

(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2018-503368  
(P2018-503368A)

(43) 公表日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06 Z N A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G O 1 N 33/53 R	
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2017-532650 (P2017-532650)  
 (86) (22) 出願日 平成27年12月15日 (2015.12.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年7月18日 (2017.7.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/079693  
 (87) 国際公開番号 W02016/096788  
 (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)  
 (31) 優先権主張番号 14198749.5  
 (32) 優先日 平成26年12月18日 (2014.12.18)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

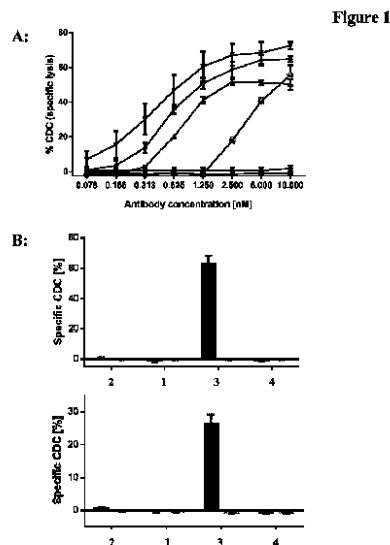
(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ124  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CDCを誘発する抗体を決定するためのアッセイ法および方法

(57) 【要約】

(i) 第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位と、(ii) 第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位とを含む組成物の補体依存性細胞障害を測定するための方法が、本明細書において報告され、本方法は、該第1の抗原と該第2の抗原とを発現する細胞を、該組成物と共にインキュベートする段階; 混合物にウサギ補体を添加する段階; および細胞溶解を測定し、それによって、該組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組成物の補体依存性細胞障害を測定するための方法であって、  
該組成物が、

(i) 第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii) 該第1の抗原上または第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位  
を含み、

該方法が、

(a) 該第1の抗原を発現するかまたは該第1の抗原と該第2の抗原とを発現するヒト細胞を、該組成物と共にインキュベートする段階、

(b) (a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c) 細胞溶解を測定し、それによって、該組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む、方法。

10

## 【請求項 2】

前記組成物が、第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する第1のヒト抗体またはヒト化抗体、および、第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2のヒト抗体またはヒト化抗体を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記組成物が、第1の抗原上の第1のエピトープにおよび第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合するヒト二重特異性抗体またはヒト化二重特異性抗体を含む、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記組成物が、前記第1の抗原上の第1のエピトープにおよび該第1の抗原上の第2のエピトープに結合し、かつ、該第1のエピトープおよび該第2のエピトープが異なる、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記第1のエピトープおよび前記第2のエピトープが、重複部分のないエピトープである、請求項4に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

細胞溶解を補体添加後0.5時間目~3時間目の間に測定する、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記ヒト細胞が、ヒト癌細胞、または自己免疫応答を誘発するヒト細胞である、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ヒト癌細胞が、上皮由来のヒト癌腫細胞である、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ヒト癌細胞がヒトB細胞リンパ腫細胞である、請求項7に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

無血清方法である、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記ウサギ補体が仔ウサギ補体である、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記第1の結合部位対前記第2の結合部位の比が0.5:1~1:0.5である、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

50

## 発明の分野

本発明は、エフェクター機能を誘発する抗体および抗体組合せを検出/選択するためのアッセイ法および方法の分野に属する。

### 【背景技術】

#### 【0002】

### 背景

免疫グロブリンは、FcRnのような特定のFc受容体ならびにC1qに対する2つの結合部位を含み、これらは各重鎖Fc領域中に1つずつある。

#### 【0003】

C1qに対する単量体IgGの親和性はかなり弱いため(約 $10^{-4}$ Mの親和性)、補体活性化のためには、複数の免疫グロブリン分子が必要である(例えば、Sledge et al., J. Biol. Chem. 248 (1973) 2818-2813、Hughes-Jones et al., Mol. Immunol. 16 (1979) 697-701を参照されたい)。多価C1qの結合は、抗原に基づく免疫グロブリン分子の結合、したがって補体活性化によって増加し得る(約 $10^{-8}$ Mの親和性)(例えば、Burton et al., Mol. Immunol. 22 (1990) 161-206を参照されたい)。

10

#### 【0004】

C1qの三次元構造は、チューリップの花束に似ており、抗体結合領域を含む球状の頭部を6つ含んでいる(例えば、Perkins et al., Biochem. J. 228 (1985) 13-26、Poon et al., J. Mol. Biol. 168 (1983) 563-577、Reid et al., Biochem. Soc. Trans. 11 (1983) 1-12、およびWeiss et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 573-581を参照されたい)。

20

#### 【0005】

US 5,851,528では、補体活性化を阻害する方法が報告されている。CD55およびCD59に対する組換え抗体およびそれらの使用が、US8,034,902において報告されている。US2012/0226020では、補体活性化を調節するハイブリッドポリペプチドおよびキメラポリペプチドが報告されている。新規の調整物質および使用方法が、US2013/0302355において報告されている。US2010/0255011では、標的細胞に対する補体調節タンパク質の活性を調整するための組成物および方法が報告されている。

#### 【0006】

WO2008/007648では、抗体の分類が、細胞表面抗原を認識できる抗体を同じ種の細胞と接触させる段階、各細胞を解析し、得られたデータを比較する段階、および類似性に基づいて個々の抗体を分類する段階を含むことが報告されている。標的細胞に対する補体調節タンパク質の活性を調整するための組成物および方法が、WO2010/120541において報告されている。

30

#### 【0007】

Mekhaieil, D.N.A.らは、エフェクター機能が改変されたポリマーヒトFc融合タンパク質を報告している(Nature Sci. Rep. 1 (2011) 1-11)。エフェクター機能が変更されたポリペプチド変種が、WO00/42072において報告されている。US2008/0089892では、Fc領域変種が報告されている。変更された抗体Fc領域およびその使用が、WO2006/105062において報告されている。

#### 【0008】

新生仔ウサギ補体は、抗体の助けを借りて、異なる複雑な免疫細胞集団に由来するリンパ球を枯渇させて移植を容易にするのに使用された(例えば、Herve, P., et al., Transplant. 39 (1985) 138-143を参照されたい)。

40

#### 【0009】

仔ウサギの補体は、マウス由来の抗体を用いて腎細胞癌(RCC)において補体依存性細胞障害(CDC)をうまく誘発することができなかった(例えば、Vessella, R.L., et al., Canc. Res. 45 (1985) 6131-6139を参照されたい)。

#### 【0010】

ウサギ血清は、p97(=メラノトランスフェリン)に結合する単一のマウスIgG2a抗体および対のマウスIgG2a抗体を用いるCDCによって、ヒトSK-Mel28黒色腫細胞(非上皮性=非癌腫

50

)を死滅させることができた(例えば、Hellstroem, I., et al., *Int. J. Canc.* 31 (1983) 553-555を参照されたい)。

【0011】

膜結合型補体調節タンパク質(mCRP)は、単球および好中球と比べて、リンパ球での発現レベルは低い(例えば、Nuutila, J., et al., *Hum. Immunol.* 74 (2013) 522-530を参照されたい)。

【0012】

免疫逃避メカニズムとしてのmCRPの上方調節は、例えばリンパ腫または黒色腫においてよりも、癌細胞の大半において、より顕著である(例えば、Fishelson, Z., et al., *Mol. Immunol.* 40 (2003) 109-123を参照されたい)。

10

【0013】

同系血清(例えば、ヒト癌腫細胞およびヒト抗体と共に正常ヒト血清(NHS))を用い、mCRPのCDC阻害作用を伴わない設定(例えば、Dechant et al., 2008, *Cancer Research*を参照されたい)、または同系血清(例えば、ヒト癌腫細胞およびヒト抗体と共に正常ヒト血清(NHS))を用い、mCRPであるCD46、CD55、およびCD59をsiRNAに頼って下方調節することによって抑えなければならなかった強いmCRP依存CDC阻害効果を示している設定(例えば、Mamidi, S., et al., *Mol. Oncol.* 7 (2013) 580-594を参照されたい)のどちらでも、抗体を用いてCDCが示された。

【0014】

Konishi, e.らは、補体依存性細胞障害を利用して低レベルの抗体を測定すること:日本脳炎ウイルスモデルにおける非構造タンパク質1への適用を報告した(*Clin. Vac. Immunol.* 15 (2008) 88-94)。Klitgaard, J.らは、2つの抗cosモノクローナル抗体を組み合わせると、慢性リンパ性白血病細胞に対する補体依存性細胞障害が相乗的に誘導されることを報告した(*Brit. J. Hematol.* 163 (2013) 182-193)。Hellstrom, I.らは、黒色腫抗原p97の2つの決定基に対するモノクローナル抗体が、補体依存性細胞障害において相乗的に作用することを報告した(*J. Immunol.* 127 (1981) 157-160)。Maddipatla, S.らは、Trail-R1およびCD20を標的とするモノクローナル抗体の組合せによってB細胞リンパ腫に対する抗腫瘍活性が増強されることを報告した(*Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 4556-4564)。Huang, J.らは、ヒトDAF、CD59、およびMCPの発現によって、ヒト補体を媒介とする溶解から異種細胞を保護することについて報告した(*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31 (2001) 203-209)。Qu, Z.らは、B細胞リンパ腫に対してインビトロおよびインビボで活性である、CD20およびCD22に対する組換え二重特異性モノクローナル抗体(bsMab)について報告した(*Blood* 108 (2006) 713a-714a)。

20

30

【発明の概要】

【0015】

概要

癌腫細胞表面抗原に結合する抗体の、癌腫細胞についてのCDC能力を解析するための、改良されたアッセイ法が本明細書において報告される。このアッセイ法は、例えばsiRNAによるmCRPの下方調節のような、例えば冗長で複雑で不安定なアプローチを必要としない。本アプローチは、体内でCDCプレッシャーを逃れる免疫逃避メカニズムとしての癌腫細胞におけるmCRPの上方調節に対抗するものである。本アッセイ法は、mCRPの作用が原因で他の設定においてCDCを誘発できない、癌腫細胞表面抗原に結合する抗体の、CDCを測定するための手段を提供する。

40

【0016】

ヒト抗体またはヒト化抗体およびヒト癌腫細胞と共にウサギ補体を用いるような非同系血清を用いて、ヒト細胞、特にヒト癌腫細胞において、非常に安定的に(robust manner)補体依存性細胞障害(CDC)を誘発できることが判明している。癌腫細胞表面抗原に特異的に結合するヒト抗体またはヒト化抗体のCDC能力を測定するためにBRCを使うことにより、癌腫細胞表面の上方調節されたヒトmCRPは、他のアッセイ法の設定で観察されるヒト抗体またはヒト化抗体のCDC誘発作用を抑制せず、

50

-いくつかの場合において、mCRPがsiRNAによって下方調節されている場合、正常ヒト血清(NHS)は、ヒト抗体またはヒト化抗体およびヒト腫瘍細胞を用いる場合のみCDCを誘発し得るという信頼性のなさを克服することができ、かつ

-様々な抗体、抗体形態、または抗体コンジュゲートのCDC能力のハイスループットなスクリーニングが可能になる。

【0017】

本明細書において報告される方法は、リンパ腫細胞または上皮由来の癌腫細胞などの癌細胞、ならびに自己免疫応答を誘発する細胞と共に使用することができる。

【0018】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii)第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位

を含む組成物の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、この方法は、

(a)第1の抗原と第2の抗原とを発現する細胞を、組成物と共にインキュベートする段階

、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c)細胞溶解を測定し、それによって、組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

【0019】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii)第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位

を含みCDC活性を有している組成物を選択するための方法であり、この方法は、

(a)第1の抗原と第2の抗原とを発現する細胞を、2種またはそれ以上の組成物と共に個別にインキュベートする段階、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、

(c)細胞溶解を測定し、それによって、組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階、および

(d)段階(c)の結果に基づいて、CDC活性を有している組成物を選択する段階を含む。

【0020】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの第1の結合部位

、

(ii)任意で、第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合部位

を含む抗体の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、この方法は、

(a)少なくとも1つの第1の抗原と任意の第2の抗原とを発現する細胞を、抗体と共にインキュベートする段階、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c)細胞溶解を測定し、それによって、抗体の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

