

明 細 書

発明の名称：

抗MerTKアゴニスト抗体、抗MerTK二重特異性抗体、及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、新規抗MerTKアゴニスト抗体、抗MerTK二重特異性抗体、及びその使用に関する。

背景技術

[0002] マクロファージ等の貪食細胞によるアポトーシス細胞、細胞由来のデブリ等の速やかな貪食・除去機構はエフェロサイトーシスと呼ばれ、組織や免疫ホメオスタシスの維持において極めて重要な機構として認識されている（Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2020, 21:398-414）。例えば、動脈硬化の病変部において、マクロファージは自己のアポトーシス細胞を認識して速やかにクリアランスすることで、炎症反応の抑制や病変進行抑制に寄与している（Nature, 2016, 536:86-90）。

[0003] TAM（Tyro3、Axl及びMerTK）受容体チロシンキナーゼファミリーの一つであるMer Tyrosine Kinase（MerTK）は、マクロファージ等の貪食細胞に発現し、エフェロサイトーシスの主要な分子の一つとして機能することが知られている。MerTKは、細胞外に2つのイムノグロブリン様ドメイン及び2つのフィブロネクチンIII型ドメイン、並びに細胞内に1つのチロシンキナーゼドメインを有する1回膜貫通型蛋白質であり、Growth arrest specific gene 6（Gas6）、Protein S（ProS）、Tubby及びTubby-like protein 1（TULP-1）等がそのリガンドとして同定されている。なかでも、Gas6及びProSは、アポトーシス細胞の表面に露出されるフォスファチジルセリン（PtdSer）と

貪食細胞上のMerTKのイムノグロブリン様ドメインを橋渡し的に結合する役割を担うリガンドである。これらのリガンドを介して、MerTKはアポトーシス細胞と結合し、エフェロサイトーシス等に必要な活性化シグナル（チロシン自己リン酸化）を下流へと伝達する（Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2020, 21:398-414; Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2013, 5:a009076; EMBO J., 2010, 29:3898-3910）。さらにMerTKは、樹状細胞のToll様受容体を介した炎症性サイトカイン産生の抑制（Cell, 2007, 131:1124-1136）やマクロファージからの炎症収束メディエーターの合成誘導（Sci. Signal., 2018, 11:eaar3721）を通して、抗炎症機能を促進することが示唆されている。

[0004] MerTKは、網膜色素上皮（Retinal Pigment Epithelium: RPE）細胞にも発現している。MerTKを介した細胞内の下流シグナルの活性化により、RPE細胞が老廃し脱落してデブリとなった視細胞外節（Photoreceptor Outer Segment: POS）を貪食する。RPE細胞はPOSと接するように位置している。POSの先端では、PtdSerが露出しており、RPE細胞はMerTK及びそのリガンドを介してPtdSerを認識することによりPOSを貪食・除去する。この貪食機能は視細胞及び網膜の恒常性・機能維持において極めて重要である（Front. Immunol., 2020, 11:604205）。

[0005] 網膜色素変性症は、視細胞又はRPEの機能や恒常性に影響を及ぼす遺伝子の変異によって引き起こされる遺伝性疾患であり、これまでに80以上の原因遺伝子が同定されている。原因遺伝子の大半は視細胞に起因し、その変異によって細胞死が誘導され、網膜組織の変性に至る。さらに、死細胞あるいはそのデブリは、炎症状態を誘発し症状を悪化させる。MerTK機能活性化による、死細胞あるいはデブリの速やかな貪食除去は、網膜色素変性症

を治療できる可能性が示唆される (Prog. Retin. Eye Res., 2017, 63:107-131; Adv. Exp. Med. Biol., 2023, 1415:365-370; PNAS Nexus, 2022, 1:pgac003)。

[0006] デブリ蓄積由来の網膜変性症 (例えば網膜色素変性症や加齢黄斑変性) の治療法として、原因遺伝子に対する遺伝子治療並びに血管新生阻害剤及び補体阻害剤等の薬理学的製剤の使用により網膜の障害を抑制させる治療法開発が進められているものの (Prog. Retin. Eye Res., 2018, 63:107-130)、いまだ充足された治療法はなく、さらなる創薬研究開発が求められている。

[0007] MerTK活性化には細胞内キナーゼドメインのチロシン自己リン酸化を引き起こすことが必要である。MerTKの細胞内キナーゼドメイン及びその下流分子AKTのリン酸化を指標に選抜された抗MerTK抗体が、MerTKを介した細胞内の下流シグナル伝達を活性化してデブリを除去することにより、網膜変性症を治癒できる可能性が示唆された (特許文献4)。しかし、現在までに、マクロファージ上のMerTKを介して貪食作用を活性化させる抗MerTK抗体の存在が示唆されてはいるものの (特許文献1～4、非特許文献1)、RPE細胞の貪食作用の活性化を実際に示した抗MerTK抗体は報告されていない。

[0008] さらに近年では、貪食細胞と被貪食物の物理的距離を近づけることにより被貪食物の効率的な貪食除去を活性化することを目的として、MerTK及び被貪食物に結合する二重特異性抗体の研究がなされている。今までに、例えばMerTKとCD20に結合する二重特異性抗体、MerTKとアミロイド β (A β) に結合する二重特異性抗体 (非特許文献2)、MerTKとがん細胞上の腫瘍関連抗原 (Tumor Associated Antigen: TAA) である上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) に結合する二重特異性抗体 (非特許文献3) 等が報告されており、二重特異性抗体がMerTK

を介した貪食除去機能を活性化できることが報告されている。

[0009] トランスサイレチン (Trans thy ret in : T T R) は、127個のアミノ酸からなる分子量14 k D aの蛋白質である。T T Rの主な産生場所は肝臓であるが、脳室脈絡叢、網膜の網膜色素上皮細胞、膵 α 細胞等からも産生される。T T Rは通常、血中で安定な4量体構造をとり、主に血中及び髄液中で、ビタミンA-レチノール結合蛋白質複合体、及び甲状腺ホルモンT4の輸送担体として機能している（特許文献5）。T T Rは遺伝性変異や加齢を要因とする全身性アミロイドーシスの原因となる蛋白質の1つであり、ミスフォールドT T Rが全身の臓器に沈着することで機能障害を引き起こすことが知られている。ミスフォールドT T Rに対する抗体がFc領域を介して、貪食細胞によるミスフォールドT T Rの貪食作用を活性化し、当該ミスフォールドT T Rの沈着を阻害する可能性が示唆されている（Amy l o i d, 2016, 23: 86-97）。しかしながら、ミスフォールドT T Rに結合するモノクローナル抗T T R I g G1抗体であるN I O O 6の第一相臨床試験において、ミスフォールドT T Rの沈着を阻害する作用に加え、複数の被験患者からサイトカイン放出症候群の発症も報告されており（非特許文献4）、T T R型アミロイドーシス等の全身性アミロイドーシスを治療するために、更なる薬剤の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：国際公開第2016/106221号
特許文献2：国際公開第2019/005756号
特許文献3：国際公開第2020/176497号
特許文献4：国際公開第2021/202590号
特許文献5：国際公開第2015/115332号

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：P L o S O N E, 2015, 10: e0145078
非特許文献2：m A b s, 2020, 12: 1685832

非特許文献3: *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23: 15673

非特許文献4: *N. Engl. J. Med.*, 2023, 389: 239-250

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の課題は、食食作用が関連する疾患の予防又は治療に用いることができる抗Me r T K アゴニスト抗体及び抗Me r T K 二重特異性抗体を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、Me r T K に結合し、Me r T K を介して食食細胞の食食除去機能を活性化する抗Me r T K 抗体の作製において相当の創意検討を重ねた結果、新規抗Me r T K アゴニスト抗体である t A 3 - 2 0 を取得した（実施例1）。t A 3 - 2 0 は、*in vitro*にて、R P E 細胞の食食除去機能を活性化させ（実施例2）、さらには *in vivo*にて、R P E における、Me r T K の細胞内キナーゼドメインのリン酸化及びその下流の A K T のリン酸化シグナルを活性化した（実施例3）。また、t A 3 - 2 0 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む片腕抗体を含む抗Me r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体は、Me r T K を介したミスフォールド T T R の食食作用を活性化し（実施例6）、さらには老齢マウスにおいて顕著に同標的に対する食食除去機能を活性化した（実施例7）。t A 3 - 2 0 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む片腕抗体を含む抗Me r T K - 抗免疫グロブリン軽鎖（I g L）二重特異性抗体は、抗体濃度依存的にヒトMe r T K 及びミスフォールド I g L に結合し、食食除去機能を活性化した（実施例10）。このように、本発明者らはMe r T K に結合し、Me r T K を介した食食細胞の食食除去機能を活性化する抗Me r T K アゴニスト抗体及び抗Me r T K 二重特異性抗体を提供し、本発明を完成した。

