1日2回投与することができる。

20

【0236】

(IL-6、IL-23、及びIL-23/IL-12抗体の親和性及び生物学的活性を決定するためのアッセイ)

(抗体親和性の決定)

抗体親和性は、当業者に周知の方法を用いて決定することができる。抗体が、それらを、本発明の二価の二重特異性抗体に含めるのに潜在的に適したものにす所望の親和性を有するかどうかを決定する目的のために、以下の詳細なアッセイ手順を提供するが、(例えば、異なるが、類似する装置、又は異なるブランドの一般試薬の使用において)方法論を少し変更しても、同じ決定がなされることが可能になることが理解されるであろう。

30

【0237】

平衡解離定数は、SensiQ Pioneer(ICx Nomadics, Stillwater, OK)、及びアミンカップリングに適したカルボキシル化COOH1センサー(同上)を用いて、表面プラズモン共鳴によって決定することができる。

【0238】

プロテインG(6510-10, Biovision, Mountain View, CA)は、アミンカップリング試薬(Sigma Aldrich(N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS, 56480)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-B'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC, E7750)、エタノールアミン(398136), St. Louis, MO)を用いるか、又はBiacoreアミンカップリングキット(BR-1000-50, GE Healthcare, Waukesha, WI)を用いて、COOH1センサーにカップリングされる。

40

【0239】

簡潔に述べると、カルボキシル化された表面を、2~10分の範囲の接触時間の間、2mM EDC及び.5mM NHSで活性化する。20~400ug/mLの範囲の可変濃度のプロテインGを、10mM酢酸バッファー、pH4.3(酢酸ナトリウム、BP334-1;氷酢酸、A490-212;Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)中に希釈し、5~10分の範囲の可変接触時間の間、5~10µL/分の範囲の速度で、活性化されたセンサーの上に注入する。COOH1センサーチップに固定化されるプロテインGの量は、400~2000応答単位(RU)の範囲である。残りの活性化された部位は、25µL/分の流速で100µLのエタノールアミンでキャッピングするべきである。

【0240】

ウサギヒトキメラmAbの平衡定数は、タンパク質GがコーティングされたチップへのmAbの結合と、その後の各分析物(IL-6又はIL-23)のそのそれぞれのmAbへの結合によって決定

50

することができる。物質移動効果を最小限に抑えるために、分析物の結合が飽和に達したときに、その対応するRUが200～300低下するように、各分析物に対するmAbの表面密度を調整するべきである。1～100nMの範囲の3x-FLAG-IL-6(実施例1参照)、IL-6(CYT-213, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)、又はヒト二量体IL-23(34-8239, eBiosciences, San Diego, CA)の希釈物をチップ表面の上に注入し、会合速度定数(Ka)及び解離速度定数(Kd)を測定する。各々の結合及び解離サイクルのために、チップ表面を15uLの20mM NaOH(5671-02, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ)で再生するべきである。アッセイ温度を25℃で維持し、分析物の流速を50μL/分とし、2分の会合段階及び10～30分の解離段階を含めるべきである。結合/解離(on/off)速度(ka/kd)及び解離定数(KD)は、上記のフォーマットを擬一次1:1相互作用モデルソフトウェア(Qdat, ICx Nomadics, Stillwater, OK)とともに用いて決定することができる。

【0241】

scFvの平衡定数は先に記載した通りに決定することができる;但し、エピトープタグ化IL-6がチップ表面に捕捉され、IL-6からの抗IL-6 scFvの解離がモニタリングされるように、プロトコルを修正するべきである。簡潔に述べると、抗FLAG(登録商標)M2抗体(200472, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)をプロテインGに結合させ、その後、3xFLAG-IL-6を抗FLAG抗体によって捕捉する。抗IL-6 scFvは、1～100nMの濃度範囲にわたってアッセイするべきである。

【0242】

(二重特異性scFvのSPR)

二重特異性scFvのSPRを、抗IL-6部分の測定について先に記載した通りに実施する;但し、二重特異性体の他方の末端での、付着した抗IL-23 scFv、31A12の結合反応速度も決定するために、プロトコルを修正する。簡潔に述べると、二重特異性体によるIL-23結合を、記載したようなIL-6を用いて、該二重特異性体を一定密度(～240RU)で固定化することによって実施した。組換えヒト二量体IL-23(34-8239, eBiosciences, San Diego, CA)の結合及び解離は、上で詳述したのと同じパラメータを用いて、3～25nMの範囲の濃度でアッセイすることができる。

【0243】

(IL-6活性の決定)

IL-6活性を調節する抗体及びその誘導体の能力は、当業者に周知の方法を用いてアッセイすることができる。抗体が、それらを、本発明の二価の二重特異性抗体に含めるのに潜在的に適したものにす所望のIL-6活性調節能力を有するかどうかを決定する目的のために、以下の詳細なアッセイ手順を提供するが、(例えば、異なるが、類似する装置、又は異なるブランドの一般試薬の使用において)方法論を少し変更しても、同じ決定がなされることが可能になることが理解されるであろう。

【0244】

ELISAを用いて、IL-6結合を評価することができる。組換えIL-6(実施例1参照)を、100μLのPBS中、0.25μg/mlでELISAプレートに添加する。プレートは、37℃で1時間、又は4℃で一晩インキュベートするべきである。ブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む100μL/ウェルのPBSを各ウェルに添加するべきである。その後、プレートを室温で1時間インキュベートするべきである。その後、プレートを脱イオン水で5回すすぐべきである。各ウェルに、50μLのPBS/10%ヤギ血清を添加する。その後、試験試料を50μL/ウェルで添加する。その後、プレートを室温で1時間インキュベートするべきである。その後、プレートを脱イオン水で5回すすぐべきである。各ウェルに、PBS/10%ヤギ血清中で1:5000希釈した100μLのペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(カタログ#111-035-008, Jackson Immuno Research)を添加する。その後、プレートを室温で1時間インキュベートし、その後、プレートを脱イオン水で5回洗浄するべきである。TMB基質(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を100μL/ウェルで添加する。その後、反応を100μLの1N H2SO4(JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)で停止させるべきである。その後、Molecular Devices製のM2プレートリーダーを用いて、吸

光度を450nmで測定することができる。

【0245】

IL-6依存的マウスB細胞ハイブリドーマ細胞株(B9細胞株;Aardenらの文献(1987))を用いるバイオアッセイを用いて、IL-6阻害を評価することができる(図3)。中和活性について試験すべき試料を、96ウェル組織培養プレート中で、100 μ lのアッセイ培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に希釈するべきである。これに続いて、50 μ lのIL-6(カタログ# CYT-274 Prospec-Tany Technogene)含有アッセイ培地を添加し、室温で30分間インキュベートする。その後、B9細胞をフラスコから回収し、180 $\times$ gで7分間遠心分離し、ペレットをIL-6不含培養培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に再懸濁する。細胞を3回遠心分離及び再懸濁して、IL-6を除去するべきである。トリパンブルー排除によって生存率を決定した後、細胞を1 $\times$ 10⁵細胞/mlに調整するべきである。5 $\times$ 10³細胞に相当する、50 μ lの容量のB9細胞を、IL-6不含培地を含む適切な対照ウェルとともに、各ウェルに添加するべきである。

10

【0246】

その後、プレートを、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で、48時間インキュベートするべきである。その後、20 μ lのAlamar Blue(カタログ# DAL1100, Invitrogen, USA)を各ウェルに添加し、プレートをさらに18時間インキュベートするべきである。その後、プレートを、570nm及び600nmで、Molecular Devices(Sunnyvale, CA, USA)製のM2プレートリーダー上で読み取ることができる。

20

【0247】

(IL-23活性の決定)

ELISAアッセイを用いて、IL-23結合を評価することができる(Aggarwalらの文献(2003))。ELISAプレートは、IL-23直接結合法又はIL-23間接結合法のどちらかを用いて、コーティングすることができる。

【0248】

間接結合法のために、抗His抗体(カタログ# A00613, GenScript社, New Jersey, USA)を、100ml/ウェルのPBS中、0.01~0.02 μ g/mlでプレートに添加するべきである。その後、プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間又は4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートするべきである。非特異的結合をブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む100ml/ウェルのPBSを各ウェルに添加するべきであり、その後、プレートを脱イオン水で5回すすぐべきである。100ml/ウェルのPBS/10%ヤギ血清中の0.5mg/mlのIL-23 p40-p19-His(配列番号4)を添加し、プレートを室温で1時間インキュベートするべきである。

30

【0249】

直接結合法のために、IL-23 p40-p19-His(配列番号4)を、100mlのPBS中、0.5mg/mlでELISAプレートに添加するべきである。その後、プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間又は4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートするべきである。非特異的結合をブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む100ml/ウェルのPBSを各ウェルに添加するべきである。その後、プレートを室温で1時間インキュベートするべきである。

40

【0250】

IL-23結合後、プレートを脱イオン水で5回すすぐべきである。各ウェルに、50mlのPBS/10%ヤギ血清を添加するべきである。その後、試験試料を50ml/ウェルで添加するべきである。その後、プレートを室温で1時間インキュベートし、脱イオン水で5回すすぐべきである。その後、各ウェルに、PBS/10%ヤギ血清中で1:5000に希釈した100mlのペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(カタログ#111-035-008, Jackson Immuno Research)を添加するべきである。その後、プレートを室温で1時間インキュベートし、その後、プレートを脱イオン水で5回洗浄するべきである。TMB基質(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を100ml/ウェルで添加するべきである。その後、反応を100mlの1N H₂SO₄(JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)で停止させるべきである。その後、Molecular Devices製のM2プレートリーダーを用いて、吸光度を450nmで測定することができる。

50

【 0 2 5 1 】

マウス脾臓細胞によるIL-23誘導性IL-17発現の検出に基づくバイオアッセイを用いて、IL-23受容体に対するIL-23結合の抗体媒介性阻害、及び結果として生じる生体活性を検出することができる。

【 0 2 5 2 】

5 × 10⁵個のC57BL/6脾臓細胞を、ヘテロ二量体IL-23(eBioscience カタログ#14-8239又はHumanzyme, Chicago, USA カタログ#HZ-1049)の希釈物を含む200ml中で、96ウェルプレートのウェル中で培養し、プレートを37 °Cで2~3日間インキュベートするべきである。使用される培養培地は、RPMI 1640、10 %FBS、50uM 2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、ピルビン酸塩、ゲンタマイシン、及び10ng/mlヒトIL-2(カタログ# CYT-209, Prospec-Tany Technogene)であるべきである。3日後、培養上清を、下記のように、IL-17AについてELISAでアッセイするべきである。

【 0 2 5 3 】

ELISAアッセイを用いて、マウスIL-17を検出することができる。プレートを、100mlのPBS中1mg/mlの抗mIL-17A(eBioscience #14-7178)でコーティングし、4 °Cで一晩又は37 °Cで1時間インキュベートする。プレートを脱イオン水中で洗浄し、100mlのPBS、10 %ヤギ血清で1時間ブロッキングするべきである。プレートを洗浄した後、50mlのPBS/10 %ヤギ血清及び50mlの培養上清をプレートに添加し、1時間インキュベートするべきである。その後、プレートを洗浄し、PBS/10 %ヤギ血清中0.5mg/mlで100ml/ウェルの抗mIL-17A-ビオチン(eBioscience #13-7179)を添加し、プレートを室温で1時間インキュベートするべきである。その後、プレートを洗浄し、PBS/10 %ヤギ血清中1:1000で100ml/ウェルのストレプトアビジン-HRP(Jackson Labs)と反応させるべきである。プレートを再洗浄し、100ml/ウェルのTMB基質(Thermo Scientific, IL, USA)を添加することによって、シグナルを検出するべきである。100ml/ウェルの1N H₂SO₄で反応を停止させた後、光学密度を450nmで読み取ることができる。

【 0 2 5 4 】

(IL-12(p40)活性の決定)

さらに、IL-23のp40サブユニットも、T_H1シグナル伝達経路に關与するIL-12の一部を形成することを考慮して、IL-12に対するその中和能力を測定するアッセイが、IFN-γ (T_H1細胞活性の生成物)のレベルを調節するその能力を利用することが本明細書に開示されている。当業者であれば、抗体の中和効果、及びIFN-γ 産生に対するその効果を決定するための好適なアッセイ法を認識しているであろうが、以下のアッセイを好適なアッセイの一例として提供する。

【 0 2 5 5 】

抗体は、IL-12応答性細胞株NK-92(CRL-2407, ATCC, Manassas, Virginia, USA)を用いて、p40中和能力についてアッセイすることができる。B細胞クローニングプレートからの50mlの培養上清、又は抗体トランスフェクションからの50mlの上清を96ウェル組織培養プレートに移すべきである。50mlのヒトIL-12(カタログ# Cyt-362, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)を各ウェルに4ng/mlで添加するべきである。その後、プレートを室温で30~60分間インキュベートするべきであり、その後、5 × 10⁴個のNK-92細胞を100ml中で各ウェルに添加するべきである。その後、培養物を37 °Cで3日間インキュベートし、その上清をヒトインターフェロン-γ 産生についてアッセイするべきである。アッセイ培地は、RPMI 1640、10 %FBS、NEAA、ピルビン酸塩、50mM 2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及び10ng/mlヒトIL-2(カタログ# Z00368, GeneScript社, Piscataway, NJ, USA)であるべきである。

【 0 2 5 6 】

ELISAアッセイを用いて、ヒトインターフェロン-γ を検出することができる。プレートを、100mlのPBS中1mg/mlの抗ヒトインターフェロン-γ (カタログ# Mab 1-D1K, Mabtech, Cincinnati, OH, USA)で、4 °Cで一晩又は37 °Cで1時間コーティングする。その後、プレートを脱イオン水中で洗浄し、100 μ lのPBS、10 %ヤギ血清で1時間ブロッキングするべきで

ある。プレートを洗浄した後、50mlのPBS/10%ヤギ血清及び50mlの培養上清をプレートに添加し、1時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中0.5 mg/mlで100ml/ウェルの抗ヒトインターフェロン- γ -ビオチン(カタログ# Mab 7b6-1-ビオチン, Mabtech)を添加し、その後、プレートを室温で1時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中1:1000で100ml/ウェルのストレプトアビジン-HRP(Jackson Labs)と反応させるべきである。その後、プレートを再洗浄し、100ml/ウェルのTMB基質(Thermo Scientific, IL, USA)を添加することによって、シグナルを検出するべきである。100ml/ウェルの1N H₂SO₄で反応を停止させた後、光学密度を450nmで読み取ることができる。

【0257】

10

(霊長類インターロイキン(IL-6、IL-23、及びIL-12)に対する反応性)

霊長類インターロイキンに対するアッセイは、霊長類バージョンのサイトカインの使用がアッセイされることを除いて、ヒトアッセイに対する活性の測定用のものと同一である。

【0258】

ヒト治療用の任意のサイトカインアンタゴニストの開発の成功は、初期の毒性試験を必要とする。毒性は、非ヒト種において最も効率的に証明される。初期の毒性研究を容易にするために、本発明の抗体を、研究が検討されている種に由来するIL-6を中和するその能力についてスクリーニングすることができる。

【0259】

20

(定義)

以下の用語は、特に示さない限り、以下の意味を有することが理解されるものとする：

【0260】

「免疫グロブリン」は四量体分子である。天然に存在する免疫グロブリンにおいて、各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対から構成されており、各々の対は、1つの「軽」鎖(約25kDa)及び1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に關与する約100~110個又はそれより多くのアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に關与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、K軽鎖及びX軽鎖と分類される。重鎖は、又はEと分類され、抗体のアイソタイプを、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEと規定する。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12個又はそれより多くのアミノ酸の「J」領域によって接続され、重鎖は、約10個又はそれより多くのアミノ酸の「D」領域も含む。一般には、基礎免疫学(Fundamental Immunology)第7章(Paul, W. 編, 第2版 Raven Press, N. Y. (1989))(全ての目的のためにその全体が引用により組み込まれる)を参照されたい。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、無傷の免疫グロブリンが2つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

30

【0261】

免疫グロブリン鎖は、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)が、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接続されているという同じ一般構造を示す。各々の対の2つの鎖に由来するCDRは、フレームワーク領域に並置されており、特異的エピトープへの結合を可能にしている。N-末端からC-末端に向かって、軽鎖と重鎖は両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割当ては、Kabatの文献(免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest))(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987及び1991))、又はChothia及びLeskの文献(J. Mol. Biol. 196: 901-917(1987)); Chothiaらの文献(Nature 342: 878-883(1989))の定義に従う。

40

【0262】

「抗体」は、無傷の免疫グロブリン、又は特異的結合を無傷の抗体と競合するその抗原結合部分を指す。抗原結合部分は、組換えDNA技術によるか、又は無傷の抗体の酵素的若しくは化学的切断によって生成させることができる。抗原結合部分としては、特に、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、及び相補性決定領域(CDR)断片、単鎖抗体(scFv)、キメラ抗

50

体、ダイアボディ、並びにポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドが挙げられる。Fab断片は、VL、VH、CL、及びCH 1ドメインからなる一価断片であり;F(ab')₂断片は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であり;Fd断片は、VHドメイン及びCH 1ドメインからなり;Fv断片は、抗体の単一のアームのVLドメイン及びVHドメインからなり;かつdAb断片(Wardらの文献(Nature 341: 544-546,1989))は、VHドメインからなる。単鎖抗体(scFv)は、VL領域及びVH領域が対合し、それらを単一のタンパク質鎖として生成させることを可能にする合成リンカーを介して一価分子を形成する抗体である(Birdらの文献(Science 242: 423-426,1988)、及びHustonらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883,1988))。

10

【 0 2 6 3 】

抗体は、1以上の結合部位を有することができる。2以上の結合部位がある場合、結合部位は、互いに同一であってもよいし、異なってもよい。例えば、天然に存在する免疫グロブリンは、2つの同一の結合部位を有し、単鎖抗体又はFab断片は、1つの結合部位を有し、一方、「二重特異性」抗体は、2つの異なる結合部位を有する。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合又はFab'断片の連結を含む、種々の方法によって産生することができる。例えば、Songsivilai及びLachmannの文献(Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321(1990))、Kostelnyらの文献(J. Immunol. 148: 1547-1553(1992))を参照されたい。

【 0 2 6 4 】

「単離された抗体」は、(1)その天然状態でそれに付随する、他の天然に関連する抗体を含む、天然に関連する成分と関連していないか、(2)同じ種由来の他のタンパク質を含まないか、(3)異なる種由来の細胞によって発現されるか、又は(4)天然では生じない、抗体である。単離された抗体の例としては、IL-6を用いて親和性精製された抗IL-6抗体、ハイブリドーマ又は他の細胞株によってインビトロで合成された抗IL-6抗体、及びトランスジェニックマウスに由来するヒト抗IL-6抗体が挙げられる。

20

【 0 2 6 5 】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する1以上の可変領域及び/又は定常領域を有する全ての抗体を含む。これらの抗体は、種々の方法で調製することができ、一例として、2つが以下に記載されている。

【 0 2 6 6 】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する抗体であり、該抗体では、重鎖及び軽鎖のフレームワーク及び定常ドメイン中の特定のアミノ酸は、ヒトでの免疫応答を回避又は無効にするように突然変異させられている。

30

【 0 2 6 7 】

或いは、ヒト化抗体は、ヒト抗体由来の定常ドメインを非ヒト種の可変ドメインと融合することによって産生することができる。ヒト化抗体の作製方法の例は、米国特許第6,054,297号、第5,886,152号、及び第5,877,293号に見出すことができる。

【 0 2 6 8 】

「キメラ抗体」という用語は、1つの抗体由来の1以上の領域、及び1以上の他の抗体由来の1以上の領域を含む抗体を指す。

40

【 0 2 6 9 】

「Koff」という用語は、抗体/抗原複合体からの抗体の解離についての解離速度(off rate)定数を指す。

【 0 2 7 0 】

「Kd」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指す。

【 0 2 7 1 】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン又はT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的に活性のある表面分子集団からなり、通常、特定の3次元構造特性、及び特定の電荷特性を有する。解離定数が、好ましくは10nM未満、最も好ましくは0nMであ

50

るとき、抗体は、抗原に特異的に結合すると言われる。

【0272】

抗体又は免疫グロブリン分子の断片又は類似体は、本明細書の教示に従って、当業者によって容易に調製され得る。

【0273】

断片又は類似体の好ましいアミノ末端及びカルボキシ末端は、機能ドメインの境界付近で生じる。構造ドメイン及び機能ドメインは、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データと公的な又は専用の配列データベースとの比較によって同定することができる。

【0274】

「IL-12」は、ジスルフィド結合で連結された、2つのサブユニットp35及びp40からなるヘテロ二量体である。主にミエロイド系統の抗原提示細胞はIL-12を発現し、IL-12は、T細胞又はナチュラルキラー細胞の表面に発現される受容体複合体との結合によって細胞性免疫に関与する。IL-12のp40サブユニットがIL-12受容体ベータ1(IL-12R β 1)受容体に結合し、p35サブユニットが第二の受容体鎖(IL-12R β 2)に結合して、細胞内シグナル伝達を生じさせると考えられている。

【0275】

「IL-23」は、p19タンパク質と共有結合した、IL-12の同じp40タンパク質サブユニットからなるヘテロ二量体である。IL-23は、IL-12Rと関連する受容体に結合し、IL-12Rは、IL-12R β 1鎖を共有し、かつ固有のIL-23R鎖も有する。

【0276】

「IL-6」は、造血、炎症、及び腫瘍形成を含む、免疫調節における様々な生物学的活性を有する多面的サイトカインである。IL-6は、IL-6受容体(IL-6R)及びシグナル伝達受容体サブユニットgp130からなる受容体複合体を活性化する。IL-6Rは、膜貫通形態と可溶性形態の両方で存在する。IL-6は、これらの形態の両方に結合し、これはその後、gp130と相互作用して、下流のシグナル伝達及び遺伝子発現を誘発することができる。

【0277】

「T_H1細胞」は、哺乳動物免疫応答に関与するT調節性細胞(Tヘルパー細胞としても知られる)である。それらは、IFN- γ の産生を特徴とする。

【0278】

「T_H17細胞」は、哺乳動物免疫応答に関与するT調節性細胞(Tヘルパー細胞としても知られる)である。それらは、IL-17の産生を特徴とする。

【0279】

「T_H17媒介性疾患」は、T_H17細胞が、該疾患の病因において役割を果たす疾患である。

【0280】

「T_H22細胞」は、哺乳動物免疫応答に関与するT調節性細胞(Tヘルパー細胞としても知られる)である。それらは、IL-22の産生を特徴とする。

【0281】

「T_H22媒介性疾患」は、T_H22細胞が、該疾患の病因において役割を果たす疾患である。

【0282】

好ましくは、コンピュータによる比較方法を用いて、既知の構造及び/又は機能の他のタンパク質に生じる配列モチーフ又は予測されるタンパク質立体構造ドメインを同定する。既知の3次元構造にフォールディングされるタンパク質配列を同定するための方法が公知である。Bowieらの文献(Science 253: 164(1991))を参照されたい。

【0283】

好ましいアミノ酸置換は:(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させ、(2)酸化に対する感受性を低下させ、(3)タンパク質複合体を形成する結合親和性を変化させ、(4)結合親和性を変化させ、かつ(4)そのような類似体の他の物理化学的又は機能的特性を付与又は修飾する置換である。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々なムテインを含むことができる。例えば、単一又は多重アミノ酸置換(好ましくは、保存的アミノ酸置換)は、天然に存在する配列中(好ましくは、分子間接触を形成するドメイン(複数

10

20

30

40

50

可)の外側のポリペプチドの部分で行なうことができる。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的に変化させるべきではない(例えば、置換アミノ酸は、親配列中に生じるヘリックスを破壊するか、又は親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造を破壊する傾向を有するべきではない)。当技術分野で認識されているポリペプチド二次構造及び三次構造の例は、タンパク質、構造、及び分子原理(Proteins, Structures and Molecular Principles)(Creighton編, W. H. Freeman and Company, New York(1984));タンパク質構造入門(Introduction to Protein Structure)(C. Branden及びJ. Tooze編, Garland Publishing, New York, N. Y.(1991));並びにThorntonらの文献(Nature 354: 105(1991))に記載されており、これらの文献は各々、引用により本明細書中に組み込まれる。

【0284】

本明細書で使用されるように、20種の従来のアミノ酸及びそれらの略語は、従来の用法に従う。引用により本明細書中に組み込まれる、免疫学-合成(Immunology-A Synthesis)(第2版, E. S. Golub及びD. R. Gren編, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991))を参照されたい。20種の従来のアミノ酸の位置異性体(例えば、D-アミノ酸)、非天然アミノ酸、例えば、 α -, α -ジ置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の非従来のアミノ酸も、本発明のポリペプチドの好適な構成要素であることができる。非従来のアミノ酸の例としては:4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、s-N、N、N-トリメチルリジン、s-N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、s-N-メチルアルギニン、及び他の同様のアミノ酸及びイミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン)が挙げられる。本明細書で

【0285】

本明細書で言及される「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドのどちらかの、長さが少なくとも10塩基のヌクレオチドのポリマー形態、又はどちらかのタイプのヌクレオチドの修飾形態を意味する。本用語は、DNAの一本鎖形態及び二本鎖形態を含む。

【0286】

本明細書で使用される「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、ゲノム起源、cDNA起源、若しくは合成起源、又はそれらのいくつかの組合せのポリヌクレオチドを意味するものとし、その起源によって、「単離されたポリヌクレオチド」は、(1)「単離されたポリヌクレオチド」が天然において見出されるポリヌクレオチドの全て若しくは一部と関連していないか、(2)天然において連結されていないポリヌクレオチドと機能的に連結されているか、又は(3)より大きな配列の一部として天然に存在していない。

【0287】

本明細書で言及される「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在するオリゴヌクレオチド連結、及び天然に存在しないオリゴヌクレオチド連結によって一緒に連結された、天然に存在するヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、通常、200塩基以下の長さを含むポリヌクレオチドサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、長さが10~60塩基であり、最も好ましくは、長さが12、13、14、15、16、17、18、19、又は20~40塩基である。オリゴヌクレオチドは、通常、例えば、プローブの場合、一本鎖であるが;オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝子突然変異体の構築に使用する場合、二本鎖であり得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、センスオリゴヌクレオチド又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのどちらかであることができる。

【0288】

本明細書で言及される「天然に存在するヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含む。本明細書で言及される「修飾ヌクレオチド」という用語は、修飾又は置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。本明細書で言及される「オリゴヌクレオチド連結」という用語は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、

10

20

30

40

50

ホスホルアニラデート、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド連結を含む。例えば、LaPlancheらの文献(Nucl. Acids Res. 14: 9081(1986));Stecらの文献(J. Am. Chem. Soc. 106: 6077(1984));Steinらの文献(Nucl. Acids Res. 16: 3209(1988));Zonらの文献(Anti-Cancer Drug Design 6: 539(1991));Zonらの文献(オリゴヌクレオチド及び類似体:実践的手法(Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach), pp. 87-108 (F. Eckstein編, Oxford University Press, Oxford England(1991));Stecらの文献(米国特許第5,151,510号);Uhlmann及びPeymanの文献(Chemical Reviews 90: 543(1990))を参照されたく、これらの開示は、引用により本明細書に組み込まれる。オリゴヌクレオチドは、所望の場合には、検出用の標識を含むことができる。

【0289】

特に明示しない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は5'末端であり;二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は5'方向と呼ばれる。新生RNA転写物の5'から3'への付加の方向は転写方向と呼ばれ;RNAと同じ配列を有し、かつRNA転写物の5'末端に対して5'側であるDNA鎖上の配列領域は、「上流配列」と呼ばれ;RNAと同じ配列を有し、かつRNA転写物の3'末端に対して3'側であるDNA鎖上の配列領域は、「下流配列」と呼ばれる。

【0290】

「機能的に連結された」配列には、関心対象の遺伝子に隣接している発現制御配列と、トランス位置又は少し離れたところで作用して関心対象の遺伝子を制御する発現制御配列の両方が含まれる。本明細書で使用される「発現制御配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現及びプロセッシングをもたらすのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列としては、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、及びエンハンサー配列;効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシングシグナル及びポリアデニル化シグナル;細胞質内mRNAを安定化する配列;翻訳効率を高める配列(すなわち、コザックコンセンサス配列);タンパク質の安定性を高める配列;並びに所望の場合には、タンパク質分泌を増強する配列が挙げられる。そのような制御配列の性質は、宿主生物によって異なり;原核生物では、そのような制御配列は、通常、プロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終結配列を含み;真核生物では、通常、そのような制御配列は、プロモーター及び転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、最低でも、その存在が発現及びプロセッシングに不可欠である全ての構成要素を含むことが意図され、かつその存在が有利である追加の構成要素、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列を含むこともできる。

【0291】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つのタイプのベクターは、「プラスミド」であり、これは、その中に追加のDNAセグメントを連結することができる、環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターは、追加のDNAセグメントをウイルスゲノム中に連結することができるウイルスベクターである。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード性哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中に導入されたときに宿主細胞のゲノム中に組み込まれることができ、それにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。

【0292】

さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」(又は単に「発現ベクター」)と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。プラスミドは、ベクターの形態で最もよく使用されるので、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は、互換的に使用されることができる。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たすような他の形態の発現ベクター、例えば、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)を含むことが意図される。

10

20

30

40

50

【0293】

本明細書で使用される「組換え宿主細胞」(又は単に「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターが導入されている細胞を指すことが意図される。そのような用語は、特定の対象細胞だけではなく、そのような細胞の子孫も指すことが意図されることを理解すべきである。突然変異又は環境の影響のどちらかが原因で、後続の世代においてある種の修飾が生じる場合があるので、そのような子孫は、実際は、親細胞と同一でない場合があるが、それでもなお、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【0294】

本明細書で言及される「選択的にハイブリダイズする」という用語は、検出可能にかつ特異的に結合することを意味する。本発明によるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、及びそれらの断片は、非特異的な核酸への検出可能な結合の感知可能な量を最小化するハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、核酸鎖に選択的にハイブリダイズする。「高ストリンジェンシー」又は「高度にストリンジェントな」条件を用いて、当技術分野で公知であり、かつ本明細書で考察されている、選択的ハイブリダイゼーション条件を達成することができる。「高ストリンジェンシー」又は「高度にストリンジェントな」条件の一例は、あるポリヌクレオチドを別のポリヌクレオチドとともに(この場合、一方のポリヌクレオチドをメンブレンなどの固体表面に貼り付けてもよい)、 $6\times$ SSPE又はSSC、50%ホルムアミド、 $5\times$ デンハルト試薬、0.5% SDS、100p,g/mlの変性させ、断片化したサケ精子DNAのハイブリダイゼーションバッファー中、42 のハイブリダイゼーション温度で12~16時間、インキュベートし、次いで、 $1\times$ SSC、0.5% SDSの洗浄バッファーを用いて、55で2回洗浄する方法である。Sambrookらの文献(上記、pp. 9.50-9.55)も参照されたい。

【0295】

2つのアミノ酸配列は、それらの配列間に部分的な又は完全な同一性がある場合、相同である。例えば、85%相同性は、2つの配列を最大限一致するように整列させたときに、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。(一致させている2つの配列のうちのどちらかにおける)ギャップは、一致を最大化する際に容認され、5以下のギャップ長が好ましく、2以下がより好ましい。或いは、及び好ましくは、2つのタンパク質配列(又はそれらに由来する長さが少なくとも30アミノ酸のポリペプチド配列)は、それらが、突然変異データマトリクス及び6以上のギャップペナルティを用いるプログラムALIGNを用いて、5(標準偏差単位)を上回るアラインメントスコアを有する場合、この用語が本明細書で使用されるように、相同である。Dayhoff, M. O.の文献、タンパク質配列及び構造のアトラス(Atlas of Protein Sequence and Structure), pp. 101-110(第5巻, National Biomedical Research Foundation(1972))、及びこの巻の補遺2, pp. 1-10を参照されたい。2つの配列又はそれらの部分は、より好ましくは、それらのアミノ酸が、ALIGNプログラムを用いて最適に整列されたときに、50%以上同一である場合、相同である。

【0296】

「に対応する」という用語は、ポリヌクレオチド配列が、参照ポリヌクレオチド配列の全て若しくは一部と同一であること、又はポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために本明細書で使用される。対照的に、「に相補的な」という用語は、相補的配列が、参照ポリヌクレオチド配列の全て又は一部と同一であることを意味するために本明細書で使用される。説明のために、ヌクレオチド配列「TATAC」は、参照配列「TATAC」に対応するものであり、かつ参照配列「GTATA」に相補的なものである。

【0297】

以下の用語は、2以上のポリヌクレオチド又はアミノ酸配列間の配列関係性を説明するために使用される:「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、及び「実質的な同一性」。「参照配列」は、配列比較のための基準として用いられる規定の配列であり;参照配列は、例えば、配列表に示された全長cDNA若しくは遺伝子配列のセグメントとしての、より大きい配列のサブセットであってもよく、又は完全なcDNA若しくは遺伝子配列を含んでいてもよい。通常、参照配列は、長さが少な

くとも18ヌクレオチド又は6アミノ酸であり、長さが少なくとも24ヌクレオチド又は8アミノ酸であることが多く、また、長さが少なくとも48ヌクレオチド又は16アミノ酸であることが多い。2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列は、各々、(1)2つの分子間で類似している配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の一部)を含むことができ、かつ(2)2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列間で相違する配列をさらに含むことができるので、2つ(又はそれより多く)の分子間の配列比較は、通常、2つの分子の配列を「比較ウィンドウ」上で比較し、配列が類似する局所領域を同定し、かつそれらを比較することによって行なわれる。本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、少なくとも18個の連続するヌクレオチドの位置又は6アミノ酸の概念的セグメントを指し、ここで、ポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列は、少なくとも18個の連続するヌクレオチド又は6アミノ酸配列の参照配列と比較することができ、また、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのために、(付加も欠失も含まない)参照配列と比較して20%以下の付加、欠失、置換、及び同様のもの(すなわち、ギャップ)を含むことができる。比較ウィンドウを整列させるための最適な配列アラインメントは、Smith及びWatermanの文献(Adv. Appl. Math. 2: 482(1981))の局所相同性アルゴリズムによるか、Needleman及びWunschの文献(J. Mol. Biol. 48: 443(1970))の相同性アラインメントアルゴリズムによるか、Pearson及びLipmanの文献(Proc. Natl. Acad. Sci.(U. S. A.)85: 2444(1988))の類似性検索方法によるか、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks、若しくはMacVectorソフトウェアパッケージ)によるか、又は検査によって行なうことができ、様々な方法によって生成される最良のアラインメント(すなわち、比較ウィンドウ上で最も高いパーセンテージの相同性を生じさせるもの)が選択される。

10

20

30

40

50

【0298】

「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウ上で2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸の配列が同一であること(すなわち、ヌクレオチドベース又は残基ベースで)を意味する。「配列同一性のパーセンテージ」という用語は、比較ウィンドウ上で2つの最適に整列された配列を比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、若しくはI)又は残基が両方の配列中で生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を得、この一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で除し、その結果に100を乗じることによって、配列同一性のパーセンテージを得ることにより算出される。本明細書で使用される「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の特徴を示し、ここで、該ポリヌクレオチド又はアミノ酸は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)の位置の比較ウィンドウ上で、多くの場合、少なくとも24~48ヌクレオチド(8~16アミノ酸)の位置の比較ウィンドウ上で参照配列と比較したときに、少なくとも90~95%の配列同一性、より好ましくは少なくとも98%の配列同一性、より一般的には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含み、ここで、この配列同一性のパーセンテージは、参照配列と、比較ウィンドウ上で参照配列の合計20%以下である欠失又は付加を含み得る配列とを比較することによって算出される。参照配列は、より大きい配列のサブセットであってもよい。

【0299】

ポリペプチドに対して適用される場合、「実質的な同一性」という用語は、2つのペプチド配列が、デフォルトのギャップウェイトを用いるGAPプログラム又はBESTFITプログラムなどによって最適に整列されたときに、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%の配列同一性、最も好ましくは99%の配列同一性を共有することを意味する。