【0021】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの第1の結合部位

、

(ii)任意で、第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合部位

10

20

30

40

50

を含む抗体の補体依存性細胞障害に対する種特異的mCRP誘発性阻害に打ち勝つための方法であり、この方法は、

(a)少なくとも1つの第1の抗原と任意の第2の抗原とを発現する細胞を、抗体と共にインキュベートする段階、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c)細胞溶解を測定し、それによって、抗体の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

【0022】

1つの態様において、抗体は、抗体形態である。

【0023】

1つの態様において、2種またはそれ以上の組成物は、第1および/または第2のエピトープまたは抗原が異なる。

【0024】

全局面の1つの態様において、組成物は、第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する第1のヒト抗体またはヒト化抗体、および、第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2のヒト抗体またはヒト化抗体を含む。

【0025】

全局面の1つの態様において、組成物は、第1の抗原上の第1のエピトープにおよび第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する、ヒト二重特異性抗体またはヒト化二重特異性抗体を含む。

【0026】

全局面の1つの態様において、第1の抗原および第2の抗原は同じ抗原であり、かつ第1のエピトープおよび第2のエピトープは異なる。1つの態様において、第1のエピトープおよび第2のエピトープは、重複部分のないエピトープである。

【0027】

全局面の1つの態様において、細胞溶解を補体添加後0.5時間目～3時間目の間に測定する。

【0028】

全局面の1つの態様において、細胞は癌細胞である。1つの態様において、癌細胞は、癌腫細胞である。1つの好ましい態様において、癌細胞は、上皮由来の癌腫細胞である。

【0029】

全局面の1つの態様において、細胞はヒト細胞である。1つの態様において、ヒト細胞は、ヒト癌細胞である。1つの態様において、ヒト細胞は、ヒトB細胞リンパ腫細胞である。1つの態様において、ヒト癌細胞は、ヒト癌腫細胞である。1つの好ましい態様において、ヒト癌細胞は、上皮由来のヒト癌腫細胞である。

【0030】

全局面の1つの態様において、方法は無血清方法である。

【0031】

全局面の1つの好ましい態様において、ウサギ補体は、仔ウサギの補体である。

【0032】

1つの態様において、第1の結合部位対第2の結合部位の比は、10:1～1:10である。1つの好ましい態様において、比は、0.5:1～1:0.5である。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】A:LDH放出に基づいて測定し、CDC%として示した、BT-474細胞に対するCDC率;黒(closed)丸:トラスツズマブ;黒四角形:ペルツズマブ;上向きの三角形:トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ;下向きの三角形=二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖;ひし形=二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖、糖鎖改変(glycoengineered);白(open)丸=二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型。B:BT-474細胞に対するCDC率(上側のグラフ)およびSK-Br3細胞に対するCDC率(下側のグラフ);1=トラスツズマブ;2=ペルツズマブ;3=トラスツズマブお

10

20

30

40

50

よびペルツズマブの組合せ4=ヒトIgG1、 軽鎖対照;左のバー:仔ウサギ補体を用いた場合のCDC率;右のバー:仔ウサギ補体を用いない場合のCDC率;CDC[%]およびCDC率は、細胞障害率(specific cytotoxicity)[%]を意味する。

【図2】細胞指標(ACEA)の経時変化;1=トラスツズマブ;2=ペルツズマブ;3=培地のみ;4=補体対照;5=トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ;6=二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖;7=二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖、糖鎖改変;8=二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型。

【図3】細胞指標(ACEA)の経時変化;1=培地のみ;2=補体対照;3=抗CD55抗体、ヒト血清プール、トラスツズマブ、ペルツズマブを用いた場合;4=抗CD59抗体、ヒト血清プール、トラスツズマブ、ペルツズマブを用いた場合;5=抗CD55抗体、抗CD59抗体、ヒト血清プール、トラスツズマブ、およびペルツズマブを用いた場合;6=トラスツズマブ、ペルツズマブ、および仔ウサギ補体。

【図4】CD46、CD55、CD59ノックダウン(三重KO)SK-OV-3細胞を用いたCDCアッセイ法の結果。10 µg/mLの各抗体、仔ウサギ補体、および正常ヒト血清と共に、細胞をそれぞれインキュベートした。

【発明を実施するための形態】

【0034】

発明の態様の詳細な説明

#### 1. 定義

「C1q結合」という用語は、抗原に結合した抗体へのC1qの結合を意味する。抗原への抗体の結合は、本明細書において報告される方法およびアッセイ法において、非限定的にインビボおよびインビトロである。

【0035】

1つの態様において、C1q結合は、(i)4 で一晩、PBSに溶かした濃度範囲0.007~25.0mg/mLの抗体でマルチウェルプレート(例えば96ウェルELISAプレート)をコーティングする段階、(ii)プレートを洗浄する段階、(iii)0.5×PBS/0.025%Tween20/0.1%ゼラチンを用いて、残っている反応性表面残基をブロックする段階、(iv)(a)3%のプールしたヒト血清、(b)ウサギ抗ヒトC1q、および(c)HRPにコンジュゲートされたブタ抗ウサギIgG抗体と共に37 で1時間、マルチウェルプレートをインキュベートする段階であって、中間の洗浄段階を含む、段階、(v)1mg/mLの2,2'-アジノ-ビス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸と共に約30分間インキュベートする段階、(vi)100 µLの2%シュウ酸を添加する段階、ならびに(vii)マイクロプレートリーダーにおいて405nmでの吸光度を測定する段階を含む方法において測定される。

【0036】

本明細書において、抗体へのC1q結合とは、高い結合力の結合をもたらす多価性の相互作用を意味する。

【0037】

「補体活性化」という用語は、古典的補体経路の開始を意味する。この開始は、抗体-抗原複合体に補体成分C1qが結合した結果として起こる。C1qは、古典的補体カスケードにおける最初のタンパク質である。C1qは、活性なC3コンバーターゼの形成をもたらす一連の反応に関与しており、活性なC3コンバーターゼは、補体成分C3を切断してC3bおよびC3aにする。C3bが膜C5に結合して、いわゆるC5bが生じ、C5bが補体活性化の後期事象(C5b、C6、C7、C8、およびC9が集合して膜侵襲複合体(MAC)になる)を誘発する。最終的に、補体カスケードにより、細胞壁に細孔が形成されて、細胞溶解が引き起こされる(補体依存性細胞障害(complement dependent cytotoxicity)、CDCとしても知られる)。

【0038】

「補体依存性細胞障害(CDC)」という用語は、細胞の表面に位置する抗原に抗体が結合すると、上記に概説したメカニズムに従って細胞溶解をもたらす、抗体を介した補体活性化のプロセスを意味する。CDCは、特異的CDCアッセイ法を用いてインビトロで測定することができる。当技術分野では、正常ヒト血清が補体供給源として使用される。

10

20

30

40

50

## 【0039】

「補体依存性細胞性細胞障害(CDCC)」という用語は、補体3(C3)切断産物(標的細胞上に位置し、抗体を介した補体活性化の結果として生じる)を認識する補体受容体を発現する細胞によって媒介される細胞死滅のプロセスを意味する。

## 【0040】

「親和性」とは、ある分子(例えば抗体)の1つの結合部位とその結合相手(例えば抗原)の間の非共有結合性相互作用の総合計の強さを意味する。別段の定めが無い限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー(例えば、抗体および抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。通常、分子Xの相手Yに対する親和性は、解離定数( $k_d$ )によって表すことができる。親和性は、本明細書において説明するものを含む、当技術分野において公知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な説明的かつ例示的態様を以下に説明する。

10

## 【0041】

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

## 【0042】

「エフェクター機能」とは、抗体クラスによって異なる、抗体のFc領域に起因し得る生物学的活性を意味する。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合および補体依存性細胞障害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC);食作用;細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)の下方調節;ならびにB細胞活性化が含まれる。

20

## 【0043】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列のFc領域および変種Fc領域を含む。1つの態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、重鎖のCys226またはPro230からカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys47)は、存在する場合もあれば存在しない場合もある。本明細書において別段の指定がない限り、Fc領域中または定常領域中のアミノ酸残基の番号付与は、EU指標とも呼ばれるEU番号付与方式に従い、これは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242において説明されている。

30

## 【0044】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は同義的に使用され、外来性核酸が導入された細胞を、そのような細胞の子孫を含めて意味する。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、初代形質転換細胞およびそれに由来する子孫が継代の回数に関わらず含まれる。子孫の核酸内容は親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含んでもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたのと同じ機能または生物活性を有している変異子孫は、本明細書に含まれる。

40

## 【0045】

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

## 【0046】

本明細書において使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可

50

変性であり(「相補性決定領域」もしくは「CDR」)、かつ特徴的な構造の(structurally defined)ループ(「超可変ループ」)を形成し、かつ/または抗原接触残基(「抗原接触部分(contact)」)を含む、抗体可変ドメインの各領域を意味する。一般に、抗体は6個のHVRを含む。3個はVH中にあり(H1、H2、H3)、3個はVL中にある(L1、L2、L3)。

【0047】

本明細書におけるHVRには、

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

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

(c)アミノ酸残基27c~36(L1)、46~55(L2)、89~96(L3)、30~35b(H1)、47~58(H2)、および93~101(H3)に存在する抗原接触部分(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996));ならびに

(d)HVRアミノ酸残基46~56(L2)、47~56(L2)、48~56(L2)、49~56(L2)、26~35(H1)、26~35b(H1)、49~65(H2)、93~102(H3)、および94~102(H3)を含む、(a)、(b)、および/または(c)の組合せが含まれる。

【0048】

別段の定めが無い限り、本明細書において、可変ドメイン中のHVR残基および他の残基(例えばFR残基)は、前記のKabatらに従って番号を付与する。

【0049】

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

【0050】

「単離された」核酸とは、その天然環境の構成要素から分離された核酸分子を意味する。単離された核酸は、その核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、その核酸分子は、染色体外に存在するか、または天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0051】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を意味する。すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、存在し得る変種抗体を除いて、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。存在し得る変種抗体は、例えば、天然に存在する変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物を作製する間に発生し、このような変種は、通常、少量で存在する。様々な決定基(エピトープ)を対象とする様々な抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、1つの抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られたものであるという抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用するためのモノクローナル抗体は、限定されるわけではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部分を含むトランスジェニック動物を使用する方法を含む、様々な技術によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法および他の例示的な方法は、本明細

書において説明される。

【0052】

マウスモノクローナル抗体4D5は、HER2を過剰発現する癌細胞において特異的にHER2を標的とする一方で、生理学的レベルのHER2を発現する細胞に対しては効果を有していない。ヒト化(4D5)モノクローナル抗体(hu4D5)は、1998年後半にFDAの販売承認を得た薬物ハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ、rhuMab HER2、US5,821,337)として商業的に公知である。

【0053】

ペルツズマブ(PERJETA(商標)、rhuMab 2C4、US7,862,817)は、ヒト化モノクローナル抗体であり、細胞表面でHER2受容体が他のHER受容体(EGFR/HER1、HER3、およびHER4)と対形成(二量体化)すること、すなわち、腫瘍の増殖および生存においてある役割を果たしていると考えられているプロセスを特異的に妨げるように設計されている。PERJETAは、HER2陽性の転移性または局所的に再発性の切除不可能な乳癌に罹患している成人患者においてハーセプチン(トラスツズマブ)およびドセタキセルとの組合せで承認されており、2013年9月にネオアジュバント乳癌治療のためのFDA承認を得た。

10

【0054】

ペルツズマブは、二量体化に不可欠であるHER2のドメインIIに結合するのに対し、トラスツズマブは、HER2の細胞外ドメインIVに結合する。

【0055】

本明細書において使用される「癌」という用語は、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細気管支肺胞(bronchioloalviolar)細胞肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭部または頸部の癌、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、胃の癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌または尿管癌、腎細胞癌、腎う癌、中皮腫、肝細胞癌、胆道癌、中枢神経系(CNS)の新生物、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形性神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫(schwannoma)、上衣腫(ependymoma)、髄芽細胞腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、およびユーイング肉腫を意味し、上記の癌のいずれかの難治性のタイプまたは上記の癌の内の1種もしくは複数種の組合せを含む。1つの態様において、癌は、癌腫である。

20

30

【0056】

「抗原結合部位」という用語は、本明細書において使用される場合、抗原結合を担っている抗体のアミノ酸残基を意味する。抗体の抗原結合部分は、「相補的(complementary)決定領域」または「CDR」に由来するアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」領域または「FR」領域とは、本明細書において定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインは、N末端からC末端に向かって、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原結合に最も寄与し、抗体の特性を定める領域である。CDR領域およびFR領域は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)の標準的な定義および/または「超可変ループ」に由来する残基に基づいて決定される。