[0014] すなわち、本発明は、これらに限定されるものではないが、以下の [1] ~ [86] に関する。

〔１〕配列番号１のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号２のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、及び配列番号３のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、並びに

配列番号４のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列からなるＣＤＲ２、及び配列番号６のアミノ酸配列からなるＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む、

抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔２〕以下の（１）～（６）からなる群より選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、〔１〕に記載の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１０のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（２）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（３）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１４のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（４）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（５）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１８のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに

（６）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号２０のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

〔３〕重鎖可変領域を含む重鎖及び軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、〔１〕又は〔２〕に記載の抗Me r T K抗体。

〔４〕重鎖にL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異（L A L A変異）（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、〔３〕に記載の抗Me r T K抗体。

〔５〕重鎖にP 3 3 1 G変異（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、〔３〕に記載の抗Me r T K抗体。

〔６〕重鎖にL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異（L A L A変異）並びにP 3 3 1 G変異（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、〔３〕に記載の抗Me r T K抗体。

〔７〕以下の（１）～（６）からなる群より選択される、〔６〕に記載の抗Me r T K抗体：

（１）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号１０のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（２）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号１２のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（３）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（４）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号１６のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（５）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号１８のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；並びに

（６）配列番号８のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号２０のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体。

〔８〕I g G抗体（抗Me r T K I g G抗体）である、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の抗Me r T K抗体。

[9] 抗原結合フラグメントが一本鎖可変領域フラグメント (s c F v)、F a b フラグメント、F a b' フラグメント、又は F (a b')₂ フラグメントである、[1] 又は [2] に記載の抗 M e r T K 抗体又はその抗原結合フラグメント。

[10] 翻訳後修飾された、[1] ~ [9] のいずれかに記載の抗 M e r T K 抗体又はその抗原結合フラグメント。

[11] [1] ~ [10] のいずれかに記載の抗 M e r T K 抗体若しくはその抗原結合フラグメントの融合体若しくは複合体、又は [1] ~ [10] のいずれかに記載の抗 M e r T K 抗体若しくはその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞。

[12] 以下の (1) ~ (7) からなる群より選択される、抗 M e r T K 抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド：

(1) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 119 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号 10 のアミノ酸番号 1 から 109 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号 12 のアミノ酸番号 1 から 109 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号 14 のアミノ酸番号 1 から 109 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号 16 のアミノ酸番号 1 から 110 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号 18 のアミノ酸番号 1 から 110 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(7) 配列番号 20 のアミノ酸番号 1 から 110 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[13] 以下の (1) ~ (7) からなる群より選択される、抗 M e r T K 抗

体の重鎖又は軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド：

(1) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(7) 配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[14] [12] 又は [13] に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[15] [14] に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

[16] 以下の(1)～(13)からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、宿主細胞：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(9) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(10) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(11) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(12) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(13) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列

番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[17] [15] 又は [16] に記載の宿主細胞を培養し、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含する、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法。

[18] [1] ~ [10] のいずれか一項に記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[19] 眼疾患の予防及び／又は治療に用いるための、[18] に記載の医薬組成物。

[20] 眼疾患が、網膜疾患である、[19] に記載の医薬組成物。

[21] 網膜疾患が、網膜変性疾患である、[20] に記載の医薬組成物。

[22] 網膜変性疾患が、網膜色素変性症又は加齢黄斑変性である、[21] に記載の医薬組成物。

[23] 眼疾患の予防及び／又は治療に使用するための、[1] ~ [10] のいずれかに記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。

[24] [1] ~ [10] のいずれかに記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を対象に投与する工程を含む、眼疾患を予防又は治療する方法。

[25] 眼疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物の製造における、[1] ~ [10] のいずれかに記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

[26] 抗Me r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、Me r T K並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する二重特異性抗体であって、

抗Me r T K抗体の重鎖可変領域が配列番号1のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3のア

ミノ酸配列からなるCDR3を含み、

抗MerTK抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む、

二重特異性抗体。

[27] 抗MerTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が以下の(1)～(6)からなる群より選択される、[26]に記載の二重特異性抗体：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[28] 抗MerTK抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗MerTK抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる1つのFc領域を含む片腕抗体（片腕抗Me

r T K 抗体)を含む、[27]に記載の二重特異性抗体。

[29] 片腕抗M e r T K 抗体の重鎖フラグメント及び軽鎖が、下記(1)～(6)からなる群より選択される、[28]に記載の二重特異性抗体：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[30] 片腕抗M e r T K 抗体の第二F c ポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介してミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域のC末端が連結された、[29]に記載の二重特異性抗体。

[31] ミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体が、ミスフォールドT T Rに結合する抗T T R抗体である、[26]～[30]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[32] [31]に記載の二重特異性抗体であって、

抗T T R抗体の重鎖可変領域が配列番号27のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号28のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号29のアミノ酸配列からなるC D R 3を含み、

抗T T R抗体の軽鎖可変領域が配列番号30のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号31のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号32の

アミノ酸配列からなるCDR3を含む、
二重特異性抗体。

[33] 抗TTR抗体の重鎖可変領域が、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であり、

抗TTR抗体の軽鎖可変領域が、配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域である、[32]に記載の二重特異性抗体。

[34] 抗TTR抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むscFv（抗TTR-scFv）を含む、[33]に記載の二重特異性抗体。

[35] 抗TTR-scFvが配列番号43のアミノ酸配列からなる、[34]に記載の二重特異性抗体。

[36] [34]又は[35]に記載の二重特異性抗体であって、抗MerTK抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗MerTK抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる1つのFc領域を含む片腕抗体（片腕抗MerTK抗体）を含み、片腕抗MerTK抗体の第二FcポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介して抗TTR-scFvのC末端が連結された、二重特異性抗体。

[37] L234A及びL235Aのアミノ酸変異（LALA変異）並びにP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）を含むFc領域を含む、[28]～[36]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[38] 第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドが配列番号39のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列又は配列番号39のアミノ酸配列において1～10個の置換を有するアミノ酸配列を含む、[37]に記載の二重特異性抗体。

[39] ノブズ・イントゥー・ホールズ（knobs into holes）変異を含むFc領域を含む、[38]に記載の二重特異性抗体。

[40] LALA変異、P331G変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ

変異を含むF c領域を含む、[38]に記載の二重特異性抗体。

[41] ノブズ・イントゥー・ホールズ変異がF c領域を形成する1つのF cポリペプチドにおけるT366W変異、並びにF c領域を形成するもう1つのF cポリペプチドにおけるT366S、L368A及びY407V変異である（ここで、前記変異位置はヒトIg γ 1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）、[39]又は[40]に記載の二重特異性抗体。

[42] 第一F cポリペプチド及び第二F cポリペプチドの配列が以下の（1）又は（2）のいずれかの配列からなるポリペプチドである、[38]に記載の二重特異性抗体：

（1）配列番号40のアミノ酸配列からなる第一F cポリペプチド、及び配列番号41のアミノ酸配列からなる第二F cポリペプチド；又は

（2）配列番号41のアミノ酸配列からなる第一F cポリペプチド、及び配列番号40のアミノ酸配列からなる第二F cポリペプチド。

[43] 配列番号42に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域及び／又は配列番号70に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域を含む、[42]に記載の二重特異性抗体。

[44] 翻訳後修飾された、[26]～[43]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[45] [26]～[44]のいずれかに記載の二重特異性抗体の融合体若しくは複合体、又は[26]～[44]のいずれかに記載の二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞。

[46] [26]～[44]のいずれかに記載の二重特異性抗体の生産に用いる、以下の（1）～（9）からなる群より選択されるポリヌクレオチド：

（1）配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗Me rTK抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（2）配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からな

る抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(9) 配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[47] [46] に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[48] [47] に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

[49] [27] ～ [44] のいずれかに記載の二重特異性抗体の生産に用いる、以下の(1)～(3)からなる群より選択されるポリヌクレオチド含む、宿主細胞：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[50] [48] 又は [49] に記載の宿主細胞を培養し、M e r T K及び