【0300】

好ましくは、同一ではない残基の位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。「保存的アミノ酸置換」は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有

するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループは、セリン及びトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギン及びグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループは、リジン、アルギニン、及びヒスチジンであり；かつ硫黄含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、システイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換のグループは：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタメート-アスパルテート、及びアスパラギン-グルタミンである。

【0301】

本明細書で論じられているように、抗体又は免疫グロブリン分子のアミノ酸配列のわずかな変動は、該アミノ酸配列の変動が、少なくとも90%、より好ましくは95%、最も好ましくは99%の配列同一性を維持する場合、本発明によって包含されることが企図される。特に、保存的なアミノ酸置換が企図される。保存的置換は、その側鎖が関連しているアミノ酸のファミリー内で生じるものである。遺伝子にコードされるアミノ酸は、通常、以下のファミリーに分類される：(1)酸性＝アスパルテート、グルタメート；(2)塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び(4)非荷電極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。より好ましいファミリーは、以下のものである：セリン及びトレオニンは、脂肪族ヒドロキシファミリーであり；アスパラギン及びグルタミンは、アミド含有ファミリーであり；アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンは、脂肪族ファミリーであり；かつフェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは、芳香族ファミリーである。例えば、ロイシンとイソロイシン又はバリンとの単独の置換、アスパルテートとグルタメートとの単独の置換、トレオニンとセリンとの単独の置換、又はあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の置換が、特に、該置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を含まない場合、得られる分子の結合又は特性に対してそれほど大きな影響を及ぼさないと考えるのは妥当である。アミノ酸変化が機能的ペプチドを生じさせるかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。アッセイは、本明細書で詳細に記載されている。

【0302】

本明細書で使用されるように、「標識」又は「標識された」という用語は、抗体中への別の分子の組込みを意味する。一実施態様では、標識は、検出可能なマーカー、例えば、放射性標識アミノ酸の組込み、又はマークを付けたアビジン(例えば、光学的方法若しくは比色法によって検出することができる蛍光マーカー若しくは酵素活性を含むストレプトアビジン)によって検出することができるビオチニル部分のポリペプチドへの付着である。別の実施態様では、標識又はマーカーは、治療薬、例えば、薬物コンジュゲート又は毒素であることができる。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野で公知であり、かつ使用可能である。

【0303】

標識の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：放射性同位体又は放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニド燐光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対の配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、磁性物質、例えば、ガドリニウムキレート、毒素、例えば、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、

10

20

30

40

50

ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びビューロマイシン、及びそれらの類似体又は相同体。いくつかの実施態様では、標識を様々な長さのスペーサーアームによって付着させ、潜在的な立体障害を低下させる。

【0304】

「患者」という用語は、ヒト及び獣医学的対象を含む。

【0305】

本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して、「含む(comprise)」という単語、又は「含む(comprises)」若しくは「含む(comprising)」などの変化形は、記載された整数又は整数の群の包含を意味するが、任意の他の整数又は整数の群の除外を意味しないことが理解されるであろう。

10

【実施例】

【0306】

(本発明の実施例)

抗原結合ドメインは、過免疫化ウサギから、クローニングされた抗原特異的B細胞から作製される。抗原特異的B細胞は、抗原パニングによってウサギ血液から選択され、活性化B細胞の拡大に有利に働く培養条件下でクローニングされる。

【0307】

(実施例1: IL6及びIL23発現クローンの構築、並びに融合タンパク質の精製:)

ヒトIL-6(DQ891463;ABM82389.1、配列番号343及び344)を3xFLAG-IL6-Avi融合体として発現させた。発現コンストラクトを、2工程のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅によって作製した。生成物を、CMVプロモーターの下流で、プレ-プロ-トリプシンリーダー配列及び三連FLAGタグとインフレームにして、プラスミドp3xFLAG-CMV-23(Sigma)に挿入した。発現されたIL-6(配列番号1)は、アミノ末端三連FLAGタグ(アミノ酸配列dhgdgykdhdidykdddd;配列番号345)及びカルボキシル末端Aviタグ(gIndifeaqkiewhe;配列番号346)(ALL066-MM4-80)を含んでいた。IL6コード領域をPCRで増幅し、p3xFLAG-CMV-23に挿入して、3xFLAG-IL6及び3xFLAG-IL6-myc融合体(配列番号2)を発現させた。

20

【0308】

アカゲザルIL-6(mmIL-6;NM_001042733.1;NP_001036198;配列番号346及び配列番号347)のコード領域を、オリゴマーの重複及びPCR(DNA2.0)によって作製した。合成された配列は、アミノ末端シグナル配列(mnsfstsaifgpfavslglllvlpaaafpap;配列番号349)及びカルボキシル末端FLAGタグを含むmmIL-6をコードする。このコンストラクトを、CMVプロモーター(ALL066-MM4-143)の下流で、哺乳動物発現ベクターpCEP4(Invitrogen)に挿入した(配列番号3)。

30

【0309】

ヒトIL-23サイトカインは、p19タンパク質(IL23A;アクセッション番号NT_029419)及びp40タンパク質(IL12B;NT_023133)の機能的ヘテロ二量体である。該IL-23二量体を、個々のタンパク質がエラスチンリンカー(アクセッション番号NM_001081755;配列番号351)アミノ酸配列VPGVGVPVG 配列番号352をコードする、gttcctggagtaggggtacctggggtgggc)で隔てられたp40:p19融合体として発現させた。2工程のPCR増幅戦略を用いて、p40:p19遺伝子融合体を作製し、該ドメインの各々に6xHISタグも導入した。p40:p19-6xHIS(配列番号4)及びp40-6xHIS:p19をコードする得られたコンストラクトを哺乳動物発現プラスミドpCEP4(Invitrogen)に導入した。

40

【0310】

霊長類IL23ヘテロ二量体を、2つのタンパク質の間にエラスチンリンカーを有し、3' 6xHISタグを含むp40(NP_001038190;NM_001044725):p19(BV209310)融合体として発現させた。該コンストラクトをオリゴマーの重複及びPCRによって合成し、CMVプロモーターの下流で、プレ-プロ-トリプシンシグナル配列(ALL087-MM-5-74)(配列番号5)とインフレームにして、p3xFLAG-CMV-13プラスミドにクローニングした。

【0311】

50

(哺乳動物発現及び標的タンパク質の精製:)

哺乳動物サイトカインの発現をHEK293又はHEK293c18細胞で実施した。トランスフェクションを、およそ200,000細胞/cm²の密度でプレATINGされた細胞に対して3 µl/µg DNAのlipofectamine 2000、又は293fectin(Invitrogen)を用いて、100万個の細胞当たり2~2.5 µgのDNAを用いて実施した。細胞を、10%胎仔ウシ血清を含むDMEM中で、37℃で3~4日間インキュベートし、成長培地を標的タンパク質の精製のために回収した。精製のために、6xHisタグ化タンパク質、1/10量の10×結合バッファー(500mMリン酸バッファー pH 7.5、3M NaCl、200mMイミダゾール、1%Tween-20)を培養培地に添加し、PBSに対して4で一晩透析した。Ni-NTAビーズを抽出物に4℃で2~3時間添加し、回転混合した。ビーズを遠心分離によって回収し、Ni-NTA洗浄バッファー(50mMリン酸塩、300mM NaCl、20mMイミダゾール、0.1%Tween)中で洗浄した。Ni-NTAビーズに結合したタンパク質を溶出バッファー(50mMリン酸バッファー pH7.5、300mM NaCl、500mMイミダゾール)によって溶出させた。標的タンパク質を含む画分をSDS-PAGE及びクマシーブルー染色によって同定し、デンストメトリーによって定量した。ピーク画分を合わせ、PBSに対して透析し、インビトロアッセイ又はSPR解析で直接用いた。

10

20

30

40

50

【0312】

FLAGタグ化タンパク質を、M2コンジュゲートビーズ(Invitrogen)を用いて、発現培地から精製した。手短に言えば、M2ビーズを発現培地に直接添加し、4℃で4~16時間インキュベートした。該ビーズをFLAG洗浄バッファー(20mMトリス、pH7.4、150mM NaCl、0.1%Tween-20、1mMエチレンジアミン四酢酸)中で洗浄し、結合タンパク質を、0.1Mグリシン(pH2.5)で洗浄するか、又は3x FLAGペプチドを用いて回収した。酸溶出物を、1/20量の1Mトリス塩基を用いて、すぐに中和した。ピーク画分をSDS-PAGE及びクマシーブルー染色によって同定し、プールした。これらをPBSに対して透析し、インビトロアッセイ又はSPR解析に直接用いた。

【0313】

(実施例2 抗体親和性の決定)

平衡解離定数は、SensiQ Pioneer(ICx Nomadics, Stillwater, OK)、及びアミンカップリングに適したカルボキシル化COOH1センサー(同上)を用いて、表面プラズモン共鳴によって決定した。プロテインG(6510-10, Biovision, Mountain View, CA)を、アミンカップリング試薬(Sigma Aldrich(N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS, 56480)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-B'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC, E7750)、エタノールアミン(398136), St. Louis, MO)を用いるか、又はBiacoreアミンカップリングキット(BR-1000-50, GE Healthcare, Waukesha, WI)を用いて、COOH1センサーにカップリングさせた。

【0314】

簡潔に述べると、カルボキシル化された表面を、2~10分の範囲の接触時間の間、2mM EDC及び.5mM NHSで活性化する。20~400ug/mLの範囲の可変濃度のプロテインGを、10mM酢酸バッファー、pH4.3(酢酸ナトリウム、BP334-1;氷酢酸、A490-212; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)中に希釈し、5~10分の範囲の可変接触時間の間、5~10 µL/分の範囲の速度で、活性化されたセンサーの上に注入した。COOH1センサーチップに固定化されるプロテインGの量は、400~2000応答単位(RU)の範囲である。残りの活性化された部位を、25 µL/分の流速で100 µLのエタノールアミンでキャッピングした。

【0315】

ウサギヒトキメラmAbの平衡定数を、タンパク質GがコーティングされたチップへのmAbの結合と、その後の各分析物(IL-6又はIL-23)のそのそれぞれのmAbへの結合によって決定した。物質移動効果を最小限に抑えるために、分析物の結合が飽和に達したときに、その対応するRUが200~300低下するように、各分析物に対するmAbの表面密度を調整した。1~100nMの範囲の3x-FLAG-IL-6(実施例1参照)、IL-6(CYT-213, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)、又はヒト二量体IL-23(34-8239, eBiosciences, San Diego, CA)の希釈物をチップ表面の上に注入し、会合速度定数(K_a)及び解離速度定数(K_d)を測定した。各々の結合及び解離サイクルのために、チップ表面を15uLの20mM NaOH(5671-02, Mallinckrodt

t Baker, Phillipsburg, NJ)で再生した。アッセイ温度を25℃で維持し、分析物の流速を50 μ L/分とし、2分の会合段階及び10～30分の解離段階を含めた。結合/解離(on/off)速度(k_a/k_d)及び解離定数(K_D)を、上記のフォーマットを擬一次1:1相互作用モデルソフトウェア(Qdat, ICx Nomadics, Stillwater, OK)とともに用いて決定した。

【0316】

scFvの平衡定数を先に記載した通りに決定した;しかしながら、エピトープタグ化IL-6がチップ表面に捕捉され、IL-6からの抗IL-6 scFvの解離がモニタリングされるように、プロトコルを修正した。簡潔に述べると、抗FLAG(登録商標)M2抗体(200472, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)をプロテインGに結合させ、その後、3xFLAG-IL-6を抗FLAG抗体によって捕捉した。抗IL-6 scFvを、1～100nMの濃度範囲にわたってアッセイした。

10

【0317】

二重特異性scFvのSPRを、抗IL-6部分の測定について先に記載した通りに実施した;しかしながら、抗IL-23 scFv、31A12の結合反応速度を決定するために、プロトコルの修正が必要であった。簡潔に述べると、二重特異性体によるIL-23結合を、記載したようなIL-6を用いて、該二重特異性体を一定密度(～240RU)で固定化することによって実施した。組換えヒト二量体IL-23(34-8239, eBiosciences, San Diego, CA)の結合及び解離を、上で詳述したのと同じパラメータを用いて、3～25nMの範囲の濃度でアッセイした。

【0318】

(実施例3:ウサギ抗ヒトIL-6モノクローナル抗体の作製)

(3.1 ウサギ免疫化:)

20

1匹のニュージーランドホワイトウサギを、Sigma Adjuvant System(Sigma S6322)中で、0、21、及び42日目に、100 μ gのIL-6タンパク質(組換え大腸菌由来ヒトIL-6、参照配列アクセッションNP000591.1、ProSpec-Tany TechnoGene社, Rehovot, Israel(カタログ# CYT-213i)から入手した)で免疫化した。採血の10日以上前に、ウサギに追加免疫した。ウサギを、NIH、USDA、及びIACUCガイドラインに従って、R & R Research Laboratories(Stanwood, WA, USA)で維持した。

【0319】

(3.2 B細胞クローニング:)

30mlの血液を静脈穿刺により各ウサギから回収した。末梢血単核細胞(PBMC)を密度遠心分離(Lympholyte-rabbit, カタログ# CL5050, Cedarlane Laboratories社, Ontario, Canada)により調製した。

30

【0320】

ヒトIL-6に対する免疫ウサギ血清の中和活性を3回の免疫化の後にアッセイした。

【0321】

ヒトIL-6を、免疫ウサギ血清の1:3200希釈物を用いて又はそれを用いないで、1ng/mlから力価測定する。IL-6に特異的なB細胞を選択するために、6cmの組織培養ペトリ皿を以下のように、IL-6でコーティングした:Hisタグ化ヒトIL-6(カタログ# CYT-484, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)を、抗His抗体がコーティングされたプレート上で捕捉した。PBS中2 μ g/mlの抗His抗体(カタログ# A00613, GeneScript社, New Jersey, USA)を、4℃で一晩、又は37℃で1時間、6cmのプラスチックペトリ皿中でインキュベートした。その後、抗体溶液を除去し、4mlのPBS + 5%BSAを1時間添加した。PBS中2 μ g/mlの3mlのHis-IL-6を1時間インキュベートすることによって、IL-6を捕捉し、その後、PBSで4回洗浄した。PBMCを、5%BSAを含む2mlのPBSに懸濁し、抗原がコーティングされた皿に、4℃で40分間プレーティングした。その後、プレートをPBSで4～8回洗浄し、軽く擦ることによって、接着細胞を除去した。これらの細胞を、完全培地(RPMI 1640、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸塩、50 μ M β -メルカプトエタノール)に、100～500 $\times 10^3$ 細胞/mlで再懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液を、5 $\times 10^5$ 細胞/ウェルのマイトマイシン-c処理したEL4-B5細胞(Zublerらの文献(1985))、20ng/mlの組換えヒトIL-2(GenScript社, Piscataway, NJ, USA)、及びウサギ脾臓細胞からの5%馴化培地を含む100 μ lの完全培地に加えて、96ウェルプレートの各ウェルに添加した。

40

50

【0322】

簡潔に述べると、EL4-B5細胞を、 1×10^7 細胞/mlの密度で、 $50 \mu\text{g/ml}$ マイトマイシン-c(カタログ# M0503, Sigma-Aldrich)を含むRPMIに40分間懸濁し、完全培地中で6回洗浄した。

【0323】

ウサギ馴化培地を以下のように調製した:ウサギ脾臓細胞を機械的に解離させ、 $70 \mu\text{m}$ メッシュに通して濾過し、 1×10^6 細胞/mlで、完全培地(RPMI 1640、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸塩、 $50 \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノール)に再懸濁した。細胞を、 500ng/ml のイオノマイシンと、 $5 \mu\text{g/ml}$ のコンカナバリンA(カタログ# C 5275, Sigma-Aldrich)又は 40ng/ml のPMAのどちらかと、 CO_2 (5%)インキュベーター中、 37°C で48時間刺激した。馴化培地を滅菌濾過し、後の実験のために -20°C で保存した。いくつかの実験については、マイトマイシン-c処理した(EL4-B5のように)正常ウサギ脾臓細胞を、クローニングプレートに $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで添加した。

10

【0324】

抗原選択された細胞を含むプレートを、 37°C 、5% CO_2 で7~10日間インキュベートした。その後、培養上清を回収し、IL-6結合(ELISA)及びIL-6活性の阻害についてアッセイした。

【0325】

ELISAを用いて、IL-6結合を評価した。組換えIL-6(実施例1参照)を、 $100 \mu\text{l}$ のPBS中、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ でELISAプレートに添加した。プレートを、 37°C で1時間、又は 4°C で一晩インキュベートした。ブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む $100 \mu\text{l}$ /ウェルのPBSを各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを脱イオン水で5回すすいだ。各ウェルに、 $50 \mu\text{l}$ のPBS/10%ヤギ血清を添加した。その後、試験試料を $50 \mu\text{l}$ /ウェルで添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを脱イオン水で5回すすいだ。各ウェルに、PBS/10%ヤギ血清中で1:5000希釈した $100 \mu\text{l}$ のペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(カタログ#111-035-008, Jackson Immuno Research)を添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、その後、プレートを脱イオン水で5回洗浄した。TMB基質(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルで添加した。反応を $100 \mu\text{l}$ の1N H_2SO_4 (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)で停止させた。Molecular Devices製のM2プレートリーダーを用いて、吸光度を450nmで測定した。

20

30

【0326】

IL-6依存的マウスB細胞ハイブリドーマ細胞株(B9細胞株;Aardenらの文献(1987))を用いるバイオアッセイを用いて、大腸菌又はCHO細胞由来ヒトIL-6(Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)に応答するB9細胞増殖を測定することによって、IL-6阻害を評価した。中和活性について試験すべき試料を、96ウェル組織培養プレート中で、 $100 \mu\text{l}$ のアッセイ培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、 $50 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に希釈した。これに続いて、 $50 \mu\text{l}$ のIL-6(カタログ# CYT-274 Prospec-Tany Technogene)含有アッセイ培地を添加し、室温で30分間インキュベートした。B9細胞をフラスコから回収し、 $180 \times g$ で7分間遠心分離し、ペレットをIL-6不含培養培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、 $50 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に再懸濁した。細胞を3回遠心分離及び再懸濁して、IL-6を除去した。トリパンブルー排除によって生存率を決定した後、細胞を 1×10^5 細胞/mlに調整した。 5×10^3 細胞に相当する、 $50 \mu\text{l}$ の容量のB9細胞を、IL-6不含培地を含む適切な対照ウェルとともに、各ウェルに添加した。

40

【0327】

プレートを、 37°C 、5% CO_2 で、48時間インキュベートした。その後、 $20 \mu\text{l}$ のAlamar Blue(カタログ# DAL1100, Invitrogen, USA)を各ウェルに添加し、プレートをさらに18時間インキュベートした。プレートを、570nm及び600nmで、Molecular Devices(Sunnyvale, CA, USA)製のM2プレートリーダー上で読み取った。

50

【0328】

図1は、さらなる特徴付けに好適な抗体を産生する細胞を選択するために実施された例示的実験を示しており：各々の上清は、IL-6結合(下のパネル)とIL-6中和(上のパネル)の両方について試験された。さらなる特徴付けに好適な上清は、両方のアッセイで陽性であった(矢印及び星印)。

【0329】

(3.3 ウサギB細胞からのV-領域レスキュー)

V-領域レスキューのプロセスを図2にまとめる。

【0330】

簡潔に述べると、IL-6中和試験とIL-6結合試験の両方について陽性の上清由来のIgG可変重鎖及び軽鎖を、逆転写酵素連動型ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いる増幅によって取得した。このようにして得られたVH及びVL cDNAをクローニングし、最終的なcDNAコンストラクトが、図3に示すようなキメラウサギヒトIgGをコードするように、ヒト定常領域コンストラクトに連結した。

10

【0331】

活性化されたウサギB細胞から免疫グロブリンV-領域をレスキューするためのプライマーを、細胞溶解後に取得されたmRNAからのcDNA合成及びその後のPCR増幅工程の両方のために設計した。該PCR増幅工程では、最後のPCRによって、発現ベクターにクローニングするための制限酵素部位が付加される。1匹のウサギはb9アロタイプバックグラウンドを有するので(Raderらの文献(2000))、J-カッパ領域及びC-カッパ領域の利用がウサギアロタイプ間で異なる場合、様々なcDNAプライマー及び入れ子型J-領域プライマーを設計する必要がある(Sehgalらの文献(1990))。RT工程とPCR工程の両方で使用される選択されたDNAオリゴヌクレオチドプライマーのリストを表1に示し、その重鎖/軽鎖特異性を右側の欄に示す。

20

【0332】

選択された陽性のB細胞を溶解させ、Dynabeads製のmRNA DIRECT Micro Kit(カタログ# 610.21)を製造者の指示に従って用いて、mRNAを調製した。v-領域を回収するために、単一の抗原陽性ウェルから生成されたmRNAを、重鎖と軽鎖の両方について、1工程RT/PCR(Qiagen One Step RT-PCRキット, カタログN. 210212)反応で用いる。該反応のために、ウサギIgG分子の重鎖及び軽鎖の定常領域に位置する遺伝子特異的プライマーを用いて、一本鎖cDNAを生成させ、その後、ウサギ可変領域の第一ラウンドのPCR生成のために、入れ子型J-領域プライマーをリーダーペプチド特異的プライマーとともに用いる。

30

【表 1】

配列 番号	プライマー 名	配列5' -3'	プライマーの特異 性（重鎖/軽鎖）
RT/第1ラウンド			
66	rCH1R1	GCCAGTGGGAAGACTGACGGAG	H
67	rVHL-F	ATGGAGACTGGGCTGCGCTGG	H
68	rJH-R1	GGAGACGGTGACCAGGGTGCCTGGG	H
69	rJH6R	TGAAGAGACGGTGACGAGGGTC	H
70	rCk1R1	GCAGCTGGTGGGAAGATGAGGAC	L
71	rVK5UTR	GCCAGGCAGGACCCAGCATGGAC	L
72	rJK2-R	ACCACCACCTYGGTCCCTCCGCC	L
73	rJK1-R	GATTTCYACCTTGGTGCCAGCTCC	L
74	rJK24R	GTTTGATCTCCACCTTGGTCCCCGCACCG	L
75	rJK2b9R	ACTTACATAGGATCTCCAGCTC	L
76	rJK5R	GTTTGATCTCCAGCTTGGTTCC	L
第2ラウンド			
77	rVH1a-H3F	GCGATAAGCTTCACCATGGAGACTGGGCTGCG CTGG	H
78	rJH-XhoR ii	GCGATCTCGAGACGGTGACCAGGGTGCCTGG G	H
79	rJH6XhoIR	GCATAGCTCGAGGAGACGGTGACGAGGGTCC CTG	H
80	rVKF-Nco	GCGATACCATGGACACGAGGGCCCCCACTCAG CTG	L
81	rJK2-BsiR2	GCGAACGTACGGACGACGAGGGCCCCCACTCAG TCCGCC	L
82	rJK1-BsiR2	GCGAACGTACGTTTGATTTTCYACCTTGGTGCCA GCTCC	L
83	rJK24BsiR	GCATACGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCC GCACCG	L
84	rJK2b9BsiR	GCATACGTACGTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC	L
85	rJK5BsiR	GCATACGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTTCC	L

表1：V-領域レスキューのためのプライマーセット

【0333】

ヒトIgG1の重鎖又は軽鎖のどちらかの定常領域を含むベクターにサブクロニングするために、第二ラウンドのPCRを実施して、レスキューされたV-領域に制限部位を付加する。重鎖及び軽鎖について、別々のPCRを実施する。該V-領域に付加される制限部位は、重鎖及び軽鎖について、それぞれ、HindIII/XhoI及びNcoI/BsiW1である。定常領域を含むベクターは、InvivoGen(pFUSE-CHlg-hG1 #08E07-SV及びpFUSE2-CLlg-hk #08F19-SV)から入手した。両方のベクターをサブクロニング戦略用に自前で修飾した。制限部位を付加し

た後、PCR生成物を適切な制限酵素消化に供し、ゲル精製し、適切なベクターに連結した。

【0334】

サブクロニング後、連結されたDNAをDH5 α 大腸菌(Invitrogen)に形質転換した。形質転換混合物全体を、適切な抗生物質耐性を含む培地中で一晚培養した。培養された細菌を回収し、キメラ抗体の一過性HEK293発現で使用するために、プラスミドDNAを単離し、精製した(Qiagenキット)。選択されたウェルは、1以上の異なるB細胞クローンを含み得るので、この時、単離されたDNAは、1つの特定のV-領域について均一であっても均一でなくてもよい。キメラ抗体を作製するために、HEK293細胞に、選択されたウェルからの重鎖と軽鎖の両方のDNAをコトランスフェクトした。上清を細胞培養の3~5日後に回収し、ELISAによるIgGと抗原の結合、及びIL-6中和についてアッセイした(方法については、上記を参照)。トランスフェクション上清中のIgGの存在を検出するために、ELISAプレートにコーティングされた抗ヒトIgG Fc捕捉抗体、次いで、上清及びヒトIgG標準を用いるELISA免疫アッセイを行なう。Fcによって捕捉された抗体の検出は、抗ヒトIgG(H&L)-HRP試薬及びTMB基質を用いて得られる。

10

【0335】

1ウェル当たり2種以上の固有のクローンがおそらく存在するであろうという前提の下、どれだけ多くの固有の重鎖と軽鎖の組合せがレスキューされるかを決定するために、DNAシーケンシングを用いて、各ELISA陽性ウェルをスクリーニングした。DNAシーケンシングのために、先にトランスフェクション用に単離されたDNAをDH5 α 大腸菌に再び形質転換し、適切な抗生物質を含む寒天プレート上にプレーティングする。各形質転換からの複数のコロニーを採取し、製造者の指示に従ってローリングサイクルDNA増幅キット(Templiphy, GE Healthcare)を用いて、DNA生成用に処理する。Templiphy反応から生成されたDNAをシーケンシングし、その後、解析して、各ウェルについて、V-領域の複雑さを決定する。この時、各DNAは固有のクローンを表すので、DNAの作製に加えて、Templiphy反応に用いた細菌を、その後のDNA単離のために取っておく。

20

【0336】

配列解析後、Templiphy反応から取っておいた細菌を用いて、重鎖と軽鎖の両方について、レスキューされた各ウェルから、各々の固有のV-領域のDNAを得た。重鎖及び軽鎖を一致させ、HEK293に一過性にトランスフェクトした。2以上の考えられる重鎖と軽鎖の組合せが存在する(ウェルがクローン性でない)とき、固有の重鎖と軽鎖の対のあらゆる考えられる組合せをトランスフェクトした。3~5日後、上清を回収し、ELISAによるIgGと抗原の結合、及びIL-6中和についてアッセイした(方法については、上記参照)。この解析工程の後、所望の活性を保持する重鎖と軽鎖の組合せをヒト化用を選択した。

30

【0337】

以下の抗体クローンは、抗原結合及び抗原中和についての基準を満たし、さらなる開発のために選択された：

【0338】

(13A8:)

配列番号6のアミノ酸配列；配列番号7のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)；

配列番号8のアミノ酸配列；配列番号9のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

40

【0339】

13A8クローンは、34pg/ml(図3A及びB)のEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力、並びにSPR解析で決定される高親和性抗原結合特性： K_d $1.38 \times 10^{-4} (s^{-1})$ ； K_a $6.33 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 、及び K_D 218pMを示した。

【表 2】

表 2

ID	配列番号		配列
13A8 VH- CDR1	10	CDR1 VH	SYDMS
13A8 VH- CDR2	11	CDR2 VH	YIYTDSSTWYANWAKG
13A8 VH- CDR3	12	CDR3 VH	GSTDYAFDTRLDL
13A8 VK- CDR1	13	CDR1 VL	QASQSNLS
13A8 VK- CDR2	14	CDR2 VL	RASTLTS
13A8 VK- CDR3	15	CDR3 VL	QQGYNSNDVDNV 10

10

【0340】

(28D2)

配列番号16のアミノ酸配列及び配列番号17のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号18のアミノ酸配列及び配列番号19のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0341】

28D2クローンは、65pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力を示した(図3A及びB)。

20

【表 3】

表 3

ID	配列番号		配列
28D2 VH- CDR1	20	CDR1 VH	KNAIA
28D2 VH- CDR2	21	CDR2 VH	IYAGGATTYASWAKG
28D2 VH- CDR3	22	CDR3 VH	EYAGDSYYTGYTQLD
28D2 VK- CDR1	23	CDR1 VL	QASEDLFSSLA
28D2 VK- CDR2	24	CDR2 VL	SASTLAS
28D2 VK- CDR3	25	CDR3 VL	LGLYYYLTPDPIYG

30

【0342】

(18D4)

配列番号26のアミノ酸配列及び配列番号27のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号28のアミノ酸配列及び配列番号29のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)

40

【0343】

18D4クローンは、54pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力、並びにSPR解析で決定される高親和性抗原結合特性： K_d $8.49 \times 10^{-5} (s^{-1})$; K_a $6.66 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 、及び K_D 128pMを示した。

【表 4】

表 4

ID	配列番号		配列
18D4 VH- CDR1	30	CDR1 VH	SYAMT
18D4 VH- CDR2	31	CDR2 VH	TSYVYSGDTWYASWWKG
18D4 VH- CDR3	32	CDR3 VH	VGDYDDYGAHDFDS
18D4 VK- CDR1	33	CDR1 VL	QASESISWLS
18D4 VK- CDR2	34	CDR2 VL	RASTLAS
18D4 VK- CDR3	35	CDR3 VL	QQGYTGNDVNA

10

【0344】

(8C8)

配列番号36のアミノ酸配列及び配列番号37のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号38のアミノ酸配列及び配列番号39のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)

【0345】

20

8C8クローンの最初のトランスフェクション上清は、生体活性の阻害についての高い効力を示した。その後、scFvをウサギIgGから直接誘導体化し、これらは、510pg/mlのEC50(200pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力を示した(図12A)。

【表 5】

表 5

ID	配列番号		配列
8C8 VH- CDR1	40	CDR1 VH	SSGVS
8C8 VH- CDR2	41	CDR2 VH	YVSIADTISYANWAKG
8C8 VH- CDR3	42	CDR3 VH	GFITYSGVL
8C8 VK- CDR1	43	CDR1 VL	QASQSISNELS
8C8 VK- CDR2	44	CDR2 VL	RTSTLAS
8C8 VK- CDR3	45	CDR3 VL	QQGYNSNDVDNV

30

【0346】

(9H4)

配列番号46のアミノ酸配列及び配列番号47のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号48のアミノ酸配列及び配列番号49のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)

【0347】

40

9H4クローンは、109pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力(図3C、D、E)、並びにSPR解析で決定される高親和性抗原結合特性: K_d $4.75 \times 10^{-5} (s^{-1})$; K_a $8.16 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 、及び K_D 58pMを示した。

【表 6】

表 6

ID	配列番号		配列
9H4 VH- CDR1	50	CDR1 VH	SYDMS
9H4 VH- CDR2	51	CDR2 VH	YIYTDSTYYANWAKG
9H4 VH- CDR3	52	CDR3 VH	GSTDYAFDTRLDL
9H4 VK- CDR1	53	CDR1 VL	QASQSI SNELS
9H4 VK- CDR2	54	CDR2 VL	RTSTLAS
9H4 VK- CDR3	55	CDR3 VL	QQGYNSNDVDNV

10

【0348】

(9C8)

配列番号56のアミノ酸配列及び配列番号57のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0349】

9C8クローンは、400pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)(図3E)、及び K_d $3.17 \times 10^{-5} (s^{-1})$; K_a $7.65 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 、及び K_D 42 pMを有する、高い活性及び抗原結合特性を示した。

20

【表 7】

表 7

ID	配列番号		配列
9C8 VH- CDR1	60	CDR1 VH	SYDMS
9C8 VH- CDR2	61	CDR2 VH	YIYDSSTYYANWAKG
9C8 VH- CDR3	62	CDR3 VH	GSTDYAFDTRLDL
9C8 VK- CDR1	63	CDR1 VL	QASQSI SNELS
9C8 VK- CDR2	64	CDR2 VL	RTSTLAS
9C8 VK- CDR3	65	CDR3 VL	QQGYNSNDVDNV

30

【0350】

(3.4 霊長類IL-6に対する反応性)

ヒト治療用の任意のサイトカインアンタゴニストの開発の成功は、初期の毒性試験を必要とする。毒性は、非ヒト種において最も効率的に証明される。毒性研究を実施するために、研究が検討されている種に由来するIL-6を中和する抗体の能力を示すことがまず必要である。

40

【0351】

非ヒト霊長類IL-6活性の中和について試験された抗IL6キメラ抗体のいくつかを図3に示す。

【0352】

(実施例4: ウサギ抗ヒトIL-23モノクローナル抗体の作製)

(4.1 ウサギ免疫化)

1匹のニュージーランドホワイトウサギ(NZW)及び1匹のB9ウサギを、0、21、及び42日目に、Sigma Adjuvant System(Sigma S6322)中で、100 µgのIL-23タンパク質(p40鎖、アク

50

セッションNM_002187及びp19鎖、アクセッションNM_016584から構成されるバキュロウイルス由来組換えヒトIL-23、eBiosciences, San Diego CA, USA製(カタログ#34-8239))で免疫化した。免疫化の少なくとも10日後に、該動物から採血した。ウサギを、NIH、USDA、及びIACUCガイドラインに従って、R & R Research Laboratories(Stanwood, WA, USA)及びSpring Valley Laboratories(Woodbine, MD, USA)で維持した。

【0353】

NZWウサギ及びB9ウサギは、異なる免疫グロブリン遺伝子アロタイプを発現しており、該アロタイプは、フレームワーク領域及びCDR領域の違いに対応し、また、単離されるmAbの構造の違いに対応している。b9アロタイプウサギは、V領域中にCys残基が存在しないために、mAbのファージディスプレイクローニングでの使用により優れていることが報告されている。抗IL-6 mAbは全てNZWウサギからクローニングされ、V領域中にCys残基を示すものはなかった。

10

【0354】

ヒトIL-23で免疫化されたB9ウサギ及びNZWウサギ由来の高力価血清のIL-23中和活性を測定した。免疫ウサギ由来の血清は、マウス脾細胞から600pg/mlのヒトIL-23によって誘導されるIL-17A分泌を、ほぼ1:10,000に等しい希釈で完全に中和することができる。

【0355】

(4.2 B細胞クローニング)

IL-23に特異的なB細胞を実施例3と同様に選択した。

【0356】

20

末梢血単核細胞(PBMC)を、各ウサギから密度遠心分離(Lympholyte-rabbit, カタログ#CL5050, Cedarlane Laboratories社, Ontario, Canada)により調製した。IL-23がコーティングされたプレートを、PBS中2 µg/mlのIL23(eBioscience)を4 で一晩、又は37 で1時間インキュベートすることにより作製し、PBSで4回洗浄し、B細胞を捕捉するのに用いた。PBMCを、5%BSAを含む2mlのPBSに懸濁し、抗原がコーティングされた皿に、4 で40分間プレーティングした。その後、プレートをPBSで4~8回洗浄し、軽く擦ることによって、接着細胞を除去した。細胞をウサギ脾臓細胞馴化培地及びEL4-B5細胞(実施例1参照)中にプレーティングし、37 、5%CO2で、7~10日間インキュベートした。その後、培養上清を回収し、IL-23結合(ELISA)、及びIL-23活性の阻害について試験した。

【0357】

30

ELISAアッセイを用いて、IL-23結合を評価した(Aggarwalらの文献(2003))。ELISAプレートを、IL-23直接結合法又はIL-23間接結合法のどちらかを用いて、コーティングした。