40

【0057】

抗体特異性とは、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を意味する。例えば、天然の抗体は単一特異性である。本明細書において使用される「単一特異性」抗体という用語は、1つまたは複数の結合部位を有しており、各結合部位が同じ抗原の同じエピトープに結合する、抗体を意味する。

【0058】

「二重特異性抗体」は、2つの異なる抗原結合特異性を有している抗体である。本明細書において使用される「二重特異性」抗体という用語は、それぞれが異なるエピトープに結合する少なくとも2つの結合部位を有している抗体を意味する。

50

## 【0059】

本出願内で使用される「価」という用語は、抗体分子中に特定の数の結合部位が存在することを意味する。したがって、「二価」、「四価」、および「六価」という用語は、1つの抗体分子中に2個の結合部位、4個の結合部位、および6個の結合部位が存在することをそれぞれ意味する。本発明による二重特異性抗体は、少なくとも「二価」であり、「三価」または「多価」(例えば、「四価」もしくは「六価」)であってよい。

## 【0060】

本明細書において使用される場合、「結合する」または「特異的に結合する」という用語は、インビトロアッセイ法における、好ましくは表面プラズモン共鳴アッセイ法(SPR、BIAcore、GE-Healthcare Uppsala, Sweden)における、抗原のエピトープへの抗体の結合を意味する。結合親和性は、用語 $k_a$ (抗体/抗原複合体における抗体の会合速度定数)、 $k_d$ (解離定数)、および $K_D(k_d/k_a)$ を用いて定義される。「結合する」または「特異的に結合する」とは、結合親和性( $K_D$ )が $10^{-7}$  mol/Lまたはそれ未満であることを意味する。

10

## 【0061】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができる任意のポリペプチド決定基を含む。特定の態様において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなど分子の化学的に活性な表面基(surface grouping)を含み、いくつかの態様において、特殊な三次元構造特徴、およびまたは特殊な荷電特性を有し得る。エピトープとは、抗体が結合する抗原領域である。

20

## 【0062】

II 本明細書において報告される方法

癌腫は上皮由来であり、これらの細胞は、インビボでCDCプレッシャーを逃れる免疫逃避メカニズムとしてmCRP(特にCD55およびCD59)をしばしば上方調節する。いくつかの場合において、癌腫細胞表面抗原に結合する抗体は、mCRPの作用/存在が原因で、CDCを誘発することができない。これまでは、癌腫細胞におけるこの問題は、例えばsiRNAによるmCRPの下方調節のような冗長で複雑で不安定なアプローチを用いて取り組まれてきた。本明細書において、癌腫細胞表面抗原に結合する抗体のCDC能力を解析するための、改良された、すなわち、とりわけ、より安定性が高くハイスループットで適合性のあるアッセイ法が報告される。

30

## 【0063】

一方では1つまたは複数の細胞表面抗原に特異的に結合し、かつ他方ではヒト由来のFc領域ポリペプチドを含む分子を含む組成物、例えば、2つもしくはそれ以上のヒト抗体もしくはヒト化抗体の組合せまたはヒト二重特異性抗体もしくはヒト化二重特異性抗体の補体依存性細胞障害を測定するためには、非同系補体、すなわちウサギ補体、例えば仔ウサギ補体を使用しなければならないことが判明している。予想外に、同系補体を使用しても、機能的な方法が得られなかった。同様に、モルモット補体(特定の非同系補体)を用いても、機能的なアッセイ法が得られなかった。

## 【0064】

抗体組合せまたは二重特異性抗体のCDC活性を測定するための方法が、本明細書において報告される。この方法は、ヒト血清およびヒト癌細胞とのインキュベーションでは信頼のおける結果が得られない場合に、特に有用である。

40

## 【0065】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i) 第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii) 第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位

を含む組成物の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、この方法は、

(a) 第1の抗原と第2の抗原とを発現する細胞を、組成物と共にインキュベートする段階

50

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および  
(c)細胞溶解を測定し、それによって、組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

【0066】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii)第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位

を含み、CDC活性を有している組成物を選択するための方法であり、この方法は、

(a)第1の抗原と第2の抗原とを発現する細胞を、2種またはそれ以上の組成物と共に個別にインキュベートする段階、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、

(c)細胞溶解を測定し、それによって、組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階、および

(d)段階(c)の結果に基づいて、CDC活性を有している組成物を選択する段階を含む。

【0067】

本明細書において報告される1つの局面は、

(i)第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの第1の結合部位

(ii)任意で、第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合部位を含む抗体の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、この方法は、

(a)少なくとも1つの第1の抗原と任意の第2の抗原とを発現する細胞を、抗体と共にインキュベートする段階、

(b)(a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c)細胞溶解を測定し、それによって、抗体の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

【0068】

単一特異性抗体は、本明細書において報告されるアッセイ法において機能しないことが判明している。

【0069】

驚くべきことに、ヒト癌細胞、ヒト抗体またはヒト化抗体、およびウサギ由来の非同系補体の組合せが、機能的アッセイ法をもたらすことが判明している。

【0070】

1つの態様において、細胞は、第1のエピトープおよび第2のエピトープを発現する。

【0071】

1つの態様において、第1の抗原および第2の抗原は、細胞表面抗原である。

【0072】

細胞表面抗原を発現する細胞は、任意の細胞であることができる。1つの態様において、細胞は、癌細胞である。1つの態様において、癌細胞は、癌腫細胞である。

【0073】

補体依存性細胞障害は、補体の添加後1時間目または2時間目に測定すべきである。したがって、1つの態様において、細胞溶解は、補体、すなわち仔ウサギ補体の添加後0.5時間目~3時間目の間に測定する。1つの態様において、細胞溶解は、補体添加後1時間目~2時間目の間に測定する。

【0074】

細胞溶解は、例えばLDH放出または細胞生存度の測定のような任意の適切な方法を用いて測定することができる。したがって、1つの態様において、細胞溶解は、LDH放出または細胞生存度を測定することによって測定する。

10

20

30

40

50

## 【0075】

本明細書において報告される方法は、血清の存在を必要としない。したがって、1つの態様において、この方法は、無血清の方法である。

## 【0076】

本明細書において報告される方法は、結合を得るために互いに交差競合しないが、(単独ではなく)組み合わせさせてCDCを発揮する抗体組合せを選択するために使用することができる。

## 【0077】

本明細書において報告される1つの局面は、組成物の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、

この組成物は、

(i) 第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第1のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第1の結合部位、および

(ii) 第1の抗原上または第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合し、ヒト由来の第2のFc領域ポリペプチドにコンジュゲートされている、第2の結合部位を含み、

この方法は、

(a) 第1の抗原を発現するかまたは第1の抗原と第2の抗原とを発現するヒト細胞を、組成物と共にインキュベートする段階、

(b) (a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c) 細胞溶解を測定し、それによって、組成物の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

## 【0078】

本明細書において報告される1つの局面は、2つの単一特異性抗体の組合せまたは二重特異性抗体の補体依存性細胞障害を測定するための方法であり、

(i) 第1の単一特異性抗体は、第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合し、第2の単一特異性抗体は、第1の抗原上もしくは第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合するか、または

(ii) 二重特異性抗体は、第1の抗原上の第1のエピトープに特異的に結合する第1の結合部位、および第1の抗原上もしくは第2の抗原上の第2のエピトープに特異的に結合する第2の結合部位を含み、

この方法は、

(a) 第1の抗原を発現するかまたは第1の抗原と第2の抗原とを発現する上皮由来のヒト癌腫細胞を、2つの単一特異性抗体の組合せと共にまたは二重特異性抗体と共にインキュベートする段階、

(b) (a)の混合物にウサギ補体を添加する段階、および

(c) 細胞溶解を測定し、それによって、2つの単一特異性抗体の組合せまたは二重特異性抗体の補体依存性細胞障害を測定する段階を含む。

## 【0079】

ヒト化抗体

典型的には、治療用物質として使用しようとする非ヒト抗体をヒト化して、非ヒト親抗体の特異性および親和性を保持しつつ、ヒトに対する免疫原性を低下させる。通常、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR(またはその一部分)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはその一部分)がヒト抗体配列に由来する、1つまたは複数の可変ドメインを含む。また、ヒト化抗体は、完全長ヒト定常領域についての少なくとも1つの部分も任意で含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復させるか、または向上させるために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基の由来元である抗体)に由来する対応する残基で置換されている。

## 【0080】

ヒト化抗体およびそれらを作製する方法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J.

10

20

30

40

50

, *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633において概説されており、例えば、Riechmann, I. et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 86 (1989) 10029-10033; US5,821,337、US7,527,791、US6,982,321、およびUS7,087,409; Kashmiri, S.V., et al., *Methods* 36 (2005) 25-34(特異性決定領域(SDR)グラフィングを説明); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498(「リサーフェシング」を説明); Dall'Acqua, W.F., et al., *Methods* 36 (2005) 43-60(「FRシャッフリング」を説明); Osbourn, J., et al., *Methods* 36 (2005) 61-68;およびKlimka, A., et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260(「FRシャッフリング」に取り組む「導かれた選択」アプローチを説明)においてさらに説明されている。

#### 【0081】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域には、「ベストフィット」法(例えば、Sims, M.J., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308を参照されたい)を用いて選択されたフレームワーク領域;特定のサブグループの軽鎖可変領域または重鎖可変領域のヒト抗体コンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289;およびPresta, L.G., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632を参照されたい);ヒト成熟(体細胞性に変異した)フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域(例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633を参照されたい);およびFRライブラリーをスクリーニングして得られたフレームワーク領域(例えば、Baca, M., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684およびRosok, M.J., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618を参照されたい)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0082】

##### 多重特異性抗体

特定の態様において、本明細書において報告される方法において使用される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位/抗原/エピトープに対する結合特異性を有しているモノクローナル抗体である。特定の態様において、二重特異性抗体は、同じ抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

#### 【0083】

多重特異性抗体を作製するための技術には、異なる特異性を有している2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え同時発現(Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540、WO93/08829、およびTrauneker, A., et al., *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659を参照されたい)および「ノブインホール(knob-in-hole)」遺伝子工学(例えばUS5,731,168を参照されたい)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。また、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電的ステアリング(electrostatic steering)効果を遺伝子工学により改変すること(WO2009/089004を参照されたい);2つまたはそれ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、US4,676,980およびBrennan, M., et al., *Science* 229 (1985) 81-83を参照されたい);二重特異性抗体を作製するためのロイシンジッパーを用いること(例えば、Kostelny, S.A., et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553を参照されたい);二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術を用いること(例えば、Holliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448を参照されたい);単鎖Fv(sFv)二量体を用いること(例えば、Gruber, M., et al., *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374を参照されたい);および例えばTutt, A., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69で説明されているように三重特異性抗体を調製することによって、多重特異性抗体を作製することもできる。

#### 【0084】

「オクトパス抗体(Octopus antibody)」を含む、3つまたはそれ以上の機能的抗原結合部位を有している遺伝子工学により改変された抗体もまた、本明細書に含まれる(例えばUS2006/0025576を参照されたい)。

#### 【0085】

10

20

30

40

50

抗体にはまた、「二重作用性Fab」または「DAF」も含まれる(例えばUS2008/0069820を参照されたい)。

【0086】

本明細書の抗体または断片にはまた、WO2009/080251、WO2009/080252、WO2009/080253、WO2009/080254、WO2010/112193、WO2010/115589、WO2010/136172、WO2010/145792、およびWO2010/145793において説明されている多重特異性抗体も含まれる。

【0087】

組換え方法および組成物

抗体は、例えば、US4,816,567において説明されているようにして、組換え方法および組成物を用いて作製することができる。発現のためには、抗体の個々のポリペプチド鎖をコードする核酸が必要である。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/または抗体のVHを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖および/または重鎖)をコードし得る。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター(例えば発現ベクター)が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つの態様において、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターおよび抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、それらを用いて形質転換されている)。1つの態様において、宿主細胞は、真核生物性、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ系細胞(例えば、YO細胞、NS0細胞、Sp20細胞)である。1つの態様において、抗体を作製する方法が提供され、この方法は、抗体の発現に適した条件下で、上記に提供されるような抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養する段階、および任意で、宿主細胞(または宿主細胞培地)から抗体を回収する段階を含む。