T T R に結合する二重特異性抗体を発現させる工程を包含する、該二重特異性抗体を生産する方法。

〔 5 1 〕 〔 2 6 〕 ～ 〔 4 4 〕 のいずれかに記載の二重特異性抗体、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

〔 5 2 〕 ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に用いるための、〔 5 1 〕 に記載の医薬組成物。

〔 5 3 〕 ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患がアミロイドーシスである、〔 5 2 〕 に記載の医薬組成物。

〔 5 4 〕 アミロイドーシスが全身性アミロイドーシスである、〔 5 3 〕 に記載の医薬組成物。

〔 5 5 〕 全身性アミロイドーシスが T T R 型アミロイドーシス又は多発性神経障害アミロイドーシスである、〔 5 4 〕 に記載の医薬組成物。

〔 5 6 〕 ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に使用するための、〔 2 6 〕 ～ 〔 4 4 〕 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

〔 5 7 〕 〔 2 6 〕 ～ 〔 4 4 〕 のいずれかに記載の二重特異性抗体の治療有効量を対象に投与する工程を含む、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患を予防及び／又は治療する方法。

〔 5 8 〕 ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物の製造における、〔 2 6 〕 ～ 〔 4 4 〕 のいずれかに記載の二重特異性抗体の使用。

〔 5 9 〕 ミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体が、ミスフォールド I g L に結合する抗 I g L 抗体である、〔 2 6 〕 ～ 〔 3 0 〕 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

〔 6 0 〕 〔 5 9 〕 に記載の二重特異性抗体であって、

抗 I g L 抗体の重鎖可変領域が配列番号 5 7 のアミノ酸番号 2 6 から 3 5 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 5 7 のアミノ酸番号 5 0 から 6 8 までのアミノ酸配列からなる C D R 2、及び配列番号 5 7 のアミノ酸番号 1 0 1 から 1 0 8 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含み、

抗 I g L 抗体の軽鎖可変領域が配列番号 59 のアミノ酸番号 24 から 39 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 59 のアミノ酸番号 55 から 61 までのアミノ酸配列からなる C D R 2、及び配列番号 59 のアミノ酸番号 94 から 103 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む、二重特異性抗体。

[61] 抗 I g L 抗体の重鎖可変領域が、配列番号 57 のアミノ酸番号 1 から 119 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であり、

抗 I g L 抗体の軽鎖可変領域が、配列番号 59 のアミノ酸番号 1 から 112 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域である、[60] に記載の二重特異性抗体。

[62] 抗 I g L 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む F a b フラグメント (抗 I g L - F a b) を含む、[61] に記載の二重特異性抗体。

[63] 抗 I g L - F a b が配列番号 57 のアミノ酸番号 1 から 226 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域 (V H) と軽鎖定常領域 (C L) からなるフラグメント及び配列番号 59 のアミノ酸からなる軽鎖可変領域 (V L) と C H 1 ドメインからなるフラグメントを含む、[62] に記載の二重特異性抗体。

[64] [62] 又は [63] に記載の二重特異性抗体であって、抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗 M e r T K 抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一 F c ポリペプチド及び第二 F c ポリペプチドからなる 1 つの F c 領域を含む片腕抗体 (片腕抗 M e r T K 抗体) を含み、片腕抗 M e r T K 抗体の第二 F c ポリペプチドの N 末端にヒンジ領域を介して抗 I g L - F a b の C 末端が連結された、二重特異性抗体。

[65] L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A のアミノ酸変異 (L A L A 変異) 並びに P 3 3 1 G 変異 (ここで、前記変異位置はヒト I g γ 1 定常領域における E U インデックスに従うアミノ酸位置である) を含む F c 領域を含む、[59] ~ [64] のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[66] 第一 F c ポリペプチド及び第二 F c ポリペプチドが配列番号 39 の

アミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列又は配列番号39のアミノ酸配列において1～10個の置換を有するアミノ酸配列を含む、[65]に記載の二重特異性抗体。

[67] ノブズ・イントゥー・ホールズ (knobs into holes) 変異を含むFc領域を含む、[66]に記載の二重特異性抗体。

[68] LALA変異、P331G変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ変異を含むFc領域を含む、[66]に記載の二重特異性抗体。

[69] ノブズ・イントゥー・ホールズ変異がFc領域を形成する1つのFcポリペプチドにおけるT366W変異、並びにFc領域を形成するもう1つのFcポリペプチドにおけるT366S、L368A及びY407V変異である（ここで、前記変異位置はヒトIg γ 1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）、[67]又は[68]に記載の二重特異性抗体。

[70] 第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドの配列が以下の（1）又は（2）のいずれかの配列からなるポリペプチドである、[66]に記載の二重特異性抗体：

（1）配列番号40のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号41のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド；又は

（2）配列番号41のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号40のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド。

[71] 配列番号42に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域を含む、[70]に記載の二重特異性抗体。

[72] 翻訳後修飾された、[59]～[71]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[73] [59]～[72]のいずれかに記載の二重特異性抗体の融合体若しくは複合体、又は[59]～[72]のいずれかに記載の二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞。

[74] [59]～[72]のいずれかに記載の二重特異性抗体の生産に用

いる、以下の（１）～（９）からなる群より選択されるポリヌクレオチド：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（２）配列番号１０のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（３）配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（４）配列番号１４のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（５）配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（６）配列番号１８のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（７）配列番号２０のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（８）配列番号５７のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

（９）配列番号５９のアミノ酸番号１から１１２までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[75] [74] に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[76] [75] に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

[77] [59] ～ [72] のいずれかに記載の二重特異性抗体の生産に用いる、以下の(1)～(4)からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、宿主細胞：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗I g L 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる抗I g L 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗I g L 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる抗I g L 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる

抗 I g L 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号 59 のアミノ酸番号 1 から 112 までのアミノ酸配列からなる抗 I g L 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(4) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 119 のアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 20 のアミノ酸番号 1 から 110 までのアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 57 のアミノ酸番号 1 から 119 までのアミノ酸配列からなる抗 I g L 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号 59 のアミノ酸番号 1 から 112 までのアミノ酸配列からなる抗 I g L 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[78] [76] 又は [77] に記載の宿主細胞を培養し、M e r T K 及び I g L に結合する二重特異性抗体を発現させる工程を包含する、該二重特異性抗体を生産する方法。

[79] [59] ~ [72] のいずれかに記載の二重特異性抗体、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[80] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に用いるための、[79] に記載の医薬組成物。

[81] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患がアミロイドーシスである、[80] に記載の医薬組成物。

[82] アミロイドーシスが全身性アミロイドーシスである、[81] に記載の医薬組成物。

[83] 全身性アミロイドーシスが A L アミロイドーシスである、[82] に記載の医薬組成物。

[84] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に使用するための、[59] ~ [72] のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[85] [59] ~ [72] のいずれかに記載の二重特異性抗体の治療有効量を対象に投与する工程を含む、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患を予防及び／又は治療する方法。

[86] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物の製造における、[59] ~ [72] のいずれかに記載の二重特異性抗体の使用。

発明の効果

[0015] 本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント、及び抗Me r T K二重特異性抗体は、貪食細胞に発現しているMe r T Kに結合し、Me r T Kを介した細胞内の下流シグナルを活性化させることにより貪食細胞の貪食除去機能を活性化させる。本発明の抗Me r T K抗体若しくはその抗原結合フラグメント、抗Me r T K二重特異性抗体又はそれらを含む医薬組成物は、Me r T Kを介した細胞内の下流シグナル活性化により予防又は治療できる疾患（例えば眼疾患）の予防又は治療のために使用することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、E L I S A法により測定した被験抗体のヒトMe r T K - H i s蛋白質への結合活性を示す。図の縦軸は結合活性（450nmの吸光度からバックグラウンド値570nmの吸光度を引いた値）を、横軸は被験抗体の濃度を表す。シンボルはそれぞれの被験抗体の吸光度の平均値を示す。

[図2-1]図2-1は、i P S - R P E細胞によるアポトーシス細胞の貪食に対する被験抗体の作用を示す。縦軸はアポトーシス細胞の貪食量の指標である蛍光強度を示す。横軸は評価開始からの経過時間を示す。各ドットは4ウェルの平均値を示す。

[図2-2]図2-2は、i P S - R P E細胞によるブタP O Sの貪食に対する被験抗体の作用を示す。縦軸はP O Sの貪食量の指標である蛍光強度を測定開始から60時間まで積算した値を示す。各ドットはウェルごとの数値を示す。棒グラフの値は平均値を示す。