【0358】

間接結合法のために、抗His抗体(カタログ# A00613, GenScript社, New Jersey, USA)を、100 µl/ウェルのPBS中、0.01~0.02ug/mlでプレートに添加した。プレートを37 で1時間、又は4 で一晩インキュベートした。非特異的結合をブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む100 µl/ウェルのPBSを各ウェルに添加し、その後、プレートを脱イオン水で5回すすいだ。100 µl/ウェルのPBS/10%ヤギ血清中の0.5 µg/mlのIL-23 p40-p19-His(配列番号4)を添加し、室温で1時間インキュベートした。

40

【0359】

直接結合法のために、IL-23 p40-p19-His(配列番号4)を、100 µlのPBS中、0.5 µg/mlでELISAプレートに添加した。プレートを37 で1時間、又は4 で一晩インキュベートした。非特異的結合をブロッキングするために、10%ヤギ血清(カタログ#16210-072, Invitrogen, USA)を含む100 µl/ウェルのPBSを各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。

【0360】

IL-23結合後、プレートを脱イオン水で5回すすいだ。各ウェルに、50 µlのPBS/10%ヤギ血清を添加した。その後、試験試料を50 µl/ウェルで添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、脱イオン水で5回すすいだ。各ウェルに、PBS/10%ヤギ血清中で1:5

50

000に希釈した100 μ lのペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(カタログ#111-035-008, Jackson Immuno Research)を添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、その後、脱イオン水で5回洗浄した。TMB基質(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を100 μ l/ウェルで添加した。反応を100 μ lの1N H_2SO_4 (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)で停止させた。Molecular Devices製のM2プレートリーダーを用いて、吸光度を450 nmで測定した。

【0361】

マウス脾臓細胞によるIL-23誘導性IL-17発現の検出に基づくバイオアッセイを用いて、IL-23受容体に対するIL-23結合の抗体媒介性阻害、及び結果として生じる生体活性を検出した。

10

【0362】

5×10^5 個のC57BL/6脾臓細胞を、ヘテロ二量体IL-23(eBioscience カatalog#14-8239又はHumazyme, Chicago, USA カatalog#HZ-1049)の希釈物を含む200 μ l中で、96ウェルプレートのウェル中で培養し、プレートを37 $^{\circ}C$ で2~3日間インキュベートした。培養培地は、RPMI 1640、10%FBS、50 μ M 2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、ビルビン酸塩、ゲンタマイシン、及び10ng/mlヒトIL-2(カタログ# CYT-209, Prospec-Tany Technogene)である。3日後、培養上清を、下記のように、IL-17AについてELISAでアッセイした。

【0363】

IL-23阻害についてアッセイするために、試験mAb試料を、150~1200pg/mlのIL-23を含むマウス脾臓細胞の培養物に様々な希釈で添加し、IL-17Aの分泌を、mAbで処理していない培養物と比較した。

20

【0364】

ELISAアッセイを用いて、マウスIL-17を検出した。プレートを、100 μ lのPBS中1 μ g/mlの抗mIL-17A(eBioscience #14-7178)で、4 $^{\circ}C$ で一晩又は37 $^{\circ}C$ で1時間コーティングした。プレートを脱イオン水中で洗浄し、100 μ lのPBS、10%ヤギ血清で1時間ブロッキングした。プレートを洗浄した後、50 μ lのPBS/10%ヤギ血清及び50mlの培養上清をプレートに添加し、1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中0.5 μ g/mlで100 μ l/ウェルの抗mIL-17A-ビオチン(eBioscience #13-7179)を添加し、プレートをRTで1時間インキュベートし、洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中1:1000で100 μ l/ウェルのストレプトアビジン-HRP(Jackson Labs)と反応させた。プレートを再洗浄し、100 μ l/ウェルのTMB基質(Thermo Scientific, IL, USA)を添加することによって、シグナルを検出した。100 μ l/ウェルの1N H_2SO_4 で反応を停止させた後、光学密度を450nmで読み取った。データをプロットし、Graphpad(Prism, Mountainview, CA)ソフトウェアで解析した。

30

【0365】

B細胞をIL-23免疫化ウサギからクローニングし、B細胞クローン上清をIL-23中和及びIL-23結合について試験した。

【0366】

図7は、各上清をIL-23結合(下のパネル)とIL-23中和(上のパネル)の両方について試験した実験からの例となる96ウェルプレートを示す。さらなる特徴付けに好適な上清は、両方の試験で陽性であった。

40

【0367】

(4.3 活性化B細胞からのV-領域レスキュー:)

IL-23中和アッセイとIL-23結合アッセイの両方について陽性のB細胞由来のIgG可変重鎖及び軽鎖を、本質的に実施例3と同様のRT-PCRで取得した。

【0368】

図5A~Iは、得られたいくつかの抗IL-23中和mAbによるヒトIL-23中和活性の例を示す。

【0369】

いくつかの抗体を、図6に示すように、霊長類IL-23に対するその結合に関してさらに特徴付けた。IL-23を中和するモノクローナル抗体を、図8Aに示すように、ヒトIL-12の中和についてさらに試験した。mAb 31A12は、IL-23を特異的に中和し、一方、45G5及び22H8は

50

、IL-23とIL-12の両方を中和する。

【0370】

本発明の抗体によって認識されるエピトープのマッピングは、交差競合結合アッセイ、又は線状ペプチドに対する結合などの、いくつかの実験方法によって達成することができる。

【0371】

詳細なエピトープマッピングは、モノクローナル抗体又はその抗体断片と抗原の複合体の共結晶化によって得ることができる。代替法は、mAbの存在下で、重水素で標識した後、抗原ペプチドの液体クロマトグラフィーマスマススペクトロスコピー(LCMS)解析を用いる。重水素化されていない残基は、mAbによって保護された残基を表す。

10

【0372】

抗原結合、抗原中和、及びIL-23の選択的結合についての基準を満たした以下のモノクローナル抗体を、さらなる開発のために選択した：

【0373】

(31A12:)

配列番号86のアミノ酸配列；配列番号87のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)；

配列番号88のアミノ酸配列；配列番号89のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0374】

20

31A12 mAbは、3286pg/mlのEC50(600pg/mlのIL-23の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)、並びにSPR解析で決定される高親和性抗原結合特性： K_D 2.02×10^{-4} (s $^{-1}$)； K_a 4.79×10^5 (M $^{-1}$ s $^{-1}$)、及び K_D 422pMを有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

【表8】

表 8

ID	配列番号		配列
31A12 VH CDR1	90	CDR1 VH	SYWMT
31A12 VH CDR2	91	CDR2 VH	TIATSSTYYASWAKG
31A12 VH CDR3	92	CDR3 VH	GLTTDYDLDL
31A12 VK CDR1	93	CDR1 VL	QASEDIESYLA
31A12 VK CDR2	94	CDR2 VL	SASTLTS
31A12 VK CDR3	95	CDR3 VL	LGADDTTTV

30

【0375】

(49B7)

配列番号96のアミノ酸配列及び配列番号97のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

40

配列番号98のアミノ酸配列及び配列番号99のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0376】

49B7 mAbは、988pg/mlのEC50(600pg/mlのIL-23の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力を示した。

【表 9】

表 9

ID	配列番号		配列
49B7 VH CDR1	100	CDR1 VH	DYDMS
49B7 VH CDR2	101	CDR2 VH	IVYDIGTIYYAPWAEG
49B7 VH CDR3	102	CDR3 VH	EAPGYSDGDI
49B7 VK CDR1	103	CDR1 VL	QASETVDNNKRLS
49B7 VK CDR2	104	CDR2 VL	GAATLAS
49B7 VK CDR3	105	CDR3 VL	GGYKDSTDVG

10

【0377】

(16C6)

配列番号106のアミノ酸配列及び配列番号107のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号108のアミノ酸配列及び配列番号109のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)

【0378】

16C6 mAbは、219pg/mlのEC50(150pg/mlのIL-23の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力を示した。

20

【表 10】

表 10

ID	配列番号		配列
16C6 VH CDR1	110	CDR1 VH	TVSGFSLNSYSMS
16C6 VH CDR2	111	CDR2 VH	VIGLGGSAYYASWAK
16C6 VH CDR3	112	CDR3 VH	ATYSDDNI
16C6 VK CDR1	113	CDR1 VL	QASQSISSWLS
16C6 VK CDR2	114	CDR2 VL	RASTLAS
16C6 VK CDR3	115	CDR3 VL	LGGDGNVSN

30

【0379】

(34E11)

配列番号116のアミノ酸配列及び配列番号117のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号118のアミノ酸配列及び配列番号119のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)

40

【0380】

34E11クローンは、50pg/mlのEC50(150pg/mlのIL-23の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する高い効力を示した。

【表 1 1】

表 11

ID	配列番号		配列
34E11 VH CDR1	120	CDR1 VH	TYDIN
34E11 VH CDR2	121	CDR2 VH	YIYRGSPYYADWAKG
34E11 VH CDR3	122	CDR3 VH	NLYSVNVL
34E11 VK CDR1	123	CDR1 VL	QASQSISSRLA
34E11 VK CDR2	124	CDR2 VL	SASTLAS
34E11 VK CDR3	125	CDR3 VL	LGSYSNTIRT

10

【0381】

(35H4)

配列番号126のアミノ酸配列及び配列番号127のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vh)。

配列番号128のアミノ酸配列及び配列番号129のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0382】

35H4クローンは、同じB細胞クローニング実験で単離された他のmAbと比べて、クローニングされたmAbのトランスフェクション上清中で高い効力を示した(図5I)。

20

【表 1 2】

表 12

ID	配列番号		配列
35H4 VH CDR1	130	CDR1 VH	DYDMS
35H4 VH CDR2	131	CDR2 VH	IVYDIGTIYYAPWAEG
35H4 VH CDR3	132	CDR3 VH	EAPGYSDGDI
35H4 VK CDR1	133	CDR1 VL	QASETVGNNNRLS
35H4 VK CDR2	134	CDR2 VL	GAATLAS
35H4 VK CDR3	135	CDR3 VL	GGYKDSTDVG

30

【0383】

(実施例5: ウサギ抗ヒトIL-23/IL-12モノクローナル抗体の作製)

図8Aに示すように、IL-23を中和する抗体を、IL-23に特異的であるものと、IL-23とIL-12の両方を中和するものとに細かく分けることができる。IL-12及びIL-23は、共通のp40ポリペプチドを共有しており、p40に共有結合する第二の鎖が異なる(図7A)。IL-23のp19鎖及びIL-12のp35鎖は両方とも、4ヘリックスバンドル型のサイトカイン様ポリペプチドである。p19サブユニット及びp40サブユニットは、ジスルフィド結合によって共通のp40サブユニットに連結される。IL-12とIL-23の両方を中和する抗体は、この2つの分子間でのp40鎖の共有のために生じる。

40

【0384】

IL-12受容体及びIL-23受容体は、共通の鎖(IL-12R β 1)を共有し、さらに各々、固有の受容体成分(IL-23R及びIL-12R β 2)を有する(図7B)。これらの違いは、標的細胞、並びにIL-12及びIL-23によって用いられるシグナル伝達経路の顕著な差をもたらす。これらの受容体は、STAT活性化のためにJAK2又はTYK2チロシンキナーゼと対をなす膜貫通シグナル伝達ドメインを有する。

50

【 0 3 8 5 】

IL-23とIL-12の両方に結合する抗体を、組換えIL-23で免疫化したウサギから単離した(実施例4参照)。IL-23とIL-12の両方に対する結合活性及び機能的活性を示すB細胞クローンをさらなる特徴付けのために選択した。

【 0 3 8 6 】

B細胞由来のキメラIgGの一次レスキュートランスフェクションをIL-23の中和について試験した。IL-23の中和に成功したものをシーケンシングし、サブクローニングし、再びトランスフェクトし、mAbをトランスフェクション上清中で定量した。これらのmAbを抗IL-23活性について確認し(図8B～E)、その後、IL-12(図8F～G)及び霊長類IL-23(図8H、I)の中和について試験した。

10

【 0 3 8 7 】

抗原結合、抗原中和、並びにIL-12及びIL-23の選択的結合についての基準を満たした以下のモノクローナル抗体を、さらなる開発のために選択した：

【 0 3 8 8 】

(22H8：)

配列番号136のアミノ酸配列；配列番号137のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)；

配列番号138のアミノ酸配列；配列番号139のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【 0 3 8 9 】

mAb 22H8は、603pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)、並びにSPR解析で決定される高親和性抗原結合特性： K_d $8.94 \times 10^{-5} (s^{-1})$ ； K_a $4.03 \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$ 、及び K_D 221pMを有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

20

【 表 1 3 】

表 13

ID	配列番号		配列
22H8 VH CDR1	140	CDR1 VH	TYTMN
22H8 VH CDR2	141	CDR2 VH	AISYDGGTAYANWAKG
22H8 VH CDR3	142	CDR3 VH	GFYVYAYIGDAFDP
22H8 VK CDR1	143	CDR1 VL	QSSQTVYKNNLLS
22H8 VK CDR2	144	CDR2 VL	LASTLAS
22H8 VK CDR3	145	CDR3 VL	LGGYDDDADTA

30

【 0 3 9 0 】

(45G5：)

配列番号146のアミノ酸配列；配列番号147のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)；

配列番号148のアミノ酸配列；配列番号149のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【 0 3 9 1 】

mAb 45G5は、385pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

40

【表 1 4】

表 14

ID	配列番号		配列
45G5 VH CDR1	150	CDR1 VH	VYPIN
45G5 VH CDR2	151	CDR2 VH	IINDVDDTAYSAWAKG
45G5 VH CDR3	152	CDR3 VH	GYLSYAYAGDAFDP
45G5 VK CDR1	153	CDR1 VL	QSSQSIYNNNLLS
45G5 VK CDR2	154	CDR2 VL	FASTLAS
45G5 VK CDR3	155	CDR3 VL	LGGYDDDADTA

10

【0 3 9 2】

(1H1:)

配列番号156のアミノ酸配列;配列番号157のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh);

配列番号158のアミノ酸配列;配列番号159のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0 3 9 3】

mAb 1H1は、603pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

20

【表 1 5】

表 15

ID	配列番号		配列
1H1 VH CDR1	160	CDR1 VH	TASGLTLGSYSMT
1H1 VH CDR2	161	CDR2 VH	VIGVGGLNYASWAQ
1H1 VH CDR3	162	CDR3 VH	GTYSGDSI
1H1 VK CDR1	163	CDR1 VL	QASQSISSWLA
1H1 VK CDR2	164	CDR2 VL	RASILTS
1H1 VK CDR3	165	CDR3 VL	LGGDGHVSN

30

【0 3 9 4】

(4F3:)

配列番号166のアミノ酸配列;配列番号167のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh);

配列番号168のアミノ酸配列;配列番号169のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

40

【0 3 9 5】

mAb 4F3は、2339pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

【表 16】

表 16

ID	配列番号		配列
4F3 VH CDR1	170	CDR1 VH	GYTMI
4F3 VH CDR2	171	CDR2 VH	IISSSGNTYYASWWKG
4F3 VH CDR3	172	CDR3 VH	GSGAYISDYFNV
4F3 VK CDR1	173	CDR1 VL	QASQSIDSWLS
4F3 VK CDR2	174	CDR2 VL	SASKLAP
4F3 VK CDR3	175	CDR3 VL	QSYVDVNAGYG

10

【0396】

(5C5:)

配列番号176のアミノ酸配列;配列番号177のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh);

配列番号178のアミノ酸配列;配列番号179のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【0397】

mAb 5C5は、1907pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

20

【表 17】

表 17

ID	配列番号		配列
5C5 VH CDR1	180	CDR1 VH	SYTMI
5C5 VH CDR2	181	CDR2 VH	IISAGGSAYYASWWNG
5C5 VH CDR3	182	CDR3 VH	GSGTYTSDYFNI
5C5 VK CDR1	183	CDR1 VL	QASQSIDSWLA
5C5 VK CDR2	184	CDR2 VL	SASKLAT
5C5 VK CDR3	185	CDR3 VL	QSYVDANAGYG

30

【0398】

(14B5:)

配列番号186のアミノ酸配列;配列番号187のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(VH);

配列番号188のアミノ酸配列;配列番号189のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(VL)。

40

【0399】

mAb 14B5は、767pg/mlのEC50(50pg/mlのIL-6の生体活性を阻害するのに必要な濃度として算出された)を有する、高い効力及び抗原結合特性を示した。

【表 18】

表 18

ID	配列番号		配列
14B5 VH CDR1	190	CDR1 VH	DYTM
14B5 VH CDR2	191	CDR2 VH	IISSSGNTYYATWWKG
14B5 VH CDR3	192	CDR3 VH	GSGAYISDYFNV
14B5 VK CDR1	193	CDR1 VL	QASQSIDSWLS
14B5 VK CDR2	194	CDR2 VL	AASKLAT
14B5 VK CDR3	195	CDR3 VL	QSYVDVNAGYG

10

【0400】

(5.1 IL-12バイオアッセイ)

抗体を、IL-12応答性細胞株NK-92(CRL-2407, ATCC, Manassas, Virginia, USA)を用いて、IL-12中和能力についてアッセイした。B細胞クローニングプレートからの50μlの培養上清、又は抗体トランスフェクションからの50μlの上清を96ウェル組織培養プレートに移した。50μlのヒトIL-12(カタログ# Cyt-362, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)を各ウェルに4ng/mlで添加した。プレートを室温で30～60分間インキュベートし、その後、 5×10^4 個のNK-92細胞を100μl中で各ウェルに添加した。培養物を37℃で3日間インキュベートし、上清をヒトインターフェロン- γ 産生についてアッセイした。アッセイ培地は、RPMI 1640、10%FBS、NEAA、ピルビン酸塩、50μM 2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及び10ng/mlヒトIL-2(カタログ# Z00368, GeneScript社, Piscataway, NJ, USA)である。

20

【0401】

(インターフェロン- γ ELISA)

ELISAアッセイを用いて、ヒトインターフェロン- γ を検出した。プレートを、100μlのPBS中1μg/mlの抗ヒトインターフェロン- γ (カタログ# Mab 1-D1K, Mabtech, Cincinnati, OH, USA)で、4℃で一晩又は37℃で1時間コーティングした。プレートを脱イオン水中で洗浄し、100μlのPBS、10%ヤギ血清で1時間ブロッキングした。プレートを洗浄した後、50μlのPBS/10%ヤギ血清及び50μlの培養上清をプレートに添加し、1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中0.5μg/mlで100μl/ウェルの抗ヒトインターフェロン- γ -ビオチン(カタログ# Mab 7b6-1-ビオチン, Mabtech)を添加し、プレートをRTで1時間インキュベートし、洗浄し、PBS/10%ヤギ血清中1:1000で100μl/ウェルのストレプトアビジン-HRP(Jackson Labs)と反応させた。プレートを再洗浄し、100μl/ウェルのTMB基質(Thermo Scientific, IL, USA)を添加することによって、シグナルを検出した。100μl/ウェルの1N H₂SO₄で反応を停止させた後、光学密度を450nmで読み取った。

30

【0402】

(実施例6: ヒト化scFvの人為作製)

40

(ヒト化の概要)

ウサギ免疫グロブリン可変領域(V-領域)を免疫化ウサギ由来の末梢血B細胞から単離されたmRNAから取得する。これらのウサギB細胞を低密度で96ウェルプレートにプレートイングし、先に記載したように活性化した。定常領域由来の遺伝子特異的プライマーを第一鎖合成用に、及びその3'末端の入れ子型J-領域特異的プライマーを5'リーダープライマーとともにPCR工程用に用いる、逆転写酵素-PCR(RT-PCR)を用いて、V-領域cDNAを各ウェルのmRNAから増幅する。その後、V-領域を、ヒトIgG重鎖ベクターカセット、カッパ軽鎖ベクターカセット、又はラムダ軽鎖ベクターカセットのいずれかにクローニングし、HEK 293細胞で一過性に発現させ、72時間後のトランスフェクション上清を、全体のIgG発現とそれぞれの標的の中和の両方について試験する。その後、強力な中和作用物質(neutralizer

50

)をシーケンシングし、それらがサブクロニングされたウェル中に存在する複雑さのレベルを決定した。固有の軽鎖及び重鎖の数を決定した後、存在する全ての考えられる組合せをHEK 293に再び一過性に発現させ、中和及びIgG含量についてアッセイした。その後、強力な中和作用物質を、他の望ましい活性についてさらにアッセイした。抗ヒトIL-6抗体を非ヒト霊長類由来のIL-6の中和について試験した。IL-12二量体とIL-23二量体は両方とも同じp19鎖を共有するので、抗ヒトIL-23抗体を、非ヒト霊長類IL-23の中和だけでなく、ヒトIL-12の中和についてもアッセイする。

【0403】

本発明者らは2つの戦略に従った：本発明者らは、配列gly-gly-gly-gly-ser (G4S)の4つのタンデム反復から構成される20アミノ酸のリンカーを2つのドメインの間に導入することによって、重鎖V-領域と軽鎖V-領域をVLVH方向又はVHVL方向のどちらかで遺伝子融合するPCRにより、選択された重鎖(VH)及び軽鎖(VK又はVL)から直接ウサギscFvを構築した。ウサギscFvは、キメラ抗体からscFvフォーマットへの変換がV-領域対の機能的又は生物物理的特性に悪影響を及ぼしたかどうかを評価するのに役立つ。その後、scFvをHEK 293で一過性に発現させ、図12Aに示すような機能についてアッセイした。強力な中和作用物質をヒト化用に選択した(第6.1節参照)。

10

【0404】

或いは、ウサギV-領域をscFvフォーマットで直接ヒト化した(下記の6.2参照)。

【0405】

免疫グロブリンV-領域は、全長抗体と単鎖Fv(scFv)の両方を含む、多くの異なるフォーマットでヒト化することができる。記載した発明は、原核生物組換えタンパク質発現に依存しているので、全長抗体構造は望ましくない。しかしながら、本発明は、抗体フォーマットでのウサギV-領域の良好なヒト化を実際に記載する。フォーマットを問わず、本発明は、任意の天然に存在するメチオニン残基の除去を含み、それにより、それらを他のアミノ酸と置換する。メチオニン残基は、免疫グロブリンV-領域のフレームワーク領域及びCDR内に見出されることが多いので、これらの残基の好適な置換を見出す必要があり、その場合は、該置換が、所望のタンパク質の発現、安定性、又は機能に影響を及ぼすことなく生じる。その後、このメチオニン不含scFvを、メチオニン要求性細菌株での発現用に最適化し、精製し、再フォールディングさせ、生物学的活性について試験することができる。

20

【0406】

良好なヒト化及びその後のメチオニン置換は、活性化PEG部分などの他の相補的分子と共有結合させるための化学反応性の高い部位を有する非天然アミノ酸の挿入部位として役立つ単一のメチオニンコドンの挿入によって化学的に修飾することができる治療的ビヒクルの一部を提供する。その後、このPEG化scFvを、PEGポリマーの残りの末端での同様に反応性の高い基を介した別のそのようなscFvへの共有結合によってさらに修飾することができる。その後、この二重特異性、PEG化生成物を精製し、再フォールディングさせて、安定で、生物学的に活性のある治療タンパク質を生じさせることができる。

30

【0407】

(6.1 全長抗体ヒト化プロセス)

ウサギ-ヒトキメラモノクローナル抗体を全長抗体としてヒト化することができる。これは、ヒトのVHフレームワーク領域及びVLフレームワーク領域を、ウサギCDRを保持したままウサギフレームワークと交換することを必要とし、多くの場合、特定のウサギフレームワーク残基を保持することを含む。齧歯類V-領域をヒト化する戦略も多数あるし、ウサギ-ヒトキメラ抗体を部分的に又は完全にヒト化し得る他の方法も考えられる。ここでは、本発明者らは、抗ヒトIL-6クローン9C8を抗体フォーマットでヒト化するために用いられる方法を記載する。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変化させることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。

40

【0408】

NZWウサギV-領域のヒト化は、まず、その一次アミノ酸配列をヒトV-領域中に見られる

50

ものと比較することによって遂行された(Altschulらの文献(1990))。適合する可能性があるヒトV-領域フレームワークを、フレームワーク領域(FR1、FR2、FR3、及びFR4)内の配列類似性、相補性決定領域(CDR1、CDR2、及びCDR3)内の配列の長さ及び内容、並びにIgVのカノニカルループ構造を支持するのに極めて重要であることが知られている重要なFR残基に基づいて作製した。これらのデータを用いて、ヒトフレームワークを、軽鎖V-領域と重鎖V-領域の両方について選択し、ウサギCDRを、図15に示すように、重複するオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRによって、これらのフレームワーク上に移植した(表19)。

【 0 4 0 9 】

9C8のヒト化のために、ウサギのVカップフレームワークをヒトフレームワークDPK8 VK1に変化させ、一方、ウサギのVHフレームワークをヒトのDP42 VH3-53フレームワークに変化させた。CDRは全てウサギのものである。重鎖の2つのバージョン(v1及びv2)を作製した(下記参照)。これら2つのバージョンは、CDR1 VH(残基H23-30)近くのフレームワーク領域が異なる。ここで、内在性9C8ウサギフレームワーク領域は、アミノ酸配列TVSGIDLSであり、これをv2に用いた。v1については、この配列の最初の2つのフレームワーク残基(ウサギにおけるTV)を、相同なヒトVH3フレームワーク位置で高度に保存されているAAに変化させた。親キメラ9C8 mAbを、ヒト化バージョンの9C8 mAbv1及びmAbv2と並べて比較した(図9B)。両バージョンとも完全な活性を保持していた。

【 0 4 1 0 】

9C8 v1及びv2におけるフレームワーク及びCDR1 VHバリエーション:

9C8 v1

FW VH復帰突然変異(H23-30):AASGIDLS(配列番号355)

CDR1 VH(H31-35):SYDMS

9C8 v2

FW-VH復帰突然変異(H23-30):TVSGIDLS(配列番号356)

CDR1 VH:(H31-35)SYDMS

【 0 4 1 1 】

図9Bは、親キメラ9C8 mAbと、VH領域(位置H23-H30)のCDR1の近くに2つの異なるウサギ復帰突然変異を含むヒト化9C8 mAb(9C8 mAbv1及び9C8 mAbv2)との並列比較を示す。ヒト化モノクローナル抗体9C8 mAbv1(VH残基23-24でTVを含む)及び9C8 mAbv2(23-24でAA)を、先に記載したように、重鎖DNAと軽鎖DNAの両方のHEK293細胞への一過性コトランスフェクションにより発現させた。ヒト化モノクローナル抗体を、示したように、50pg/ml IL-6の中和について試験した。これらの変化、TVSGIDLS(mAbv2)又はAASGIDLS(mAbv1)は、機能的活性に影響を及ぼさない(図9B)。9C8 mAbv1を、図9Cのヒト化mAb 18D4とさらに比較した。

。

10

20

30

【表 19】

表 19

選択されたヒトV-領域フレームワーク上にウサギCDRを移植するために用いられたオリゴヌクレオチドプライマー

AZ_ID	配列 番号	プライマー配列
scFv-NotF	200	GCGATAGCGGCCGCACCACCATGGAGGCTCCC
JHXhoR	201	GCTATACTCGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCC
DPK8F1	202	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTTCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAG
DPK8- AgeF	203	GACACAACCGGTGACATCCAGTTGACCCAGTC

9C8-H1F	204	GAATCGACCTCAGTAGCTACGACATGAGCTGGGTCCGTCAGGCA CCTG
9C8- H1R1	205	GTAGCTACTGAGGTTCGATTCCAGAAGCTGCACAGGAGAGGCGCA GGG
9C8- H1R2	206	GTAGCTACTGAGGTTCGATTCCAGAGACAGTACAGGAGAGGCGCA GGG
9C8-H2F	207	ACTGATAGTAGCACATACTACGCGAACTGGGCGAAGGGCCGCTT CACCATCAG
9C8-H2R	208	GCGTAGTATGTGCTACTATCAGTATAAATGTAGCTCACCCACTCC AGACCC
9C8- H3R1	209	GTGTGCGAAAGCATAATCGGTACTACCTCTGGCGCAGTAATACACC GCGGTGTC
9C8- H3R2	210	GACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGAGATCCAACCGAGTGTGCGAAAG CATAATCGG
13A8-L2F	211	GGGCATCCACTCTGACATCTGGAGTCCCATCAAGGTTC
13A8-L2R	212	GACTCCAGATGTCAGAGTGGATGCCCTATAGATCAG
13A8-H2F	213	GCACATGGTACGCGAACTGGG
13A8- H2R	214	AGTTCGCGTACCATGTGCTACTATCAG
13A8- EcoF	215	GGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGC
13A8- EcoR	216	GAGAGTGAATTCTGTCCCAGATCCACTG
31A12- L1F	217	GCCAGTGAGGACATCGAGAGCTACCTGGCTTGGTATCAGCAAAA ACCAG
31A12- L1R	218	AGCTCTCGATGTCCTCACTGGCCTGGCAAGTGATGGTGACTCTGT C
31A12- L2F	219	AGTGCATCCACTCTGACCTCTGGCGTCCCATCAAGGTTTCAGC
31A12- L2R	220	AGAGGTCAGAGTGGATGCACTATAGATCAGGAGCTTAGGG
31A12- L3F	221	GTCTCGGTGCTGACGATACCACTACCGTCTTCGGCGGAGGGACC AAGGTG
31A12- L3R	222	AGTGGTATCGTCAGCACCGAGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTC AG
31A12- H1F	223	GGATTCAGCCTCAGTTCCTATTGGATGACCTGGGTCCGTCAGGCA CCTG
31A12- H1R	224	ATAGGAACTGAGGCTGAATCCAGAGGCTGTACAGGAGAGGCGCA GGGAC

10

20

30

40

31A12-H2F	225	AGCTCCACATACTATGCATCTTGGGCGAAAGGCCGCTTCACCATC AGCCGC	10
31A12-H2R	226	GATGCATAGTATGTGGAGCTGGTAGCAATAGTGCCCACCCACTCC AAACCC	
31A12-H3R1	227	AGAGATCTAAGTCATAGTCTGTAGTGAGTCCTCTGGCGCAGTAAT ACACC	
31A12-HXhoR	228	GACCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGAGATC TAAGTCATAGTC	
45G5-L1F	229	AGAGTATTTATAATAACAACCTCTTATCCTGGTATCAGCAAAAACC AGGG	20
45G5-L1R	230	GGATAAGAGGTTGTTATTATAAAATACTCTGACTGGACTGGCAAGT GATGGTGAC	
45G5-L2F	231	GCATCCACTCTGGCATCTGGCGTCCCATCAAGGTTTCAGC	
45G5-L2R	232	GCCAGATGCCAGAGTGGATGCAAAATAGATCAGGAGCTTAGGG	
45G5-L3F	233	GGCGGTTATGATGATGATGCTGATACTGCTTTTCGGCGGAGGGAC CAAGGTG	30
45G5-L3R	234	GCATCATCATCATAACCGCCTAGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTT CAG	
45G5-H1F	235	GGATTCTCCCTCAGTGTATATCCAATAAACTGGGTCCGTCAGGCA CCTG	
45G5-H1R	236	GATATACACTGAGGGAGAATCCAGAGACTGTACAGGAGAGGGCGC AGGGAC	
45G5-H2F	237	GTTGATGACACAGCCTACTCAGCCTGGGCGAAAGGCCGCTTCAC CATCAGCCGC	40
45G5-H2R	238	GAGTAGGCTGTGTCATCAACATCATTAAATAATGCCACCCACTCC AAACCCTTG	
45G5-H3R1	239	AGCATCTCCAGCATAAGCATAACTCAAATAACCTCTGGCGCAGTA ATACACC	
45G5-H3R2	240	ACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGGGATCGAAAGCATCTCC AGCATAAGC	
22H8-L1F	241	AGACTGTCTATAAGAACAACCTCTTATCCTGGTATCAGCAAAAACC AGGG	40
22H8-L1R	242	GGTTGTTCTTATAGACAGTCTGACTGGACTGGCAAGTGATGGTGA CTCTG	
22H8-L2F	243	GATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGGCGTCCCATCAAGGTT CAG	
22H8-L2R	244	AGATGCCAGAGTGGATGCCAGATAGATCAGGAGCTTAGGG	
22H8-L3F	245	AGGCGGTTATGATGATGACGCTGATACTGCTTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTG	

22H8-L3R	246	GCGTCATCATCATAACCGCCTAGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTT CAG	10
22H8-H1F	247	GGATTCTCCCTCAGTACCTATACANTGAACTGGGTCCGTCAGGCA CCTG	
22H8-H1R	248	GTATAGGTACTGAGGGAGAATCCAGAGACTGTACAGGAGAGGCG CAGGGAC	
22H8-H2F	249	ATGGTGGCACAGCCTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGCTTCACC ATCAGCCGC	
22H8-H2R	250	GCGTAGGCTGTGCCACCATCATAACTAATGGCGCCCAACCACTC CAAACCC	
22H8-H3R1	251	GAAAGCATCCCCAATATAAGCATAAACATAAAAACCTCTGGCGCA GTAATACACC	20
22H8-H3R2	252	GGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGGGATCGAAAGCATCCCCAA TATAAGC	
H82XR	253	GCAGGCTGTTGANTTGCAGATACAGGGTGTTT	
H82XF	254	ATCTGCAANTCAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC	
DPK8gsR 1	255	GCCGCTACCGCCACCACCAGAACCGCCACCGCCTTTGATTTCCA CCTTGGTCC	
DPK8gsR 2	256	CTGCACCTCGGATCCGCCCCCTCCGGAACCACCGCCGCGCTAC CGCCACCACCAG	30
DP427Ba mF	257	GGGCGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAG	
DPK8scfv R	258	ACCGCCTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAA	

【 0 4 1 2 】

ヒト化V-領域を増幅するために用いられるプライマーは、先の実施例でウサギV-領域を取得するために用いられ、図10に示されているものと同一の制限酵素部位をコードする。この方法で、ヒト化軽鎖を、Cカッパを含む発現ベクターに連結し、ヒト化重鎖V-領域を、Cガンマ1を含む発現ベクターに連結し、先に記載したように、大腸菌に形質転換した。その後、単離されたコロニーをスクリーニングし、シーケンシングした。

【表 2 0】

表 20

フレームワーク	呼称	配列番号	呼称
ウサギ	ウサギ VH 9C8 AA	56	キメラab用の ウサギv-領域
ウサギ	ウサギ VH 9C8 nuc	57	キメラab用の ウサギv-領域
ウサギ	ウサギ VL 9C8 AA	58	キメラab用の

			ウサギv-領域
ウサギ	ウサギ VH 9C8 nuc	59	キメラab用の ウサギv-領域
ウサギ	9C8 VH- CDR1	60	ウサギ CDR's
ウサギ	9C8 VH- CDR2	61	ウサギ CDR's
ウサギ	9C8 VH- CDR3	62	ウサギ CDR's
ウサギ	9C8 VK- CDR1	63	ウサギ CDR's
ウサギ	9C8 VK- CDR2	64	ウサギ CDR's
ウサギ	9C8 VK- CDR3	65	ウサギ CDR's
VH3-66	ヒト化_9C8 VH AA	196	9C8-v6-LL用のv- 領域
VH3-67	ヒト化_9C8 VH nt	197	9C8-v6-LL用のv- 領域
DPK5,6	ヒト化_9C8 VL AA	198	9C8-v6-LL用のv- 領域
DPK5,7	ヒト化_9C8 VL nt	199	9C8-v6-LL用のv- 領域
ウサギ	9C8_ウサギ_scFV	313	完全にウサギのscFV
ウサギ	9C8_ウサギ_scFV	314	完全にウサギのscFV
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_met不含-ヌク レオチド-哺乳動物-発現 _VH3-66-DK5, 6 (9C8v6-LL)	315	9C8v6-LL scFV nuc
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_met不含-AA- 哺乳動物-発現 _VH3-66-DK5, 6 (9C8v6-LL)	316	9C8v6-LL scFV AA
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_メチオニン含 有-AA-哺乳動物-発現 _VH3-66-DK5, 6: (9v3-1)	317	9C8v3-1 scFV AA
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_メチオニン含 有-nuc-哺乳動物-発現 _VH3-66-DK5, 6: (9v3-1)	318	9C8v3-1 scFV nuc
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_メチオニン含 有-ヌクレオチド-哺乳動物-発 現_VH3-66-DK5, 6: (9v3-2)	319	9C8v3-2 scFV nuc
VH3- 66/DPK5,6	9C8_ヒト化scFV_メチオニン含 有-AA-哺乳動物-発現 _VH3-66-DK5, 6: (9v3-2)	320	9C8v3-2 scFV AA
VH3-53/DPK8	9C8_ヒト化-VK-ヌクレオチド __DK8_抗体用	321	9C8-vK-humAb 1&2 nuc
VH3-53/DPK8	9C8_ヒト化-VK-AA __DK8_抗体用	322	9C8-vK-huMab 1&2 AA
VH3-53/DPK8	9C8-バージョン1_ヒト化-VH- ヌクレオチド__DP42_抗体用	323	9C8-vH humAbv1- nuc
VH3-53/DPK8	9C8-バージョン1_ヒト化 -VH-AA__DP42_抗体用	324	9C8-vH humAbv1 AA
VH3-53/DPK8	9C8-バージョン2_ヒト化-VH- ヌクレオチド__DP42_抗体用	325	9C8-vH humAbv2 nuc
VH3-53/DPK8	9C8-バージョン2_ヒト化 -VH-AA__DP42_抗体用	326	9C8-vH humAbv2 AA