【0088】

抗体を組換え作製する場合、例えば前述したような抗体をコードする核酸は、単離され、宿主細胞におけるその後のクローニングおよび/または発現のために、1つまたは複数のベクター中に挿入される。このような核酸は、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)、容易に単離および配列決定され得る。

【0089】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞には、本明細書において説明する原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合には特に、細菌において作製することができる。細菌における抗体断片および抗体ポリペプチドの発現については、例えば、US5,648,237、US5,789,199、およびUS5,840,523を参照されたい;また、大腸菌(*E. coli*)における抗体断片の発現を説明しているCharlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照されたい)。発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離することができ、さらに精製することができる。

【0090】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物も、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主であり、これらには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、その結果、部分的または全面的にヒトグリコシル化パターンを有している抗体を産生する真菌株および酵母株が含まれる(Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414;およびLi, H., et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215を参照されたい)。

【0091】

グリコシル化抗体の発現のために適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と組み合わせて、特にスポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)

10

20

30

40

50

)細胞のトランスフェクションのために使用され得る多数のパキユロウイルス株が同定されている。

#### 【0092】

植物細胞培養物もまた、宿主として使用することができる(例えば、US5,959,177、US6,040,498、US6,420,548、US7,125,978、およびUS6,417,429(トランスジェニック植物において抗体を作製するためのPLANTIBODIES(商標)技術を説明している)を参照されたい)。

#### 【0093】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で増殖するように順応させた哺乳動物細胞株が、有用である場合がある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7);ヒト胚性腎臓株(例えばGraham, F.L., et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74で説明されている293または293細胞);仔ハムスター腎臓細胞(BHK);マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252で説明されているTM4細胞);サル腎臓細胞(CV1);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76);ヒト子宮頸部癌腫細胞(HELA);イヌ腎臓細胞(MDCK);バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A);ヒト肺細胞(W138);ヒト肝臓細胞(Hep G2);マウス乳房腫瘍(MMT060562);例えば、Mather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68で説明されている、TRI細胞;MRC5細胞;およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR<sup>+</sup>CHO細胞(Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞;ならびにY0、NS0、およびSp2/0などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体作製に適したいくつかの哺乳動物宿主細胞株の概要については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), 255-268を参照されたい。

#### 【0094】

##### 薬学的製剤

抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有しているそのような抗体を1種または複数種の任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980))と混合することによって、凍結乾燥製剤または水性液剤の形態で調製される。通常、薬学的に許容される担体は、使用される投与量および濃度において受け手にとって非毒性であり、限定されるわけではないが、次のものが含まれる:リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤;アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤;保存剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム;塩化ベンゼトニウム;フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール;メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾールなど);低分子量(約10残基未満の)ペプチド;血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質;ポリ(ビニルピロリドン)のような親水性ポリマー;グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸;グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物;EDTAのようなキレート剤;スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖;ナトリウムのような塩を形成する対イオン;金属複合体(例えばZn-タンパク質複合体);ならびに/またはポリエチレングリコール(PEG)のような非イオン系界面活性剤。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体には、さらに、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)のような侵入型(interstitial)薬物分散剤、例えば、rhuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)のようなヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質が含まれる。rhuPH20を含む、いくつかの例示的なsHASEGPおよび使用方法は、US2005/0260186およびUS2006/0104968において説明されている。1つの局面において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼのような1種または複数種の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

#### 【0095】

例示的な凍結乾燥抗体製剤が、US6,267,958において説明されている。水性抗体製剤に

は、US6,171,586およびWO2006/044908において説明されているものが含まれ、後者の製剤は、ヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0096】

製剤はまた、治療される個々の適応症に対する必要に応じて複数の有効成分、好ましくは、補完的な活性を有しており、互いに悪影響を及ぼさないものも含んでよい。このような有効成分は、意図される目的のために有効な量で組み合わせられて存在するのが適切である。

【0097】

有効成分は、例えば、コアセルベーション技術もしくは界面重合により調製されたマイクロカプセル中に、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)中に、またはマクロエマルジョン中に閉じ込めることができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.(ed.) (1980)で開示されている。

10

【0098】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の適切な例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、これらのマトリックスは、造形品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態で存在する。

【0099】

インビボ投与のために使用される製剤は通常滅菌済みである。無菌状態は、例えば、滅菌ろ過膜に通してろ過することによって、容易に実現することができる。

20

【0100】

治療方法および組成物

本明細書において提供される方法を用いて選択された組成物、すなわち、抗体組合せまたは多重特異性抗体のいずれも、治療方法で使用することができる。

【0101】

1つの局面において、医薬として使用するための、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物が提供される。特定の態様において、治療方法において使用するための、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物が提供される。特定の態様において、本発明は、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の有効量を個体に投与する段階を含む、個体を治療する方法において使用するための、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物を提供する。1つのこのような態様において、この方法は、少なくとも1種の追加の治療物質の有効量を個体に投与する段階をさらに含む。上記の態様のいずれかに記載の「個体」は、好ましくはヒトである。

30

【0102】

さらなる局面において、本発明は、医薬を製造または調製する際の、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の使用を提供する。さらなる態様において、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の有効量を疾患に罹患している個体に投与する段階を含む、疾患を治療する方法において使用するためのものである。1つのこのような態様において、この方法は、少なくとも1種の追加の治療物質の有効量を個体に投与する段階をさらに含む。上記の態様のいずれかに記載の「個体」は、ヒトであってよい。

40

【0103】

さらなる局面において、本発明は、疾患を治療するための方法を提供する。1つの態様において、この方法は、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の有効量を、そのような疾患に罹患している個体に投与する段階を含む。1つのこのような態様において、この方法は、少なくとも1種の追加の治療物質の有効量を個体に投与する段階をさらに含む。上記の態様のいずれかに記載の「個体」は、ヒトであってよい。

【0104】

50

さらなる局面において、本発明は、例えば、上記の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物を含む薬学的製剤を提供する。1つの態様において、薬学的製剤は、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物のいずれかおよび薬学的に許容される担体を含む。別の態様において、薬学的製剤は、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物のいずれかおよび少なくとも1種の追加の治療物質を含む。

【0105】

本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、治療法において単独でまたは他の作用物質と組み合わせて使用することができる。例えば、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、少なくとも1種の追加の治療物質と同時投与

10

【0106】

前述のこのような併用療法は、併用投与(2種またはそれ以上の治療物質が同じ製剤または別々の製剤に含まれる)、ならびに個別投与を包含し、個別投与の場合、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の投与は、1種または複数種の追加の治療物質の投与の前、同時、および/または後に行われてよい。1つの態様において、本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の投与および追加の治療物質の投与は、互いから約1ヶ月以内に、または約1、2、もしくは3週間以内に、または約1、2、3、4、5、もしくは6日以内に、行われる。

【0107】

本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物(および任意の追加の治療物質)は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与、ならびに局所的治療のために望ましいならば、病巣内投与を含む、任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短時間であるかまたは長期的であるかにある程度応じて、任意の適切な経路によって、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によって行うことができる。限定されるわけではないが、単回投与または様々な時点に渡る複数回投与、ポラス投与、およびパルス注入を含む様々な投薬スケジュールが、本明細書において企図される。

20

【0108】

本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、優良医療規範(good medical practice)と一致する様式で製剤化され、分量を決定され(dosed)、投与される。この状況で考慮すべき因子には、治療される個々の障害、治療される個々の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、作用物質の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医師に公知である他の因子が含まれる。本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、そうする必要はないが、任意で、問題の障害を予防または治療するのに現在使用されている1種または複数種の作用物質と共に製剤化される。このような他の作用物質の有効量は、製剤中に存在する成分の量、障害または治療のタイプ、および上記の他の因子に依存する。これらは通常、本明細書において説明するのと同じ投与量および投与経路で、もしくは本明細書において説明する投与量の約1~99%で、または適切

30

40

【0109】

疾患を予防または治療する際、(単独で使用される場合、または1種もしくは複数種の他の追加の治療物質と組み合わせて使用される場合)本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物の適切な投与量は、治療しようとする疾患のタイプ、組成物のタイプ、疾患の重症度および経過、その組成物が予防目的で投与されるのかまたは治療目的で投与されるのか、以前の治療法、患者の臨床歴および組成物に対する応答、ならびに主治医の判断によって決まる。本明細書において報告される方法を用いて選択される組成物は、1回で、または一連の治療の間、患者に適宜投与される。疾患のタイプおよび重症度によって、約1  $\mu$ g/kg ~ 15mg/kg (例えば0.5mg/kg ~ 10mg/kg)の組成物が、患者に投与する

50

ための最初の候補投与量であることができ、例えば、1回または複数回の個別投与によるか持続注入によるかを問わない。1つの典型的な1日投与量は、前述の因子に応じて、約1 µg/kg ~ 100mg/kgまたはそれ以上の範囲に及び得る。数日間またはそれより長い期間に渡る反復投与の場合、病態に応じて、疾患症状の所望の抑制が起こるまで、通常、治療は継続される。組成物の1つの例示的な投与量は、約0.05mg/kg ~ 約10mg/kgの範囲であろう。したがって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、もしくは10mg/kg(またはその任意の組合せ)という1種または複数種の用量が、患者に投与され得る。このような用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間ごとに(例えば、患者に抗体が約2 ~ 約20回、または例えば約6回与えられるように)投与されてよい。最初に多めの負荷用量、続いて、1回または複数回の少なめの用量を投与してよい。しかしながら、他の投与計画が有用である場合がある。この治療法の経過は、従来技術およびアッセイ法を用いて容易にモニターされる。

10

#### 【実施例】

#### 【0110】

#### III 実施例

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上記に提供した一般的説明を前提として、他の様々な態様が実施され得ることが理解される。

#### 【0111】

#### 材料および方法

#### 組換えDNA技術

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

20

#### 【0112】

#### 遺伝子およびオリゴヌクレオチドの合成

所望の遺伝子セグメントは、Genart GmbH(Regensburg, Germany)において化学合成によって調製された。合成された遺伝子断片を、増殖/増幅のために大腸菌プラスミド中にクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列は、DNA配列決定によって確認した。あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチドをアニールすることによって、またはPCRによって、短い合成DNA断片を組み立てた。個々のオリゴヌクレオチドは、meta bion GmbH(Planegg-Martinsried, Germany)によって調製された。

30

#### 【0113】

#### 試薬

市販の化学製品、抗体、およびキットはすべて、別段の記載が無い限り、製造業者のプロトコールに従って定められているように使用した。

#### 【0114】

#### 抗体

#### トラスツマブ

#### 軽鎖:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP  
GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGRSGTD FTLTISLQP  
EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG  
LSSPVTKSFN RGEN (SEQ ID NO: 01)

40

#### 重鎖:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA  
 PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY  
 LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGLVTVSS  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS  
 WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
 YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 02)

10

ベルツズマブ

軽鎖:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP  
 GKAPKLLIYS ASYRYTGVPV RFGSGSGTD FTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFN RGEN (SEQ ID NO: 03)

重鎖:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNFT DYTMDWVRQA  
 PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSSA  
 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW  
 NSGALTSKVH TFPVAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY  
 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP  
 SVFLFPPKPK DTLMISRTPV VTCVVDVSH EDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL  
 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 04)

20

二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖

共通の軽鎖:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP  
 GKAPKLLIYS ASFRYTGVPV RFGSRSRGTD FTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFN RGEN (SEQ ID NO: 05)

30

重鎖1(ノブ、トラスツズマブ):

40

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA  
 PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY  
 LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGLVTVSS  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
 YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPCRDE  
 LTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV  
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT

10

QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 06)

重鎖2(ホール、ベルツスマブ):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN DYTMDWVRQA  
 PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NRRFKGRFTL SVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPFYFDYWG QGTLVTVSSA  
 STKGPSVFP APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW  
 NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY  
 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP  
 SVFLFPPKPK DTLMISRTP VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDEL  
 TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV  
 DSDGSFFLV SKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ  
 KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 07)

20

二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型:

重鎖1:

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFNIK DTYIHWVRQA  
 PGQGLEWMGR IYPTNGYTRY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY  
 MELSR LRSDD TAVYYCSRWG GEGFYAMDYW GQGMVTVSS  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
 YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VCTLPPSRDE  
 LTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV  
 LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT  
 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 08)