[図3-1]図3-1は、マウス硝子体内にtA3-20を投与して1時間後のRPEにおけるリン酸化MerTK蛋白質レベルを示す。図の縦軸は総MerTK蛋白質量で補正したリン酸化MerTK蛋白質量を、横軸は被験抗体の投与量を示す。各ドットは個体ごとの数値を示す。バーは平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図3-2]図3-2は、マウス硝子体内にtA3-20を投与して1時間後のRPEにおけるリン酸化AKT蛋白質レベルを示す。図の縦軸は総AKT蛋白質量で補正したリン酸化AKT蛋白質量を、横軸は被験抗体の投与量を示す。各ドットは個体ごとの数値を示す。バーは平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図4-1]図4-1は、ELISA法により測定した被験抗体のmisTTRへの結合活性を示す。図の縦軸は結合活性（450nmの吸光度からバックグラウンド値570nmの吸光度を引いた値）を、横軸は被験抗体の濃度を表す。シンボルはそれぞれの被験抗体の吸光度の平均値を示す。

[図4-2]図4-2は、ELISA法により測定した被験抗体のヒトMerTK-Fc蛋白質への結合活性を示す。図の縦軸は結合活性（450nmの吸光度からバックグラウンド値570nmの吸光度を引いた値）を、横軸は被験抗体の濃度を表す。シンボルはそれぞれの被験抗体の吸光度の平均値を示す。

[図5]図5は、tA-009によるpHrodo-misTTRのMerTK依存的な貪食作用を示す。図の縦軸は観察期間中の総貪食量（ $[p/s] \cdot h$ ）を示す。値は平均値+標準誤差を示す。コントロール群である溶媒群とtA-009群との比較、及びコントロール群であるtA-009群とtA-009+ONO7475群との比較はStudent's t-testを用いて行い、P値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。図中のアスタリスク（*）及びシャープ（#）は、それぞれ溶媒群とtA-009群との比較及びtA-009群とtA-009+ONO7475群との比較における有意差を示す。

[図6-1]図6-1は、tA-009又はマウス型371MによるDL800-misTTRの食食除去機能の活性化を示す。図の縦軸は観察期間中のmisTTRの総残存量（ $[p/s] \cdot h$ ）を示す。値は平均値＋標準誤差を示す。コントロールである溶媒群と薬物（マウス型371M又はtA-009）群との比較はDunnett's testを用いて行い、P値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。図中の*は溶媒群と薬物との比較における有意差を示す。

[図6-2]図6-2は、老齢マウスに皮下投与したDL800-misTTRに対するtA-009又はマウス型371Mによる食食除去機能の活性化を示す。図の縦軸は観察期間中のmisTTRの総残存量（ $[p/s] \cdot h$ ）を示す。値は平均値＋標準誤差を示す。コントロール群である若齢マウス・溶媒群と老齢マウス・溶媒群との比較はStudent's t-testを用い、コントロール群である老齢マウス・溶媒群と老齢マウス・薬物（マウス型371M又はtA-009）群との比較はDunnett's testを用いて行い、それぞれP値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。図中の*及び#は、それぞれ若齢マウス・溶媒群と老齢マウス・溶媒群との比較及び老齢マウス・溶媒群と老齢マウス・薬物との比較における有意差を示す。

[図7]図7は、ELISA法により測定した被験抗体のヒトMeRTK及びミスフォールドIgL蛋白質への結合活性を示す。図の縦軸は結合活性（450nmの吸光度からバックグラウンド値570nmの吸光度を引いた値）を、横軸は被験抗体の濃度を表す。シンボルはそれぞれの被験抗体の吸光度を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下に、本発明について詳述する。

[0018] <定義> 本明細書の用語は、以下で特に定義されない限り、当該技術分野で当業者に一般に使用されている意味にて使用される。

[0019] 抗体（又は免疫グロブリン）とは、単一の配列を有する重鎖2本と、単一

の配列を有する軽鎖2本からなる左右対称Y字型の構造を有する4本鎖構造を基本構造とする糖蛋白質をいう。抗体にはIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEの5つのクラスが存在する。抗体分子の基本構造は各クラス共通であり、分子量5万～7万の重鎖2本と2万～3万の軽鎖2本がジスルフィド結合及び非共有結合によって結合し、分子量15万～19万のY字型の4本鎖構造からなる抗体分子を形成する。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEに対応してそれぞれ、Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ とよばれる。さらにIgGには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のサブクラスが存在し、それぞれに対応する重鎖はIg γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、Ig γ 4とよばれる。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、 λ 型と κ 型の2種が知られており、それぞれIg λ 、Ig κ という。前記2種の軽鎖は、いずれの種類の重鎖とも対をなすことができる。

[0020] 抗体分子の鎖内ジスルフィド結合は、重鎖には4つ（Ig μ 、Ig ϵ には5つ）、軽鎖には2つ存在し、アミノ酸100～110残基ごとに1つのループを成している。それらの立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位又はドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにアミノ末端（本明細書において「N末端」とも称する）に位置するドメインは可変領域とよばれ、同種動物の同一クラス（又はサブクラス）から産生された抗体であっても多様なアミノ酸配列を有し、抗体と抗原との結合特異性に関与することが知られている。可変領域よりも下流のカルボキシ末端（本明細書において「C末端」とも称する）側のドメインのアミノ酸配列は、各クラス又はサブクラスごとにほぼ一定であり、定常領域とよばれている。重鎖は、N末端からC末端に向かって重鎖可変領域（VH）及び重鎖定常領域（CH）を有する。CHはさらにN末端側からCH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインの3つのドメインに分けられる。軽鎖は、N末端からC末端に向かって軽鎖可変領域（VL）及び軽鎖定常領域（CL）を有する。

- [0021] V H及びV Lに存在する3つの相補性決定領域（C D R）のアミノ酸配列は変化が非常に大きく、可変領域の可変性に寄与している。C D Rは、重鎖と軽鎖のN末端それぞれにC D R 1、C D R 2、C D R 3の順番で存在するおよそ5～10アミノ酸残基からなる領域であって、抗原結合部位を形成する。一方、可変領域のC D R以外の部分はフレームワーク領域（F R）とよばれ、F R 1～4からなり、アミノ酸配列の変化は比較的少ない。
- [0022] 抗体を蛋白質分解酵素のパパインで処理すると、3つの抗体断片が得られる。N末端側の2つの断片はF a b（抗原結合断片、F r a g m e n t, a n t i g e n b i n d i n g）領域と呼ばれている。本明細書において、「F a b領域」とは、重鎖のV HとC H 1ドメイン及び軽鎖（V LとC L）からなる領域を指し、当該F a b領域が構成する先端部分の抗原結合部位で抗原と結合する。本明細書において、「重鎖フラグメント」とは、F a b領域を構成する重鎖のV HとC H 1ドメインからなるフラグメントを指す。また、C末端側の断片をF c（結晶化可能断片、F r a g m e n t, c r y s t a l l i z a b l e）領域とよぶ。本明細書において、「F cポリペプチド」は、重鎖のC H 2ドメイン及びC H 3ドメインからなるポリペプチドをいい、「F c領域」は第一F cポリペプチド及び第二F cポリペプチドの2つのF cポリペプチドからなる複合体を指す。ここで、F cポリペプチドに用いられる「第一」又は「第二」という用語は、便宜上区別するために使用され、特定の順序や意味を付与することを意図しているのではない。
- [0023] 本明細書において、「ヒンジ領域」とは重鎖のC H 1ドメインとC H 2ドメインとの間に存在する可動性の高いペプチド領域を指し、重鎖フラグメントとF cポリペプチドはヒンジ領域を介して繋がっている。また、抗体の2本の重鎖はヒンジ領域でジスルフィド結合を介して繋がっている。
- [0024] 本明細書において、「抗原」とは一般的に用いられている意味で用いられ、抗体や抗原結合フラグメントが特異的に結合し得る分子又は分子の一部を表す用語として用いられる。抗原は蛋白質、核酸等の分子であり得る。1つの抗原は、異なる抗体等と相互作用することができる1つ又はそれ以上のエ

ピトープを有する場合もある。

[0025] 本明細書において「I g G抗体」とは、2つのF a b領域とF c領域からなるY字型の構造を有する抗体をいう。すなわち、I g G抗体は、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる構造を有する。1つの実施形態において、I g G抗体の2つのF a b領域は、同一のV H及びV L配列を含む。