10

20

30

40

ヒト化9C8 scFvをヒト化mAbv1(TV)及びmAbv2(AA)から得た。得られたscFvは、VH1CDR1近くにウサギフレームワーク1残基(23-30)を保持していた。これらのscFvは、H34及びH82に内在性メチオニン残基も保持していた。その後、9C8のヒト化scFvの最終バージョンをこれらのscFvから作製したが、新しいフレームワークDPK5,6/DP47に置換した。これらの新しいヒト化scFv、9C8 Hum scFv v3-1及び9C8 Hum scFv v3-2は、強力な抗IL-6中和活性を示した(図9D)。

【0414】

(6.2 V-領域の1工程ヒト化及びウサギ-ヒトキメラmAbからのscFvの作製)

ウサギV-領域は、scFvフォーマットで直接ヒト化することもできる。用いられるヒト化方法は、一般に、モノクローナル抗体をヒト化するのに用いられるものと同じであり得るが、全てのヒト化抗体が容易にscFvに変換されるわけではない。さらに、抗体のヒト化は、移植されたCDRとの定常領域相互作用を説明する必要条件を備えている。重鎖V-領域と軽鎖V-領域の両方の配列をヒト生殖系列比較し、実施例6.1に記載されているようなV-ベース(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)及びIgBLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の両方を用いて、配列を発現させた。

【0415】

クローニングされたウサギVH領域及びVL領域の大部分は、それぞれ、ヒトIGHV3(IGHV3-66、IGHV3-49)ファミリー及びIGVK1(DPK-9)ファミリーのメンバーと厳密に一致したが、位置L4のメチオニンが存在しないために、DPK-8(VK1遺伝子座L8、V-BASEデータベース)を軽鎖フレームワークとして用いた(第6.1節参照)。

【0416】

5'のNot I制限酵素部位に続いて、コザックボックス(Kozakの文献(1987))、IgVK3リーダー(L2)、ヒトVK1-JK4フレームワーク、20アミノ酸の柔軟な(gly4ser)4リンカー、ヒトVH3-JH4フレームワーク、及びVH3-FR4のC-末端の最後の2つのセリン残基内で入れ子になっている3'のXho I制限部位をコードするように、ヒト化scFvを設計した(図15)。scFv DNAは全て、重複するDNAオリゴヌクレオチド伸張(Dillon及びRosenの文献(1990))を用いるデノボのDNA合成によって構築し、Not I及びXho I(NEB, Ipswich, MA)で消化し、1%アガロース-TAEゲルで単離し、ゲルから切り出し、製造者の指示を用いて、MinElute Gel Extractionキット(Qiagen, wherever, CA)を用いて精製した。このDNAを、T4 DNAリガーゼ(NEB, Ipswich, MA)を用いて、Not I-Xho I消化されたpcDNA 3.1(-)(Invitrogen, Carlsbad, CA)に連結した。pcDNA3.1(-)ベクターカセットは、プロリンに富む短いリンカーに続いて、6XHisタグ(gly-pro-pro-pro-pro-his-his-his-his-his-his)をscFvのC-末端とインフレームでコードするように修飾されたものであった。連結されたpcDNA3.1-6_13A8をコンピテント大腸菌TOP 10(Invitrogen, Carlsbad, CA)に形質転換し、LB寒天+100 µg/mlカルベニシリンプレート(Teknova, Hollister, CA)上で37 °Cで一晩選択した。これらのプレートから、単離されたコロニーを採取し、2mlのYTブロス+100 µg/mlカルベニシリン(Teknova)に播種し、振盪インキュベーター内で、37 °Cで一晩成長させた。PureLink Quick Plasmid Miniprepカラム(Invitrogen)を用いて、いくつかのクローンからDNAを単離し、その後、制限消化により、0.8KbpのscFv断片の存在についてスクリーニングした。その後、正確な制限パターンを与えるクローンを、製造者の指示に従ってBig Dye Terminator v3.1キット(ABI)を用いるPCRサイクルシーケンシングの後に、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)でシーケンシングした。得られたDNA配列を解析し、VNTI v 10(Invitrogen)を用いて、その参照ヌクレオチド配列及び参照アミノ酸配列と比較した。

【0417】

配列を確認した後、各scFvを、製造者のプロトコルを用いてLipofectamine 2000(Invitrogen)を用いて、HEK293細胞にトランスフェクトした。簡潔に述べると、トランスフェクションの前日に、対数期のHEK293細胞を、完全培地(DMEM+Glutamax+非必須アミノ酸+Pen-Strep+10%FBS Life Sciences)中、1ウェル当たり500,000細胞の密度で、12ウェル培養プレート(Corning, Lowell, MA)にプレーティングし、37 °CのCO₂インキュベーター内で

一晚インキュベートした。細胞が約80%コンフルエントになったとき、4 μ gのscFv DNAを100 μ LのOpti-MEMに希釈し、4 μ LのLipofectamine 2000を100 μ LのOpti-MEMに希釈し、その後、これら2つの希釈物を合わせて、トランスフェクションミックスとし、室温で20分間インキュベートした。その後、12ウェルプレートから培地を除去し、1ml/ウェルのSFM4-Transfectx - 293無血清培地(Hyclone, Logan, UT)と交換し、トランスフェクションミックスを各ウェルに滴加した。トランスフェクションプレートを37 °CのCO₂インキュベーターに戻して、3日間成長させ、先の実施例で記載したような機能的活性について試験した。

【 0 4 1 8 】

1工程法を用いてヒト化された抗IL-6 scFvは、13A8(図11A~B)、28D2、及び9C8 v3-1(図11C)について示したように、哺乳動物細胞で発現させたとき、IL-6中和活性を保持していた。表面プラズモン共鳴(SPR)による結合親和性の測定もまたは、13A8及び9C8抗IL-6 scFvの良好なヒト化を示した(表21)。親和性試験に用いられたヒト化13A8及び9C8 scFvは、6x-ヒスチジンタグを含んでおり、トランスフェクトされたHEK上清から(先の実施例に記載の方法を用いて)精製され、本質的に実施例2に記載したように実施されたSPRによって試験された。

【 表 2 1 】

表 21: ヒト化され、哺乳動物で発現された抗IL-6 scFv(メチオニン置換前)、及びその親キメラAbの親和性及び効力。

抗体	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)	EC50 (pg/ml)
13A8キメラAb	6.33×10^5	1.38×10^{-4}	218	34
13A8ヒト化scFv	8.76×10^5	8.64×10^{-5}	98.2	64
9C8キメラAb	7.65×10^5	3.17×10^{-5}	42	400
9C8ヒト化scFv	4.47×10^5	4.03×10^{-5}	89	319
28D2キメラAb				65
28D2ヒト化scFv	9.18×10^5	1.002×10^{-4}	109	43

【 0 4 1 9 】

哺乳動物細胞で発現された抗IL-23 31A12ヒト化scFvは、ヒトIL-23と霊長類IL-23の両方に対して親mAbと同程度のIL-23中和活性を保持していた(図12)。さらに、31A12 scFvは、親キメラmAbと少なくとも同じくらい良好なピコモル濃度の親和性を保持している(表22)。

【 表 2 2 】

表 22: ヒト化され、哺乳動物で発現された抗IL-23 scFv 31A12、及び親キメラAbの親和性及び効力。

抗体	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)	EC50 (pg/ml)
31A12キメラAb	4.79×10^5	2.02×10^{-4}	422	3286
31A12ヒト化scFv	7.73×10^5	7.11×10^{-5}	92	1368

【 0 4 2 0 】

45G5ヒト化scFvは、図13に記載したようなIL-23に対する強力な生物学的活性を保持し

ていた。

【表 2 3】

表 23: ヒト化V領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列:

抗 IL-6	AZ_ID	配列番号
ヒト化_13A8 VH AA		259
ヒト化_13A8 VH nt		260
ヒト化_13A8 VL AA		261
ヒト化_13A8 VL nt		262
ヒト化_28D2 VH AA		263
ヒト化_28D2 VH nt		264
ヒト化_28D2 VL AA		265
ヒト化_28D2 VL nt		266
抗 IL-23	AZ_ID	配列番号
ヒト化_31A12 VH AA		267
ヒト化_31A12 VH nt		268
ヒト化_31A12 VL AA		269
ヒト化_31A12 VL nt		270
抗 IL-12/23	AZ_ID	配列番号
ヒト化_22H8 VH AA		271
ヒト化_22H8 VH nt		272
ヒト化_22H8 VL AA		273
ヒト化_22H8 VL nt		274
ヒト化_45G5 VH AA		275
ヒト化_45G5 VH nt		276
ヒト化_45G5 VL AA		277
ヒト化_45G5 VL nt		278

10

20

30

40

50

【0 4 2 1】

(6.3 ヒト化scFvにおけるメチオニン置換)

ヒト免疫グロブリン(Ig)V領域は、VH-FR3の比較的保存された残基(ヒトVH3ファミリー、アミノ酸H82)、及びカッパ軽鎖の位置L4で、軽鎖と重鎖の両方のCDR1にメチオニン残基を含むことが多い。これらのヒト化scFvは、メチオニン類似体を用いて最終的に共有結合されるので、成熟scFv内の全てのメチオニン残基は、別の天然に存在するアミノ酸に置換されなければならない。このアミノ酸置換は、得られるscFvの機能又は安定性に対して、最小限の影響しか及ぼさないもの、又は全く影響を及ぼさないものでなければならない。

【0 4 2 2】

軽鎖アミノ酸の位置L4でのメチオニン残基を回避するために、CDRを、その位置にロイシン残基を有するヒト生殖系列フレームワークDPK8(GenBank X93626)に移植した。位置H82の重鎖のメチオニン残基を置換するために、メチオニンをイソロイシン(ile)、ロイシン(leu)、バリン(val)、又はフェニルアラニン(phe)のいずれかに変化させるような、縮重

オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。これら4つのアミノ酸は、他の種由来のIgVH領域内の位置H82で、及びいくつかの発現されたヒト抗体において見出すことができる。これらの新しいメチオニン不含scFvをHEK 293細胞で一過性に発現させ、その後、中和活性をその親scFvのものと比較した。

【0423】

効力及び発現に基づいて、メチオニンを含まないDNA配列を、翻訳効率に干渉し得るコドン使用及び潜在的二次構造を変化させることによって、大腸菌内での発現用に最適化した。

【0424】

VHの位置H82Mで代替りのアミノ酸に置換するために、フランキングプライマー(上記のプライマー1、2 それぞれ、配列番号200及び201)を伴うPCRによって、ロイシン、バリン、イソロイシン、又はフェニルアラニンを位置H82に導入するように、重複する縮重プライマー(上記のプライマー54、55)を設計した。PCR生成物を上記のようにクローニングし、DNAをシーケンシングして、各々の選択されたクローンによってどのアミノ酸がコードされているかを決定した。

10

【0425】

ヒト化抗IL-6 scFv 13A8(いくつかの他のscFvとして)は、VHの位置H34及びH82に2つのメチオニン残基を有している。これらの残基を、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCRにより置換し、メチオニンと上記のようなロイシン、イソロイシン、バリン、又はフェニルアラニンのいずれかとの置換を生じさせた。その後、これらのメチオニン不含scFv(下記の表24)を、製造者のプロトコルを用いて、HEK 293細胞にトランスフェクトし(Lipofectamine 2000, Invitrogen, Carlsbad, CA)、得られた72時間の上清を、野生型親scFv対照上清と比べたIL-6中和についてアッセイした。ほとんど全ての置換によって、活性の完全な保持が得られた(図14A~D)。

20

【表 2 4】

表 24: 試験した13A8 scFvメチオニン置換

クローン名	H34	H82	
13A8-MM	M	M	
13A8-FF	F	F	
13A8-FI	F	I	
13A8-FL	F	L	
13A8-FM	F	M	
13A8-FV	F	V	
13A8-IF	I	F	
13A8-II	I	I	
13A8-IL	I	L	
13A8-IM	I	M	
13A8-IV	I	V	
13A8-LF	L	F	
13A8-LI	L	I	
13A8-LL	L	L	
13A8-LM	L	M	
13A8-LV	L	V	
13A8-VF	V	F	
13A8-VI	V	I	
13A8-VL	V	L	
13A8-VM	V	M	
13A8-VV	V	V	

10

20

【0 4 2 6】

H34Lは、一般に、十分に許容される置換であった。抗IL-23ヒト化scFvの31A12において、H34Lと組み合わせて、H82を異なるアミノ酸と置換することによって、Metを含む親scFvと比べて、活性の完全な保持が得られた(図14E)。同様のやり方で、H34Lと組み合わせて、45G5 H82をL又はVと置換することによって、もとのキメラmAbと比べて、活性の完全な保持が得られた(図14F)。H82L及びH34Lを有するように9C8ヒト化scFv中のMetを置換することによっても、強力な活性が保持された(図14G)。22H8 scFvは、本来、位置H82にMet残基を持たない。H34のMetをL又はVのどちらかと置換することによって、強力なIL-23中和活性の完全な保持が得られた(図14H)。各々のリード候補VH領域の特異的なVH突然変異が表25Xに示されており、これは、H23～30、及びH49でのウサギ復帰突然変異、並びにH34及びH82メチオニン置換を示している。

30

【0 4 2 7】

最終的なリードscFv候補の各々について、位置H82と位置H34の両方で置換されるアミノ酸としてロイシンを選んだ。リード候補scFv DNA配列を、大腸菌が好むものに従ってコドン使用を修飾することにより、大腸菌内での発現用に最適化した。この時点で、Ahaなどのメチオニン類似体によるインビボでの置換を表す単一のMet残基の配置を調べた。DNAを(上記のような)PCRによって合成し、pQEベクターなどの適切な発現ベクターにクローニングした。発現ベクター中の合成DNA遺伝子配列をDNA配列により確認した。最後に、発現ベクター内の合成遺伝子を、組換えタンパク質産生のために、B834などのメチオニン(Methionine)要求性大腸菌宿主に形質転換した。

40

【表 2 5】

表 25X: リードヒト化ウサギVH配列におけるアミノ酸突然変異

scFv	VHフレームワーク1復帰突然変異										
	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H34	H49	H82
VH3-66	A	A	S	G	F	T	V	S	M	S	M
31A12	T	A	S	G	F	S	L	S	L	G	L
45G5	T	V	S	G	F	S	L	S	*na	G	na
22H8	T	V	S	G	F	S	L	S	L	G	L
13A8	T	V	S	G	I	D	L	S	L	G	L
28D2	T	V	S	G	L	S	L	S	na	G	na
9C8	T	V	S	G	I	D	L	S	L	G	L

これらの突然変異は、ウサギ配列 (H23~30、及びH49) の復帰突然変異であるか、又は多くのVH配列に共通のMet置換 (H34、H82) であるかのどちらかである。

*naは、ウサギ又はヒト配列中でMetではなく、置換を必要としなかった位置を表す。

表 25 A: ScFv アミノ酸配列

scFv AZ_ID	配列番号
13A8 scfv 大腸菌	280
28D2 scfv 大腸菌	282
31A2 scfv 大腸菌	284
22H8 scfv 大腸菌	286
45G5 scfv 大腸菌	288

表 25B：大腸菌発現に適合したnt配列

scFv AZ_ID	配列番号
13A8 scfv 大腸菌	279
28D2 scfv 大腸菌	281
31A2 scfv 大腸菌	283
22H8 scfv 大腸菌	285
45G5 scfv 大腸菌	287

10

【 0 4 2 8 】

scFvは、非天然アミノ酸(NNAA)が大腸菌内でのタンパク質産生時に組み込まれ得る位置に導入される単一のMet残基を有さなければならない。このNNAAは、特異的なバイオコンジュゲーション部位になる。これらの生成物に好まれるNNAAはアジドホモアラニン(Aha)であり、これは、銅によって触媒される環状付加バイオコンジュゲーションの使用を可能にする。1つのAha残基を含むscFvを産生するために、単一のメチオニンコドンを含むscFv DNAを、大腸菌発現用にコドン最適化し、合成し、B384などのメチオニン要求性大腸菌株中にクローニングした。細胞を対数期まで成長させ、Ahaを含むメチオニン不含培地に移し、1mMのIPTGを添加してscFv発現を誘導した。その後、所望の場所に機能的Aha基を有する所望のscFvを含む封入体(IB)を単離した。

20

【 0 4 2 9 】

単一のメチオニン残基を、限定されないが、N末端及びC末端、又はVLドメインとVHドメインを接続するリンカー中を含む、多くの可能な位置で、scFvに導入し得ることが明らかにされた。3つの単一のMet形態は全て、ヒト化28D2から構築されており、これを、Aha NNAAがメチオニン残基の代わりに導入されている大腸菌で発現させ、機能的活性について試験した。3つの形態全てが、完全な生物学的活性を保持していた(図15)。さらに、それらは全て、高い親和性を保持していた。

30

【 表 2 6 】

表 26: 異なる位置でAhaを有する28D2の親和性

scFv	$K_a (M^{-1}s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
28D2	$9,18 \times 10^5$	$1,002 \times 10^{-4}$	109
28D2 N-Aha	$1,46 \times 10^6$	$8,99 \times 10^{-4}$	62
28D2-C Aha	$1,45 \times 10^6$	$7,60 \times 10^{-5}$	52
28D2-L Aha	$1,30 \times 10^6$	$6,88 \times 10^{-5}$	53

40

【 0 4 3 0 】

(実施例7: ヒト化scFvのPEG化及び再フォールディング)

(二重特異性体調製の一般的概観)

二重特異性scFvは、2つの異なるscFv抗原結合ドメインをリンカーによって互いにコンジュゲートさせることにより構築される。この戦略は、各scFvが二官能性リンカーにコンジュゲートされる2工程プロセスで実現される。二重特異性コンジュゲートを含む2つのsc

50

Fvは、各々、特異的なコンジュゲーション部位の役割を果たす位置で単一の非天然アミノ酸(Aha又はその他)を含む。リンカーは、ホモ二官能性又はヘテロ二官能性であることができ、scFvに含まれる非天然アミノ酸(Aha)と反応性がある相補的官能基(アルキン)を含む。反応スキームは、以下の実施例で詳述されているように、本発明者らによって、いくつかの二重特異性scFvの良好な作製にうまく適用されている(下記スキーム1)。

【0431】

これらの実施例で利用されるリンカーは、PEG(ポリエチレングリコール)である。PEGは、最終的な二重特異性生成物で望ましく、かつscFvに特有の問題を解決するいくつかの化学的特性を有する。PEG化は、タンパク質溶解性を向上させ、scFv安定性を増大させ、scFvの凝集及び沈殿を低下させる。さらに、PEG化は、scFv二重特異性生成物の血清半減期を増大させることが示されている。PEGなどの長くて柔軟なリンカーは、2つの抗体断片の物理的隔離を増大させ、それらが互いに独立に再フォールディングするのを可能にする。これは、遺伝子融合によって連結された二重特異性抗原結合ドメインの再フォールディングで起こり、そのために、2つのドメインの無制御でかつ望ましくない架橋が生じる傾向がよくある、極めて重大な問題の1つを解決する。

【0432】

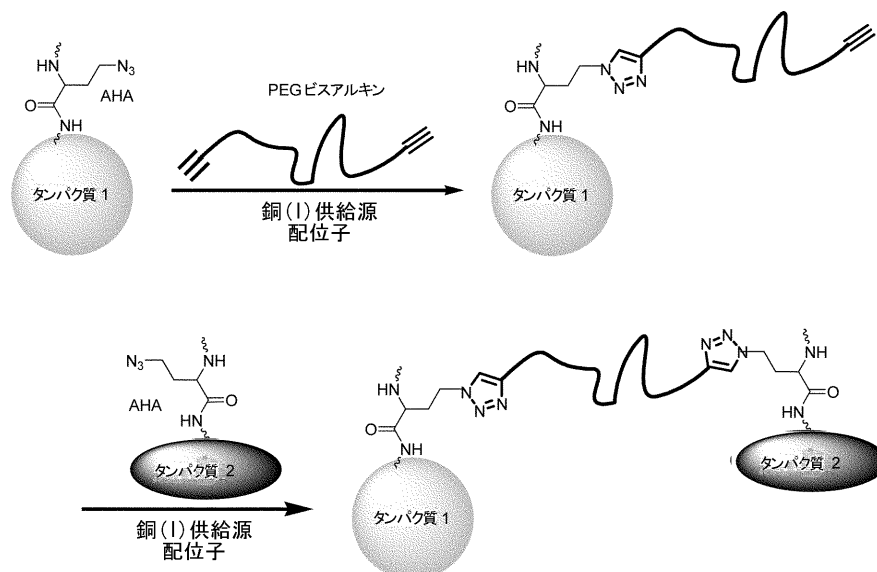
PEGリンカーの使用は、化学合成の柔軟性のために、さらなる利点を有する。PEGは、scFvタンパク質に組み込まれる任意の非天然アミノ酸との相補的反応パートナーとなるように容易に官能化することができる。PEGは、多価タンパク質ハイブリッドの構築を可能にする複数のコンジュゲーション部位を有するように官能化することもできる。PEG官能化は、所望のコンジュゲーション化学反応に応じてホモ二官能性又はヘテロ二官能性PEGを用いて行なうことができる。PEGの構造は、薬物動態及び生体活性に影響を及ぼし得る線状又は分岐状のパリエーションに合わせることができる。

【0433】

scFvをリンカーにコンジュゲートさせるために用いられる化学反応は、20種の天然アミノ酸に対して直交性である。scFv-PEGコンジュゲート及び二重特異性体の調製において、ここでは、アジド-アルキン銅媒介性の環状付加を用いる。典型的なシーケンスにおいて、アジドホモアラニン(Aha)を含むscFvを、アルキンで官能化された過剰量のホモ二官能性PEGリンカーと反応させる。一価のPEG化材料を精製し、その後、PEGリンカーの遊離のペンダントアルキンは、Ahaを含む第二のscFvとの第二の銅媒介性アジド-アルキン環状付加を経て、二重特異性体を生じさせる。

【化6】

スキーム 1



【0434】

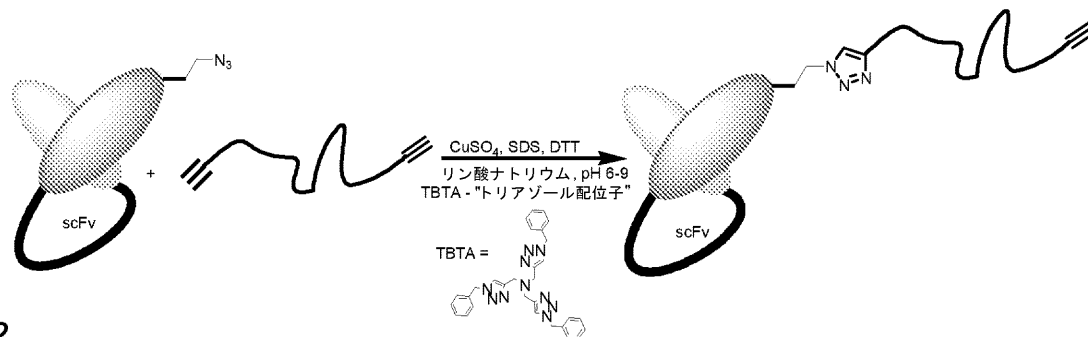
(工程1の概観)

二重特異性体の調製の第一工程は、アジドホモアラニン(Aha)などの非天然アミノ酸を含むscFvのPEG化による部位特異的PEG化であり、該PEGは、ホモ二官能性(例えば、ビス-アルキン)又はヘテロ二官能性(例えば、少なくともモノ-アルキン)のどちらかである。一価のPEG化scFvを、このプロセスの第二工程の前に、一連のCHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーによって精製する。また、一価材料を、再フォールディングされるその能力について評価する。最後に、再フォールディングされた材料を活性についてバイオアッセイにより評価する。

【0435】

非天然アミノ酸のアジドホモアラニン(Aha)を含むscFvのPEG化は、過剰のPEGビス-アルキン(2~100当量)で進める。種々のPEG分子量が使用されている。コンジュゲーションに使用されるアジド-アルキン環状付加は、CuIなどの銅(I)供給源に由来するか、又は銅(II)供給源(CuSO₄)を、DTT、システイン、β-メルカプトエタノール、グルタチオン、シスタミン、トリス-カルボキシエチルホスフィンなどの還元剤で還元することによって得られる銅(I)によって媒介される。トリス[(1-ベンジル-1H-1,2,3-トリアゾル-4-イル)メチル]アミン、TBTAなどの配位子も反応混合物に含まれる。TBTAなどの配位子は、反応性の銅種を安定化し、反応収率を改善することが示されている。反応pHは、リン酸ナトリウムバッファ、トリス、又はHEPESなどの緩衝化試薬の添加によって、3~10、又は場合により、6~9に保持される。SDSなどのさらなる添加剤を用いて、反応条件及びタンパク質動力学を向上させることができる。Ahaなどの非天然アミノ酸をscFv配列の骨格のどこかに組み込む能力は、後に、PEG化がこの所定の場所で起こることを可能にする。これらの実施例では、PEG化は、scFvのC末端、及びN末端で示されているが、さらなるプログラムされた場所でも同様に起こり得る。この一般化された手順は、いくつかの抗IL-6 scFv及び抗IL-23 scFvをPEG化するのにうまく利用されている。(スキーム2)。

【化7】



スキーム 2

【0436】

反応後、一価のPEG化scFvを未反応のscFv及びPEGから分離することができる。これは、後の二重特異性体調製工程における副生成物の形成を防ぐ。その目的のために、通常、混合物を遠心分離又は濾過して、固体微粒子を除去し、溶液を過剰の還元剤、例えば、DTTで処理する。その後、該溶液は、一連のクロマトグラフィー工程を経る。一価scFv-PEGの精製の第一工程は、還元された反応混合物をCHTカラムに充填することであり、このカラムは、反応中のscFv及びscFv-PEG生成物を捕捉するが、未反応PEGには全く結合しない。反応中のscFv及び生成物scFv-PEGは、CHTカラムからのリン酸塩溶出によって部分的に又は完全に分割することができる。所望の画分をプールし、その後、残りの未反応のscFvを分離することができるサイズ排除カラム(SEC)に充填する。SECの後、材料は、次の工程で使用されるか、又は再フォールディング実験を経るのに十分に純粋である。

【0437】

(7.1 抗IL-6 scFvのコンジュゲーション)

(7.1.1 30kDa PEGへの28D2c Ahaのコンジュゲーション)

磁気攪拌棒を備えた250mLのガラスビーカーに、リン酸ナトリウムバッファ(250mM、p

H7.4、7.1mL)及びSDSの溶液(10%wt/vol、3.3mL)を入れた。28D2c Ahaの溶液(2.81mg/mL、1当量、53mL)及び30K PEGアルキンの溶液(10%wt/vol、2mM、60mg/mL、8.7当量、22mL)を添加した。TBTAトリアゾール配位子及びヨウ化銅のDMSO溶液(両成分とも80mM、2.8mL)を速やかに添加すると、沈殿が生じた。混合物を5分間静置させておき、その後、撹拌を開始した。該混合物を一晩(18h)撹拌し、その後、SDS-PAGE(還元型)及びレーザーデンシトメトリーでアッセイすると、56%の収率が示された。

【0438】

該反応混合物を50mLの遠心分離チューブに注ぎ入れ、遠心分離した(12,000g、10分)。上清をDTT(1.5g)に注ぎ入れ、窒素下で1時間撹拌した。CHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーの組合せによって、精製を達成した。

10

【0439】

(7.1.2 PEGビス-アルキンによる28D2c AhaのPEG化)

磁気撹拌子を備えた50mLの丸底フラスコに、水(9.7mL)、及び28D2c Ahaの溶液(2.58mg/mL、1当量、8.7mL)を添加した。この溶液に、20K PEGビス-アルキンの溶液(3mM、60mg/mL、4当量、1mL)を添加した。TBTAトリアゾール配位子(48mg)を添加し、溶液を数分間静置させておいた。ヨウ化銅のDMSO溶液(40mM、DMSO溶液、1.1mL)を添加し、丸底フラスコに蓋をして、混合物を一晩(16h)撹拌した。反応混合物をSDS-PAGE(還元型)及びデンシトメトリーで解析すると、42%の収率が示された。

【0440】

該反応混合物を50mLの遠心分離チューブに注ぎ入れ、遠心分離した(12,000g、10分)。上清をDTT(462mg)に添加し、窒素下で1時間撹拌した後、-20℃で保存した。

20

【0441】

(7.1.3 20K PEGビス-アルキンによる13A8n AhaのPEG化)

磁気撹拌棒を備えた400mLのガラスビーカー中に、リン酸ナトリウムバッファー(50mM、pH7.4、14mL)、ドデシル硫酸ナトリウムの溶液(10%wt/vol、42mL)、及びジチオスレイトールの溶液(250mM、2.7mL)を入れた。13A8n Ahaの溶液(3mg/mL、1当量、86mL)及び20K PEGビス-アルキンの溶液(3mM、60mg/mL、26当量、75mL)を添加した。TBTAトリアゾール配位子(537mg)を添加し、混合物を撹拌しないで静置させておいた。硫酸銅溶液(80mM、6.4mL)を添加し、ビーカーをアルミ箔で覆った。混合物を室温で一晩(16時間)撹拌した。該混合物を、レーザーデンシトメトリーによるゲル解析を伴うSDS-PAGE(還元型)で評価すると、69%の収率が示された。図16A。

30

【0442】

該反応混合物を遠心分離ボトルに注ぎ入れ、遠心分離した(10000g、15分)。上清を250mLのボトルに注ぎ入れ、DTT(3.4g)を添加し、窒素下で1時間撹拌した。セラミックハイドロキシアパタイト(CHT-I、Bio-Rad)クロマトグラフィーと、それに続くサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)(Superdex 200)によって、さらなる精製を達成した。

【0443】

(7.1.4 20K PEGビス-アルキンによる13A8c AhaのPEG化)

スクリーキャップ及び磁気撹拌子を備えた1000mLのガラスボトル中に、リン酸ナトリウムバッファー(50mM、pH = 7.4、58mL)、SDSの溶液(10%wt/vol、112mL)、及びジチオスレイトールの溶液(250mM、7.2mL)を入れた。scFv 13A8c Ahaの溶液(3.5mg/mL、1当量、206mL)及び20K PEGビス-アルキンの溶液(3mM、60mg/mL、25当量、200mL)を該ボトルに添加した。TBTAトリアゾール配位子(1.4g)を添加し、混合物を撹拌しないで静置させておいた。5分後、硫酸銅の溶液(80mM、17mL)を添加し、該ボトルに蓋をして、混合物を適度な速度で一晩撹拌した。青灰色の溶液をSDS-PAGE(還元型)及びレーザーデンシトメトリー解析で評価し、反応物が70%の収率を有することを明らかにした(図16B)。

40

【0444】

該反応混合物を1対の遠心分離ボトルに注ぎ入れ、遠心分離した(10000g、15分)。上清をスクリーキャップ付きの2Lのガラスボトルに注ぎ入れた。DTTを添加し(9g)、容器に窒素を行き渡らせ、1時間撹拌した。反応混合物の精製を、実施例7.1.3と同様に、CHTク

50

ロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーの組合せにより達成した。

【0445】

(7.1.5 40K PEGビス-アルキンによる13A8c AhaのPEG化)

スクリーキャップ及び磁気攪拌棒を備えた500mLのポリカーボネート遠心分離ボトルの中に、scFv 13A8cAHAの溶液(8.8mg/mL、1当量、142mL)、リン酸ナトリウムバッファの溶液(500mMストック溶液、pH = 7.4、23mL)、及びSDSの溶液(20%wt/volストック溶液、8.8mL)を入れた。40K PEGビス-アルキン(9.35g)を該攪拌溶液に固体として添加した。混合物を全てのPEGが溶解するまで攪拌し、TBTAトリアゾール配位子(446mg)を添加し、該混合物を攪拌しないで5分間静置させておいた。攪拌を再開し、新鮮なシステインの溶液(250mMストック、534μL)を添加した。硫酸銅の溶液(160mMストック溶液、2.6mL)を添加し、混合物に窒素を行き渡らせ、適度な攪拌で4時間攪拌した。該反応混合物をレーザーデンスシトメトリーによるゲル解析を伴うSDS-PAGE(還元型)用にサンプリングして、反応収率(51%)を決定した(図16C)。

10

【0446】

攪拌棒を反応容器から取り出し、混合物を高速で遠心分離した(10000g、15分)。上清を500mLのポリカーボネートボトルに注ぎ入れた。DTTを添加し(3g)、容器に窒素を行き渡らせ、1時間攪拌した。反応混合物の精製を、先の実施例と同様に、CHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーの組合せによって達成した。

【0447】

(7.1.6 20K PEGビス-アルキンによる13A8L AhaのPEG化)

磁気攪拌子を備えた250mLの丸底フラスコ中に、極めて純粋な水(12.5mL)、SDSの溶液(10%wt/volストック、17.3mL)、及びscFv 13A8L AHAの溶液(4.11mg/mLストック、26.3mL)を入れた。20K PEGビス-アルキンの溶液(3mM、60mg/mLストック、30mL)を該反応混合物に添加した。TBTAトリアゾール配位子(214mg)を添加し、混合物を攪拌しないで静置させておいた。攪拌を再開し、ジチオスレイトールの溶液(250mMストック、1.08mL)、次いで、硫酸銅の溶液(80mMストック、2.53mL)を添加した。丸底をセプタムで閉じ、一晚攪拌した。翌日、反応混合物をSDS-PAGE(還元型)で評価した。得られたゲルをレーザーデンスシトメトリー解析で解析すると、60%の反応収率が示された(図16D)。

20

【0448】

該反応混合物を遠心分離ボトル(250mL)に移し、遠心分離した(12000g、15分)。上清を250mLのボトルに注ぎ入れ、DTTを添加した(1.5g)。容器に窒素を行き渡らせ、固体が溶解するまで攪拌した。反応混合物の精製を、先の調製と同様に、CHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーの組合せによって達成した。

30

【0449】

(7.2 抗IL-23 scFv Ahaとの反応)

(7.2.1 20kDa PEG-ビスアルキンへのIL-23 31A12c Aha scFvのコンジュゲーション)

スクリーキャップ及び磁気攪拌子を備えた1000mLのガラスボトルに、リン酸ナトリウムバッファの溶液(50mM、pH = 7.4、65mL)、SDSの溶液(10%溶液、80mL)、及びジチオスレイトールの溶液(250mM、5.1mL)を入れた。該溶液を穏やかに攪拌し、IL-23-31A12c Ahaの溶液(pH = 7.4、4mg/mL、1当量、121mL)及び20K PEGビス-アルキンの溶液(60mg/mL、26当量、142mL)を添加した。攪拌を中断し、TBTA(1.1g)を添加した。該材料を沈殿させておき(~5分)、硫酸銅の溶液(80mM、12mL)を添加し、攪拌を再開した。ボトルに蓋をし、混合物を室温で16時間攪拌した。該反応混合物をSDS-PAGE(還元型)で解析し、得られたゲルをデンスシトメトリーで解析すると、出発材料の所望のPEG化生成物への59%変換が示された(図16B)。