30

重鎖2:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFFTF DYTMDWVRQA  
 PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY  
 LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSSA  
 SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW  
 KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLST LTLKADYEK  
 HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC DKTH TCPPCPAPEL  
 LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK  
 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC  
 RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN  
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 09)

40

軽鎖1:

DIQLTQPPSV SVAPGQTARI TCGASQDVST AVAWYQQKPG  
 QAPVLVVYSA SFLYSGIPSR FSGSRSGTDF TLTISRVEAG  
 DEADYQCQHQ YTPPTFTGTG TKVTVLRTVA APSVFIFPPS  
 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE  
 SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL  
 SSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 10)

軽鎖2:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP  
 GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIKSSA STKGPSVFPPL  
 APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTISW NSGALTSVH  
 TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY ICMVNHKPSN  
 TKVDKKEPK SC (SEQ ID NO: 11)

10

【0115】

発現

(a) 発現プラスミドの構築

重鎖および軽鎖をコードする発現プラスミドの構築にはいずれも、以下の発現ベクターを使用した。このベクターは以下のエレメントから構成される:

- 選択マーカーとしてのヒグロマイシン耐性遺伝子、
- エプスタイン・バー(Epstein-Barr)ウイルス(EBV)の複製起点oriP、
- 大腸菌においてこのプラスミドが複製するのを可能にするベクターpUC18由来の複製起点、
- 大腸菌にアンピシリン耐性を与える -ラクタマーゼ遺伝子、
- ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ヒト免疫グロブリンポリアデニル化(「ポリA」)シグナル配列。

20

【0116】

重鎖または軽鎖を含む免疫グロブリン遺伝子を遺伝子合成によって調製し、前述のようにpGA18(ampR)プラスミド中にクローニングした。可変重鎖構築物は、独特な制限酵素部位を用いて、方向性をもつクローニングによって構築した。可変軽鎖構築物は、VLおよびCLを含む遺伝子合成物として注文し、独特な制限酵素部位を用いて、方向性をもつクローニングによって構築した。この最終的な発現ベクターを大腸菌細胞に形質転換し、発現プラスミドDNAを単離し(ミニプレップ(Miniprep))、制限酵素解析およびDNA配列決定に供した。正確なクローンをLB-Amp培地150ml中で増殖させ、再びプラスミドDNAを単離し(マキシプレップ(Maxiprep))、配列の完全性をDNA配列決定によって確認した。

30

【0117】

(b) HEK293細胞における免疫グロブリン変種の一過性発現

製造業者の取扱い説明書に従って(Invitrogen, USA)FreeStyle(商標)293発現系を用いて、ヒト胎児由来腎臓293-F細胞を一過性トランスフェクションすることによって、組換え免疫グロブリンを発現させた。小規模の試験発現のために、HEK293F細胞 $0.5 \times 10^6$ 個/mLを30mL、トランスフェクションの1日前に播種した。翌日、プラスミドDNA(1mLの培養体積当たり $1 \mu\text{g}$ のDNA)を、Opti-MEM(登録商標)I低血清培地(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)1.2mLと混合し、続いて、293フェクチン(商標)トランスフェクション試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)40  $\mu\text{L}$ を添加した。この混合物を室温で15分間インキュベートし、細胞に一滴ずつ添加した。トランスフェクション後1日目に、各フラスコに、L-グルタミン(200mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)300  $\mu\text{L}$ およびアミノ酸、糖、微量元素、RPMIを含まないFreeStyle培地を含むフィード(feed)600  $\mu\text{L}$ を加えた(fed)。トランスフェクション後3日目に、培地中の細胞の濃度、生存度、およびグルコース濃度を、生死細胞オートアナライザー(Vi-CELL(商標)XR, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)およびグルコースメーター(Accu-CHEK(登録商標)センサーコンフォート(Sensor comfort)、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いて測定した。さらに、各フラスコに、L-グルタ

40

50

ミン300  $\mu$ L、非必須アミノ酸溶液(PANTM Biotech, Aidenbach, Germany)300  $\mu$ L、ピルビン酸ナトリウム(100mM、Gibco, Invitrogen)300  $\mu$ L、フィード1.2mlおよびad 5g/Lグルコース(D-(+)-グルコース溶液45%、Sigma)を加えた。最後に、トランスフェクション後6日目に、X3R Multifuge (Heraeus, Buckinghamshire, England)を用いて3500rpm、周囲温度で15分間遠心分離することによって抗体を回収し、上清をSteriflipフィルターユニット(0.22  $\mu$ m Millipore Express PLUS PESメンブレン、Millipore, Bedford, MA)に通して滅菌ろ過し、後で使用するまで-20 で保存した。5Lまでの大規模トランスフェクションは、直線的に量を増やした。

#### 【0118】

##### (c) 精製

Protein A-Sepharose(商標)(GE Healthcare, Sweden)を用いるアフィニティークロマトグラフィーおよびSuperdex200サイズ排除クロマトグラフィーによって、二重特異性抗体を細胞培養上清から精製した。簡単に説明すると、ろ過した滅菌済み細胞培養上清を、PBS緩衝液(10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、137mM NaCl、および2.7mM KCl、pH7.4)で平衡にしたHiTrap Protein A HP(5mL)カラムに添加した。未結合タンパク質は、平衡緩衝液で洗い流した。0.1Mクエン酸緩衝液、pH2.8を用いて抗体および抗体変種を溶出させ、0.1mlの1M Tris、pH8.5を用いてタンパク質含有画分を中和した。溶出させたタンパク質画分を集め、Amicon Ultra遠心ろ過装置(MWCO:30K、Millipore)を用いて体積3mLまで濃縮し、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0で平衡化したSuperdex200 HiLoad 120mL 16/60ゲルろ過カラム(GE Healthcare, Sweden)に載せた。高分子量凝集物が5%未満である、精製された二重特異性抗体および対照抗体を含む画分を集め、1.0mg/mLの分取物として-80 で保存した。

#### 【0119】

##### (d) タンパク質の定量

予め充填されたPoros(登録商標)A Protein Aカラム(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)と共に自動Ultimate 3000システム(Dionex, Idstein, Germany)を用いて、アフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質を定量した。試料はすべて、緩衝液A(0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot [2\text{H}_2\text{O}]$ 、pH7.4)で添加し、緩衝液B(0.1Mクエン酸、0.2M NaCl、pH2.5)で溶出させた。タンパク質濃度を測定するために、全試料に対して吸光係数1.62を使用した。

#### 【0120】

##### (e) 精製タンパク質の解析

280nmにおける光学濃度(OD)を測定し、アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を用いることによって、精製タンパク質試料のタンパク質濃度を決定した。還元剤(5mM 1,4-ジチオトレイトール(dithiotreitol))の存在下および非存在下でのSDS-PAGEならびにクマシーブリリアントブルーを用いた染色によって、二重特異性抗体および対照抗体の純度および分子量を解析した。NuPAGE(登録商標)Pre-Castゲルシステム(Invitrogen, USA)を製造業者の取扱い説明書に従って使用した(4~20%トリス-グリシンゲル)。二重特異性抗体試料および対照抗体試料の凝集物含有量を、200mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、250mM KCl、pH7.0のランニング緩衝液において25 でSuperdex200分析用サイズ排除カラム(GE Healthcare, Sweden)を用いる高速SECによって解析した。タンパク質25  $\mu$ gを流速0.5mL/分でカラムに注入し、50分間に渡って無勾配で溶出させた。ペプチド-N-グリコシダーゼF(Roche Molecular Biochemicals)を用いる酵素処理によってN-グリカンを除去した後、還元された二重特異性抗体の軽鎖および重鎖のアミノ酸主鎖の完全性をNanoElectrospray Q-TOF質量分析法によって検証した。

#### 【0121】

##### (f) 分析的HPLC

TSK-GEL G3000SWゲルろ過カラム(7.5mm ID  $\times$  30cm、Tosohaas Corp., Montgomeryville, PA, USA)と共にAgilent HPLC 1100(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて、抗体を分析した。溶出されたタンパク質18  $\mu$ Lを、緩衝液A(300mM NaClに溶かした0.0

10

20

30

40

50

5M  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ 、pH7.5)においてカラムに添加し、サイズに基づいて分離した。

【 0 1 2 2 】

#### 実施例1

様々な補体供給源を用いるアッセイ法

#### モルモット補体(GPC)を用いるアラマールブルーアッセイ法

GlutaMax(Gibco、カタログ番号31331-028)を含むDMEM/F12培地を入れた96ウェル平底細胞培養プレート(NUNC、100  $\mu$ L/ウェル)に、20,000細胞/ウェルとなるようにCHO-K1 Nxre1 9細胞(IL15RをトランスフェクトしたCHO-K1)を播種した。25  $\mu$ LのIL15-Fc融合ポリペプチド(最終濃度6倍)を添加し、1時間インキュベートした。その後、モルモット補体(Sigma Aldrich、カタログ番号S1639)25  $\mu$ Lを添加し、3.5時間インキュベートした。その後、アラマールブルー(Promega)50  $\mu$ Lを添加し、37  $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。550nm(励起)および595nm(発光)の波長でプレートを測定した。

10

試料	シグナル[AU]	変動係数
細胞のみ	16290	240
2.5 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCなし	16408	161
補体のみ、IL15-Fc融合物なし	4893	207
2.5 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4410	360
1.25 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4104	163
0.625 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4397	299
0.3125 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4070	104
0.156 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	3944	198
0.078 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	3817	117
0.039 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4047	29
0.020 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4432	293
0.010 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4381	293
0.005 $\mu$ g/mLのIL15-Fc融合物、GPCあり	4092	89

20

【 0 1 2 3 】

データから、どの希釈率においても、Fc領域がない場合でさえ、モルモット補体が毒性であることが理解できる。

30

【 0 1 2 4 】

#### ヒト補体(HUC)を用いるLDHアッセイ法

GlutaMax(Gibco、カタログ番号31331-028)を含むDMEM/F12培地を入れた96ウェル平底細胞培養プレート(NUNC、100  $\mu$ L/ウェル)に、10,000細胞/ウェルとなるようにCHO-K1 Nxre1 9細胞(IL15RをトランスフェクトしたCHO-K1)を播種し、一晩培養した。IL15-Fc融合ポリペプチドを添加し(25  $\mu$ L/ウェル、最終濃度5倍)、1時間インキュベートした。増殖培地を除去し、無血清培地で細胞を1回洗浄した。その後、190  $\mu$ L/ウェルの無血清培地および10  $\mu$ Lのヒト補体(SigmaAldrich、カタログ番号S1764、c=1mg/mL)を添加した。4時間後、200 gでプレートを遠心分離し、100  $\mu$ L/ウェルを別の96ウェル平底プレートに移した。その後、LDH反応ミックス(細胞障害検出キット、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)100  $\mu$ Lを添加した。37  $^{\circ}$ C で20分間インキュベーションした後、Tecan Sunriseリーダーを用いて492/690nmで光学濃度(OD)を測定した。

40

試料	シグナル [OD]	
	実験 1	実験 2
1000ng/mLのIL15-Fc融合物、HUCあり	29.1	42.6
333.3ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	32.9	42.8
111.1ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	34.0	43.1
37.04ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	35.5	39.6
12.35ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	37.0	39.0
4.12ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	38.4	40.7
1.37ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	37.2	42.2
0.46ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	29.9	32.7
0ng/mlのIL15-Fc融合物、HUCあり	27.7	27.7

10

## 【 0 1 2 5 】

上記のデータから、ヒト補体は用量依存的な補体依存性毒性を発揮しないことが理解できる。

## 【 0 1 2 6 】

## 仔ウサギ補体(BRC)を用いるLDHアッセイ法

GlutaMax(Gibco、カタログ番号31331-028)を含むDMEM/F12培地を入れた96ウェル平底細胞培養プレート(NUNC、100 $\mu$ L/ウェル)に、10,000細胞/ウェルとなるようにCHO-K1 Nxre1 9細胞(IL15RをトランスフェクトしたCHO-K1)を播種し、一晚培養した。IL15-Fc融合ポリペプチドを添加し(25 $\mu$ L/ウェル、最終濃度5倍)、1時間インキュベートした。その後、1パイアルの仔ウサギ補体(Cedarlane、カタログ番号CL3441)を2回蒸留水1mLで還元した。補体溶液を培地で希釈し、25 $\mu$ Lをウェルに添加した。4時間後、200gでプレートを遠心分離し、100 $\mu$ L/ウェルを別の96ウェル平底プレートに移した。その後、LDH反応ミックス(細胞障害検出キット、Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany)100 $\mu$ Lを添加した。37 $^{\circ}$ Cで20分間のインキュベーション期間の後、Tecan Sunriseリーダーを用いて492/690nmで光学濃度(OD)を測定した。