[0026] 本明細書において、「抗原結合フラグメント」とは、免疫グロブリン分子の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、抗原結合活性を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む分子である。代表的な抗原結合フラグメントとしては、一本鎖可変領域フラグメント(s c F v)、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、F (a b')₂フラグメントが挙げられる。s c F vは、リンカーで連結されたV HとV Lから構成される、一価の抗原結合フラグメントである。F a bフラグメントは、軽鎖と、重鎖のV H、C H 1ドメインを含むフラグメントから構成される、一価の抗原結合フラグメントである。F a bフラグメントはF a b領域を含む。F a b' フラグメントは、軽鎖と、重鎖のV H、C H 1ドメインとヒンジ領域の一部とを含むフラグメントから構成される、一価の抗原結合フラグメントであり、このヒンジ領域の部分には重鎖間S-S結合を構成していたシステイン残基が含まれる。F (a b')₂フラグメントは、F a b' フラグメントがジスルフィド結合で繋がっている二価の分子である。一価とは、抗原結合部位を1つ含むことを、二価とは、抗原結合部位を2つ含むことを意味する。また、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、F (a b')₂フラグメントには、重鎖のV H 1及びC H 1ドメイン、並びに軽鎖のV L及びC Lの全部又は一部をクロスオーバーさせたフラグメントも含まれ得る(m A b s, 2016, 8(6): 1010-1020)。さらに「抗原結合フラグメント」にはV H H抗体などの重鎖抗体(m A b s, 2017, 9(2): 182-212)も含まれる。

[0027] 本明細書において、「H a l f - I g」とは、1つのV H、1つのV L及び1つのF cポリペプチドを含む一価の抗体である。1つの実施形態におい

て、H a l f - I g は、1つのV H、1つのC H 1ドメイン、1つのV L、及び1つのF c ポリペプチドを含む。1つの実施形態において、H a l f - I g は、1つの重鎖フラグメント（V H及びC H 1ドメイン）、1つのF c ポリペプチド（C H 2ドメイン及びC H 3ドメイン）及び1つの軽鎖（V L及びC L）を含む。1つの実施形態において、H a l f - I g は、1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む。

[0028] 本明細書において、「片腕抗体」とは、1つのV H、1つのC H 1ドメイン、1つのV L、1つのC L並びに第一F c ポリペプチド及び第二F c ポリペプチドからなる1つのF c 領域を含む一価の抗体である。1つの実施形態において、片腕抗体は、1つの重鎖フラグメント（V H及びC H 1ドメイン）、1つのF c 領域（第一及び第二F c ポリペプチド（C H 2ドメイン及びC H 3ドメイン））、並びに1つの軽鎖（V L及びC L）を含む。1つの実施形態において、片腕抗体は、1つの重鎖フラグメント、ヒンジ領域、1つのF c 領域、並びに1つの軽鎖を含む。1つの実施形態において、片腕抗体は、1つのF a b領域、ヒンジ領域及び1つのF c 領域を含む。1つの実施形態において、片腕抗体は1つのF a b領域、ヒンジ領域及び1つのF c 領域を含み、該F a b領域の重鎖フラグメントがヒンジ領域を介して該F c 領域の第一F c ポリペプチドに連結された構造を有する。1つの実施形態において、片腕抗体は1つのF a b領域、ヒンジ領域及び1つのF c 領域を含み、該F a b領域の重鎖フラグメントがヒンジ領域を介して該F c 領域の第一F c ポリペプチドのN末端に連結された構造（1つの重鎖）を有する。

[0029] 本明細書において、「二重特異性抗体」とは、2つの異なる抗原に特異的に結合することができる抗体をいう。二重特異性抗体は、それぞれ異なる抗原に結合することができる2つの抗体又は抗原結合フラグメントから構成され、様々な構造の二重特異性抗体が当業者に公知である（m A b s, 2017, 9(2):182-212）。

[0030] 本明細書において、「多重特異性抗体」とは、3以上の異なる抗原に特異的に結合できる抗体をいい、結合する抗原の数により、例えば、三重特異性

抗体、四重特異性抗体と呼ばれる。多重特異性抗体は、それぞれ異なる抗原に結合することができる3以上の抗体及び／又は抗原結合フラグメントから構成される。

[0031] 本明細書において、「抗体」は、文脈上特に限定されない限り、IgG抗体、Half-Ig、片腕抗体、二重特異性抗体及び多重特異性抗体も含む用語として使用される。

[0032] 本明細書において、「ヒト抗体」とは、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有する抗体を表す。本明細書において「完全ヒト型抗体」とは、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列のみからなる抗体を表す。本明細書において「マウスーヒトキメラ抗体」とはマウス免疫グロブリンアミノ酸配列の抗原結合可変領域及びヒト免疫グロブリンアミノ酸配列の定常領域を有する抗体を表す。

[0033] 本明細書中で使用される抗体のアミノ酸残基番号はKabatナンバリング又はEUインデックス(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, NIH Publication: No. 91-3242)を指定することで、それらのナンバリングシステムに従って規定することができる。

[0034] 本明細書において、「対象」とは、疾患の予防又は治療を必要とする、ヒト又はその他の動物を意味する。1つの実施形態において、対象は疾患の予防又は治療を必要とするヒトである。1つの実施形態において、対象は種々の眼疾患、肺疾患、自己免疫疾患、神経障害疾患、心疾患、内分泌・代謝疾患、がん等の予防又は治療を必要とするヒトである。

[0035] 本明細書において、「診断」とは、罹患の有無の判定に限らず、確定診断後の重症度（進行度）、将来罹患・発症する可能性が高いか否かの判定等、あらゆる診断を包含する。

[0036] 本明細書において、「予防」とは疾患の発生を防ぐ、又は遅延させるために行う、何らかの介入(intervention)を意味する。

[0037] 本明細書において、「治療」とは疾患の症状、病状、疾患と関連する生化学的徴候の進行、発症、重篤化又は再発を、回復、緩和、改善、抑制又は遅延させる目的で対象に対して行われる何らかの介入、処置又は対象への有効成分の投与を意味する。

[0038] 本明細書において、「有効成分」とは疾患の予防又は治療に用いる医薬組成物、医薬品等に含まれる物質のうち、何らかの生理活性を示すものを意味する。1つの実施形態において、有効成分は抗体又は抗原結合フラグメントである。1つの実施形態において、有効成分は抗体又は抗原結合フラグメントの融合体・複合体である。1つの実施形態において、有効成分は二重特異性抗体である。

[0039] 本明細書において、「医薬組成物」とは、有効成分及び薬学的に許容される賦形剤（例えば薬剤用賦形剤や薬剤用担体等が含まれるがこれに限らない）を含み、対象の予防又は治療を目的として処方される薬剤である。

[0040] 本明細書において、薬剤の「有効量」とは薬剤が対象に投与された場合に、対象の組織又は細胞に作用することにより、対象に生理学的変化をもたらすために必要な薬剤の量を指す。

[0041] <本発明の抗Me r T K抗体>

本明細書において、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントとは、ヒトMe r T Kに結合可能な抗体又はその抗原結合フラグメントをいう。ヒトMe r T Kに結合するか否かは、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、実施例1－2又は1－3に記載のEnzyme－Linked ImmunoSorbent Assay（ELISA）法を用いることができる。

[0042] 本発明は、以下に示す抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する：

配列番号1のアミノ酸配列からなるCD R 1、配列番号2のアミノ酸配列からなるCD R 2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるCD R 3を含む重鎖可変領域、並びに、配列番号4のアミノ酸配列からなるCD R 1、配列

番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。

本明細書中、当該抗Me r T K抗体を「本発明の抗Me r T K抗体」とも称し、当該抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを「本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント」とも称する。

[0043] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、以下の(1)～(6)からなる群より選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントである：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