40

【0450】

該反応混合物を遠心分離ボトル(500mL)に移し、遠心分離した(10,000g、15分)。得られた上清を滅菌ポリカーボネートボトルに移し、ジチオスレイトールを添加し(6.3g)、該溶液を窒素下で1時間攪拌した。さらなる精製を、実施例7.1.3で実施されたようなCHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーによって達成した。

50

【 0 4 5 1 】

(7.2.2 20K PEGビス-アルキンによる45G5c AhaのPEG化)

磁気攪拌子を備えた250mLの丸底フラスコ中に、リン酸ナトリウムバッファ(50mM、pH 7.4、74mL)を入れ、攪拌を開始し、ジチオスレイトールの溶液(250mM、1.9mL)を添加した。scFv 45G5c Ahaの溶液(1.8mg/mL、1当量、53mL)及び20K PEGビスアルキンの溶液(3mM、60mg/mL、25当量、27mL)を該攪拌溶液に添加した。攪拌を中断し、TBTAトリアゾール配位子(382mg)を添加し、混合物を5分間静置させておいた。硫酸銅溶液(80mM、4.5mL)を添加し、フラスコにゴム製のセプタムで蓋をした。混合物を設定を最低にして一晩(16時間)攪拌した。反応をSDS-PAGE(還元ゲル)でアッセイし、ゲルをデンシトメトリーで解析すると、40%の収率が示された(図16E)。

10

【 0 4 5 2 】

該反応混合物を遠心分離ボトルに移し、ティルトローターで遠心分離した(10,000g、15分)。上清を新しいポリカーボネートボトルに注ぎ入れ、攪拌棒及びDTT(2.4g)を添加し、窒素下で1時間攪拌した。精製を、実施例7.1.3で実施されたようなCHTクロマトグラフィーと、それに続くサイズ排除クロマトグラフィーによって達成した。

【 0 4 5 3 】

(7.4 フォールディング:)

フォールディングは、変性したscFv-PEG(例えば、8M尿素中)を取り、それを(例えば、透析又は接線流濾過によって)酸化還元系(例えば、システイン/シスチン)を含む部分変性バッファ(例えば、3M尿素)中に交換し、その後、それを非変性バッファ(例えば、リン酸緩衝化食塩水)中に交換することによって生じることができる。

20

【 0 4 5 4 】

(7.4.1 28D2c-PEGのフォールディング)

30kDaの線状PEGビスアルキンがC末端にコンジュゲートされたscFv 28D2をフォールディングさせた。28D2c-PEGをまず精製し、バッファを9M尿素及びジチオスレイトール(DTT)を含むバッファ、pH7.2に交換した。その後、28D2c-PEGを0.05~1mg/mLタンパク質の出発濃度までに希釈した。その後、出発材料を、室温で一晩、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2~6mMシステイン、及び1~3mMシスチンからなる第一のフォールディングバッファ中に透析した。その後、該材料を、室温で一晩、20mMリン酸ナトリウム及び150mM NaCl、pH7.4からなる最終的なバッファ中に透析した。

30

【 0 4 5 5 】

再フォールディングした材料は、非還元SDS-PAGEとSECの両方により、単量体と見られる。単量体28D2c-PEGの回収は、0.05~0.25mg/mLタンパク質のタンパク質フォールディング濃度で最も良好であった。同様の結果は、6:1~2:3mMの範囲のシステイン:シスチン濃度で達成された。具体的な例として、材料を0.1mg/mLタンパク質、3mMシスチン、及び2mMシステインでフォールディングさせたとき、SECによる単量体回収は37%であり、生成物のEC50は116pg/mLであり(図17A)、SPR(本質的に実施例1.4と同様に実施された)で測定された結合親和性を表27に示す。

【表 2 7】

表 27: 尿素からの透析によって再フォールディングされたフォールディングした28D2c-PEGの結合親和性

40

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)
28D2c-PEG	5.07×10^5	9.78×10^{-5}	193.3
28D2cAha	1.05×10^6	7.10×10^{-5}	67.4

【 0 4 5 6 】

フォールディングは、変性したscFv-PEGを取り、それを部分変性バッファ中に速やかに希釈し、その後、それを非変性バッファ中に交換することによって生じることでもある。この方法のための出発材料は、尿素若しくはグアニジン中で変性させたか、又はSDS

50

中で変性させたscFV-PEGを含むことができる。

【0457】

9M尿素及びDTTを含むバッファー、pH7.2中の28D2c-PEG、1mg/mLを、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2～6mMシステイン、及び1～3mMシスチンからなる第一のフォールディングバッファー中に0.05～0.1mg/mLになるまで速やかに希釈し、その後、同じバッファー中で、室温で一晩透析した。その後、該材料を、20mMリン酸ナトリウム及び150mM NaClからなる最終的なバッファー、pH7.4中に、室温で一晩透析した。具体的な例として、材料を、2mMシステイン及び2mMシスチンを用いて、0.1mg/mLでフォールディングさせたとき、SECによる単量体回収は38%であり、生成物のEC50は138pg/mLであった。

【0458】

10

0.1% SDS及びDTTを含むバッファー、pH7.25中、0.52mg/mLタンパク質の28D2c-PEGを、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2～6mMシステイン、及び1～3mMシスチンからなる第一のフォールディングバッファー中に速やかに希釈し、その後、同じバッファー中で一晩透析した。200倍希釈を用いて、最終SDS濃度を0.0005%にまで低下させた。任意に、該フォールディングバッファーは、400mMアルギニン及び/又は150mM NaClも含んでいた。或いは、該フォールディングバッファーは、システイン/シスチンの代わりに、2mMグルタチオン及び2mM酸化グルタチオンを含んでいた。その後、該材料を、5 で3日間、20mMリン酸ナトリウム及び150mM NaClからなる最終的なバッファー、pH7.4中に透析した。その後、該材料を、Millipore Centriprep濃縮装置(10,000 MWCO)を用いて20倍濃縮した。

【0459】

20

具体的な例として、材料を3mMシスチン及び2mMシステインでフォールディングさせたとき、SECによる単量体回収は20%であり、生成物のEC50は256pg/mLであった。これらの試料によるIL-6結合反応速度をSPRで決定した。これを表28に示す。(SPRは、本質的に実施例1.4と同様に実施された)

【表28】

表 28: SDSからの速やかな希釈によって再フォールディングされた28D2c-PEGの結合親和性

	$K_a (M^{-1}s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
28D2c-PEG	3.26×10^5	1.04×10^{-5}	319.4

30

【0460】

フォールディングは、グアニジン中で変性させた出発材料からの交換及び/又は希釈によって生じることでもある。6M塩酸グアニジン及びDTTを含むバッファー、pH8.0中で28D2c-PEGを調製した。その後、該材料を、フォールディングバッファー中に透析するか、又は速やかに希釈した後、該バッファー中に透析し、その後、PBS中に透析した。フォールド中のタンパク質濃度は0.05～0.25mg/mLであり、フォールドバッファーは、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2mMシステイン、及び2mMシスチンからなっていた。任意に、フォールドバッファーは、400mMアルギニンも含み、任意に、150mM NaClも含んでいた。具体的な例としては、タンパク質濃度が0.25mg/mLであるとき、SECによる単量体回収は22%であり、生成物のEC50は150pg/mLであった。

40

【0461】

(7.4.2 他のPEG化scFvのフォールディング)

線状PEG 20kDaがN末端又はC末端にコンジュゲートされたscFvの13A8n、13A8c、13A8L、及び31A12cも同様の方法でフォールディングさせた。これらのscFv-PEGを8M尿素及びDTTを含むバッファー中で調製し、0.05～0.5mg/mLの総タンパク質になるまで希釈した。その後、それらを、室温で、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2～6mMシステイン、及び1～3mMシスチンを含むフォールドバッファー中に透析した。交互に、pH8若しくは9、4M若しくは2M尿素、1%ポリソルベート80、及び/又は4 での透析も用いた。タンパク質は、ポリソルベ

50

ート80を添加した、又はポリソルベート80を添加していない、尿素を含まないフォールドバッファ中への透析によってフォールディングさせることもできた。フォールディングを、PBS、又は酸化還元系(2～6mMシステイン及び1～3mMシスチン)を含むPBS中への透析によって完了させた。具体的な例を表29に示す。

【表 2 9】

表 29

材料	フォールド中の総タンパク質濃度 (mg/mL)	システイン (mM)	シスチン (mM)	SECによる単量体回収	EC50 (pg/mL)
13A8c-PEG20	0.1	4	2	>95%	93
13A8n-PEG20	0.1	4	2	43%	1976
13A8L-PEG20	0.1	4	2	75%*	278
31A12c-PEG20	0.1	4	2	55%	1040

*13A8Lの回収をSDS PAGEで決定した。

【 0 4 6 2 】

回収は、0.05～0.1mg/mLでのタンパク質フォールディングの場合に最も良好であった。フォールドバッファ中での尿素の非存在下での31A12c-PEGのフォールディングによって、生成物中のジスルフィド結合がより多い高分子量種が得られた。PEG化scFvを、異なる温度での安定性について評価し、哺乳動物で発現させた非PEG化scFvと比較した。2つのPEG化種、13A8c-PEG及び31A12c-PEGは、13～20日間の期間にわたって、その全ての活性を保持していた(図17B及び17C)。

【 0 4 6 3 】

PEG化scFvのT_m測定によって、これらの分子の安定性がさらに確認された。31A12-PEGは、69.9 のT_mを有することが分かった。13A8-PEGは、66.1 のT_mを有することが分かった。

【 0 4 6 4 】

(7.4.3 非PEG化scFvのフォールディング)

同様のフォールディング方法を、非PEG化scFv[例えば、13A8c及び22H8c]をフォールディングさせるために用いることができた。これらの方法は、望ましい場合、コンジュゲーションの前にタンパク質をフォールディングさせるのに有用であり得た。具体的な例として、3つのバッチの13A8cを、3M尿素、4mMシステイン、2mMシスチン、30mMトリスを含むバッファ、pH8.5中、0.1mg/mLの総タンパク質でフォールディングさせ、その後、PBS中に透析した。この再フォールディングプロトコルは再現性があり、SDS-PAGEによる3つのバッチからの単量体13A8c回収率は、それぞれ、37%、35%、及び44%であった。再フォールディングされた非PEG化22H8c scFvは、親mAbと比べて高い効力を保持していた。

【 0 4 6 5 】

(実施例8:scFv-PEG-scFv二重特異性抗IL-6/IL23コンジュゲートの作製)

抗IL-6/抗IL-23 scFv PEGコンジュゲートの作製の次の工程は、Ahaなどの非天然アミノ酸を含むscFvの、実施例7で調製されたscFv-PEGアルキンコンジュゲートへのコンジュゲーションである。コンジュゲーション反応後、混合物をクロマトグラフィーの組合せによって精製し、その後、再フォールディングプロセスを経ると、所望のscFv-PEG-scFv二重特異性体得られる。最終的な材料を、生体活性及び薬物動態特性、並びに疾患モデルにおける効力について評価する。

【 0 4 6 6 】

二重特異性体調製における第二の化学工程は、精製された一価体(scFv-PEG)の第二のscFvへのコンジュゲーションである。カップリングは、銅媒介性のヒュスゲン環状付加を介

10

20

30

40

50

した第二のscFvのAhaに対する一価scFv-PEGの遊離のペンダントアルキンの反応によって達成される。いくつかの一価scFv-PEGコンジュゲートが良好に作製されており、抗IL-6-scFv-PEG又は抗IL-23 scFv-PEGのどちらかを用いることができる。同様に、Aha含有タンパク質は、抗IL-6 scFv又は抗IL-23 scFvのどちらかであることができる。

【0467】

第二の反応については、反応条件が、第一の工程の銅媒介性の環状付加とは異なる。工程1では、反応条件は、反応を助けるために、過剰のPEG-ビスアルキン及びSDSなどの添加物を用いた。しかしながら、過剰のアルキンの使用は、経済的に実現可能でもないし、精製の観点から望ましくもない。それゆえ、第二の工程は、はるかに厳しい比率のアルキン対アジド(1:1~1:3のアルキン:アジド)反応成分を用いる。さらに、第二の工程のコンジュゲーションは、より大きい希釈で最もうまく行くことが分かった。さらに、このプロセスの第一の工程で利用されるTBTAトリアゾール配位子を最終的に省いた。

10

【0468】

反応混合物の精製は、実施例7で用いたものと同様の、クロマトグラフィーの混合によって進める。反応混合物をまずCHTカラムに充填し、リン酸塩勾配を用いて溶出させる。所望の画分をプールし、その後、SECカラムに充填する。その後、この材料を、再フォールディング条件用に、さらに処理することができる。

【0469】

上記のプロセスにおいて、コンジュゲーションは、フォールディングに先行する。PEGリンカーの存在は、その後の再フォールディング工程を容易にし、scFvは、最小限の鎖間架橋で独立に再フォールディングする。鎖間架橋は、遺伝子融合によって連結され、かつPEGリンカーを持たない二重特異性コンストラクトでよく生じる重大な障害であり、抗原結合ドメインの相互作用を妨げる。

20

【0470】

(8.1 抗IL-23、抗IL-6二重特異性31A12c-PEG-28D2cの調製)

磁気攪拌棒を備えた1Lのガラスビーカー中に、リン酸ナトリウムバッファー(125mM、pH 7.4、486mL)を入れた。28D2c Ahaの溶液(4.2mg/mL、5.1mL)及び31A12c-PEGの溶液(0.49mg/mL、44mL)を添加した。TBTAトリアゾール配位子及びヨウ化銅の溶液(両成分とも80mM、16mL)を添加すると、沈殿が形成した。混合物を一晚(16時間)攪拌した。反応混合物をSDS-PAGE(還元型)及びデンストメトリーで解析した(収率=29%)。

30

【0471】

該反応混合物を2つの遠心分離ボトル(500mL)に分けて、遠心分離し(10000g、30分)、上清を捨てた。1つのボトルに、SDSの溶液(8%wt/vol)及びTPPTSの溶液(1M HEPES、pH7.4、25mL中、500mM TPPTS)及びリン酸ナトリウムバッファー(10mM、25mL)を添加した。材料が溶解するか又は完全に懸濁されるまで、該ボトルを転頭運動及び旋回させた。中身を第二の遠心分離ボトル/ペレットに移し、第一の遠心分離ボトルから2部のリン酸ナトリウムバッファー(10mM、12.5mL)ですすぎ落とした。第二の遠心分離ボトルを、ペレットが溶解するまで、旋回させた。該材料を遠心分離した(10,000g、5分)。上清をさらなる精製のために保持した。

40

【0472】

(8.2 抗IL-23、抗IL-6二重特異性31A12c-PEG-13A8cの調製)

スクリーキャップ及び小型攪拌棒を備えた2000mLのガラスボトルに、水(814mL)、及びジチオスレイトールの溶液(250mM、12mL)を添加し、穏やかに攪拌した。scFv 13A8c Ahaの溶液(0.85mg/mL、35mL)、次いで、31A12c-PEGコンジュゲートの溶液(0.55mg/mL、55mL)を添加した。MESバッファーの溶液(80mM、pH7.5、56mL)及び硫酸銅(80mM、28mL)を添加した。該ボトルに蓋をし、混合物を最低攪拌速度で一晚(16時間)攪拌した。反応をSDS PAGE(還元型)及びデンストメトリーで解析すると、51%の収率が示された。2つのさらなる1000mL反応を同時に実施すると、同様の収率であった。

【0473】

プール反応混合物(3000mL)の一部を遠心分離ボトル(250mLボトル当たり~200mL)に注ぎ

50

入れ、スピニングバケット遠心分離器中で遠心分離した(Sorvall RC-3BP、5000g、15分)。上清を捨てた。さらなるプール反応混合物をペレットに添加し、再び遠心分離した。該反応混合物が全て処理されてしまうまで、このシーケンスを繰り返した。ペレットに、600mLの以下のバッファー、10mMリン酸塩pH=7.4、2%SDS、及び250mM DTTを添加した。攪拌棒を加え、混合物を30分間攪拌し、次いで50℃まで5分間温め、その後、室温でさらに攪拌した。固体をガラス棒で破壊した。TPPTS(Strem、350mM、pH7.6、25mL)を添加し、混合物を1時間攪拌し、その時点で、固体は全て溶解した。該材料をさらなる精製に回した。セラミックハイドロキシアパタイト(CHT-I、BioRad)クロマトグラフィーとサイズ排除(Superdex 6プレップ)クロマトグラフィーの組合せを用いて、二重特異性生成物を精製した。

10

【0474】

(8.3 抗IL-23、抗IL-6二重特異性13A8c-PEG-31A12cの調製)

磁気攪拌子を備えたスクリュウキャップ付きの2000mLのガラスボトル中に、水(830mL)を入れ、ジチオスレイトールの溶液(250mM、12mL)を添加しながら、この溶液を穏やかに攪拌した。scFv 31A12cAhaの溶液(0.88mg/mL、45mL)及びコンジュゲート13A8c-PEGの溶液(0.7mg/mL、30mL)を添加した。MESバッファー(80mM、56mL)及び硫酸銅の溶液(80mM、28.1mL)を添加し、ボトルに蓋をした。一晚穏やかに攪拌し続ける。反応混合物のSDS PAGE解析及びデンストメトリーにより、48%の収率が示された。反応を、2つのさらなる1L反応及び7つのさらなる500mL反応を用いて同時に実施すると、49%の平均収率であった(図18A)。

20

【0475】

プールした6500mLの反応容量を以下のように処理した。2つの遠心分離ボトル(500mL)中に、各ボトルに、およそ450mLの反応混合物を入れた。スイングバケット遠心分離器(5000g、15分)中で遠心分離した。上清を捨て、さらなる反応混合物を各回収遠心分離ボトルに添加し、材料を再び遠心分離した。プールした反応容量が全て遠心分離されてしまうまでシーケンスを繰り返し、ペレット(×2)を保持した。各ボトルに、攪拌棒、及び以下のバッファー(700mL):250mM DTT、2%SDS、10mMリン酸ナトリウムバッファーを添加した。室温で30分間攪拌した。水浴(40℃)中に入れ、10分間攪拌した。さらに30分間攪拌し、その時点で、固体は残っていなかった。2つの溶液をプールした後、CHTカラムに充填した。リン酸塩勾配による溶出。所望の画分を、サイズ排除カラムによるさらなる精製によってプールする。

30

【0476】

(8.4 抗IL-23、抗IL-6二重特異性13A8n-PEG-31A12cの調製)

小型磁気攪拌子を備えたスクリュウキャップ付きの2000mLのガラスボトル中に、水(640mL)及びDTTの溶液(250mM、9.6mL)を入れた。この混合物に、31A12cAhaの溶液(0.88mg/mL、27mL)及び13A8c-PEGコンジュゲートの溶液(0.42mg/mL、56mL)を添加した。MESバッファー(80mM、45mL)及び硫酸銅溶液(80mM、23mL)を添加し、ボトルに蓋をした。混合物を、最低攪拌速度で、一晚(16時間)穏やかに攪拌した。SDS-PAGE及びデンストメトリーによって、47%の収率が示された。2つのさらなる反応を先に記載したのと同じように調製すると、ゲル解析によって、それぞれ、51%及び47%の収率が得られた。

40

【0477】

3つの反応容量を合わせ、以下のように処理した。2つの遠心分離ボトル(250mL)中に、各ボトルに、およそ200mLの反応混合物を入れた。スイングバケット遠心分離器(5000g、15分)中で遠心分離した。上清を捨て、さらなる反応混合物を各回収遠心分離ボトルに添加し、材料を再び遠心分離した。3つの反応からの反応混合物が全て遠心分離されてしまうまでシーケンスを繰り返し、ペレットを保持した。各ボトルに、攪拌棒、及び以下のバッファー(220mL):250mM DTT、2%SDS、10mMリン酸ナトリウムバッファーを添加した。室温で30分間攪拌した。水浴(40℃)中に入れ、10分間攪拌した。固体が残った。水浴から取り出し、TPPTS溶液(250mM、pH=7.4、5mL)を添加した。攪拌し(1時間)、その時点で、固体は残っていなかった。溶液をプールした後、CHTカラムに充填した。リン酸塩勾配によ

50

る材料の溶出によって、二重特異性体及びさらなるタンパク質成分の半精製混合物が得られた。SECによるさらなる精製によって、所望の二重特異性生成物が得られた。

【0478】

(8.5 抗IL-12/23、抗IL-6二重特異性13A8n-PEG-45G5cの調製)

大きい磁気攪拌棒を備えた2000mLのガラスビーカー中に、水(898mL)及びDTTの溶液(250mM、12mL)を入れた。45G5cAhaの溶液(0.9mg/mL、33mL)及び13A8n-PEGの溶液(0.98mg/mL、30mL)を添加した。硫酸銅溶液(80mM、28mL)を添加し、混合物を一晩攪拌した(16時間)。第二の同一の反応を先に記載した反応と並行して実施した。反応混合物をSDS-PAGE(還元型)及びデンスイトメトリーで評価した(24%収率-反応1及び25%反応2)(図18B)。

【0479】

およそ400mLの反応混合物を遠心分離ボトルに注ぎ入れた(500mL×2、両方の反応混合物を別々にした)。スイングバケット遠心分離器中に入れ、遠心分離した(5000g、15分)。上清を捨てた。反応混合物が全て処理されるまでシークエンスを繰り返し、ペレットだけが残る。該ペレットに、以下のバッファー(200mL):20mMリン酸ナトリウムバッファー、2% SDS、250mM DTTを添加した。30分間穏やかに攪拌した。攪拌しながら、水浴(40℃)中で10分間温めた。室温に戻し、固体が溶解するまで攪拌した。還元された材料をプールし、さらなる精製をCHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーによって達成した。

【0480】

(8.6 抗IL-12/23、抗IL-6二重特異性13A8c-PEG-22H8の調製)

スクリーキャップ及び磁気攪拌子を備えた2000mLのボトル中に、水(950mL)及びDTTの溶液(250mM、14mL)を入れて、穏やかに攪拌した。この攪拌溶液に、scFv 22H8cAhaの溶液(0.75mg/mL、60mL)及び13A8c-PEGコンジュゲートの溶液(0.69mg/mL、35mL)を添加した。MESバッファー(80mM、65mL)及び硫酸銅の溶液(80mM、32mL)を添加し、該ボトルに蓋をして、混合物を一晩攪拌した。SDS PAGE解析及びデンスイトメトリーによって、60%の収率が示された(図18C)。同じ割合のさらに5つの1150mL反応を同時に実施すると、54%の平均収率であった。

【0481】

合わせた6900mLの反応容量を先に記載したのと同様に処理した。2つの500mLの遠心分離ボトル(500mL)に、およそ450mL(×2)の反応容量を入れた。混合物をスイングバケット遠心分離器中で遠心分離した(5000g、15分)。上清を捨て、さらなる反応混合物を各回収遠心分離ボトルに添加し、材料を再び遠心分離した。6900mL全体が処理されるまで、このシークエンスを繰り返した。各ペレットに、以下のバッファー(700mL):250mM DTT、2% SDS、10mMリン酸ナトリウムバッファーを添加した。室温で30分間攪拌した。固体をへらで粉砕し、攪拌をさらに1時間再開した。2つの溶液を合わせ、CHTカラムに充填し、リン酸塩勾配により溶出させた。半純粋な二重特異性体のさらなる精製をSECクロマトグラフィーによって達成した。

【0482】

(8.7 抗IL-23、抗IL-6二重特異性13A8c-40KPEG-31A12cの調製)

磁気攪拌子を備えたスクリーキャップ付きの5000mLのガラスボトル中に、リン酸ナトリウムバッファー(5mMストック溶液、2100mL)を入れた。一価の中間体13A8c-40KPEGの溶液(0.34mg/mLストック、138mL)及びscFv31A12cAHAの溶液(3.2mg/mLストック、26.1mL)を添加した。該溶液を穏やかに攪拌しながら、MESバッファー(80mMストック、141mL)及びジチオスレイトールの溶液(250mMストック、12mL)を添加した。硫酸銅の溶液(80mMストック、70mL)を添加し、該ボトルに蓋をして、一晩穏やかに攪拌し続けた。反応混合物のSDS PAGE解析及びデンスイトメトリーによって、58%の収率が示された。反応を、2つのさらなる2.5L反応及び1つのさらなる1.0L反応を用いて同時に実施すると、58%の平均収率であった(図18D)。

【0483】

プールした8500mLの反応容量を遠心分離して、固体を全て回収した。該固体を以下の後処理バッファー(1700mL):250mM DTT、2% SDS、10mMリン酸ナトリウムバッファーに溶解さ

10

20

30

40

50

せた。最終的な溶液をCHTクロマトグラフィー及びSECクロマトグラフィーの組合せによって精製した。

【 0 4 8 4 】

(8.8 抗IL-23、抗IL-6二重特異性31A12c-20KPEG-13A8Lの調製)

磁気攪拌子を備えた8×30mMのバイアル中に、水(87uL)及びMESバッファー(80mMストック、5.6uL)を入れた。これに、31A12c-20KPEGの溶液(0.550mg/mLストック、3.8uL)及びscFv 13A8LAHAの溶液(4.11mg/mLストック、0.95uL)を添加した。DTTの溶液(250mMストック、1.2uL)及び硫酸銅の溶液(80mMストック、2.8uL)を添加し、バイアルに蓋をし、室温で一晩攪拌させておいた。翌日、反応混合物をSDS-PAGE用にサンプリングした。得られたゲルをレーザーデンストメトリーで解析し、37%の二重特異性体の収率が示された(図18E)

10

【 0 4 8 5 】

(8.9 二重特異性scFvのフォールディング:)

線状の20kDa PEGリンカーを介して13A8にコンジュゲートされた31A12(両方ともC末端にコンジュゲートされている)を、上に示したものと同様の方法でフォールディングさせた。二重特異性分子を、8M尿素及びDTTを含むバッファー、pH7.3中、0.05~0.1mg/mLの総タンパク質で調製した。材料は、この段階で、二重特異性分子の他に、若干量の残留未反応31A12-PEG scFvを含んでいる可能性があった。その後、該材料を、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン中に、室温で一晩透析することによってフォールディングさせた。任意に、1%ポリソルベート80、500mMトリス、又は500mMアルギニンも、該フォールドバッファーに添加したか、又はフォールディングを4で実施することができた。フォールディング反応物を20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH7.4(PBS)中にさらに透析した。具体的な例としては、4つのパッチの0.1mg/mLの31A12c-PEG-13A8cを、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン中、室温で再フォールディングさせ、その後、PBS中に透析した。この再フォールディングプロトコルは再現性があり、同様の単量体二重特異性scFv回収収率及びEC50をもたらした(表30、図19A及び19B)。単量体タンパク質を回収し、得られた分子は、親分子と比べて高い生体活性を保持していた。重要なことに、フォールディングは、大量の31A12c-PEG scFvの存在下でもうまく行った。さらに、表面プラズモン共鳴データによって、IL-6標的(13A8)とIL-23標的(31A12)の両方に対する二重特異性体の両方の末端の生体活性がさらに確認された(表31)。

20

30

【表 3 0】

表 30: 様々なバッチからの単量体二重特異性scFvの回収及びEC50

材料	SECによる単量体回収	抗IL-6 EC50 (pg/mL)	抗IL-23 EC50 (pg/mL)
31A12c-PEG-13A8c A	48%	82	2941
31A12c-PEG-13A8c B	23%	64	1194
31A12c-PEG-13A8c C	41%	136	2038
31A12c-PEG-13A8c D	46%	ND	ND

40

【表 3 1】

表 31: 31A12c-PEG-13A8c二重特異性体の結合親和性

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (pM)
IL-6に対する親和性	2.9×10^5	5.14×10^{-5}	214.9
IL-23に対する親和性	7.73×10^5	7.11×10^{-5}	91.8

【0 4 8 6】

10

20kDa線状PEGリンカーを用いて作製された、二重特異性体のインビボ薬物動態を、裸のscFvのPKと比較した。scFv単体は極めて迅速に排泄され、約2時間の終末 $t_{1/2}$ 、500pg/mlのCmax、1~2時間のtmaxを有し、8時間までにほぼ完全に除去された(図20A)。該二重特異性体は、はるかにより長いインビボ半減期を示し、約24時間の終末 $t_{1/2}$ 、1500pg/mlのCmax、24時間のtmax、及び100時間での血清中での検出可能なレベルを有していた(図20B)。二重特異性scFvの薬物動態挙動のこの改善により、それは、単純なscFvよりもはるかに強力でかつ効果的な治療薬になる。

【0 4 8 7】

20

同じフォールディング方法をPEG化二重特異性13A8n-PEG20-31A12cに用いることができた(C末端ではなく13A8のN末端でのPEG化)。2つのバッチの0.1mg/mLのタンパク質を、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン中でフォールディングさせ、その後、PBS中に透析した。両方のバッチから、SECによる>95%の単量体回収、哺乳動物由来の13A8 scFvの場合の59pg/mlというEC50と比べて、それぞれ、二重特異性体によるIL-6の中和についての1674pg/mL及び1691pg/mLのEC50(図21)、並びにそれぞれ、IL-23の中和についての4956pg/mL及び3249pg/mLのEC50が得られた。単量体タンパク質は、良好な収率で回収された。

【0 4 8 8】

(8.8 さらに二重特異性scFvコンストラクトの再フォールディング)

30

13A8n-PEG-45G5cを、31A12に基づく二重特異性体についての方法と同様の方法でフォールディングさせた。0.1mg/mLのタンパク質を、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン中でフォールディングさせ、その後、PBS中に透析した。これにより、SECによる29%の単量体回収、並びにIL-6に対する933pg/mLのEC50、及びIL-23に対する5,662pg/mLのEC50が得られた(図22A及びB)。

【0 4 8 9】

40

13A8c-PEG-22H8cを上と同様の方法でフォールディングさせた。13A8c-PEG-22H8cを、8M尿素及びDTTを含むバッファー中で調製し、0.05~0.1mg/mLの総タンパク質になるまで希釈した。その後、それらを、室温で、3M尿素、30mMトリス pH8.5、2~6mMシステイン、及び1~3mMシスチンを含むフォールドバッファー中に透析した。交互に、pH8若しくは9、0.01~1%ポリソルベート80、及び/又は4での透析も用いた。フォールディングをPBS中への透析により終了させた。具体的な例としては、0.1mg/mLの13A8c-PEG-22H8cを、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン、0.05%ポリソルベート80中で、室温でフォールディングさせ、その後、0.05%ポリソルベート80を含むPBS中に透析した。これにより、SECによる35%の単量体回収、並びにIL-6の中和についての246pg/mLのEC50、及びIL-23の中和についての234pg/mLのEC50が得られた(図23A及びB)。

【0 4 9 0】

13A8c-40KPEG-31A12cを、20K二重特異性体についての方法と同様の方法でフォールディングさせた。0.1mg/mLのタンパク質を、3M尿素、30mMトリス pH8.5、4mMシステイン、2mMシスチン中で、4でフォールディングさせ、その後、4でPBS中に透析した。これにより、SECによる56.3%回収、並びにIL-6に対する137.5pg/mLのEC50及びIL-23に対する2699pg/mLのEC50が得られた(図24A及びB)。さらに、13A8c-40KPEG-31A12cを、室温と4の両

50

方の温度での、0.5M塩酸グアニジンを含む再フォールディングバッファー中への透析によって、より高い濃度(0.5mg/mL)で再フォールディングさせることもできた。

【0491】

13A8c-40KPEG-31A12c二重特異性体のインビボ薬物動態を、13A8c-20KPEG-31A12c、13A8c-PEG、及び裸の28D2のPKと比較した(図25A及びB)。被験物質をラットの皮下に1mg/kg(二重特異性体及び裸のscFv)又は0.5mg/kg(13A8c-PEG)で投与した。投与後に時間間隔を空けて採血し、血清を、B9 IL-6中和アッセイを用いて、被験物質の存在についてアッセイした。結果は、裸のscFvが速やかに排除される一方で、二重特異性体及び13A8c-PEGが、有意により大きい半減期及びAUCを有することを示している。13A8c-40KPEG-31A12cもまた、13A8c-20KPEG-31A12cと比べて有意に増大したAUCを示している(図25B)。

10

【0492】

再フォールディングした二重特異性コンジュゲートは、4 で最大6カ月間の優れた安定性を示した。13A8-PEG-31A12二重特異性体は、抗IL-6アッセイと抗IL-23アッセイの両方で一貫した効力を示した。SDS-PAGE解析でもSECクロマトグラフィーでも、分解はほとんど観察されなかった。

【表32】

時間 (5°C)	IL6の効力 (任意単位)	IL23の効力 (任意単位)	t0からの純度の変化 (還元型SDS-PAGE)	SECによる単量 体%
0	100	100	100%	89%
3 wk	105	93	93%	86%
1 mo	124	123	90%	89%
2 mo	139	86	86%	92%
5 mo	84	93	94%	79%
6 mo	84	97	92%	85%

20

30

【0493】

(実施例9:インビトロで測定されるTh17細胞及びTh22細胞の発生に対する二重特異性scFvの効果)

Th17 T細胞サブセット及びTh22 T細胞サブセットは、抗CD3 + 抗CD28を用いた全PBMC若しくは純化T細胞の刺激によるか、又は混合リンパ球培養物中の同種異系細胞によるかのどちらかによって、インビトロで分化させることができる(図26A)。そのようなT細胞の分化は、Th17細胞について特に十分に特徴付けられているいくつかの重要な調節性サイトカインの添加をさらに必要とする。これらの調節性サイトカインは、主に骨髄性細胞に由来しており、該調節性サイトカインの添加は、骨髄性細胞をその調節性サイトカインを放出するように刺激する化合物と併せた該骨髄性細胞の添加と置き換えることができる。LPSを抗CD3とともに用いて、Th17細胞へと分化するように全PBMCを刺激した。多くの研究者により、骨髄性細胞に由来するこれらのサイトカインが、純化されたナイーブT細胞からのTh17の分化を促進することが以前に示されているように、最も良好な結果は、IL-1及びTGF β も添加したときに得られた。Th17 T細胞及びTh22 T細胞は、骨髄性細胞をその調節性サイトカインを放出するように誘導する刺激物質を添加して、同種異系混合リンパ球培養物(MLC)中で分化させることもできる。ペプチドグリカン、IL-1、IL-6、TNF、並びに他の調節性サイトカイン及び炎症促進性サイトカインの分泌を誘導することが知られているので、ペプチドグリカンをその刺激物質としてMLCに添加した。Th22細胞の誘導を研究することが目的である場合、IL-2の添加も必要であった。PBMCを抗CD3/28 + LPS及びTGF β

40

50

で刺激した。5日後、それらをPMA + イオノマイシンで再刺激して、サイトカイン分泌を誘導し、IL-17の発現についてフローサイトメトリーで解析した。PBMC培養物中のTh17細胞のパーセンテージは、これらの培養条件の結果として3倍になった(図26B)。IL-23アンタゴニストと組み合わせてIL-6を含めると、Th17細胞の3倍化が妨げられた。Th22細胞は、抗CD3/28刺激でも見られる(図26C)。同種異系白血球を用いるインビトロのヒトT細胞のインビトロ刺激もまた、高レベルのIL-17産生T細胞を誘導した(図26D)。