20

試料	シグナル [OD]	
	BRC 1/40	BRC 1/30
9000ng/mLのIL15-Fc融合物、BRCあり	11.3	12.3
3000ng/mLのIL15-Fc融合物、BRCあり	12.3	17.0
1000ng/mLのIL15-Fc融合物、BRCあり	10.2	13.6
333.3ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	7.8	12.2
111.1ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	8.3	13.0
37.04ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	14.9	19.7
12.35ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	43.2	53.0
4.12ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	41.5	63.8
0ng/mlのIL15-Fc融合物、BRCあり	42.4	48.4

30

40

## 【 0 1 2 7 】

BRCは低いバックグラウンド毒性を有しておりかつ用量依存的な補体毒性を示すことが理解できる。

## 【 0 1 2 8 】

## 実施例2

## BT-474細胞における抗HER2抗体へのC1q結合

約 $3 \times 10^5$ 個のBT-474細胞を、10%FCSを含むRPMI 1640中で、10 $\mu$ g/mLの指定の抗体と共に氷上でインキュベートした。氷上で30分間インキュベーションした後、10 $\mu$ g/mLのC1q(Sigma Aldrich、カタログ番号C1740)を添加した。その後、さらに20分間、氷上でインキ

50

ュベーションを継続した。洗浄後、培地200  $\mu$ Lに細胞を再懸濁し、PEで標識した抗C1q抗体(Cedarlane、カタログ番号CL7611PE-SP)で対比染色した。氷上で30分間のインキュベーション期間の後、細胞を2回洗浄し、FACS Canto IIを用いて解析した。

1種の抗体/複数種の抗体	PEシグナル (幾何平均(geomean))
トラスツズマブ	282
ペルツズマブ	344
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	2157
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖	1439
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖、糖鎖改変	1036
二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型	489

10

## 【0129】

このC1qアッセイ法は、BT-474細胞表面の様々な抗体に組換え補体因子C1qが結合することを示す。

## 【0130】

## 実施例3

BT-474細胞における抗HER2抗体による増殖阻害

20

1万( $1 \times 10^4$ )個/ウェルのBT-474細胞を、96ウェル平底プレートに入れた10%FCSを含むRPMI 1640培地中で培養した。24時間後、増殖培地を除去し、最終体積が100  $\mu$ Lになるまで、量を増やしながら指定の抗体を添加した(培地中で予備混合したもの;200nM、66.7nM、22.2nM、7.4nM、2.5nM、0.8nM、0.3nM、0.1nM)。培養中の生細胞の数を測定するために、CellTiterGlo発光式細胞生存度アッセイ法(Luminescent Cell Viability Assay)を製造業者の取扱い説明書に従って実施した(代謝活性のある細胞の指標としてATPレベルを定量する)。したがって、6日間の培養後、CellTiterGlo反応ミックス(Promega、カタログ番号G7571)100  $\mu$ Lを細胞に添加し、振盪しながら2分間インキュベートした。その後、溶解物75  $\mu$ Lを別々の96ウェル平底プレート(Costar、カタログ番号3917)に移した。さらに混合した後、製造業者の取扱い説明書に従ってTecan Infiniteリーダーを用いて蛍光を評価し(assessed)、各 $IC_{50}$ 値を算出した。

30

1種の抗体/複数種の抗体	$IC_{50}$ [nM]
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	6.20
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖	3.31
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖、糖鎖改変	3.93
二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型	4.75

## 【0131】

40

増殖アッセイ法において、抗体がBT-474の増殖を阻害することが示された。

## 【0132】

## 実施例4

BT-474細胞、SK-Br3細胞、およびSK-OV-3細胞における抗HER2抗体によるCDC活性化

1万個/ウェルの細胞(BT-474細胞、SK-Br3細胞、またはSK-OV-3細胞)を96ウェルプレートに播種し、37  $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>で20時間インキュベートした。その後、培地を除去し、AIM-V培地(Gibco、カタログ番号0870112 DK)100  $\mu$ Lで細胞を1回洗浄した。AIM-V培地50  $\mu$ Lを各ウェルに入れた。その後、抗体溶液50  $\mu$ L(最終濃度3倍)を添加し、37  $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>で30分間インキュベートした。AIM-V培地で1:10希釈した仔ウサギ補体(Cedarlane、カタログ番号CL3441、バッチ番号6312)50  $\mu$ Lを添加し、インキュベーションを2時間継続した。その後、上

50

清50  $\mu$ Lを移し、LDH反応ミックス(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)50  $\mu$ Lと混合した。37  $^{\circ}$ Cで15分間さらにインキュベーションした後、Tecan Sunriseリーダーを用いて490/620nmでの吸光度(Ex.)を測定した。抗体依存性毒性率(平均値 $\pm$ SD、n=4)を以下のようにして算出した:抗体依存性毒性%=(試料の吸光度-自発的溶解による吸光度/最大溶解時の吸光度-自発的溶解) $\times$ 100。これらの結果を図1に示す。

#### 【0133】

BT474細胞、SkBr3細胞、およびSK-OV-3細胞をトラスツズマブ、ペルツズマブ、またはそれらの組合せ(抗体の合計濃度は10  $\mu$ g/mLまたは1  $\mu$ g/mL)と共にインキュベートし、続いて、仔ウサギ補体と2時間インキュベートした。軽鎖を有しているヒトIgG1をアイソタイプ対照として使用した。LDH細胞障害キット(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11644793001)を用い、Tecan sunriseリーダーによって細胞溶解(LDH放出)の読取りを実施した。溶解率(specific lysis)は、3%トリトン-Xで処理した細胞(最大溶解)に対するシグナルとして与えられる。実験は、5つ1組で実施した。

1種の抗体/複数種の抗体	投与量	溶解率[%]		
		BT-474 細胞	SkBr3 細胞	SK-OV-3 細胞
トラスツズマブ	10 $\mu$ g/mL	12.8 $\pm$ 0.9	-1.1 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 1.8
ペルツズマブ	10 $\mu$ g/mL	7.3 $\pm$ 0.6	-1.4 $\pm$ 0.7	-0.5 $\pm$ 1.1
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	5 $\mu$ g/mL + 5 $\mu$ g/mL	179.6 $\pm$ 1.3	157.2 $\pm$ 8.7	34.6 $\pm$ 9.9
ヒトIgG1、 $\kappa$	10 $\mu$ g/mL	0.9 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 1.5	-0.7 $\pm$ 1.0
トラスツズマブ	1 $\mu$ g/mL	-8.1 $\pm$ 0.6	-7.7 $\pm$ 3.1	1.3 $\pm$ 0.9
ペルツズマブ	1 $\mu$ g/mL	-5.1 $\pm$ 0.6	-2.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 3.2
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	0.5 $\mu$ g/mL + 0.5 $\mu$ g/mL	109.3 $\pm$ 5.4	64.3 $\pm$ 19.8	20.9 $\pm$ 14.4
ヒトIgG1、 $\kappa$	1 $\mu$ g/mL	10.3 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 1.4

#### 【0134】

このCDCアッセイ法は、仔ウサギ補体の存在下で様々な抗体(型、組合せ)で処理した際の瀕死の細胞/死細胞のマーカーとしてのLDHの放出を示す。

#### 【0135】

##### 実施例5

##### CDCのための抗体比の測定

ウェル当たり1万個のSK-OV-3細胞を、ウェル当たり100  $\mu$ LのAIM-V培地(Gibco、カタログ番号0870112-DK)を入れた96ウェル平底プレート(Thermo Scientific、Nunclonデルタ表面)に播種し、37  $^{\circ}$ Cおよび5%CO<sub>2</sub>で20時間、インキュベートした。インキュベーション期間後、トラスツズマブおよびペルツズマブを最終濃度0.1  $\mu$ g/mL、0.5  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、または10  $\mu$ g/mLで含む抗体原液50  $\mu$ Lを添加した。ヒトIgG1、軽鎖(Sigma、カタログ番号I5154-1MG)を対照として使用した。最大溶解を測定するために、最終濃度1%のトリトン-X(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11332481001)を添加した。37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションした後、仔ウサギ補体原液(Cedarlane、カタログ番号CL3441)50  $\mu$ Lを、最終希釈倍率1/30で添加した。その後、これらのプレートを37  $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした(最終体積/ウェル=150  $\mu$ L)。細胞障害検出キット(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11644793001)を用いて、LDH活性を介して細胞溶解の量を測定した。Tecan Sunriseリーダーを用いて490nmおよび620nmで吸光度を測定した。

#### 【0136】

陽性対照として以下の試料を使用した:

培地対照:SK-OV-3細胞およびAIM-V培地、  
 自発的溶解:SK-OV-3細胞および活性BRC、  
 最大溶解:SK-OV-3細胞および1%トリトン-X、  
 アイソタイプ対照:SK-OV-3細胞ならびに10 µg/mLのヒトIgG、 およびBRC、  
 陰性対照:SK-OV-3細胞ならびに10 µg/mLの抗体/組成物および加熱不活性化したBRC、  
 アッセイ法対照:SK-OV-3細胞、ならびに10 µg/mLのトラスツズマブおよびペルツズマブ  
 ならびに活性BRC。

## 【0137】

最適な細胞死滅は、0.5:1~1:1のトラスツズマブ/ペルツズマブ比ならびに0.5:1~1:1  
 のペルツズマブ/トラスツズマブ比において観察された。比が1:10の場合でさえ、CDCは劇  
 的な影響を受けなかったことから、全体的に見て、このアッセイ法は、抗体比の変化に対  
 する安定性が非常に高いと考えられた。

10

## 【0138】

実施例6

抗HER2抗体による、CDCを介したBT-474細胞死滅

1万個/ウェルのBT-474細胞を、96ウェルEプレート(ACEA Biosciences Inc.)に播種し、  
 Xcelligence装置においてAIM-V培地中で一晩増殖させた。増殖培地を除去し、無血清AIM-  
 V培地(Gibco)で細胞を1回洗浄した。ウェル当たり50 µLのAIM-V培地およびAIM-Vに溶かし  
 た50 µL抗体(最終濃度3倍)を添加し、20分間インキュベートした。その後、50 µLの仔ウ  
 サギ補体(Cedarlane)を添加し、細胞指標(CI;細胞の生存度の代表値とみなす)を5分毎に  
 測定した。以下の式に従ってCDC率を算出したが、一方、CIは標準化した細胞指標である  
 。

20

$$\text{CDC \%} = \frac{\text{補体対照のCI} - \text{試料のCI}}{\text{補体対照のCI}} \times 100$$

## 【0139】

2つの代表的な時点(反応開始後1時間目および2時間目)に、溶解率(すなわち、CDCによ  
 って誘導された細胞死)を算出し、図2および以下の表に示した(平均値+/SEM、n=4)。

1種の抗体/複数種の抗体	溶解率[細胞指標ACEAの 比率(%)]	
	1時間	2時間
トラスツズマブ	-3.5 ± 0.6	-6.5 ± 0.8
ペルツズマブ	-5.3 ± 1.0	-8.3 ± 2.1
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	20.9 ± 6.7	26.3 ± 7.0
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖	31.8 ± 3.4	38.9 ± 3.7
二重特異性抗HER2抗体、共通の軽鎖、 糖鎖改変	28.8 ± 2.6	35.8 ± 2.6
二重特異性抗HER2抗体、CrossMab型	12.9 ± 1.4	22.7 ± 1.6

30

40

## 【0140】

このCDCアッセイ法は、仔ウサギ補体の存在下で様々な抗体(型、組合せ)で処理した際  
 の瀕死の細胞/死細胞のマーカとしての細胞指標の変化を示す。

## 【0141】

実施例7(比較例)