- [0044] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体は、重鎖及び軽鎖を含む抗体である。重鎖及び軽鎖を含む抗体には、I g G抗体、H a l f - I g及び片腕抗体が含まれる。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体は、I g G抗体（抗M e r T K I g G抗体）である。
- [0045] 1つの実施形態において、本発明の抗原結合フラグメントは、s c F v、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、又はF（a b'）₂フラグメント又はV H H抗体である。
- [0046] 本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントに含まれる重鎖定常領域としては、I g γ、I g μ、I g α、I g δ又はI g εのいずれの定常領域も選択可能である。I g γとしては、例えば、I g γ 1、I g γ 2、I g γ 3又はI g γ 4から選択することが可能である。本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントに含まれる軽鎖定常領域としては、I g λ又はI g κのいずれの定常領域も選択可能である。1つの実施形態において、該抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域は、それぞれ、ヒトI g γ 1及びI g λの定常領域である。
- [0047] 本発明の抗M e r T K抗体は、抗体依存性細胞傷害活性（A D C C）、抗体依存性細胞貪食活性（A D C P）や補体依存性傷害活性（C D C）を低下させる変異を含んでもよい。L 2 3 4 Aとは、ヒトI g γ 1定常領域のアミノ酸2 3 4位のロイシンのアラニンへの置換である。L 2 3 5 Aとは、ヒトI g γ 1定常領域のアミノ酸2 3 5位のロイシンのアラニンへの置換である。ヒトI g γ 1定常領域L 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異を「L A L A変異」という。当該変異は、抗体のF c領域とF c γ受容体との結合活性及びC 1 qとの結合活性が低下することにより抗体のA D C C、A D C PやC D Cを低下させることが知られている（M o l . I m m u n o l . , 1 9 9 2 , 2 9 : 6 3 3 - 6 3 9 ; J . I m m u n o l . , 2 0 0 0 , 1 6 4 : 4 1 7 8 - 4 1 8 4 ; F r o n t . I m m u n o l . , 2 0 1 9 , 1 0 : 1 2 9 6）。P 3 2 9 AとはヒトI g γ 1定常領域のアミノ酸3 2 9位のプ

ロリンのアラニンへの置換、またP 3 3 1 G又はP 3 3 1 Sとは、ヒト I g γ 1 定常領域のアミノ酸 3 3 1 位のプロリンのグリシン又はセリンへの置換である。当該変異は、抗体のCDCを低下させることが知られている（J. Immunol., 2000, 164: 4178-4184）。

[0048] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、重鎖にL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異（L A L A変異）を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、重鎖にP 3 2 9 A、P 3 3 1 G又はP 3 3 1 S変異のいずれかを含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、重鎖にL A L A変異及びP 3 2 9 A、P 3 3 1 G又はP 3 3 1 S変異のいずれかの変異を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、重鎖にL A L A変異及びP 3 2 9 A変異を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、重鎖にL A L A変異及びP 3 3 1 G変異を含む。

[0049] なお、本明細書において、L A L A変異、P 3 2 9 A、P 3 3 1 G又はP 3 3 1 S変異等のアミノ酸変異の記載は、ヒト I g γ 1 定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置に基づくものである。例えば、前述の通り、L 2 3 4 Aとは、ヒト I g γ 1 定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸 2 3 4 位のロイシンのアラニンへの置換である。

[0050] 本発明の抗Me r T K抗体は、さらに他の公知技術に基づく変異を含んでもよい。例えば、本発明の抗Me r T K抗体は、N 2 9 7 G変異（P r o t e i n c e l l, 2018, 9: 63-73）、ノブズ・イントゥー・ホールズ（K n o b s i n t o h o l e s, k i h）技術に基づく変異（以下、「ノブズ・イントゥー・ホールズ変異」とも称する）や静電ステアリング変異を含んでもよい。

[0051] k i h技術は、一方の重鎖のC H 3領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（k n o b : 突起）に置換し、もう一方の重鎖のC H 3領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖（h o l e : 空隙）に置換することにより、突起が空隙内に配置されるようにして、重鎖のヘテロ二量体化を促進し

、目的のヘテロ二量体化抗体分子を効率的に取得できる技術である（Nature, 1994, 372:379-383; Nature Biotech., 1998, 16:677-681; J. Mol. Biol., 1997, 270:26-35; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2013, 110:E2987-E2996、国際公開第1998/050431号）。

[0052] 静電ステアリングを用いた技術は、一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖を負電荷のアミノ酸側鎖に置換し、もう一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖を正電荷のアミノ酸側鎖に置換する（本明細書において、「静電ステアリング変異」と称する）ことにより、静電気力にて重鎖のヘテロ二量体化を促進し、目的のヘテロ二量体化抗体分子を効率的に取得できる技術である（J. Biol. Chem., 2010, 285:19637-19646）。マウス由来の抗体における静電ステアリング変異及びヘテロ二量体化抗体分子を安定化させるための変異としては、一方の重鎖のCH3ドメインにE356K、T364S、M368L、T370K、D399K、R411Tを含み、もう一方の重鎖のCH3領域にT364S、M368L、T370K、K409E、R411T、K439Dを含む変異が知られている（mAbs, 2019, 12:1-12）。

[0053] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK抗体は、以下の（1）～（6）からなる群より選択される、抗MerTK抗体である：

（1）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗MerTK抗体；

（2）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗MerTK抗体；

（3）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗MerTK抗体；

（4）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗MerTK抗体；

(5) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体。

[0054] 本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントには、ヒトMe r T Kへの結合に加え、マウス、サル、及び／又はラット由来のMe r T Kにも結合する抗体又はその抗原結合フラグメントも含まれる。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト、マウス、サル、及び／又はラット由来のMe r T Kに結合する抗体又はその抗原結合フラグメントである。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトMe r T K（遺伝子番号：NM__006343）に結合する。各種のMe r T Kへの結合は、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、E L I S A法、フローサイトメトリー法等の方法が挙げられる。E L I S A法又はフローサイトメトリー法を用いる場合は、例えば国際公開第2022/224997号の実施例3又は5に記載の方法を用いることができる。

[0055] 本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントのアゴニスト活性を評価する方法として、Me r T Kの下流シグナルであるA K Tリン酸化誘導活性を評価してもよい。A K Tリン酸化誘導活性の評価方法としては、例えば公知の方法を用いることができる。本明細書中では、A K Tリン酸化誘導活性を有する抗Me r T K抗体を「抗Me r T Kアゴニスト抗体」とも称する。

[0056] 本明細書において「翻訳後修飾」とは、抗体を細胞内で発現させた場合に抗体が翻訳後に修飾を受けることをいう。翻訳後修飾の例として、N-結合型又はO-結合型糖鎖の付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化等が挙げられる。種々の抗体において、このような翻訳後修飾が生じることが知られている（J. P h a

rm. Sci., 2008, 97:2426-2447)。

[0057] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、翻訳後修飾されていてもよい。1つの実施形態において、翻訳後修飾はN-結合型又はO-結合型糖鎖の付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、及び／又はメチオニンの酸化である。

[0058] 本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、本明細書に開示される、本発明のMe r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、後述の<本発明の抗Me r T K抗体を生産する方法>に記載の方法に従い製造することができる。

[0059] <本発明のポリヌクレオチド>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド（「本発明のポリヌクレオチド」とも称する）を提供する。

[0060] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0061] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0062] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、以下の(a)～(f)からなる群より選択されるポリヌクレオチドである

:

- (a) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び
- (f) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0063] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドは、以下の(a)～(f)からなる群より選択されるポリヌクレオチドである：

- (a) 配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び
- (f) 配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0064] 本発明のポリヌクレオチドは、その塩基配列に基づき、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、国際公開第90/07861号に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。

[0065] <本発明の発現ベクター>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び／又は本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター（「本発明の発現ベクター」とも称する）を提供する。

[0066] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、本発明の抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、本発明の抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、又は本発明の抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターであってよい。

[0067] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、本発明の抗Me r T K抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、本発明の抗Me r T K抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、又は本発明の抗Me r T K抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターであってよい。

[0068] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、以下の（1）～（7）からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む：

（1）配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる

重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0069] 1つの実施形態において、本発明の発現ベクターは、以下の(1)～(7)からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(7) 配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含む

む、ポリヌクレオチド。

[0070] 本発明の発現ベクターとしては、真核細胞（例えば、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母）及び／又は原核細胞（例えば、大腸菌）の各種の宿主細胞中で本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び／又は本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを発現し、これらによりコードされるポリペプチドを産生できるものである限り、特に制限されるものではない。このような発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等が挙げられ、例えば、p c D N A 3. 4 T O P Oベクター、p E E 6. 4やp E E 1 2. 4を使用することができる。また、A G - γ 1やA G - κ （例えば、国際公開第94／20632号を参照）等の予めヒトI g定常領域遺伝子を有する発現ベクターに可変領域遺伝子断片を導入して抗体遺伝子を発現することもできる。