【0494】

個々のIL-6アンタゴニスト及びIL-23アンタゴニストの添加は、抗CD3/28培養系でのTh17分化及びTh22分化を阻害した。2つのアンタゴニスト、31A12 scFv及び13A8 scFvの組合せは、どちらかのアンタゴニスト単独よりも効果的であった(図27)。これは、先の実験と同じアンタゴニストによるMLC中でのTh17の阻害の場合にも当てはまる(図28)。13A8c-20kPEG-31A12c二重特異性体は、親キメラmAbである13A8及び31A12の組合せよりも活性があり、どちらかのmAb単独よりも、MLC中でのTh17細胞の阻害が良好であった(図29)。これは、本発明の二価の二重特異性コンストラクトを用いることによって得られる有益な効果を示している。

10

【0495】

(実施例10: インビボで測定されるTh17細胞及びTh22細胞の発生に対するscFvの効果)

インビボでのTH17及びTH22分化の阻害を評価するために、異種移植片モデルを使用した。このモデルでは、ヒト造血幹細胞が免疫不全マウスに移植され、それにより、ヒト免疫系が獲得されている。これらのヒト化NOD-scid IL2rg^{null} (NSG) マウスに、マウスに存在するヒト免疫細胞と同種異系のヒト皮膚を移植する(図30)。その後、それらを、IL-6及びIL-23のPEG化scFvアンタゴニスト(13A8c-PEG及び31A12c-PEG)の混合物で処置する。その後、ヒト免疫系は、ヒトT細胞のエフェクター細胞への分化を介して、この同種異系ヒト皮膚を拒絶する。IL-6アンタゴニスト及びIL-23アンタゴニストは、同種異系皮膚移植の1つの結果であるTh17細胞の分化を阻害したが、これらのアンタゴニストは、皮膚同種移植片の拒絶を阻害せず、その狙いを定めた免疫抑制効果を反映した。簡潔に述べると、新生NSGマウスに放射線照射し、臍帯血由来のヒト造血幹細胞を注射し、その後、12週での末梢血中の生着レベルをスクリーニングした(Brehmらの文献(2010))。生着に成功したマウスに、ヒト同種異系皮膚を移植し、100 µgの抗IL-6及び抗IL-23(13A8c-PEG及び31A12c-PEG)を2日おきに投与した。皮膚移植から30日後、脾臓を摘出し、単一細胞懸濁液をPMA/イオノマイシンで刺激し、細胞内サイトカインについてアッセイした。CD3+/CD4+細胞を、IL-17及びIL-22産生についてフローサイトメトリーで解析した。

20

30

【0496】

サイトカインアンタゴニストで処置していないマウスでは、フローサイトメトリープロファイル(図31A)、及び各サブセット中のTh細胞の数を表す収集データ(図31B)に示すように、極めて顕著なレベルのTH17細胞及びTH22細胞が発達した。皮膚移植後、マウスを、抗IL-6(13A8c scFv-PEG)と抗IL-23(31A12c-PEG)の組合せで30日間処置した。処置マウスにおけるTH17細胞及びTH22細胞の分化は、完全に阻害された。これらのデータは、IL-6及びIL-23が、これらのTH17細胞及びTH22細胞のインビボ分化に必要であることを初めて明確に示している。さらに、これらのデータは、この動物モデルが、ヒトT細胞分化の誘導及び調節をすることができるモデルであることを示している。最後に、これらのデータは、これらのサイトカインの作用をインビボで完全に阻害するためにここで用いられているIL-6アンタゴニスト及びIL-23アンタゴニストの有効性を示している。

40

【0497】

同様の結果は、13A8c-20kPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体についても得られた。図32A~Cに示すように、この二重特異性分子は、一価の抗IL-23試薬よりもTh17分化を阻害するのに効果的である。しかしながら、TH17/22以外の細胞型の白血球マーカーが有意には低下しなかったので、図32D~Lは、該二重特異性体が、一般に免疫抑制性であるわけではないことを示している。

【0498】

50

(実施例11: インビボの乾癬モデルで測定されるTh17細胞及びTh22細胞のエフェクター機能に対するscFvの効果)

炎症部位でのTh17エフェクター機能の阻害を評価するために、ヒトの乾癬皮膚が免疫不全scidマウスに移植されているscid/hu乾癬モデルを用いた。皮膚移植片及び乾癬炎症は、最大2カ月間存続する。このマウスを薬物で2週間処置し、炎症に対する効果を、図33に示すような組織学的解析で測定する。この解析では、13A8c-20kPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体の効果を、表皮厚の有意な低下に明白に見ることができる。この効果は、組織学的切片から定量することもできる。13A8c-20kPEG-31A12cとその一価抗IL-6阻害剤成分、又はIL-6アンタゴニストmAbのトシリズマブ(Actemra)との比較は、移植片がまだマウス表面に存在する間の、病理学者による半定量的臨床スコアリング(図34A)、又は上記のような組織学的切片における表皮厚の定量的測定(図34B)のどちらかによって測定される、どちらかのIL-6アンタゴニスト単体に対する13A8c-20kPEG-31A12cの有意な優位性を示している。さらに、13A8c-20kPEG-31A12cは、TNFアンタゴニストのEnbrelよりも素速く炎症を阻害するように作用する(図34C~D)。

【0499】

(実施例12: インビボで測定されるIL-23媒介性の耳の炎症の発生に対する二重特異性scFvの効果)

ヒトIL-23はマウスIL-23受容体に作用することができるので、ヒトIL-23をマウスの耳に皮内注射すると、該IL-23は炎症を引き起こす。耳に4日間毎日IL-23を注射することにより、ヒトIL-23によって誘導される耳の炎症を阻害する13A8c-PEG-31A12cの能力を測定した。その後、耳の腫脹を測定した(図35A)。IL-23処置が始まる前日に始めて、IL-23処置が始まった翌日に、マウスを処置し、この処置は、耳の腫脹を効果的に阻止した(図35B)。13A8c-PEG-31A12cは、図35Cに示すように、IL-12/23アンタゴニストmAbのStelera(ウステキヌマブ)と少なくとも同じくらい効果的であった。重要なことに、20kDa PEG又は40kDa PEGのどちらかを用いて作製された13A8c-PEG-31A12cによるマウスの処置は、IL-23処置が始まる前日にしか投与されない場合でも、耳の腫脹の非常に効果的な阻害剤となった(図35D)。

【0500】

(実施例13: AZ17のIL-23特異的scFv成分のエピトープマッピング)

31A12 mAbは、これまでに記載されていない独特のエピトープに結合する。使用されたmAbは全て、ヒトIL-12に結合するが(図36B)、31A12及び49B7は、IL-23阻害に特異的であり、ヒトIL-12を阻害しない(図36B)。これらのデータは、これらのmAbがp40鎖に結合することを明白に示している。31A12及び49B7は、IL-12も阻害する22H8と比べて、比較的弱くヒトIL-12に結合する。しかしながら、3つのmAbは全て、サルIL-12に強く結合し(図36B)、かつサルIL-12生体活性も阻害する(図36C)。したがって、31A12及び49B7は、ヒトIL-12活性とサルIL-12活性を識別する。31A12及び49B7は、ヒトIL-12で部分的にマスクされ、サルIL-12、及び両方の種由来のIL-23で露出しているp40エピトープを認識するようである。さらに、AZ17は、ヒトIL-12とヒトIL-23の両方を阻害するp40特異的mAbである、ウステキヌマブの結合を阻害しない。

【0501】

(参考文献)

10

20

30

40

【化 8】

Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PM. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol.* 1987; 17:1411-6.

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunol.* 2007;8; 942-9.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003; 278:1910-4.

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 1221-30.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215: 403-10.

10

Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL. Humanized mouse models to study human diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010 Apr;17(2):120-5.

Dillon PJ, Rosen CA. A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* 1990; 9: 298, 300.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. pp. iii-xxvii, 41-175. National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1992.

20

Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15: 8125-48.

Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF 3rd. The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13668-76.

30

Sehgal D, Johnson G, Wu TT, Mage RG. Generation of the primary antibody repertoire in rabbits: expression of a diverse set of Igk-V genes may compensate for limited combinatorial diversity at the heavy chain locus. *Immunogenetics.* 1999; 50: 31-42.

Zubler RH, Erard F, Lees RK, Van Laer M, Mingari C, Moretta L, MacDonald HR. Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. *J Immunol.* 1985; 134: 3662-8.

40

補足参考文献

Abhinandan KR, Martin AC. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. *Mol Immunol.* 2008; 45: 3832-9.

Allegretti M, Young-Cooper GO, Alexander CB, Newman BA, Mage RG. Preferential rearrangement in normal rabbits of the 3' VHa allotype gene that is deleted in Alicia mutants;

somatic hypermutation/conversion may play a major role in generating the heterogeneity of rabbit heavy chain variable region sequences. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 411-7.

Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One.* 2008; 3:e2189.

Bernstein KE, Lamoyi E, McCartney-Francis N, Mage RG. Sequence of a cDNA encoding Basilea kappa light chains (K2 isotype) suggests a possible relationship of protein structure to limited expression. *J Exp Med.* 1984; 159: 635-40.

10

Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science.* 1988; 240: 1041-3.

Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1987; 196: 901-17.

Degryse E. Influence of the second and third codon on the expression of recombinant hirudin in *E. coli*. *FEBS Lett.* 1990; 269: 244-6.

20

Déret S, Maissiat C, Aucouturier P, Chomilier J. SUBIM: a program for analysing the Kabat database and determining the variability subgroup of a new immunoglobulin sequence. *Comput Appl Biosci.* 1995; 11: 435-9.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119:3573-85.

30

Gouy M. Codon contexts in enterobacterial and coliphage genes. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 426-44.

Gross G, Mielke C, Hollatz I, Blöcker H, Frank R. RNA primary sequence or secondary structure in the translational initiation region controls expression of two variant interferon-beta genes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1990; 265: 17627-36.

40

Guisez Y, Robbens J, Remaut E, Fiers W. Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis. *J Theor Biol.* 1993; 162: 243-52.

Hole NJ, Young-Cooper GO, Mage RG. Mapping of the duplicated rabbit immunoglobulin kappa light chain locus. *Eur J Immunol*. 1991; 21: 403-9.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986; 3219: 522-5.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2001;40:2004-2021.

10

Khudyakov YuE, Neplyueva VS, Kalinina TI, Smirnov VD. Effect of structure of the initiator codon on translation in *E. coli*. *FEBS Lett*. 1988; 232: 369-71.

Knight KL, Becker RS. Molecular basis of the allelic inheritance of rabbit immunoglobulin VH allotypes: implications for the generation of antibody diversity. *Cell*. 1990; 60: 963-70.

Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renauld JC, Becher B. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007; 12:8098-104.

20

Lamoyi E, Mage RG. Lack of K1b9 light chains in Basilea rabbits is probably due to a mutation in an acceptor site for mRNA splicing. *J Exp Med*. 1985; 162: 1149-60.

Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Müller W, Bontrop R, Lemaitre M, Malik A, Barbié V, Chaume D. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: 209-12.

Looman AC, Bodlaender J, Comstock LJ, Eaton D, Jhurani P, de Boer HA, van Knippenberg PH. Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1987; 6: 2489-92.

30

MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*. 1996; 262: 732-45.

Mage RG. Diversification of rabbit VH genes by gene-conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunol Rev*. 1998; 162: 49-54.

40

Martin AC, Thornton JM. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J Mol Biol*. 1996; 263: 800-15.

Meldal M, Tornøe CW. Cu-catalyzed Azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev*. 2008; 108:2953-3015.

Nisonoff A, Rivers MM Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity Arch Biochem Biophys. 1961; 93:460-2.

Nogales KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon m, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E. IL-22 producing "T-22" T cells account for the upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing Th17 T cells. J. Allergy Clin. Immunol. 2009; 123: 1244-1252.

Oresic M, Shalloway D. Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. J Mol Biol. 1998; 281: 31-48.

10

Orlandi R, Güssow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86: 3833-7.

Pogulis RJ, Vallejo AN, Pease LR. In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. Methods Mol Biol. 1996; 57: 167-76.

Sehgal D, Schiaffella E, Anderson AO, Mage RG. Analyses of single B cells by polymerase chain reaction reveal rearranged VH with germline sequences in spleens of immunized adult rabbits: implications for B cell repertoire maintenance and renewal. J Immunol. 1998; 161: 5347-56.

20

Steinberger P, Sutton JK, Rader C, Elia M, Barbas CF 3rd. Generation and characterization of a recombinant human CCR5-specific antibody. A phage display approach for rabbit antibody humanization. J Biol Chem. 2000; 275: 36073-8.

Sørensen MA, Kurland CG, Pedersen S. Codon usage determines translation rate in Escherichia coli. J Mol Biol. 1989; 207: 365-77.

30

Thanaraj TA, Argos P. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. Protein Sci. 1996; 5: 1973-83.

Tiwari A, Sankhyani A, Khanna N, Sinha S. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. Protein Expr Purif. 2010. [Epub ahead of print]

40

Trinchieri, G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. Immunity 2003; 19: 641-4.

Valente CA, Prazeres DM, Cabral JM, Monteiro GA. Translational features of human alpha 2b interferon production in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 5033-6.

Wang A, Winblade Nairn N, Johnson RS, Tirrell DA, Grabstein K. Processing of N-terminal unnatural amino acids in recombinant human interferon-beta in *Escherichia coli*. *Chembiochem*. 2008; 9: 324-30. PubMed PMID: 18098265.

Wang Z, Yang D, Wang Q, Li B, Lü Z, Yu J, Zheng H, Fan P, Tang J, Qian M, et al. High expression of synthetic human interferon-gamma cDNA in *E. coli*. *Sci China B*. 1995; 38: 1084-93.

Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*. 1989; 341: 544-6.

Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: e59.

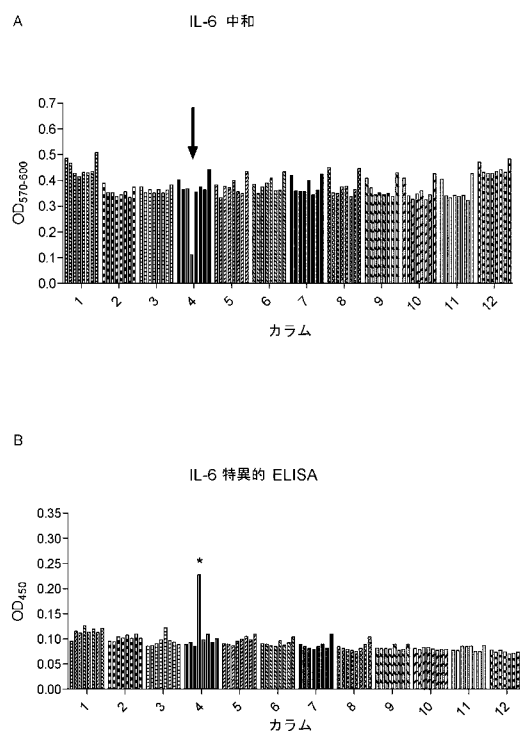
Zhang W, Xiao W, Wei H, Zhang J, Tian Z. mRNA secondary structure at start AUG codon is a key limiting factor for human protein expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349: 69-78.

10

20

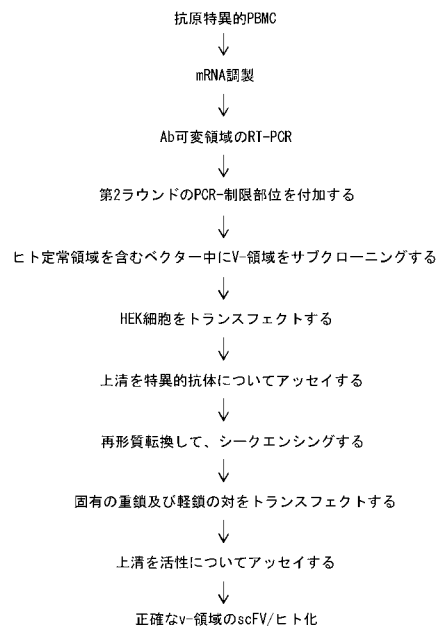
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2

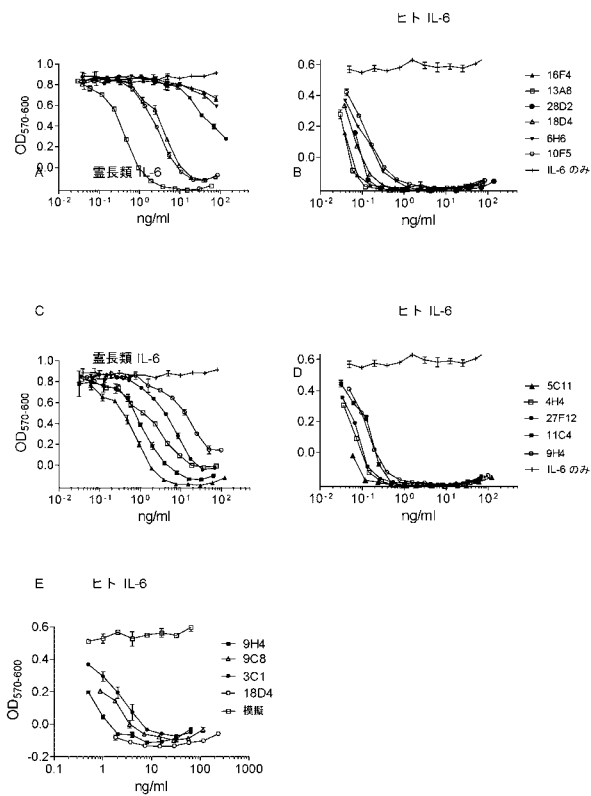


ウサギ
可変

ヒト
定常

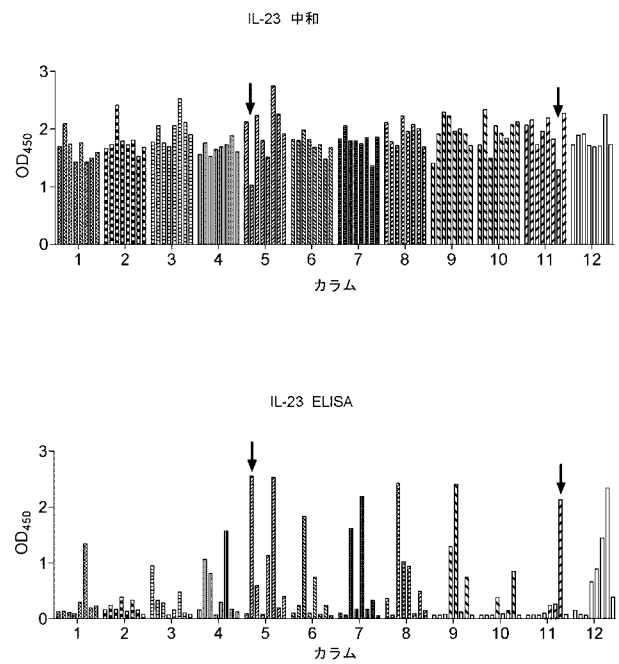
【図 3】

図 3



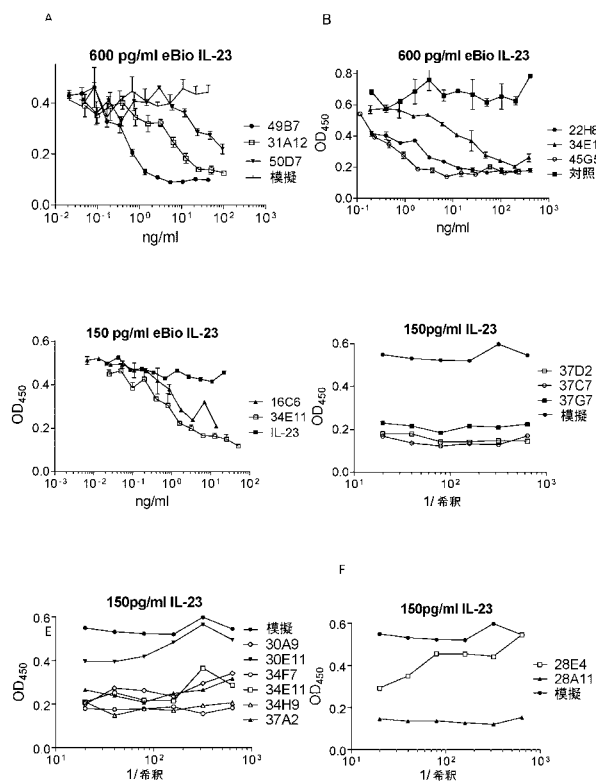
【図 4】

図 4



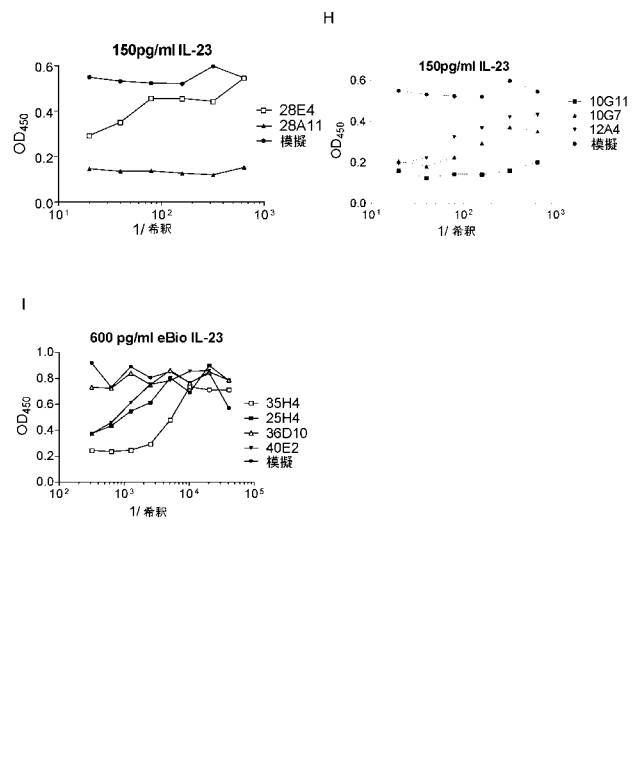
【図 5 - 1】

図 5



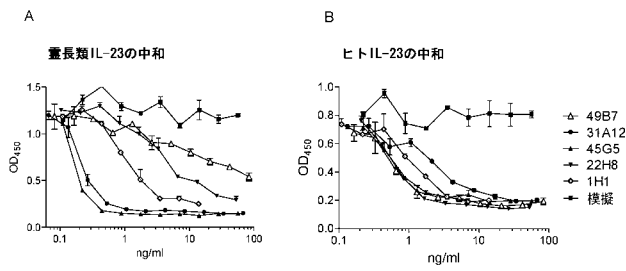
【図 5 - 2】

図 5- 続き



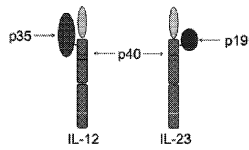
【図 6】

図 6



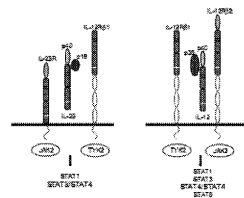
【図 7 A】

A



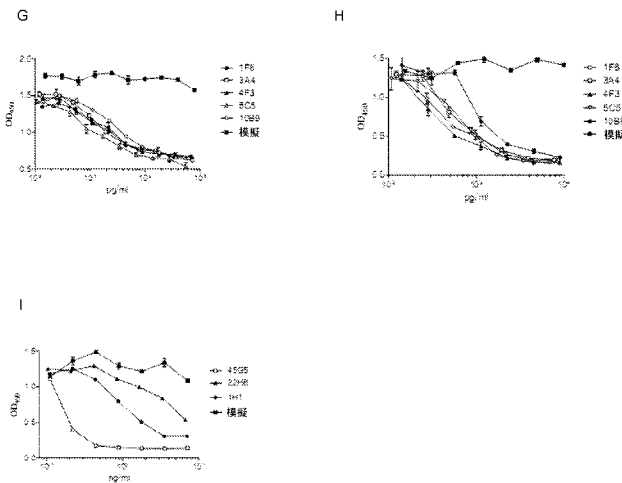
【図 7 B】

B



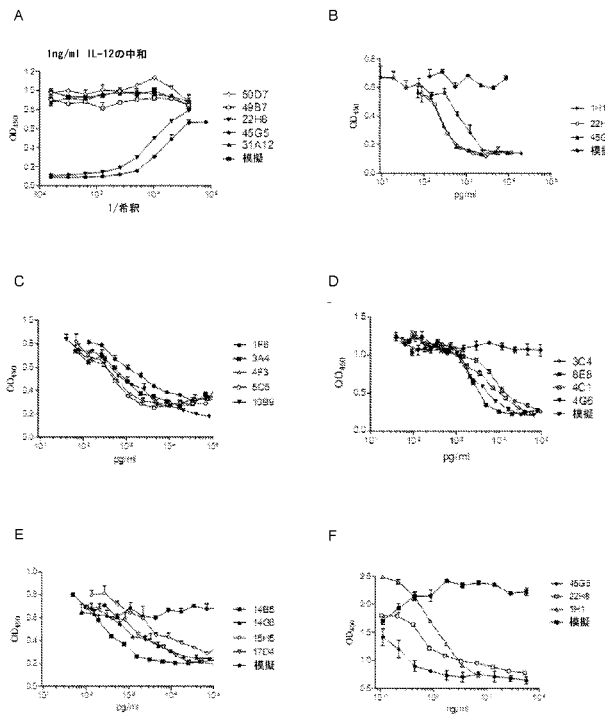
【図 8 - 2】

図 8 - 続き



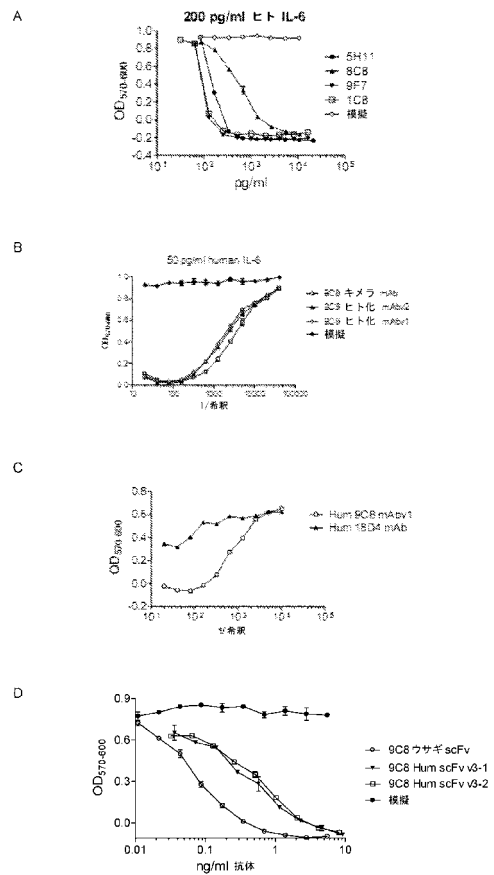
【図 8 - 1】

図 8



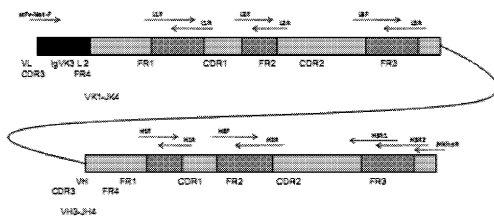
【図 9】

図 9



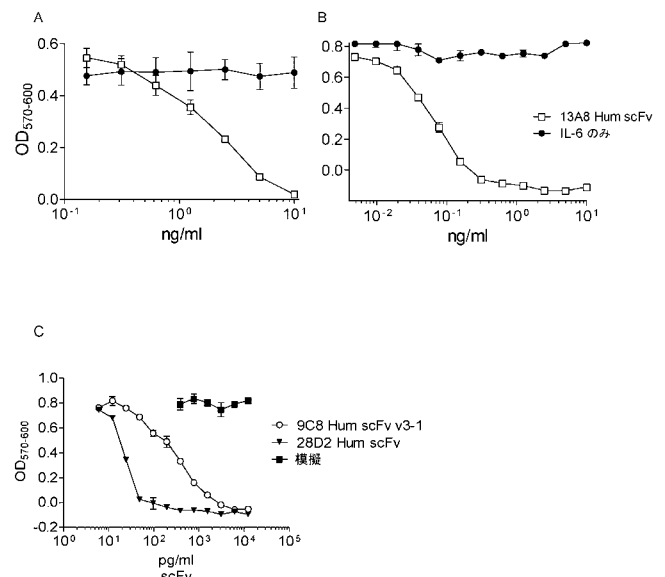
【図 10】

Figure 10



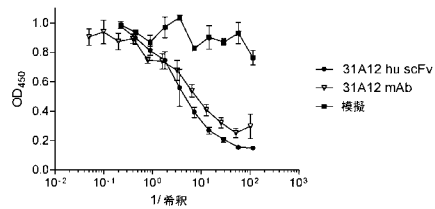
【図 11】

図 11



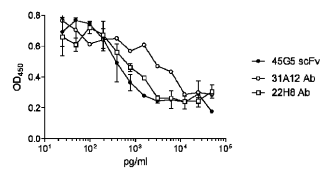
【図 12】

図 12



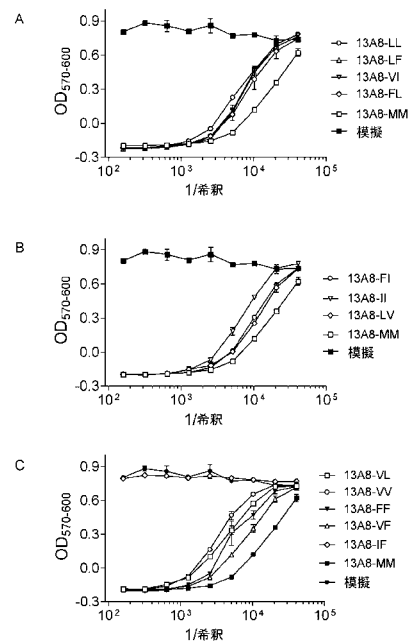
【図 13】

Figure 13



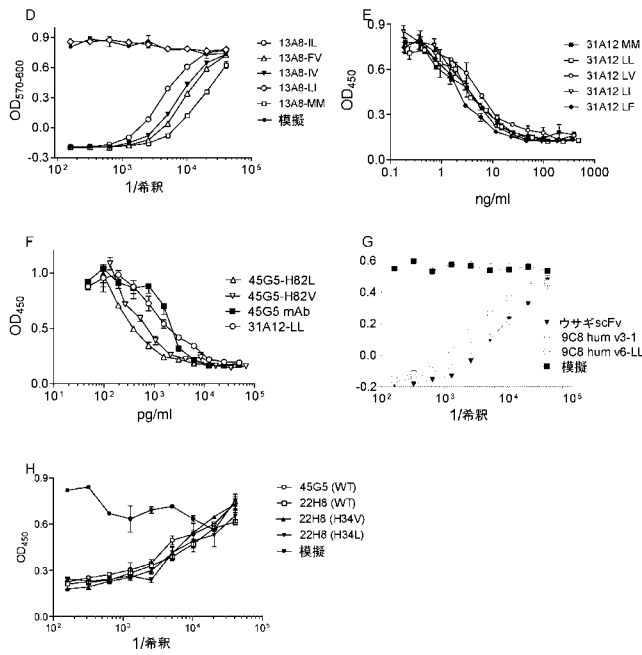
【図 14 - 1】

図 14



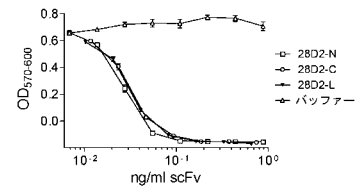
【図 14 - 2】

図 14- 続き



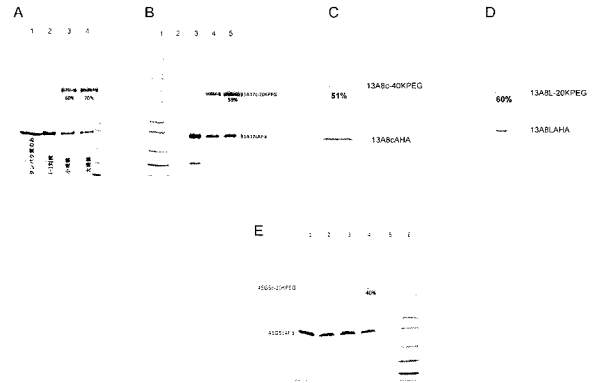
【図 15】

図 15



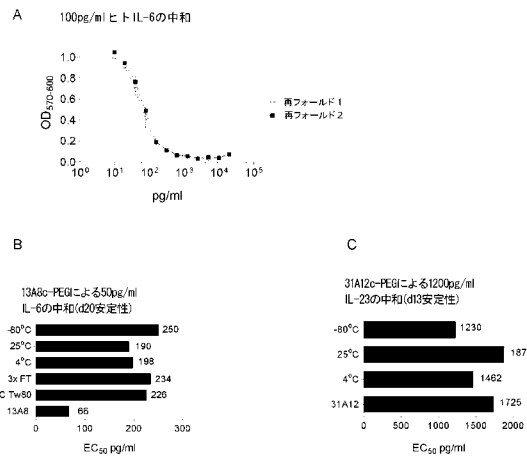
【図 16】

図 16



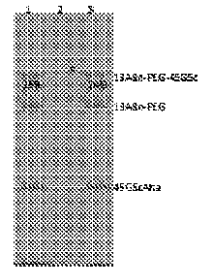
【図 17】

図 17



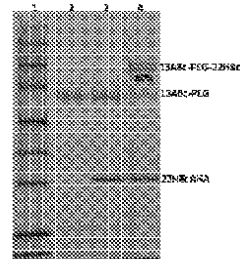
【図 18 B】

B



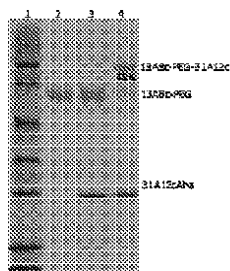
【図 18 C】

C

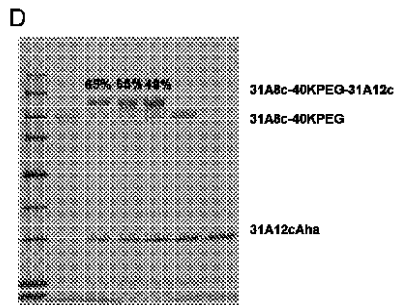


【図 18 A】

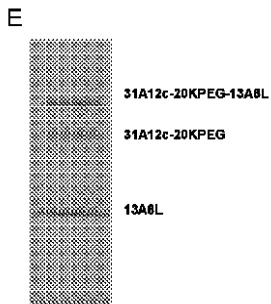
A



【図 18 D】

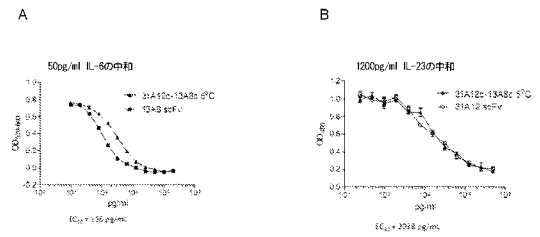


【図 18 E】



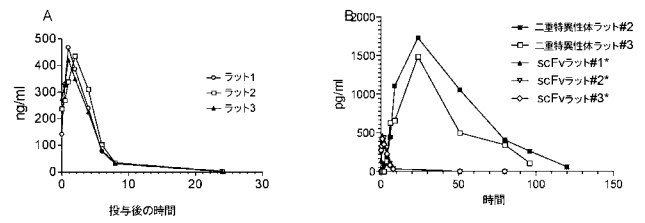
【図 19】

図 19



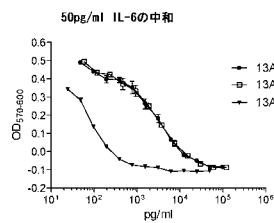
【図 20】

図 20



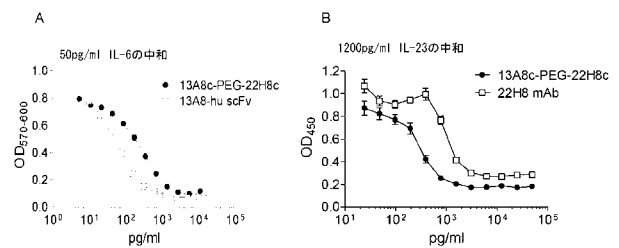
【図 21】

図 21



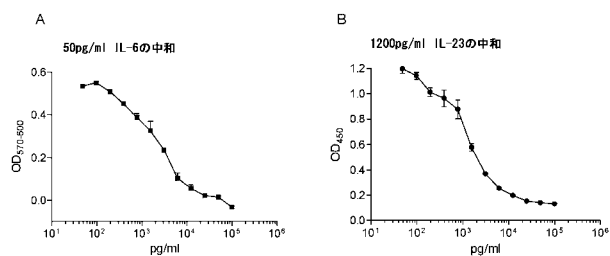
【図 23】

図 23



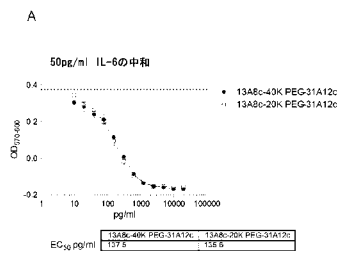
【図 22】

図 22

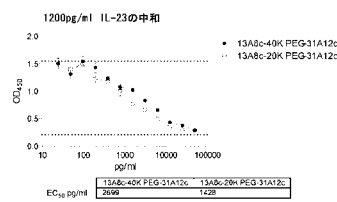


【 図 2 4 】

図 24

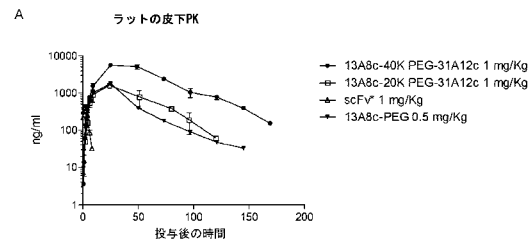


B



【 図 2 5 】

図 25

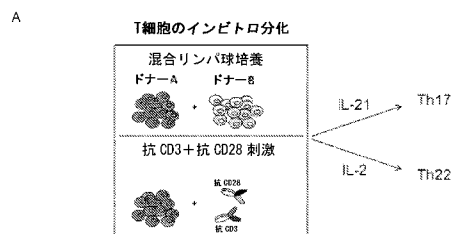


B

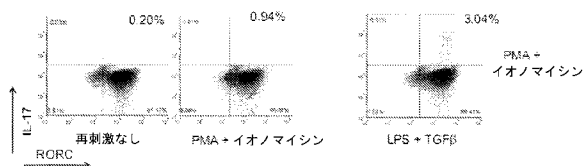
動物	13A8c-40KPEG-31A12c				13A8c-20KPEG-31A12c				13A8c-PEG				scFv			
	F1	F2	F3	平均	F1	F2	F3	平均	F1	F2	F3	平均	F1	F2	F3	平均
T _{1/2} (h)	26.9	28.6	31.5	29.0	24.0	22.1	31.2	25.8	53.0	28.0	27.7	36.6	33.6	1.47	1.79	1.5
Cl _{int} (ml/h)	5815.7	5415.0	5040.0	5279.9	5709.9	5463.0	5100.0	5424.3	994.3	2597.0	1495.0	1865.4	1865.4	456.0	430.0	440.4
Tr _{mean} (h)	40	35	35	36.7	34	34	34	34.0	26	26	25	25.7	0	0	0	0
AUC _{0-24h} (ng·h/ml)	34610.6	33413.0	34330.0	34117.9	32804.6	32814.9	33831.0	33143.5	64993.7	56326.6	60173.4	67444.9	60593.0	1835.0	1983.0	1732.0