ヒト由来の補体に基づくCDCアッセイ法を確立するための試み

SkBr3細胞をトラスツズマブ、ペルツズマブ、またはトラスツズマブおよびペルツズマ  
 ブの組合せ(抗体総濃度10 µg/mL)で感作し、続いて、仔ウサギ補体(BCR、実施例4で説明  
 したとおり)または健常ドナー3名の正常ヒト血清(NHS)(1:50希釈、NHS1、NHS2、NHS3)と

50

共に2時間インキュベーションした。軽(light)を有しているヒトIgG1をアイソタイプ対照として使用した。

【0142】

LDH細胞障害キット(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11644793001)を用い、Tecan sunriseリーダーによって細胞溶解(LDH放出)の読取りを実施した。平均溶解(単位%)は、3%トリトン-Xで処理した細胞(最大溶解)に対するシグナルである。実験は、3つ1組で実施した。

1種の抗体/複数種の抗体	溶解率[%]			
	BRC	NHS 1	NHS 2	NHS 3
トラスツズマブ	12.5 ± 0.3	0.6 ± 0.6	-2.9 ± 0.5	-2.3 ± 0.6
ペルツズマブ	16.5 ± 0.9	-1.9 ± 1.2	-3.8 ± 0.4	-4.0 ± 0.7
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	46.9 ± 2.0	3.6 ± 1.5	-0.6 ± 0.2	-0.9 ± 1.5
ヒトIgG1、κ	4.9 ± 1.2	-3.5 ± 0.8	-6.8 ± 1.7	-5.2 ± 0.7

10

【0143】

実施例8(比較例)

siRNAを介したCD55、CD59、およびCD46のノックダウン細胞株の作製

20

CD46、CD55、およびCD59のノックダウンのために、対応するsiRNA(Biospring;CD46 カタログ番号203525-A、CD55 カタログ番号203526-A、CD59 カタログ番号203527-A)、1つの対照siRNA(Biospring、カタログ番号203524-A)、およびトランスフェクション試薬リポフェクタミン(Invitrogen、カタログ番号13778-100)でSK-OV-3細胞を処理した。使用量は、製造業者のプロトコールに従った。3日間の培養後、50 μL中に細胞1~2 × 10<sup>5</sup>個を含む細胞懸濁液およびFACS抗体のマスターミックスを用いて、FACS解析によって細胞表面のCD46、CD55、およびCD59の量を測定した。抗体マスターミックスは、各1 μLの抗CD-55-APC抗体(BD Pharmingen、カタログ番号555696)および抗CD59-PE抗体(BD Pharmingen、カタログ番号555764)ならびに10 μLの抗CD46-FITC抗体(BD Pharmingen、カタログ番号555949)、10%マウス血清(Southern Biotech、カタログ番号0050-01)、ならびにFACS緩衝液(20 μL BSAを含む5mL DPBS)を含んだ。FACS抗体を滴定して、適切な使用濃度を決定した。アイソタイプ対照のために、20 μLのIgG2a、k-FITC(BD Pharmingen、カタログ番号556652)、IgG2a、k-APC(BD Pharmingen、カタログ番号552893)、IgG2a、k-PE(BD Pharmingen、カタログ番号551438)をそれぞれ、10%マウス血清およびFACS緩衝液と共に使用した。細胞を4および20rpmで30分間、前述のFACS抗体と共にインキュベートし、氷冷したDPBS緩衝液600 μLで洗浄し、Cytifix(BD Pharmingen、カタログ番号554655)200 μL中に再懸濁した。FACS Canto IIを用いてFACS解析を実施した。

30

標的	シグナル	野生型SK-OV-3細胞	ノックダウンSK-OV-3細胞
CD46	FITC	683	662
CD55	APC	1447	275
CD59	PE	1192	649

40

【0144】

CD55の顕著なノックアウトが実現した(約80%のノックダウン)。CD59の発現は、約45%、下方調節された。CD46は発現レベルの変化を示していない。

【0145】

ノックダウン後のCDC

CD46、CD55、およびCD59のノックダウンのために、対応するsiRNA(Biospring;CD46 カ

50

カタログ番号203525-A、CD55 カタログ番号203526-A、CD59 カタログ番号203527-A)およびトランスフェクション試薬リポフェクタミン(Invitrogen、カタログ番号13778-100)でSK-OV-3細胞を処理した。使用量は、製造業者のプロトコールに従った。3日間の培養後、FACS解析によって細胞表面のCD46、CD55、およびCD59の量を測定した(上記を参照されたい)。4日目に、野生型(=siRNAで処理していない)SK-OV-3、(3種すべてのsiRNAをトランスフェクトされた)SK-OV-3-三重細胞、および(非特異的な対照siRNAをトランスフェクトされた)SK-OV-3-対照siRNAを用いてCDCアッセイ法を実施した。このCDC-アッセイ法のために、ウェル当たり1万個の細胞を、ウェル当たり100  $\mu$ LのAIM-V培地(Gibco、カタログ番号0870112-DK)を含む96ウェル平底プレート(Thermo Scientific、Nunclonデルタ表面)に播種し、37 °Cおよび5%CO<sub>2</sub>で20時間、インキュベートした。その後、トラスツズマブ、ペルツズマブ、ヒトIgG1、(Sigma、カタログ番号I5154)および二重特異性抗HER2抗体(共通の軽鎖)を、最終濃度10  $\mu$ g/mLで試験した。最大溶解を測定するために、最終濃度1%のトリトン-X(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11332481001)を使用した。試料はすべて、37 °Cで30分間インキュベートした。続いて、仔ウサギ補体(BRC)(Cedarlane、カタログ番号CL3441)および正常ヒト血清(NHS)を最終希釈倍率1/30で添加し、これらのプレートを37 °Cで2時間インキュベートした(最終体積/ウェル=150  $\mu$ L)。細胞障害検出キット(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany、カタログ番号11644793001)を用いて、LDH活性を介して細胞溶解の量を測定した。Tecan Sunriseリーダーを用いて490nmおよび620nmで吸光度を測定した。

10

20

30

40

50

#### 【0146】

陽性対照として以下の試料を使用した:

培地対照:SK-OV-3細胞およびAIM-V培地、

自発的溶解:SK-OV-3細胞および活性BRC、

最大溶解:SK-OV-3細胞および1%トリトン-X、

アイソタイプ対照:SK-OV-3細胞ならびに10  $\mu$ g/mLのヒトIgG、 およびBRC、

陰性対照:SK-OV-3細胞ならびに10  $\mu$ g/mLの抗体/組成物および加熱不活性化したBRC、

アッセイ法対照:SK-OV-3細胞、ならびに10  $\mu$ g/mLのトラスツズマブおよびペルツズマブならびに活性BRC。

#### 【0147】

結果を図4に示す。

#### 【0148】

補体供給源としてNHSが存在する場合、CDCを発揮するにはCD55およびCD59のノックダウンが絶対的に必要である。冗長なsiRNAノックダウン手順は、BRCを使用することによって上手く対処することができる(overcome)。このアッセイ法は、癌腫細胞表面にmCRPが存在することによる影響を示さなかった。このことは、本明細書において報告されるアッセイ法を(様々な抗体組合せのスクリーニングに加えて)様々な抗体形態のハイスループットなスクリーニングに使用するための必要条件であり、または他のCDCアッセイ法の陽性対照として明白である。

#### 【0149】

陽性対照は、このCDCアッセイ法が機能していることを示した。SK-OV-3、SK-OV-3-三重KO、およびSK-OV-3-対照siRNAのOD490/620nmおよび細胞障害率(%)を比較したところ、対照siRNAが細胞障害を誘導しないことが示された。

#### 【0150】

##### 実施例9(比較例)

膜結合型補体調節タンパク質(mCRP)の操作によってCDCアッセイ法を確立するための試み(BRCと対立するものとして)NHSを特異的に対象とする標的細胞による制限的因子がこのアッセイ法に影響を及ぼすかどうかをはっきりさせるために、CDCプロセスの様々な段階を阻害するタンパク質群であるmCRPの発現を減少させることを試みた。

#### 【0151】

抗CD55中和抗体および抗CD59中和抗体

トラスツズマブおよび/またはペルツズマブによる処理後、標的であるCD55およびCD59に対する中和抗体を単独インキュベーションおよび同時インキュベーション(中和抗体の合計濃度10 µg/mL)において用いて、mCRP阻害を実施した(Zhao, W.P., et al., Onc. Rep. 21 (2009) 1405-1411を参照されたい)。

【0152】

このアッセイ法は、次の改変を加えて、実施例6と同様に実施した:SK-OV-3細胞をCD55、CD59、または両方に対する中和抗体(neu mAb)(neu mAb合計濃度10 µg/mL)と共にインキュベートし、続いて、トラスツズマブおよび/もしくはペルツズマブ(またはアイソタイプ対照)と共にインキュベートし、血清を添加した(1:30希釈)。観察結果を図3に示す。

【0153】

プールしたヒト血清を用いてこの実験を繰り返したところ、同じ結果が得られた。

【0154】

どちらの実験でも、BRCの場合、約50%の相対的CDCが得られたのに対し、ヒト血清では、15%未満の相対的CDCしか観察することができなかった。

【0155】

siRNAを介したCD46、CD55、およびCD59のノックダウン

mCRP-mRNAに特異的な低分子干渉RNA(siRNA)分子を細胞中にトランスフェクトし、これによって細胞質中の各mRNA分子の分解を招くことによるRNA干渉技術(RNAi)によって、mCRP発現を減少させた。標的細胞を、siRNAトランスフェクション後48時間目のmCRP表面発現についてのFACS解析に供して、遺伝子ノックダウンの効率を測定した(例えば、Mamidi, S., et al., Mol.Onc.7 (2013) 580-594を参照されたい)。

【0156】

製造業者のプロトコール(Biospring)に従ってリポフェクション(Dharmafect 1)を用いて、BT474細胞、SkBr3細胞、およびSK-OV-3細胞に、CD46 siRNA(SEQ ID NO: 12および13)、CD55 siRNA(SEQ ID NO: 14および15)、CD59 siRNA(SEQ ID NO: 16および17)、またはスクランブルsiRNA(SEQ ID NO: 18 および 19)(通常25nM)をトランスフェクトした。

【0157】

トランスフェクション後48時間目に、CD46、CD55、およびCD59に対する標識抗体(各5 µg/mL、CD46-FITC カタログ番号555949、CD55-APC カタログ番号555696、CD59-PE カタログ番号555764;BD Pharmingen)で細胞 $2 \times 10^5$ 個を染色し、対照を含む指定の受容体の表面発現を解析した。FACSによって測定したCD46発現の相対的減少を、以下の表に示す。

(n=2) RNA	BT-474 細胞	SkBr3 細胞	SK-OV-3 細胞
	[FACSのMFIの相対的減少]		
未処理の参照	0	0	0
模擬トランスフェクション	4.2	-8.6	-4.9
スクランブル	10.5	-1.7	-8.6
CD46-siRNA	67.4	42.7	55.4

【0158】

3種のsiRNAをトランスフェクトされた細胞の、FACSによって測定したCD46発現、CD55発現、およびCD59発現の相対的減少を、以下の表に示す。

siRNA	BT-474 細胞	SkBr3 細胞	SK-OV-3 細胞
	[FACSのMFIの相対的減少]		
CD46	64.6	1.4	55.1
CD55	26.5	69.6	61.7
CD59	72.5	-45.4(*)	88.0

(\*)SK-OV-3細胞は、siRNAトランスフェクションに対する感受性が非常に高い。模擬トランスフェクションおよびスクランブルRNAトランスフェクションの結果、CD46発現は最大2

10

20

30

40

50

7%、およびCD59発現は最大610%増加した。

【0159】

トランスフェクション後96時間目に、実施例4で説明したようにして、(前述のsiRNAまたは対照の存在または非存在下で)仔ウサギ補体またはプールした正常ヒト血清を用いて、SkBr3細胞のLDHアッセイ法を実施した。以下の表において、仔ウサギ補体を用いた場合の、CD46、CD55、およびCD59に対するsiRNAをトランスフェクトされたSkBr3細胞(3種をトランスフェクトされた細胞)の平均溶解率のパーセンテージを示している(+/-SD、n=3)。

1種の抗体/複数種の抗体	溶解率 [%]
トラスツズマブ	0.2 ± 4.2
ペルツズマブ	-5.3 ± 1.6
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	52.0 ± 10.3
ヒトIgG1、κ	-6.5 ± 2.1