[0071] 本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。動物細胞で本発明のポリヌクレオチドを発現させるためのプロモーターとしては、例えば、CMV、RSV、SV40などのウイルス由来プロモーター、アクチンプロモーター、EF（e l o n g a t i o n f a c t o r）1 α プロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。細菌（例えば、エシェリキア属菌）で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、t r pプロモーター、l a cプロモーター、 λ P Lプロモーター、t a cプロモーターなどが挙げられる。また、酵母で発現させるためのプロモーターとしては、例えば、G A L 1プロモーター、G A L 1 0プロモーター、P H O 5プロモーター、P G Kプロモーター、G A Pプロモーター、A D Hプロモーターなどが挙げられる。

[0072] 宿主細胞として動物細胞、昆虫細胞、又は酵母を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン及び終止コドンを含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、エンハンサー配列、本発明の抗体又はその重鎖可変領域若

しくは軽鎖可変領域をコードする遺伝子の5'側及び3'側の非翻訳領域、分泌シグナル配列、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、あるいは複製可能単位などを含んでいてもよい。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域、及び複製可能単位を含み得る。この場合、本発明の発現ベクターは、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでいてもよい。

[0073] <本発明の形質転換された宿主細胞>

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド又は本発明の発現ベクター（纏めて「本発明のポリヌクレオチド等」とも称する）によって形質転換された宿主細胞（「本発明の宿主細胞」とも称する）を提供する。本発明の宿主細胞は、細胞内に本発明のポリヌクレオチド等を含む。導入された本発明のポリヌクレオチド等は宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれていてもよく、組み込まれていなくてもよい。宿主細胞として用いる細胞は、*in vitro*で培養可能な細胞又は生体内の細胞のいずれでもよい。宿主細胞が*in vitro*で培養可能な細胞である場合、本発明のポリヌクレオチド等を*in vitro*にて細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。宿主細胞を形質転換する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、又はリポフュージョン法等の当業者に一般的に用いられる方法を使用することができる。宿主細胞が生体内の細胞である場合、宿主細胞に本発明のポリヌクレオチド等を導入する方法は、特に限定されるものではないが、核酸送達用キャリア（カチオン性キャリア又は非カチオン性キャリア（例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子（LNP）を含むがこれに限らない）等）を用いることができる。

[0074] *in vitro*で培養可能な細胞としては、使用する発現ベクター又はエレクトロポレーション法等の方法によって形質転換され、抗体又はポリペ

プチドを発現することができるものである限り特に限定されるものではない。*in vitro*で培養可能な細胞としては、例えば、本発明の技術分野において通常使用される従来細胞又は人工的に樹立された細胞等種々の細胞（例えば、動物細胞（例えば、CHO-K1細胞、Exp i CHO-S（登録商標）細胞、CHOK1SV細胞、CHO-DG44細胞、HEK293細胞、Exp i 293F細胞、NSO細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf9）、細菌（エシェリキア属菌等）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属等）が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の宿主細胞はExp i 293F細胞、CHO-K1細胞、又はExp i CHO-S細胞である。

[0075] *in vitro*にて形質転換された宿主細胞の選別は、当業者に一般に使用されている方法にて行うことができる。選別方法には、例えば、薬剤選択マーカー遺伝子とテトラサイクリン、アンピシリン、ネオマイシン又はハイグロマイシン等の薬剤を用いた薬剤選択法や、限外希釈法、シングルセルソーティング法、又はコロニーピッキング法等の細胞単離法を用いることができる。

[0076] 1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、以下の（a）～（c）からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む：

（a）本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（b）本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

（c）本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0077] 1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、以下の（a）～（c）からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む：

（a）本発明の抗MerTK抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌ

クレオチド、及び、該抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b) 本発明の抗M e r T K抗体の重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(c) 本発明の抗M e r T K抗体の軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0078] 1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、以下の(1)～(13)からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(9) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番

号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(10) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(11) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(12) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(13) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0079] <本発明の抗Me r T K抗体を生産する方法>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法（「本発明の生産方法」とも称する）を提供する。本発明の生産方法には、前述の本発明のポリヌクレオチドの生産方法、本発明の発現ベクターの生産方法及び本発明の宿主細胞の生産方法が含まれ得る。さらに、本発明の生産方法には、前述の<本発明の形質転換された宿主細胞>に記載の宿主細胞を培養し該細胞又は該培養上清中に該抗体を発現させる工程、該抗体を回収、単離及び精製する方法等も含まれ得る。しかしながら、本発明の生産方法は、本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントが生産される限りにおいて、これらの方法に限定されるものではない。

[0080] 1つの実施形態において、本発明の生産方法は、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、該抗体又はその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養し、抗M e r T K抗体を発現させる工程を含む。

[0081] 形質転換された宿主細胞の培養は公知の方法により行うことができる。培養条件、例えば、温度、培地のpH、及び培養時間は、適宜選択される。宿主細胞が動物細胞の場合、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（Science, 1959, 130:432-437）、DMEM培地（Virology, 1959, 8:396-397）、RPMI 1640培地（J. Am. Med. Assoc., 1967, 199:519）、199培地（Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73:1-8）等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約30～40℃で約15～336時間行われる。宿主細胞が昆虫細胞の場合、培地としては、例えば、胎児牛血清を含むGrace's培地（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, 82:8404-8408）等を用いることができる。培地のpHは約5～8であるのが好ましく、培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20～40℃で約15～100時間行われる。宿主細胞が大腸菌又は酵母である場合、培地としては、例えば、栄養源を含有する液体培地が適当である。栄養培地は、形質転換された宿主細胞の生育に必要な炭素源、無機窒素源又は有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源又は有機窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが挙げられる。所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類など）、抗生

物質（例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）を含んでいてもよい。培地のpHは約5～8であるのが好ましい。宿主細胞が大腸菌の場合、好ましい培地としては、例えば、LB培地、M9培地（Cold Spring Harb. Laboratory, 2001, 3:A2.2）等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約14～39℃で約3～24時間行われる。宿主細胞が酵母の場合、培地としては、例えば、Burkholder最小培地（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1980, 77:4504-4508）等を用いることができる。培養は、必要により通気や攪拌しながら、通常約20～35℃で約14～144時間行われる。上述のような培養により、本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させることができる。

[0082] 本発明の生産方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程に加えて、さらには、該形質転換された宿主細胞から抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントを回収、例えば単離又は精製する工程を含むことができる。単離又は精製方法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。例えば、培養上清中に蓄積された抗体は、各種クロマトグラフィー、例えば、プロテインAカラム又はプロテインGカラムを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製することができる。

[0083] 本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントには、本発明の生産方法で生産された抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントも含まれる。

[0084] <本発明の融合体、本発明の複合体、及び本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞>

本発明はまた、M e r T K以外の蛋白質（抗体を含む）やポリペプチドを連結した、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント（「本発明の融合体」ともいう）を提供する。すなわち、本明細書において「本発明の融合体」とは、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントと、M e r T K以外の蛋白質（抗体を含む）やポリペプチドとを連結させたものを意味する。本発明の融合体に用いられる蛋白質やポリペプチドは特に限定されず、例えば、抗体、抗原結合フラグメント、リガンド、受容体、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、生理活性物質、ヒト血清アルブミン、各種タグペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合蛋白質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、その他の多量体化を促進し得るペプチド又は蛋白質等を使用し得る。1つの実施形態において、本発明の融合体は、蛋白質やポリペプチドが、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントにリンカー（例えば、ペプチドリナー）を介して連結されたものであってよい。1つの実施形態において、本発明の融合体に用いられる蛋白質やポリペプチドは、例えばT細胞、B細胞、n a t u r a l k i l l e r（NK）細胞、樹状細胞、顆粒球、マクロファージ、マスト細胞等の免疫細胞、上皮細胞、線維芽細胞、若しくはR P E細胞等の細胞表面抗原に対する抗体若しくはその抗原結合フラグメント、又は各種インターロイキン（例えばI L - 2、I L - 7、I L - 1 2、I L - 1 5）等の免疫細胞を活性化するポリペプチドであってよい。この場合、本発明の融合体に用いられる蛋白質やポリペプチドは、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントに直接連結していてもよく、また、任意のリンカー（例えば、ペプチドリナー）を介して連結させてもよい。

[0085] 本発明はまた、糖質、脂質、金属（放射性同位体を含む）、有機化合物（毒素、近赤外蛍光色素、キレート剤を含む）等（「修飾剤」ともいう）と結合した、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント（「本発