【 図 2 6 】

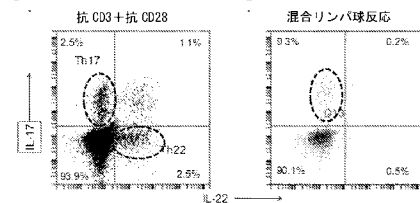
図 26



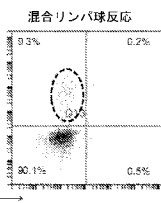
B



C

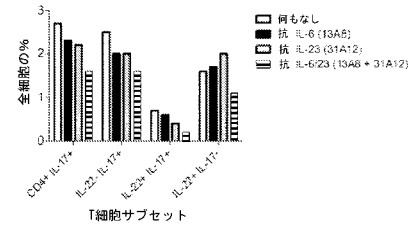


D



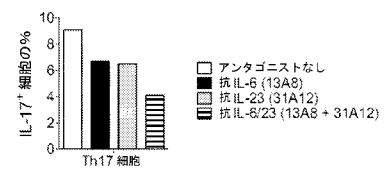
【 図 2 7 】

図 27



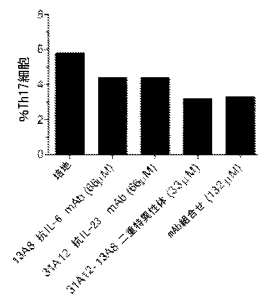
【 図 2 8 】

図 28



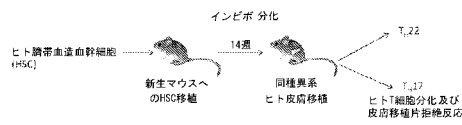
【図 29】

図 29



【図 30】

図 30

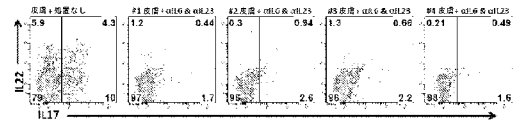


【図 31】

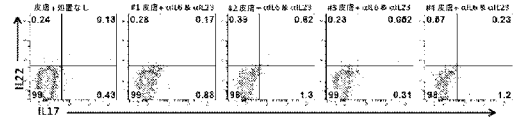
図 31

A

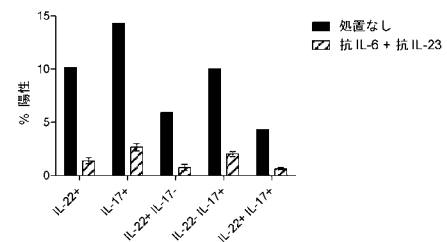
PMA/イオノマイシン刺激



刺激なし



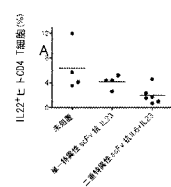
B



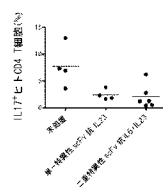
【図 32】

図 32

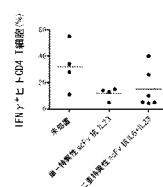
A



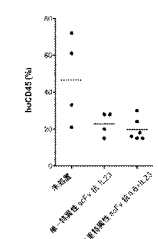
B



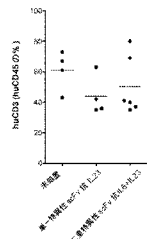
C



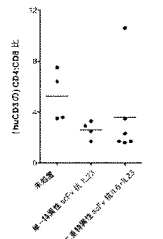
D



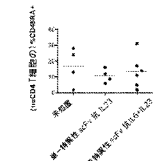
E



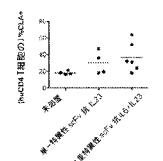
F



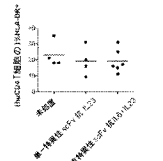
G



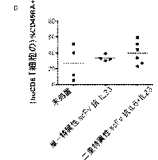
H



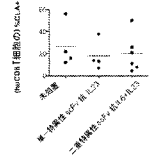
I



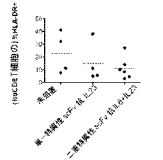
J



K

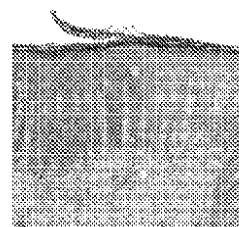


L



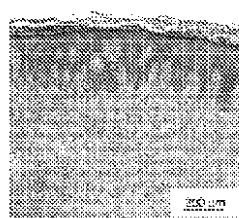
【図 33 A】

A



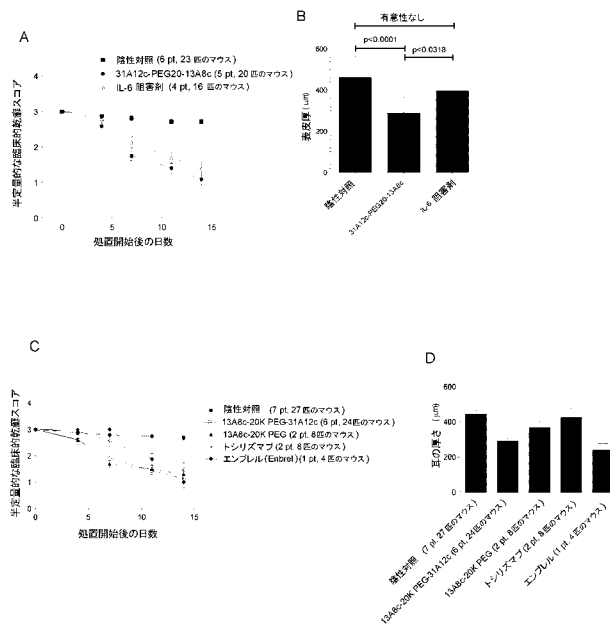
【図 33 B】

B



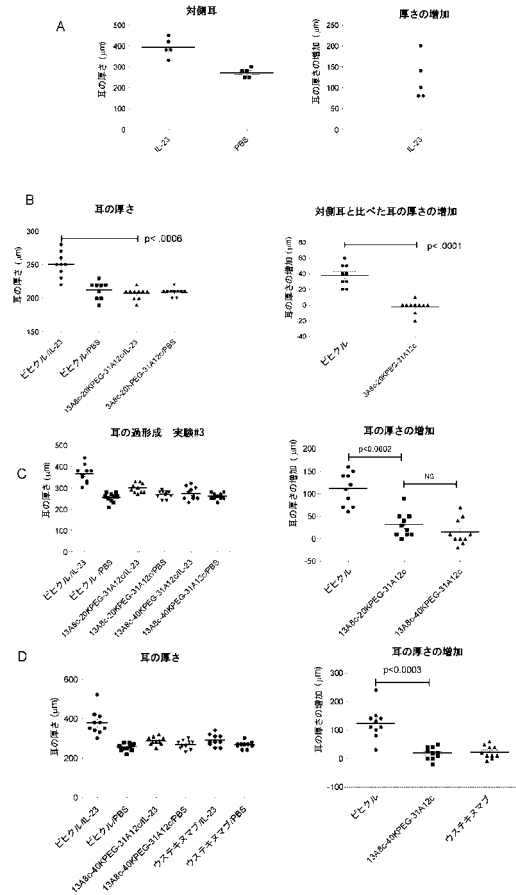
【図 3 4】

図 34



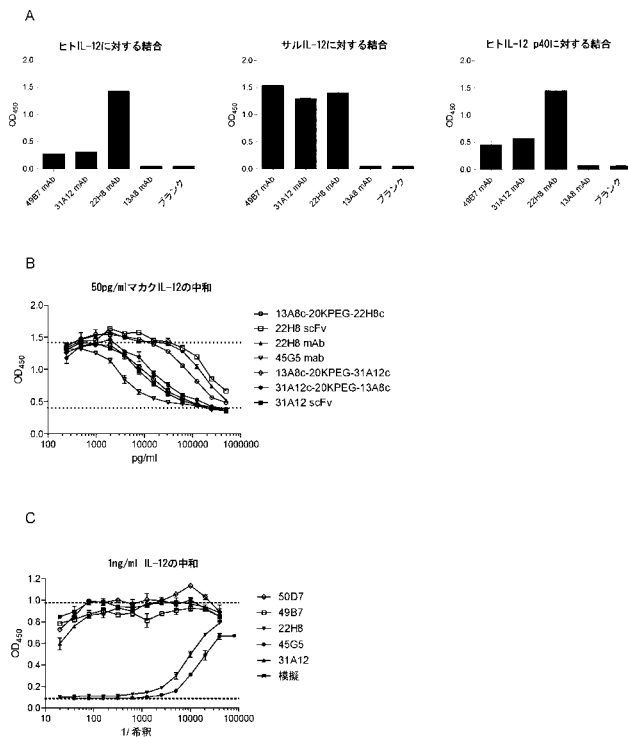
【図 3 5】

図 35



【図 3 6】

図 36



【配列表】

2013545438000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年10月17日(2013.10.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗IL-6抗体又はその誘導体、及び抗IL-23抗体又はその誘導体を含む、二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項2】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、モノクローナル抗体であるか、若しくはモノクローナル抗体に由来するものであり、かつ/又は前記抗IL-23抗体又はその誘導体が、モノクローナル抗体であるか、若しくはモノクローナル抗体に由来するものである、請求項1記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項3】

前記モノクローナル抗体がヒトモノクローナル抗体である、請求項2記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項4】

前記モノクローナル抗体がキメラ抗体である、請求項2記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項5】

前記キメラ抗体がヒト化フレームワーク領域を含む、請求項4記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項6】

抗IL-6抗体の誘導体及び/又は抗IL-23抗体の誘導体を含み、ここで、該誘導体(複数可)が、可変領域全体、可変領域の重鎖(VH)、可変領域の軽鎖(VL)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、dAb、又は相補性決定領域(CDR)を含み得る、請求項1~4のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項7】

前記誘導体がscFvである、請求項6記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項8】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体、及び/又は前記抗IL-23抗体又はその誘導体が、少なくとも1つの非天然アミノ酸を組み込むように修飾されている、請求項1~7のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項9】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列YIYTDX¹STX²YANWAKG(配列番号335)(式中、

X¹は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

X²は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され;かつ

好ましくは、X¹は、セリン又はトレオニンであり、かつX²が、トリプトファン又はチロシンである)

を含むCDR2領域を含む、請求項1~8のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項10】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 RX^1STLX^2S (配列番号336)(式中、 X^1 及び X^2 は、独立に、アラニン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 1】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択される、請求項1～10のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 2】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～12からなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 3】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号13～15からなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 4】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、配列番号10～15のアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 5】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号259を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 6】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号261を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 7】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体がscFvである、請求項1～16のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 8】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、
(i) 配列番号10～12からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖;及び
(ii) 配列番号13～15からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖
を含むscFvである、請求項1～17のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 9】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、
(i) 配列番号259のアミノ酸配列を含む重鎖;及び
(ii) 配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含むscFvである、請求項1～18のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 0】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する、請求項1～19のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 1】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項1～20のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンス

トラクト。

【請求項 2 2】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号10～15からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上の保存的アミノ酸置換を含む、請求項21記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 3】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、配列番号10～15のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗 IL-6 抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、請求項1～22のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 4】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、13A8、9H4、9C8、8C8、18D4、及び28D2からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項1～23のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 5】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列YYAX¹WAX²G(配列番号337)
(式中

X¹は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X²は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される)

を含むCDR2領域を含む、請求項1～24のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 6】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列AX¹TLX²S(配列番号338)
(式中、

X¹は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X²は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)

を含むCDR5領域を含む、請求項1～25のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 7】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号90～95からなる群から選択される、請求項1～26のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 8】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号90～92からなる群から選択される、請求項1～27のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 2 9】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号93～95からなる群から選択される、請求項1～28のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 0】

前記抗 IL-6 抗体又はその誘導体が、配列番号90～95のアミノ酸配列を含む、請求項1～29のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 1】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号267を含む、請求項1～30のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 2】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号269を含む、請求項1～31のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 3】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体がscFvである、請求項1～32のいずれか一項記載の二価

の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 4】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号 90～92 からなる群から選択される配列を有する少なくとも 1 つの CDR を含む重鎖; 及び

(ii) 配列番号 93～95 からなる群から選択される配列を有する少なくとも 1 つの CDR を含む軽鎖

を含む scFv である、請求項 1～33 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 5】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号 267 を含む重鎖; 及び

(ii) 配列番号 269 を含む軽鎖

を含む scFv である、請求項 1～24 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 6】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 90～95 からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% の同一性を有する、請求項 1～35 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 7】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 90～95 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する 1 以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項 1～35 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 8】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、少なくとも 1 つの CDR 領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号 90～95 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する 1 以上の保守的アミノ酸置換を含む、請求項 37 記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 3 9】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、配列番号 90～95 のアミノ酸配列に対応する CDR を有する抗 IL-23 抗体と同じエピトープに結合する少なくとも 1 つの CDR 領域を含む、請求項 1～38 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 0】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、31A12、34E11、35H4、49B7、及び 16C6 からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項 1～39 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 1】

前記抗 IL-23 抗体又はその誘導体が、IL-12 を阻害することもできる(すなわち、抗 IL-23 /IL-12 抗体)、請求項 1～24 のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 2】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 WX¹KG (配列番号 358) (式中、X¹ は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、又はトリプトファンであり、好ましくは、アラニン又はバリンである)を含む CDR2 領域を含む、請求項 41 記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 3】

前記抗 IL-23/IL-12 抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列 YAYX¹GDAFDP (配列番号 339) (式中、X¹ は、アラニン又はイソロイシンである)を含む CDR3 領域を含む、請求項 42 記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 4】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列SDYFNX¹(配列番号340)(式中、X¹は、イソロイシン又はバリンである)を含むCDR3領域を含む、請求項42記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 5】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列QX¹SQX²(配列番号359)(式中、

X¹は、アラニン又はセリンであり、かつ

X²は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

好ましくは、X²は、セリン又はトレオニンである)

を含むCDR4領域を含む、請求項41～44のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 6】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列ASX¹LA(配列番号341)(式中、X¹は、リジン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、請求項41～45のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 7】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、アミノ酸配列QSYDX¹NAGYG(配列番号342)(式中、X¹は、アラニン又はバリンである)を含むCDR6領域を含む、請求項41～46のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 8】

前記抗 IL-23/IL-12抗体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択される、請求項41～47のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 4 9】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の重鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～142からなる群から選択される、請求項41～48のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 0】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の軽鎖が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号143～145からなる群から選択される、請求項41～49のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 1】

前記抗 IL-6抗体又はその誘導体が、配列番号140～145のアミノ酸配列を含む、請求項41～50のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 2】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体の重鎖が、配列番号271を含む、請求項41～51のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 3】

前記抗 IL-23抗体又はその誘導体の軽鎖が、配列番号273を含む、請求項41～52のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 4】

前記抗 IL-p40抗体又はその誘導体がscFvである、請求項41～53のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 5 5】

前記抗 IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、

(i) 配列番号140～142からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖;及び

(ii) 配列番号143～145からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖

を含むscFvである、請求項41～54のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項56】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、
(i)配列番号271を含む重鎖；及び
(ii)配列番号273を含む軽鎖
を含むscFvである、請求項41～55のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項57】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列との少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する、請求項41～56のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項58】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上のアミノ酸付加、欠失、又は置換を含む、請求項41～57のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項59】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、少なくとも1つのCDR領域を含み、そのアミノ酸配列が、配列番号140～145からなる群から選択されるアミノ酸配列に対する1以上の保守的アミノ酸置換を含む、請求項58記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項60】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、配列番号140～145のアミノ酸配列に対応するCDRを有する抗IL-23/IL-12抗体と同じエピトープに結合する少なくとも1つのCDR領域を含む、請求項41～59のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項61】

前記抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体が、22H8、45G5、14B5、4F3、5C5、及び1H1からなる群から選択されるか、又は該群に由来する、請求項41～60のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項62】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体と前記抗IL-23抗体又はその誘導体の両方が、1以上の非天然アミノ酸を組み込んでいる、請求項1～61のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項63】

前記抗IL-6抗体又はその誘導体が、各々の抗体又はその誘導体中の非天然アミノ酸間のリンカーを介して、前記抗IL-23抗体又はその誘導体に結合している、請求項62記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項64】

リンカーがPEG分子である、請求項63記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項65】

アミノ酸配列YIYTDX¹STX²YANWAKG(配列番号335)
(式中、

X¹は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され；かつ

X²は、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンからなる群から選択され；かつ

好ましくは、X¹は、セリン又はトレオニンであり、かつX²が、トリプトファン又はチロシンである)
を含むCDR2領域を含む、抗IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 6】

アミノ酸配列 RX^1STLX^2S (配列番号336)(式中、 X^1 及び X^2 は、独立に、アラニン又はトレオニンである)を含むCDR5領域を含む、IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 7】

配列番号10～15又は20～25又は30～35又は40～45又は50～55又は60～65から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 6 8】

13A8、9H4、9C8、8C8、18D4、及び28D2、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択される抗IL-6抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-6抗体若しくはその誘導体。

【請求項 6 9】

配列番号259のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号261のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項67記載の抗IL-6抗体又はその誘導体。

【請求項 7 0】

アミノ酸配列 $YYAX^1WAX^2G$ (配列番号337)

(式中、

X^1 は、セリン、プロリン、及びアスパルテートからなる群から選択され、かつ

X^2 は、リジン及びグルタミンからなる群から選択される)

を含むCDR2領域を含む、IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項 7 1】

アミノ酸配列 AX^1TLX^2S (配列番号338)

(式中、

X^1 は、セリン及びアラニンからなる群から選択され、

X^2 は、アラニン及びトレオニンからなる群から選択される)

を含むCDR5領域を含む、IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項 7 2】

配列番号90～95又は100～105又は110～115又は120～125又は130～135から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗IL-23抗体又はその誘導体。

【請求項 7 3】

31A12、34E11、35H4、49B7、及び16C6、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択される抗IL-23抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-23抗体若しくはその誘導体。

【請求項 7 4】

配列番号267記載のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号269記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項72記載の抗IL-23抗体又は誘導体。

【請求項 7 5】

アミノ酸配列 WX^1KG (配列番号358)(式中、 X^1 は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、又はトリプトファンであり、好ましくは、アラニン又はバリンである)を含むCDR2領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 7 6】

アミノ酸配列 $YAYX^1GDAFDP$ (配列番号339)(式中、 X^1 は、アラニン又はイソロイシンである)を含むCDR3領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 7 7】

アミノ酸配列 $SDYFNX^1$ (配列番号340)(式中、 X^1 は、イソロイシン又はバリンである)を含むCDR3領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 7 8】

アミノ酸配列 QX^1SQX^2 (配列番号359)

(式中、

X¹は、アラニン若しくはセリンであり、かつ

X²は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、及びチロシンからなる群から選択され;

好ましくは、X²は、セリン若しくはトレオニンである)

を含むCDR4領域を含み;かつ/又は

アミノ酸配列ASX¹LA(配列番号341)(式中、X¹は、リジン若しくはトレオニンである)を含むCDR5領域を含み;かつ/又は

アミノ酸配列QSYDX¹NAGYG(配列番号342)(式中、X¹は、アラニン若しくはバリンである)を含むCDR6領域を含む、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 7 9】

配列番号140～145又は150～155又は160～165又は170～175又は180～185又は190～195から選択される配列を有する1以上のCDR(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのCDR)を有する、抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 8 0】

22H8、45G5、14B5、4F3、5C5、及び1H1、若しくはそれらの誘導体からなる群から選択される、抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体;又は該抗体のいずれか1つと同じエピトープに結合する、抗IL-23/IL-12抗体若しくはその誘導体。

【請求項 8 1】

配列番号271記載のアミノ配列を含む重鎖、及び配列番号273記載のアミノ配列を含む軽鎖を含む、請求項79記載の抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体。

【請求項 8 2】

PEG化されている、請求項65～81のいずれか一項記載の抗IL-6若しくは抗IL-23(抗IL-23/IL-12抗体を含む)、又はそれらの誘導体。

【請求項 8 3】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの一部をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8 4】

請求項1～81のいずれか一項記載の抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 8 5】

請求項83又は84記載のポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドの核酸配列が、大腸菌(*E. coli*)での発現に最適化されている、前記ポリヌクレオチド。

【請求項 8 6】

請求項83～85のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8 7】

請求項86記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8 8】

栄養要求性である、請求項87記載の宿主細胞。

【請求項 8 9】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトを産生する方法であって:

(i)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組み込みによって修飾されている抗IL-6抗体又はその誘導体を提供すること;

(ii)少なくとも1つの非天然アミノ酸の組み込みによって修飾されている、抗IL-23抗体又はその誘導体(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)を提供すること;

(iii)これら2つが各部分の非天然アミノ酸間の連結によって結合されるように、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体を、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体と反応させること

を含む、前記方法。

【請求項 90】

前記修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体と修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体の間の連結がリンカー部分を含み、ここで、該リンカー部分の一方の末端が、該修飾された抗IL-6抗体又は修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合されており、かつ該リンカー部分のもう一方の末端が、該修飾された抗IL-23抗体又は修飾されたその誘導体の非天然アミノ酸に結合されている、請求項89記載の方法。

【請求項 91】

前記リンカー部分が、PEG、水溶性ポリマー、ポリビニルアルコール、多糖、ポリアルキレンオキシド、ヒドロキシエチルデンブレン、又はポリオール、好ましくはPEGを含む、請求項90記載の方法。

【請求項 92】

前記非天然アミノ酸が、連結の前のアジド、アルキン、アルケン、歪んだシクロオクテン、歪んだシクロアルケン、シクロプロペン、ノルボルネン、又はアリーール、アルキル、若しくはビニルハライド、ケトン、アルデヒド、シアノ、ヒドラジン、ケタール、アセタール、ヒドラジド、アルコキシアミン、ボロン酸、有機スズ、有機ケイ素、 β -シリルアルケニルハライド、 β -シリルアルケニルスルホネート、ニトリル酸化物、ピロン、テトラジン、ピリダジン、アリーールスルホネート、チオセミカルバジド、セミカルバジド、テトラゾール、 α -ケト酸基を含む、請求項89～91のいずれか一項記載の方法。

【請求項 93】

前記非天然アミノ酸が、アジドホモアラニン、ホモプロパルギルグリシン、ホモアリルグリシン、p-ブromoフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、アジドフェニルアラニン、アセチルフェニルアラニン、又はエチニルフェニルアラニン(ethynylephenylalanine)、trans-クロチルアルケンなどの内部アルケンを含むアミノ酸、セリンアリルエーテル、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、又はビニルグリシン、ピロリジン、N- σ -o-アジドベンジルオキシカルボニル-L-リジン(AzZLys)、N- σ -プロパルギルオキシカルボニル-L-リジン、N- σ -2-アジドエトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン(BocLys)、N- σ -アリルオキシカルボニル-L-リジン(AllocLys)、N- σ -アセチル-L-リジン(AcLys)、N- σ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン(ZLys)、N- σ -シクロペンチルオキシカルボニル-L-リジン(CycLys)、N- σ -D-プロリル-L-リジン、N- σ -ニコチノイル-L-リジン(NicLys)、N- σ -N-Me-アントラニロイル-L-リジン(NmaLys)、N- σ -ピオチニル-L-リジン、N- σ -9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-リジン、N- σ -メチル-L-リジン、N- σ -ジメチル-L-リジン、N- σ -トリメチル-L-リジン、N- σ -イソプロピル-L-リジン、N- σ -ダンシル-L-リジン、N- σ -o,p-ジニトロフェニル-L-リジン、N- σ -p-トルエンスルホニル-L-リジン、N- σ -DL-2-アミノ-2カルボキシエチル-L-リジン、N- σ -フェニルピルバミド-L-リジン、N- σ -ピルバミド-L-リジンである、請求項89～92のいずれか一項記載の方法。

【請求項 94】

第一の部分を第二の部分と結合させる反応が、[3+2]環状付加若しくはアジド-アルキン環状付加反応、シュタウディングーライゲーション、ヘック反応、園頭反応、鈴木反応、スティルカップリング、檜山/デンマーク反応、オレフィンメタセシス、ディールス-アルダー反応、又はヒドラジン、ヒドラジド、アルコキシアミン、若しくはヒドロキシルアミンとのカルボニル縮合である、請求項89～93のいずれか一項記載の方法。

【請求項 95】

請求項89～94のいずれか一項記載の方法であって：

- (i) 少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている抗IL-6抗体又はその誘導体をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；
- (ii) 少なくとも1つの非天然アミノ酸の組込みによって修飾されている抗IL-23抗体又はその誘導体(抗IL-23/IL-12抗体又はその誘導体を含む)をコードするポリヌクレオチドを有するベクターを含む宿主細胞を提供すること；
- (iii) 該宿主細胞が、修飾された抗IL-6抗体又はその誘導体、及び修飾された抗IL-23抗体

又はその誘導体を発現するような条件下で、該宿主細胞を成長させること、
(iv) 該抗IL-6抗体又はその誘導体、及び該抗IL-23抗体又はその誘導体を単離すること；
(v) 該抗IL-6抗体又はその誘導体が、各部分の非天然アミノ酸間の連結によって該抗IL-23抗体又はその誘導体と結合されるように、該抗IL-6抗体又はその誘導体を該抗IL-23抗体又はその誘導体と反応させること
を含む、前記方法。

【請求項 9 6】

請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトに含めるのに好適な親抗体を選択する方法であって：

(i) IL-6又はIL-23に特異的なB細胞を選択する工程；
(ii) 該B細胞の個別の試料を(例えば、96細胞ウェルプレートのウェルに)分注する工程；
(iii) 該B細胞を培養する工程；
(iv) 抗体を含む上清を、各々の分注試料から個別に回収する工程；
(v) 各々の分注試料由来の上清を(例えば、ELISAを用いて)IL-6又はIL-23結合についてアッセイする工程；
(vi) 該各々の分注試料由来の上清をIL-6又はIL-23活性の阻害についてアッセイする工程；
(vii) 高レベルのIL-6若しくはIL-23活性の阻害及び/又は強いIL-6若しくはIL-23結合を示したウェルから抗体を選択する工程；並びに
(viii) 任意に、IL-23分注試料由来の上清をIL-12活性の阻害についてアッセイする工程；並びに
(ix) 高レベルのIL-12活性及び/又は強いIL-12結合をさらに示すIL-23抗体を親抗体として選択する工程
を含む、前記方法。

【請求項 9 7】

治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト又は請求項65～82のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 9 8】

T_H17媒介性疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 9 9】

T_H17によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 0 0】

前記T_H17によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項 1 0 1】

T_H22媒介性疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 1 0 2】

T_H22細胞によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 0 3】

前記T_H22細胞によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項 1 0 4】

T_H17細胞とT_H1細胞の両方によって媒介される疾患を治療する方法であって、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 0 5】

前記T_H17細胞とT_H1細胞の両方によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求

項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項106】

前記 T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項1～64のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクトの使用。

【請求項107】

T_H17 媒介性疾患を治療する方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項108】

T_H17 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項109】

T_H17 媒介性疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項110】

T_H22 媒介性疾患を治療する方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項111】

T_H22 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項112】

T_H22 媒介性疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項113】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療方法であって、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの治療有効量を患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項114】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療で使用するための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せ。

【請求項115】

T_H17 細胞と T_H1 細胞の両方によって媒介される疾患の治療用の薬剤の製造のための、請求項65～69のいずれか一項記載の抗IL-6抗体と請求項70～81のいずれか一項記載の抗IL-23又は抗IL-23/抗IL-12抗体の組合せの使用。

【請求項116】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項107、110、又は113のいずれか一項記載の方法。

【請求項117】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項108、111、又は114のいずれか一項記載の組合せ。

【請求項118】

前記抗体が抗IL-23/抗IL-12抗体である、請求項109、112、又は115のいずれか一項記載の使用。

【請求項119】

前記 T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患が、炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植

拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される、請求項98、101、104、107、110、113、又は116のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2 0】

炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項99、102、又は105のいずれか一項記載の二価の二重特異性コンストラクト。

【請求項 1 2 1】

炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療で使用するための、請求項108、111、114、又は117のいずれか一項記載の組合せ。

【請求項 1 2 2】

前記薬剤が、炎症性疾患及び自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎、尋常性天疱瘡、臓器移植拒絶反応、クローン病、炎症性腸疾患(IBD)、過敏性腸症候群(IBS)、エリテマトーデス、及び糖尿病からなる群から選択される T_H17 媒介性疾患、 T_H22 媒介性疾患、又は T_H17 及び T_H1 媒介性疾患の治療用のものである、請求項100、103、106、109、112、115、又は118のいずれか一項記載の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 1】

(図面の簡単な説明)

【図 1】図1は、B細胞選択を示す。1枚のB細胞の96ウェルプレートの各ウェルを、B9細胞株増殖アッセイによるIL-6中和とELISAによるIL-6結合の両方についてアッセイした。比較のために、各アッセイの結果を並べている。

【図 2】図2は、V領域レスキューからscFv作製までの実験プロセスの概略を示す。

【図 3】図3A及びBは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒト及び霊長類IL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したような、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。図3C及びDは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒト及び霊長類IL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したように、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。図3Eは、選択された抗IL6ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒトIL-6中和活性を示す：ウサギ/ヒトキメラmAbを哺乳動物細胞で発現させた。該mAbを上清中でELISAにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したように、50pg/mlのヒトIL-6又は100pg/mlの霊長類IL-6の中和について試験した。

【図 4】図4は、B細胞選択を示す。1枚のB細胞の96ウェルプレートの各ウェルをIL-23中和及びIL-23結合についてアッセイした。比較のために、各ウェルについての2つのアッセイの結果を並べている。

【図 5】図5A～5Iは、選択された抗IL-23ウサギ/ヒトキメラ抗体のヒトIL-23中和活性を示す。候補mAbを取得し、ヘテロ二量体組換えIL-23(eBio IL23)の中和について試験した。

【図 6】図6A及び6Bは、霊長類及びヒトIL-23の中和活性を示す。いくつかのmAbのラン

スフェクション上清を、ヘテロ二量体ヒトIL-23(パネルB)又は霊長類IL-23(パネルA)のどちらかの中和について、マウス脾細胞アッセイを用いて比較した。比活性の比較を可能にするために、Igレベルをトランスフェクション上清中で測定した。

【図7】図7Aは、IL-12及びIL-23の構造を示す。図7Bは、IL-12及びIL-23受容体、並びにそれらの会合メカニズムを示す。

【図8】図8Aは、いくつかのmAbのトランスフェクション上清を、ヒトIL-12の中和について、NK92細胞株アッセイを用いて比較したことを示す。図8Bは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Cは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Dは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8Eは、選択されたmAbによるヒトIL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1200pg/mlのIL-23(eBiosciences)の中和について試験した。図8F～8Gは、選択されたmAbによるヒトIL-12の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1000pg/mlのヒトIL-12の中和について試験した。図8H及び8Iは、選択されたmAbによる霊長類IL-23の中和を示す。B細胞クローン由来の一次レスキュートランスフェクションで陽性であるmAbをHEK293一過性トランスフェクションで発現させ、該一過性トランスフェクションで、EC50値を算出するために、IgG濃度を定量した。該mAbを1000pg/mlの霊長類IL-23の中和について試験した。

【図9】図9Aは、ウサギscFvを哺乳動物細胞で発現させたことを示す。該scFvを上清中でSDS PAGEにより定量した。それらを、B9細胞増殖アッセイを用いて、示したような200pg/mlのヒトIL-6の中和について試験した。図9Bは、9C8ヒト化を示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。様々なヒトフレームワーク配列を9C8のヒト化について比較した。該ヒト化mAbをHEK293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。トランスフェクション上清を、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。図9Cは、ヒト化抗IL-6 mAbを示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8及び18D4を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。該ヒト化mAbをHEK293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。トランスフェクション上清中のIgGを定量し、それらを、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。図9Dは、ヒト化抗IL-6 mAb及びscFvを示す。高親和性かつ高効力のキメラmAbである9C8を、VH及びVLのフレームワーク領域をヒトフレームワーク配列に変えることによってヒト化し、ウサギフレームワーク配列への復帰突然変異を制限した。2つのヒト化9C8 scFvをウサギscFvから作製し、2つの異なるVHCDR1配列を比較した。該ウサギscFvをヒト化しないで直接発現させ、該ヒト化mAb、及びscFvをHEK293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。トランスフェクション上清を、50pg/mlのヒトIL-6を中和する能力について、B9細胞増殖アッセイを用いて試験した。