10

【0160】

以下の表において、プールしたヒト血清を用いた場合の、CD46、CD55、およびCD59に対するsiRNAをトランスフェクトされたSkBr3細胞(3種をトランスフェクトされた細胞)の平均溶解率のパーセンテージを示している(+/-SD、n=3)。

20

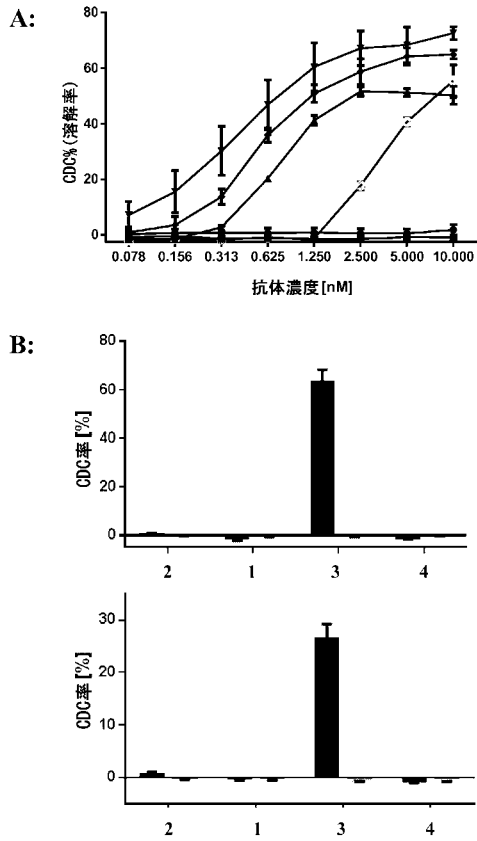
1種の抗体/複数種の抗体	溶解率 [%]
トラスツズマブ	9.7 ± 1.7
ペルツズマブ	-1.2 ± 2.0
トラスツズマブおよびペルツズマブの組合せ	8.7 ± 1.4
ヒトIgG1、κ	5.0 ± 1.8

30

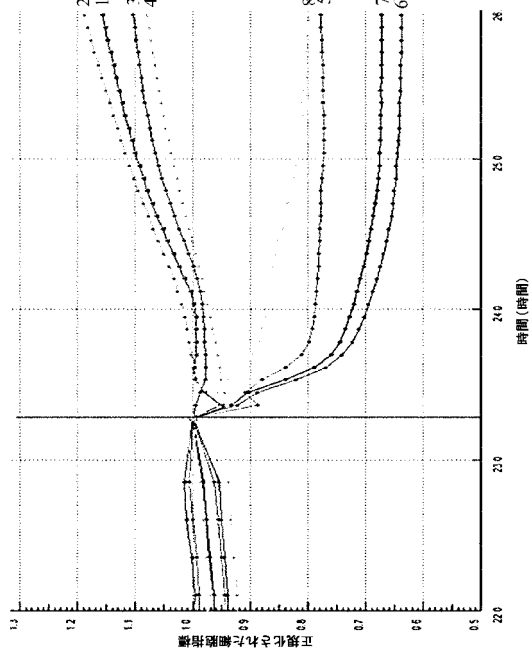
【0161】

前述の本発明は、理解を明確にするために、例示および例としていくらか詳しく説明してきたが、これらの説明および例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されるあらゆる特許および科学文献の開示は、その全体が参照により明確に組み入れられる。

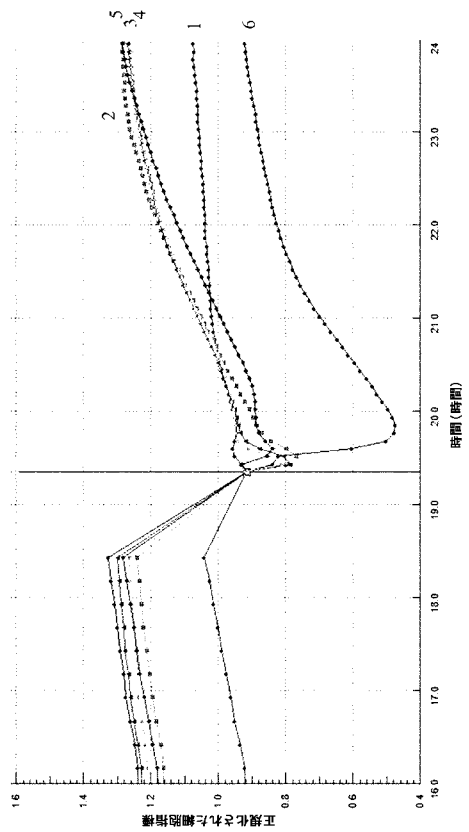
【 図 1 】



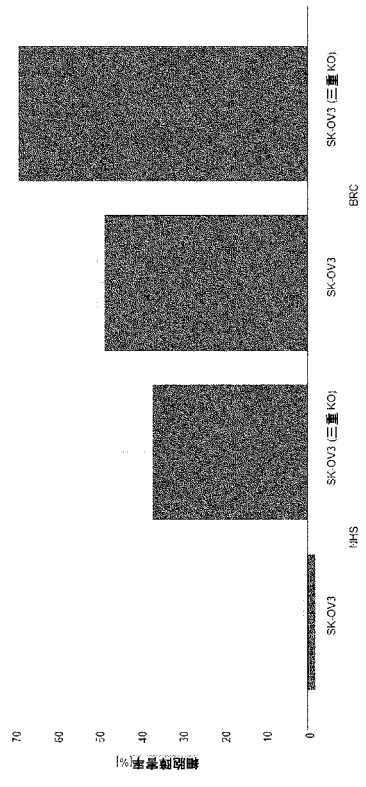
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2018503368000001.app

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/079693

**Box No. 1 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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of 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/EP2015/079693**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.:  
4, 5(completely); 1, 6-12(partially)

**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 SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/079693
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. KONISHI ET AL: "Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity To Measure Low Levels of Antibodies: Application to Nonstructural Protein 1 in a Model of Japanese Encephalitis Virus", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 15, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 88-94, XP055194781, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00347-07 abstract	1,4-12
Y	----- -/--	1,4-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 February 2016		14/04/2016
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  Gundlach, Björn

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/079693

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KLITGAARD JOSEPHINE L ET AL: "Combination of two anti-CD5 monoclonal antibodies synergistically induces complement-dependent cytotoxicity of chronic lymphocytic leukaemia cells", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 163, no. 2, October 2013 (2013-10), pages 182-193, XP055195519, abstract page 184, column 1, paragraph 4 -----	1,4-12
Y	HELLSTRÖM I ET AL: "Monoclonal antibodies to two determinants of melanoma-antigen p97 act synergistically in complement-dependent cytotoxicity.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) JUL 1981, vol. 127, no. 1, July 1981 (1981-07), pages 157-160, XP055195523, ISSN: 0022-1767 abstract page 158, column 1, paragraph 4 -----	1,4-12
Y	MADDIPATLA S ET AL: "Augmented antitumor activity against B-cell lymphoma by a combination of monoclonal antibodies targeting TRAIL-R1 and CD20", CLINICAL CANCER RESEARCH 20070801 US, vol. 13, no. 15, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 4556-4564, XP055195526, ISSN: 1078-0432 abstract -----	1,4-12
Y	HUANG JIAN ET AL: "Protection of xenogeneic cells from human complement-mediated lysis by the expression of human DAF, CD59 and MCP", FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 31, no. 3, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 203-209, XP002249602, ISSN: 0928-8244, DOI: 10.1016/S0928-8244(01)00261-9 abstract page 206, paragraph 2 -----	1,4-12
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2015/079693

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QU ZHENGXING ET AL: "Recombinant bispecific monoclonal antibody (bsMAb) against CD20 and CD22 active in vitro and in vivo against B-cell lymphomas", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 108, no. 11, part 1, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 713A-714A, XP008176628, ISSN: 0006-4971 the whole document -----	1,4-12

1

International Application No. PCT/ EP2015/ 079693

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 4, 5(completely); 1, 6-12(partially)

Method for determining complement dependent cytotoxicity of a composition using two binding sites binding to epitopes on the same antigen

---

2. claims: 2, 3(completely); 1, 6-12(partially)

Method for determining complement dependent cytotoxicity of a composition using two binding sites binding to epitopes on two different antigens

---

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

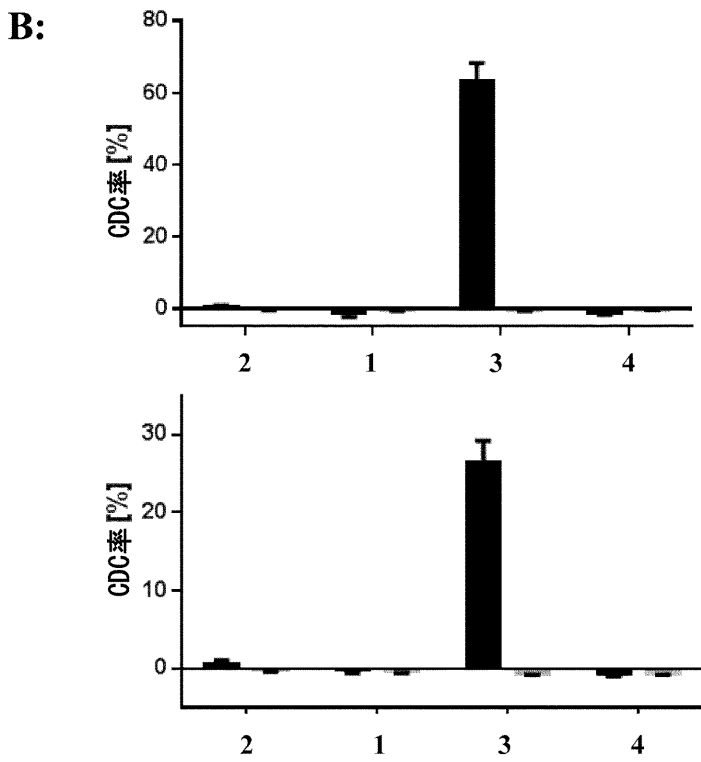
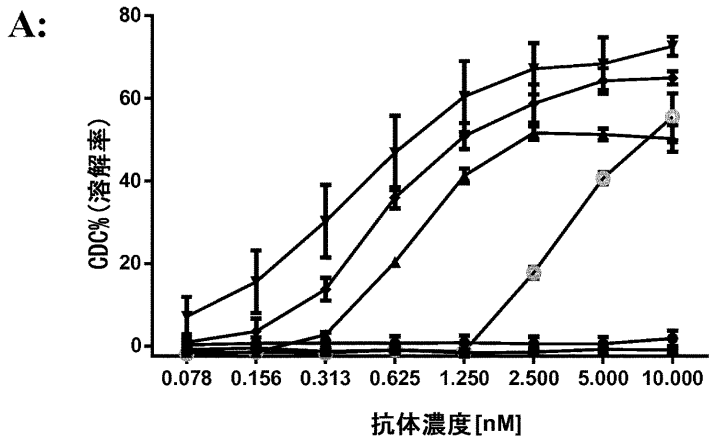
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 オフナー ゴーニャ  
ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ヴァクセンシュタインシュトラッセ 2 7

(72)発明者 ツィック カールハインツ  
ドイツ連邦共和国 8 1 7 3 9 ミュンヘン クルト - コルゲンス - シュトラッセ 1 0

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QR04 QR16 QR48 QS11 QS36

【要約の続き】



专利名称(译)	用于测定CDC诱导抗体的测定和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018503368A</a>	公开(公告)日	2018-02-08
申请号	JP2017532650	申请日	2015-12-15
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	オフナーゾーニャ ツィックカールハインツ		
发明人	オフナー ゾーニャ ツィック カールハインツ		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/6854 G01N2333/4716 G01N33/50 G01N33/68 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/06.ZNA G01N33/53.N G01N33/53.R C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR04 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS11 4B063/QS36		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2014198749 2014-12-18 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(i) 与第一抗原上的第一表位特异性结合并与人源的第一Fc区多肽缀合的第一结合位点, 和(ii) 第二测量包含第二结合位点的组合物的补体依赖性细胞毒性, 该第二结合位点与抗原上的第二表位特异性结合并与人源的第二Fc区多肽结合 本文报道, 其中所述方法包括用所述组合物孵育表达第一抗原和第二抗原的细胞; 将免补体添加至混合物。并测量细胞裂解, 从而测定组合物的补体依赖性细胞毒性。