【図 1 0】図10は、scFvフォーマットでのヒトV-領域フレームワーク上へのCDR移植のためのPCR戦略を示す。VL、軽鎖V-領域;L、リーダー(シグナルペプチド);FR、フレームワーク領域;CDR、相補性決定領域;矢印は、個々のプライマー及びPCR増幅におけるその方向性を示す;CDR特異的プライマーは、鎖及びCDR番号で表されており、HはVHであり、LはVLである;プライマーの方向性は、F(フォワード)及びR(リバーズ)でも表されている;VL-FR4とVH-FR1の間の曲線は、scFv構築のために付加される20aa(G4S)4リンカーを表す。

【図 1 1】図11A及び11Bは、ヒト化scFv 13A8によるIL-6中和を示す。ヒト化13A8抗IL-6 scFvを哺乳動物細胞で発現させた。該scFvをNi親和性によって上清から精製した。ヒトIL-6(B)又は霊長類IL-6(A)の中和についての試験を、B9細胞増殖アッセイを用いて実施した。図11Cは、抗IL-6ヒト化scFvによるIL-6中和を示す:ヒト化9C8 scFv v3-1(多工程法から得たもの)及び28D2 scFvを哺乳動物細胞で発現させ、Niクロマトグラフィーで精製し、IL-6誘導性B9細胞増殖の阻害について比較した。

【図 1 2】図12は、抗IL-23 31A12 scFvがIL-23を中和することを示す。31A12 mAbをヒト化scFvに変換し、親mAbとともに哺乳動物トランスフェクションで発現させた。両方を、600pg/mlのeBiosciences製のヒトIL-23の中和について、IL-17の誘導用のマウス脾細胞アッセイを用いて試験した。

【図 1 3】図13は、ヒト化抗IL-23 45G5 scFvがヒトIL-23を中和することを示す:ヒト化45G5 scFvをキメラmAb 31A12及び22H8と比較した。全てのmAbを哺乳動物細胞で発現させ、精製し、1.2ng/mlのeBiosciences製のヒトIL-23の阻害について、IL-17誘導用のマウス脾細胞アッセイを用いて試験した。

【図 1 4】図14A~14Dは、2つのMet残基を除去するように改変されたヒト化13A8 scFv哺乳動物発現コンストラクトの試験を示す。様々な二重突然変異体コンストラクト、及び親scFv(MM)をHEK細胞で発現させ、50pg/mlのヒトIL-6の阻害について、インビトロのB9バイオアッセイを用いて試験した。図14Eは、HEK293細胞で一過性に発現された、両方のMetが置換されているヒト化31A12 scFv(H34Lバージョンのみを示す)、及びMetを含む親scFvの試験を示す。上清を、600pg/mlのeBiosciences製のIL-23の生物学的活性の阻害について、マウス脾細胞アッセイで試験した。図14F及び14Gは、H82 MetがL又はVのどちらかと置換され、両方ともH34Lと組み合わせられ、親45G5キメラmAb及びMetを含まない31A12 scFv(31A12-LL)と比較された、ヒト化45G5 scFvの試験を示す。全てをHEK293細胞で一過性に発現させた。scFv及びmAbを精製し、1200pg/mlのeBiosciences製のIL-23の生物学的活性の阻害について、マウス脾細胞アッセイで試験した。図14Hは、ヒト化抗IL-23 scFvがヒトIL-23を中和することを示す。野生型抗IL-23 scFv 22H8及び45G5を、示したような、H34のMetがV又はLのどちらかと置換された22H8 scFvと比較した。

【図 1 5】図15は、N又はC末端に、又はGly/Serリンカー中にAhaを有する大腸菌28D2 scFvによるIL-6の中和を示す:N又はC末端に、又はGly/Serリンカー中に単一のMetコドンを持つ28D2コンストラクトを、大腸菌発酵で発現させ、MetをAhaに置換した。これらの精製scFvを、50pg/mlのヒトIL-6の中和について試験した。

【図 1 6】図16Aは、20K線状PEGビスアルキンをを用いた13A8cAhaのPEG化を示す。20K PEGビスアルキンをを用いた13A8cAha PEG化反応のSDS PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:13A8cAhaのみ;レーン2:(-)対照-銅なし;レーン3:200mLの小規模反応混合物;レーン4:600mLの反応-遠心分離済み-試料上清。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化13A8cAhaの70%収率(レーン4)を示した。図16Bは、20K線状PEGビスアルキンをを用いた31A12cAhaのPEG化を示す。20K PEGビスアルキンをを用いた31A12cAha PEG化のSDS PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー;レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:小規模反応;レーン5:400mLの反応-遠心分離済み-試料上清。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化31A12cAhaの59%収率(レーン5)を示した。図16Cは、40K線状PEGビスアルキンをを用いた13A8cAhaのPEG化を示す。13A8c-40KPEGの調製のSDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。走査型レーザーデンストメトリーは、51%収率を示した。図16Dは、20K線状PEGビス-アルキンをを用いた13A8L AhaのPEG化を示す。SDS-PAGE(還元性、4~20%トリス-グリシン)。走査型レーザーデンストメトリーは、60%収率を示した。図16Eは、20K

線状PEGビスアルキンを用いた45G5cAhaのPEG化を示す。SDS PAGE(還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1:(-)対照-銅なし;レーン2:小規模反応;レーン3:小規模反応、トリアゾール配位子なし;レーン4:160mLの反応-遠心分離済み-試料上清;レーン6:分子量マーカー。走査型レーザーデンストメトリーは、PEG化45G5cの59%収率を示した。

【図17】図17Aは、28D2c-PEGを用いたIL-6中和を示す。異なる条件下で再フォールディングさせた2つの28D2c-30KPEGの試料をIL-6中和についてアッセイした。図17B及びCは、PEG-scFvの安定性を示す:31A12-PEGは、69のT_mを有する。13A8-PEGは、66のT_mを有する。これは、示したような溶液中でのこれらの分子の安定性に反映される。各々のscFv-PEGをPBS(又は示されている場合、Tween)中でインキュベートし、親scFv(哺乳動物発現から得たもの)と比べた効力についてアッセイする。13日間又は20日間の保存温度が示されている;3XFTは、3サイクルの凍結及び解凍を示す。

【図18】図18Aは、13A8c-PEG-31A12c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー、レーン2:13A8-PEGのみ、レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:1000mLの反応。図18Bは、13A8n-PEG-45G5c二重特異性体の調製を示す:SDS-PAGE(還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1:大規模反応1、レーン3:大規模反応2。図18Cは、13A8c-PEG-22H8c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1:分子量マーカー、レーン2:13A8c-PEGのみ、レーン3:(-)対照-銅なし、レーン4:1150mLの反応。図18Dは、13A8c-40KPEG-31A12cAHAの調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1:MWマーカー、レーン2:13A8c-40KPEG、レーン3:反応混合物の直接試料、レーン4:最終処理混合物の試料、6uLの投入量、レーン5:最終処理混合物の試料、12uLの投入量。レーン6:銅なしでの反応、レーン7:31A12cAHAのみ。収率(2つの投入物の平均)=56%、生成物対一価物の比率は4.5:1。図18Eは、13A8L-PEG-31A12c二重特異性体の調製を示す。SDS-PAGE(還元性、4～20%トリス-グリシン)。レーン1 二重特異性体を形成させるための31A12-20KPEG + 13A8LAhaの反応。反応収率は37%であることが分かった。

【図19】図19Aは、IL-6及びIL-23の中和に対する31A12c-PEG-13A8cの機能的活性を示す。scFvのみと比較した二重特異性体対IL-6及びIL-23の生体活性。A:二重特異性体の13A8 scFv部分の抗IL-6活性。19B:二重特異性体の31A12c scFv部分の抗IL-23活性も測定した。EC50を力価測定により算出した。

【図20】図20Aは、皮下投与された28D2c scFvのラットPKを示す。ラットを1mg/kgの抗IL-6 scFv 28D2cで皮下処置した。示された時間で採血し、ラットの血漿中の28D2の存在を、抗IL-6中和アッセイを用いて測定した。図20Bは、皮下投与された31A12c-PEG-13A8c二重特異性体のラットPKを示す:ラットを1mg/kgの31A12c-PEG-13A8c二重特異性体で皮下処置した。示された時間で採血し、ラットの血漿中の二重特異性体の存在を、抗IL-6中和アッセイを用いて測定した。比較のために、図20Aからの28D2 scFvのPKデータがここに含まれている。

【図21】図21は、13A8n-PEG-31A12c二重特異性体の生体活性を示す。該二重特異性体による50pg/mlのIL-6の中和をB9バイオアッセイで測定した。比較のために、哺乳動物13A8 scFvタンパク質が含まれている。

【図22】図22は、IL-6及びIL-23に対する13A8n-PEG-45G5の機能的活性を示す。二重特異性体対IL-6及びIL-23の生体活性が示されている。13A8n-PEG-45G5二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(22A)及び1200pg/ml(22B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株バイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

【図23】図23は、IL-6及びIL-23に対する13A8c-PEG-22H8cの活性を示す。IL-6及びIL-23に対する13A8c-PEG-22H8cの生体活性が示されている。13A8c-PEG-22H8二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(A)及び1200pg/ml(B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株バイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

【図24】図24は、IL-6及びIL-23に対する13A8c-40KPEG-31A12cの活性を示す。IL-6及び

IL-23に対する13A8c-40kPEG31A12cの生体活性が示されている。該二重特異性体による50pg/mlのヒトIL-6(A)及び1200pg/ml(B)のeBiosciences製のヒトIL-23の中和を、IL-6についてはB9細胞株バイオアッセイ、IL-23についてはマウス脾細胞アッセイを用いて測定した。EC50値を曲線から算出した。

【図25】図25Aは、ラットにおける皮下投与後の13A8c-40KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-20KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-PEG、及び裸のscFv(28D2)の血清レベル(B9アッセイで測定した場合)を示す。図25Bは、ラットにおける皮下投与後の13A8c-40KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-20KPEG-31A12c二重特異性体、13A8c-PEG、及び裸のscFv(28D2)の血清レベルの薬物動態解析の結果を示す。

【図26】図26Aは、 $T_H17/22$ 細胞のインビトロ分極を示す。 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を含む、様々なヒトT細胞サブセットを、インビボ系とインビトロ系の両方で発生させることができる。図26Bは、インビトロでのヒトTh17の発達を示す：ヒトPBMCを、示したように、単独又はLPS及びTGFbの存在下のどちらかで、抗CD3/28で7日間インビトロで刺激した。その後、それらを、示したように、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17及びRORCについて染色した。図26Cは、 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を培養PBMCから発生させることができることを示す。 T_H17 は混合リンパ球反応物中に見られ、一方、 T_H17 及び T_H22 は、抗CD3で刺激したPBMCで見られる。PBMCを抗CD3/28 + IL-1b + LPS又は同種異系PBMC + ペプチドグリカンで5日間刺激し、その後、PMA + イオノマイシンで再刺激し、細胞内のIL-17及びIL-22について染色した。

【図27】図27は、選択されたscFvを用いたインビトロでのTh17及びTh22発生の阻害を示す。ヒトPBMCを、示されたscFvの存在下、抗CD3 + 抗CD28及びLPS + IL-1 + TGFb中で5日間培養した。5日後、該細胞をPMA + イオノマイシンで再刺激し、CD4、IL-17、及びIL-22産生細胞の%をフローサイトメトリーで決定した。

【図28】図28は、混合リンパ球反応を示す。単独で使用されたか、又は組み合わせて使用された抗IL-6 scFv及び抗IL-23 scFvの T_H17 分化に対する阻害効果が示されている。示された抗IL-6 scFv及び抗IL-23 scFvを、同種異系PBMCによる刺激の間、PBMC培養物に添加した。5日後、該細胞を洗浄し、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17について染色した。

【図29】図29は、二重特異性抗IL-6/IL-23抗体の T_H17 分化に対する有益な阻害効果を示す。抗IL-6及び抗IL-23 mAb(13A8及び31A12)、並びに31A12c-20KPEG-13A8c二重特異性体を単独で又は組み合わせて試験した。該mAb又は該二重特異性体を、同種異系PBMCによる刺激の間、PBMC培養物に添加した。添加された結合ドメインのモル濃度が示されている。5日後、該細胞を洗浄し、PMA + イオノマイシンで再刺激し、IL-17について染色した。

【図30】図30は、 $T_H17/22$ 細胞のインビボ分極を示す。 T_H17 細胞及び T_H22 細胞を含む、様々なヒトT細胞サブセットを、インビボ系とインビトロ系の両方で発生させることができる。

【図31】図31Aは、IL-6に対するアンタゴニストとIL-23に対するアンタゴニストの組合せによるヒト化scid/huマウスの処置を示す。ヒト免疫細胞を移植するのに成功したNSGマウスに、ヒト同種異系皮膚を移植し、100mgの13A8c-PEG抗IL-6及び31A12c-PEG抗IL-23(scFv-PEG)を2日おきに投与した。皮膚移植の30日後、脾臓を摘出し、単一細胞懸濁液をPMA/イオノマイシンで刺激し、細胞内サイトカインについてアッセイした。CD3+/CD4+細胞を、IL-17及びIL-22産生について、フローサイトメトリーで解析した。図31Bは、IL-6に対するアンタゴニストとIL-23に対するアンタゴニストの組合せで処置したヒト化scid/huマウスの脾臓由来のCD3+/CD4+細胞における細胞内サイトカイン発現を示す。先の図に記載したように、皮膚同種移植片を有する処置NSGマウス及び未処置NSGマウス由来の脾細胞、CD3+/CD4+細胞を、細胞内IL-17及びIL-22について、フローサイトメトリーで解析した。データは、抗IL-6及び抗IL-23で処置した動物におけるIL-17及びIL-22陽性CD4+ T細胞の全集団の顕著な低下を示している。該データは、TH17細胞又はTH22細胞の示されたサブセットに従って、処置マウス又は未処置マウスの平均及びSEMとしてプロットされている。

【図32】図32は、Sci/hu同種移植モデルでのTh17及びTh22分化の阻害に対する13A8cPEG

-31A12c二重特異性体の効果を示す: ヒト免疫系が樹立された成獣scidマウスに同種異系ヒト皮膚を移植した。EOD処置の4週間後、示したように、脾細胞をインビトロで活性化し、サイトカインを、各々のヒトCD4⁺ T細胞において、多重パラメータフローサイトメトリーにより測定した。各々の点は、個々の処置マウス又は対照マウスを示し、各々のマウスは、(示された各々のサイトカインについて)3回示されている。単一特異的scFv抗IL23は31A12cPEGであり;二重特異性scFv抗IL6 IL23は13A8c-20KPEG-31A12cである。未処置マウスにはプラセボを投与した。13A8c-20KPEG-31A12cは、IL-17(図32A、* $p < 0.05$)及びIL-22(図32B、 $p < 0.05$)産生CD4⁺ヒトT細胞の阻害によって測定したとき、Th17細胞の分化を有意に低下させた。他の全てのパネルは、一般的な白血球マーカーを測定したものであり、13A8c-20KPEG-31A12cが、TH17/22細胞以外の白血球に対して一般に免疫抑制性であるわけではないことを示している。

【図33】図33は、13A8c-20kPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体(B)で処置したマウスと比べたプラセボ処置マウス(A)の表皮の切片の組織学的解析を示し、この解析において、13A8c-20KPEG-31A12c抗IL-6/抗IL-23二重特異性体は、乾癬の組織学的特徴、特に、表皮厚を有意に低下させる。

【図34】図34は、scid/hu同種移植モデルを用いた6回の実験が遂行されたことを示し、処置期間中、内容を知らされなかった(blinded)病理学者によって判定された臨床スコアが図34Aにまとめられている(臨床スコア)。組織学的切片の解析は、乾癬の最も意味のあるマトリクスの非常に定量的な測定を可能にし、特に、客観的尺度である表皮厚が図34Bに示されている(定量的表皮厚)。二重特異性scFvは、乾癬の臨床スコア及び表皮厚の低下に対する極めて有意かつ強力な効果を有する。

【図35】図35Aは、耳の過形成マウスモデルの読出しを示す: マウスに、0、1、2、及び3日目に、20 μ Lの容量の右耳へのrhIL-23の皮内注射(1 μ g)を投与した。対照として、対側耳にPBSを注射した。耳の厚さを4日目に測定した。1つ目のパネルは、PBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物についての、PBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の厚さの増加を示す。図35Bは、マウスを、-1日目及び2日目に、ビヒクル又は13A8c-20KPEG-31A12c(100ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物又は13A8c-20KPEG-31A12cで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。図35Cは、マウスを、-1日目にのみ、ビヒクル又は13A8c-20KPEG-31A12c又は13A8c-40KPEG-31A12c(100ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物、13A8c-20KPEG-31A12cで処置した動物、又は13A8c-40KPEG-31A12cで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。図35Dは、マウスを、-1日目及び2日目に、ビヒクル又は13A8c-40KPEG-31A12c(100ug i.p.)又はウステキヌマブ(288ug i.p.)で処置したときの耳の過形成モデルの結果を示す。1つ目のパネルは、ビヒクルで処置した動物、13A8c-40KPEG-31A12cで処置した動物、又はウステキヌマブで処置した動物の両方におけるPBSを注射した耳と比較したIL-23を注射した耳の耳の厚さを示す。2つ目のパネルは、各々の動物について、IL-23を注射した耳をPBSを注射した耳と比較したときの耳の厚さの増加を示す。

【図36】図36Aは、ELISAプレートにコーティングされたIL-12に対する抗IL-23キメラ抗体の結合を示す。抗IL-6抗体(13A8)は、陰性対照として含まれている。1つ目のパネルでは、ヒトIL-12が、プレートにコーティングされている。22H8が強い結合を示すのに対し、31A12及び49B7は、より弱いけれども、依然として陽性の結合を示す。2つ目のパネルでは、サルIL-12(マカク)が、プレートにコーティングされている。この場合、49B7、31A12、及び22H8は全て、マカクIL-12に対する強い結合を示す。3つ目のパネルでは、プレートが、ヒトIL-12 p40サブユニットでコーティングされている。22H8は強い結合を示し、49B7及び31A12は、p40サブユニットに対するより弱い結合を示す。図36Bは、NK92細胞バイオ

アッセイにおけるマカクIL-12誘導性インターフェロン γ 分泌の中和を示す。31A12と22H8は両方とも、マカクIL-12の強い阻害を示す。図36Cは、NK92細胞バイオアッセイにおけるヒトIL-12誘導性インターフェロン γ 分泌の中和を示す。この場合、マカクIL-12とは対照的に、ヒトIL-12は、31A12によっても49B7によっても中和されない。22H8は、マカクIL-12とヒトIL-12の両方を中和する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

(Fab、Fab'、F(ab)')

本発明のある実施態様では、抗IL-6抗体又は変異体抗IL-6抗体のFab、Fab'、F(ab)'断片が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23抗体又は変異体抗IL-23抗体のFab、Fab'、F(ab)'断片が提供される。

本発明のある実施態様では、抗IL-23/IL-12抗体又は変異体抗IL-23/IL-12抗体のFab、F(ab)'、F(ab)'断片が提供される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

ある実施態様では、突然変異した抗IL-23/IL-12抗体は、突然変異前の抗IL-23/IL-12抗体と比べて変化していない少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を有する。変化していないCDRは、CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5、又はCDR6であることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0142

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0142】

(非天然アミノ酸を組み込むための修飾)

本発明は、抗IL-6、抗IL-23、及び抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体への非天然アミノ酸残基の組み込みを提供して、抗IL-6抗体又はその誘導体の、抗IL-23又は抗IL-23/IL-12抗体、又はそれらの誘導体への付着点を提供する。当業者は、例えば、アジドホモアラニン(Aha)を含む、いくつかの潜在的に好適な非天然アミノ酸を認識している。さらなる非天然アミノ酸としては、アジドノルロイシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、p-エチニル-フェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシ-フェニルアラニン、m-エチニル-フェニルアラニン、6-エチニル-トリプトファン、5-エチニル-トリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロル-3-イル)プロパン酸(propanic acid)、p-プロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン(idiophenylalanine)、p-アジドフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブロモインドリル(bromoindoyl))アラニン、3-(5-ブロモインドリル)アラニン、ホモアリルグリシン、ホモプロパルギルグリシン、及びp-クロロフェニルアラニンが挙げられる。好ましい実施態様では、非天然アミノ酸はAhaである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

1つのタイプの誘導体化された二価の二重特異性コンストラクトは、標識された二価の二重特異性コンストラクトである。本発明の二価の二重特異性コンストラクトを誘導体化し得る有用な検出剤としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル(naphthalenesulfonyl)クロライド、フィコエリスリン、ランタニド燐光体などを含む、蛍光化合物が挙げられる。二価の二重特異性コンストラクトは、検出に有用である酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどで標識することもできる。二価の二重特異性コンストラクトが検出可能な酵素で標識されている場合、それは、該酵素が用いるさらなる試薬を添加して、識別され得る反応生成物を産生することによって検出される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0245

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0245】

IL-6依存的マウスB細胞ハイブリドーマ細胞株(B9細胞株;Aardenらの文献(1987))を用いるバイオアッセイを用いて、IL-6阻害を評価することができる(図3)。中和活性について試験すべき試料を、96ウェル組織培養プレート中で、100 μ lのアッセイ培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に希釈すべきである。これに続いて、50 μ lのIL-6(カタログ# CYT-274 Prospec-Tany Technogene)含有アッセイ培地を添加し、室温で30分間インキュベートする。その後、B9細胞をフラスコから回収し、180 $\times$ gで7分間遠心分離し、ペレットをIL-6不含培養培地(L-グルタミン、10%FBS、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI 1640)に再懸濁する。細胞を3回遠心分離及び再懸濁して、IL-6を除去すべきである。トリパンブルー排除によって生存率を決定した後、細胞を 1×10^5 細胞/mlに調整すべきである。 5×10^3 細胞に相当する、50 μ lの容量のB9細胞を、IL-6不含培地を含む適切な対照ウェルとともに、各ウェルに添加すべきである。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0260

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0260】

「免疫グロブリン」は四量体分子である。天然に存在する免疫グロブリンにおいて、各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対から構成されており、各々の対は、1つの「軽」鎖(約25kDa)及び1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約100~110個又はそれより多くのアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、 κ 軽鎖及び λ 軽鎖と分類される。重鎖は、又はEと分類され、抗体のアイソタイプを、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEと規定する。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12個又はそれより多くのアミノ酸の「J」領域によって接続され、重鎖は、約10個又はそれより多くのアミノ酸の「D」領域も含む。一般には、基礎免疫学(Fundamental Immunology)第7章(Paul, W. 編, 第2版 Raven Press, N. Y. (1989))(全ての目的のためにその全体が引用により組み込まれる)を参照されたい。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、無傷の免疫グロブリンが2つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0284

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0284】

本明細書で使用されるように、20種の従来のアミノ酸及びそれらの略語は、従来の用法に従う。引用により本明細書中に組み込まれる、免疫学-合成(Immunology-A Synthesis)(第2版, E. S. Golub及びD. R. Gren編, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991))を参照されたい。20種の従来のアミノ酸の位置異性体(例えば、D-アミノ酸)、非天然アミノ酸、例えば、 α -、 α -ジ置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の非従来のアミノ酸も、本発明のポリペプチドの好適な構成要素であることができる。非従来のアミノ酸の例としては:4-ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、s-N、N、N-トリメチルリジン、s-N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、s-N-メチルアルギニン、及び他の同様のアミノ酸及びイミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン)が挙げられる。本明細書で使用されるポリペプチド表記法では、標準的な用法及び慣習に従って、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0303

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0303】

標識の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない:放射性同位体又は放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニド燐光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対の配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、磁性物質、例えば、ガドリニウムキレート、毒素、例えば、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、及びそれらの類似体又は相同体。いくつかの実施態様では、標識を様々な長さのスペーサーアームによって付着させ、潜在的な立体障害を低下させる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0313

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0313】

(実施例2 抗体親和性の決定)

平衡解離定数は、SensiQ Pioneer(ICx Nomadics, Stillwater, OK)、及びアミンカップリングに適したカルボキシル化COOH1センサー(同上)を用いて、表面プラズモン共鳴によって決定した。プロテインG(6510-10, Biovision, Mountain View, CA)を、アミンカップリング試薬(Sigma Aldrich(N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS, 56480)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC, E7750)、エタノールアミン(398136), St. Louis, MO)を用いるか、又はBiacoreアミンカップリングキット(BR-1000-50, GE

Healthcare, Waukesha, WI)を用いて、COOH1センサーにカップリングさせた。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 2 2】

簡潔に述べると、EL4-B5細胞を、 1×10^7 細胞/mlの密度で、50 μ g/mlマイトマイシン-c(カタログ# M0503, Sigma-Aldrich)を含むRPMIに40分間懸濁し、完全培地中で6回洗浄した。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 0】

(28D2)

配列番号16のアミノ酸配列及び配列番号17のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号18のアミノ酸配列及び配列番号19のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 2】

(18D4)

配列番号26のアミノ酸配列及び配列番号27のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号28のアミノ酸配列及び配列番号29のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 4】

(8C8)

配列番号36のアミノ酸配列及び配列番号37のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号38のアミノ酸配列及び配列番号39のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 6】

(9H4)

配列番号46のアミノ酸配列及び配列番号47のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号48のアミノ酸配列及び配列番号49のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0348

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0348】

(9C8)

配列番号56のアミノ酸配列及び配列番号57のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0375

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0375】

(49B7)

配列番号96のアミノ酸配列及び配列番号97のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号98のアミノ酸配列及び配列番号99のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0377

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0377】

(16C6)

配列番号106のアミノ酸配列及び配列番号107のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号108のアミノ酸配列及び配列番号109のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0379

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0379】

(34E11)

配列番号116のアミノ酸配列及び配列番号117のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号118のアミノ酸配列及び配列番号119のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(Vl)。

【手続補正 21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 3 8 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 8 1 】

(35H4)

配列番号126のアミノ酸配列及び配列番号127のヌクレオチド配列として同定された可変領域重鎖(Vh)。

配列番号128のアミノ酸配列及び配列番号129のヌクレオチド配列として同定された可変領域軽鎖(VI)。

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 4 0 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 4 0 0 】

(5.1 IL-12バイオアッセイ)

抗体を、IL-12応答性細胞株NK-92(CRL-2407, ATCC, Manassas, Virginia, USA)を用いて、IL-12中和能力についてアッセイした。B細胞クローニングプレートからの50 μ lの培養上清、又は抗体トランスフェクションからの50 μ lの上清を96ウェル組織培養プレートに移した。50 μ lのヒトIL-12(カタログ# Cyt-362, Prospec-Tany Technogene, Rehovot, Israel)を各ウェルに4ng/mlで添加した。プレートを室温で30～60分間インキュベートし、その後、 5×10^4 個のNK-92細胞を100 μ l中で各ウェルに添加した。培養物を37℃で3日間インキュベートし、上清をヒトインターフェロン- γ 産生についてアッセイした。アッセイ培地は、RPMI 1640、10%FBS、NEAA、ピルビン酸塩、50 μ M 2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及び10ng/mlヒトIL-2(カタログ# Z00368, GeneScript社, Piscataway, NJ, USA)である。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 配列表

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【配列表】

2013545438000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/065697

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/065697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/24
 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

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2010/088444 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; BOWEN MICHAEL [US]; WU HERREN [US]; DALL ACQUA WIL) 5 August 2010 (2010-08-05) the whole document	65-69 1-64, 83-122
X A	WO 2010/027767 A1 (SCHERING CORP [US]; PRESTA LEONARD G [US]; ERMAKOV GRIGORI P [US]) 11 March 2010 (2010-03-11) the whole document	75-82 1-64, 83-122
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 document 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

23 March 2012

Date of mailing of the international search report

30/03/2012

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

Marinoni J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/065697

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOUTRUBA NORA ET AL: "Review of ustekinumab, an interleukin-12 and interleukin-23 inhibitor used for the treatment of plaque psoriasis.", THERAPEUTICS AND CLINICAL RISK MANAGEMENT 2010 LNKD- PUBMED:20421912, vol. 6, March 2010 (2010-03), pages 123-141, XP002665071, ISSN: 1178-203X the whole document -----	1-64, 83-122
X	WO 2008/103473 A1 (SCHERING CORP [US]; PRESTA LEONARD G [US]; BEYER BRIAN M [US]; INGRAM) 28 August 2008 (2008-08-28) the whole document -----	70-74
A	the whole document -----	1-64, 83-122
X	WO 2008/106131 A2 (SCHERING CORP [US]; BOWMAN EDWARD PAUL [US]; CUA DANIEL J [US]; KASTEL) 4 September 2008 (2008-09-04) the whole document -----	70-74
A	the whole document -----	1-64, 83-122
A	WO 2010/035769 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]; IGAWA TOMOYUKI [JP]; ISHII SHINYA [JP]) 1 April 2010 (2010-04-01) the whole document & US 2011/098450 A1 (IGAWA TOMOYUKI [JP] ET AL) 28 April 2011 (2011-04-28) paragraph [0207] -----	1-64, 83-122
X	WO 2010/062896 A1 (ABBOTT LAB [US]; CORREIA IVAN R [US]; RADZIEJEWSKI CZESLAW H [US]; FRA) 3 June 2010 (2010-06-03) the whole document -----	75-82
A	the whole document -----	1-64, 83-122
A	EHSAN ALIAHMADI ET AL: "TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 39, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1221-1230, XP002635193, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.200838742 [retrieved on 2009-04-06] cited in the application the whole document -----	1-64, 83-122
----- -/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/065697

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WALDNER M J ET AL: "Novel cytokine-targeted therapies and intestinal inflammation", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 9, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 702-707, XP026766571, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2009.07.005 [retrieved on 2009-08-10] the whole document -----	1-64, 83-122
A	SCHMIDT-WEBER ET AL: "TH17 cells in the big picture of immunology", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY, INC, US, vol. 120, no. 2, 29 July 2007 (2007-07-29), pages 247-254, XP022199073, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2007.06.039 the whole document -----	1-64, 83-122
A	CHAN ANDREW C ET AL: "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 10, no. 5, May 2010 (2010-05), pages 301-316, XP002665072, the whole document -----	1-64, 83-122

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/065697

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010088444	A1	05-08-2010	AU 2010208125 A1	21-07-2011
			CA 2749200 A1	05-08-2010
			EP 2391384 A1	07-12-2011
			KR 20110108398 A	05-10-2011
			SG 172354 A1	28-07-2011
			US 2012034212 A1	09-02-2012
			WO 2010088444 A1	05-08-2010

WO 2010027767	A1	11-03-2010	AR 073140 A1	13-10-2010
			US 2011158992 A1	30-06-2011
			WO 2010027767 A1	11-03-2010

WO 2008103473	A1	28-08-2008	CA 2678863 A1	28-08-2008
			CN 101663320 A	03-03-2010
			EP 2064242 A1	03-06-2009
			EP 2426145 A1	07-03-2012
			JP 2010518858 A	03-06-2010
			US 2010111966 A1	06-05-2010
			WO 2008103473 A1	28-08-2008

WO 2008106131	A2	04-09-2008	AU 2008219681 A1	04-09-2008
			CA 2679400 A1	04-09-2008
			EP 2056838 A2	13-05-2009
			EP 2417974 A1	15-02-2012
			EP 2425838 A2	07-03-2012
			JP 2010520197 A	10-06-2010
			US 2010135998 A1	03-06-2010
			WO 2008106131 A2	04-09-2008

WO 2010035769	A1	01-04-2010	AR 073404 A1	03-11-2010
			AU 2009290162 A1	15-04-2010
			CA 2699834 A1	01-04-2010
			CA 2763039 A1	01-04-2010
			CN 101849006 A	29-09-2010
			CO 6362048 A2	20-01-2012
			EP 2330193 A1	08-06-2011
			JP 4550938 B2	22-09-2010
			JP 2010239958 A	28-10-2010
			KR 20100061834 A	09-06-2010
			MA 32707 B1	02-10-2011
			TW 201021829 A	16-06-2010
			US 2011098450 A1	28-04-2011
			WO 2010035769 A1	01-04-2010

WO 2010062896	A1	03-06-2010	AR 074427 A1	19-01-2011
			AU 2009319856 A1	03-06-2010
			CA 2742791 A1	03-06-2010
			CN 102301235 A	28-12-2011
			EP 2350649 A1	03-08-2011
			KR 20110096553 A	30-08-2011
			TW 201036627 A	16-10-2010
			US 2010172862 A1	08-07-2010
			UY 32279 A	30-06-2010
			WO 2010062896 A1	03-06-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/065697**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 065697

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-64, 83, 89-96, 98-106, 120(completely); 84-88, 97, 107-119, 121, 122(partially)

Bispecific antibodies comprising an anti-IL-6 antibody and an anti-IL-23 antibody and there use for the treatment of Th17 and Th22 mediated diseases; Combined use of IL6 and IL23or IL23/IL12 antibodies for treating the same

2. claims: 65-69(completely); 82, 84-88, 97, 107-119, 121, 122(partially)

IL-6 antibodies

3. claims: 70-74(completely); 82, 84-88, 97, 107-119, 121, 122(partially)

IL-23 antibodies

4. claims: 75-81(completely); 82, 84-88, 97, 107-119, 121, 122(partially)

IL-23/IL-12 antibodies

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		4 H 0 4 5		
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 2			
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	P			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48				
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5			
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00				
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06				
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00				
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06				
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02				
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00				
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10				
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02				

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, HU, I D, 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, 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, VN, ZA

(72) 発明者 ウィルリアム ブラドイ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 2 0 1 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 ゴルドン キング
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 ナタリエ ウインブラデ ナイルン
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 クルト ダビド シャネベク
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 パウル ヘフフネル スラグレ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 ケネットフ クフリストブヘル トホルント
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 ミチャエル ベテル バンブルント
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
 ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド

(72) 発明者 アンドレア ワング
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ

ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド
(72)発明者 ヘンギョ クウ
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル エアスト スイテ 2 0 2 エアストラ
ケ アベニュー 1 6 1 6 アルロズイネ, インコーポレーテッド
F ターム(参考) 4B024 AA01 BA46 CA07 DA02 EA02 EA04 GA13 HA01
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA05 CA25 CA44
4C076 CC05 CC07 EE23 EE59
4C085 AA14 AA16 BB11 BB18 BB50 CC23 DD62 EE01
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA22 EA24 FA74

专利名称(译)	抗体诱导体		
公开(公告)号	JP2013545438A	公开(公告)日	2013-12-26
申请号	JP2013527629	申请日	2011-09-09
[标]发明人	ケンネトフグラブステイン ウィルリアムブラドイ ゴルドンキング ナタリエウインブラデナイルン クルトダビドシャネベクク パウルヘフフネルスラグレ ケンネトフクフリストプヘルトホルント ミチャエルペテルバンブルント アンドレアワング ヘンギュクウ		
发明人	ケンネトフ グラブステイン ウィルリアム ブラドイ ゴルドン キング ナタリエ ウインブラデ ナイルン クルト ダビド シャネベクク パウル ヘフフネル スラグレ ケンネトフ クフリストプヘル トホルント ミチャエル ペテル バンブルント アンドレア ワング ヘンギュ クウ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C12P21/08 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61K47/48 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P1 /00 A61P3/10 A61P37/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/244 C07K16/248 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/33 C07K2317/40 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317 /622 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K2039/507 C07K16/468 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C12P21/08 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00. 102 G01N33/53.P A61K39/395.N A61K47/48 A61P43/00.105 A61P29/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P1/00 A61P3/10 A61P37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA46 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024 /HA01 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/CC05 4C076 /CC07 4C076/EE23 4C076/EE59 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB18 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045/FA74		
代理人(译)	石川 彻		
優先权	61/381789 2010-09-10 US		
其他公开文献	JP2013545438A5 JP6173911B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明特别涉及包含抗IL-6抗体或其衍生物和抗IL-23抗体或其衍生物的二价双特异性构建体，及其在治疗中的用途。 本发明还涉及有用的抗IL-6和抗IL-23抗体。 [选择图]无