明の複合体」ともいう)を提供する。すなわち、本明細書において「本発明の複合体」とは、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントと、蛋白質やポリペプチド以外の物質とを連結させたものを意味する。本明細書において、「修飾剤」とは抗体又はその抗原結合フラグメントに直接又はリンカー等を介して結合している、非ペプチド性の物質を指す。本発明の複合体に用いられる修飾剤は特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、放射線同位体(例えば、ジルコニウム-89(89Zr)、イットリウム-90(90Y)、インジウム-111(111In)、アスタチン-211(211At)、アクチニウム-225(225Ac))、有機化合物、毒素、近赤外蛍光色素(例えばI R D y e(登録商標))、キレート剤等が挙げられる。当該複合体に用いられる物質は、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントに直接結合していてもよく、また、任意のリンカーを介して結合していてもよい。1つの実施形態において、本発明の複合体は、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの薬物複合体(A n t i b o d y D r u g C o n j u g a t e : A D C)である。ADCに用いられる薬剤及びリンカーは、当業者が一般に用いる薬剤及びリンカーの中より選定され得る。1つの実施形態において、本発明の複合体は、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントに放射線同位体が結合した放射性同位体標識抗体である。

[0086] 本発明の複合体は可溶型又は膜型M e r T Kの検出にも使用することができる。本明細書において「検出」とは定量的又は定性的検出を包含する。

[0087] 本発明はまた、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞(例えば免疫担当細胞又は免疫エフェクター細胞)の表面に提示させた細胞(例えば、C h i m e r i c a n t i g e n r e c e p t o r - T c e l l : C A R - T細胞)(以降、「本発明の提示細胞」とも称する)を提供する。本発明の提示細胞の作製方法は特に限定されないが、例えば、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドを用いて、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメン

トを細胞表面に発現させることによって作製することができる。本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを提示させる細胞には、各種細胞（マクロファージ、肺胞マクロファージ、T細胞、及びNK細胞等）を用いることができる。

[0088] 本発明の融合体、本発明の複合体、及び本発明の提示細胞を纏めて「本発明の融合体等」とも称する。

[0089] 1つの実施形態において、本発明の融合体等に用いられる抗体又は抗原結合フラグメントは、翻訳後修飾されていてもよい。1つの実施形態において、翻訳後修飾は、N－結合型又はO－結合型糖鎖の付加、N末端又はC末端のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、及び／又はメチオニンの酸化である。

[0090] 本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント、本発明の融合体等は、本明細書に開示される本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントのV H及びV Lの配列情報、本発明の融合体に使用される他のペプチド又は蛋白質（例えば、抗体）、本発明の複合体に用いられる修飾剤の情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、＜本発明の抗Me r T K抗体を生産する方法＞の項に記載の方法に従って製造することができる。

[0091] ＜本発明の医薬組成物＞

本発明はまた、本発明の抗Me r T K抗体、その抗原結合フラグメント、又は本発明の融合体等及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物（「本発明の医薬組成物」とも称する）を提供する。本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられている賦形剤、すなわち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴用剤、点眼剤等の非経口剤が挙げられ、眼内投与、硝子体内投与、眼球後投与、結膜下投与、眼球鞘下投与、網膜下投与、吸入投与、髄腔内投与、腹腔内投与、静脈内

投与、皮下投与、関節内投与、点鼻投与及び筋肉内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。

[0092] 本発明の医薬組成物は、複数種の本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント、又は本発明の融合体等及びそれらの翻訳後修飾体を含み得る。例えば、N-結合型又はO-結合型糖鎖の付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、及び／又はメチオニンの酸化を受けた抗体等を含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0093] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、以下の(a)～(f)のいずれかの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、本発明の抗M e r T K抗体若しくはその抗原結合フラグメント又は本発明の融合体等及び／又は当該抗体又はその抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等の翻訳後修飾体を含有する医薬組成物である：

(a) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(b) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(c) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(d) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(e) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに

(f) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0094] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、以下の(a)～(f)のいずれかの重鎖及び軽鎖を含む、本発明の抗Me r T K抗体若しくは本発明の融合体等及び／又は当該抗体若しくは本発明の融合体等の翻訳後修飾体を含有する医薬組成物である：

(a) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖；

(b) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖；

(c) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号14に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖；

(d) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖；

(e) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号18に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

(f) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0095] 上記製剤化に当たっての本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいは抗体の結合力価等により異なるが、例えば、0.0001mg/kg～100mg/kg程度を用いることができる。

[0096] <本発明の抗Me r T K抗体の医薬用途>

本発明の抗Me r T K抗体、その抗原結合フラグメント、又は本発明の融合体等、及びそれらを含有する医薬組成物は、アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ、及び／又はPt d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積を原因とする疾患の予防又は治療のために用いることが

できる。本明細書において「デブリ」とは、無傷の細胞とは区別される概念であり、細胞断片又は／及び生体構成物質等の生体内で不要となった物質を含む混合物をいう。本明細書において「細胞由来のデブリ」とは無傷の細胞が断片化した細胞断片、又は／及び生体構成物質等の生体内で不要となった物質を含む混合物をいう。本明細書において「P t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリ」とは、アポトーシス細胞、及びアポトーシス細胞由来のデブリ以外の、P t d S e rを含む細胞、組織又はデブリをいう。

[0097] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含む医薬組成物は、M e r T Kの活性化を介して貪食細胞を活性化することにより被貪食物を貪食させることができる。

[0098] 本明細書において、「貪食細胞」とは、貪食除去機能を持つ細胞を意味し、「貪食作用」とは、貪食細胞が被貪食物を取り込む作用を意味し、「貪食除去機能」とは、貪食作用から、その後取り込んだ被貪食物を消化し、分解するまでの機能を意味する。本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含む医薬組成物によって貪食作用又は／及び貪食除去機能が、亢進又は誘導される貪食細胞としては、例えば、マクロファージ、肺胞マクロファージ、樹状細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、上皮細胞、R P E細胞、気道上皮細胞、クッパー細胞、肝細胞、内皮細胞、好中球、単球、巨核球、星状細胞、ランゲルハンス細胞、サテライト細胞、アストロサイト、神経前駆細胞、ポドサイト、メサングウム細胞、C D 1 0 3 + 樹状細胞、C D 1 1 b + マクロファージ、C D 1 1 b + C D 1 0 3 + マクロファージ、腸上皮細胞及びセルトリ細胞等 (N a t . R e v . M o l . C e l l B i o l . , 2 0 2 0 , 2 3 : 3 9 8 - 4 1 4 ; C e l l s , 2 0 2 1 , 1 0 : 1 4 4 3) が挙げられる。なお、本明細書において、貪食作用や貪食除去機能の亢進又は誘導をまとめて貪食作用や貪食除去機能の「活性化」と称する場合もある。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは

本発明の融合体等、又はそれらを含有する医薬組成物によって活性化される貪食細胞は、上皮細胞（例えば、R P E細胞、気道上皮細胞、腸上皮細胞）である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含有する医薬組成物によって活性化される貪食細胞は、R P E細胞である。本明細書において「R P E細胞」とは網膜色素上皮（R e t i n a l p i g m e n t E p i t h e l i u m、R P E）を形成する細胞である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含有する医薬組成物によって活性化される貪食細胞は、マクロファージ又は組織常在性マクロファージ（例えば、肺胞マクロファージ、ミクログリア、クッパー細胞）である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含有する医薬組成物によって活性化される貪食細胞は、肺胞マクロファージである。

[0099] 本明細書において、「被貪食物」とは、貪食細胞による貪食対象を意味する。本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含有する医薬組成物は、貪食細胞の貪食除去機能を活性化することによって被貪食物の除去を亢進し得る。被貪食物としては、アポトーシス細胞、がん細胞、好中球、マスト細胞、筋線維芽細胞、脂肪細胞、それらの細胞に由来するデブリ、P O S及びミエリンデブリが含まれるがこれらに限られない。

[0100] 1つの実施形態において、被貪食物は、アポトーシス細胞である。1つの実施形態において、被貪食物は、アポトーシス細胞由来のデブリである。1つの実施形態において、被貪食物は、P t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリである。1つの実施形態において、被貪食物は、P O Sである。1つの実施形態において、被貪食物は、ミエリンデブリである。1つの実施形態において、被貪食物は、好中球である。1つの実施形態において、被貪食物は、好中球由来のデブリである。

- [0101] 本発明による予防又は治療の対象となる疾患には、アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ若しくはP t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積を原因とする疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患が含まれる。アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ若しくはP t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積由来の疾患、又は貪食除去機能低下由来の疾患は、特に限定されないが、例えば、種々の眼疾患、肺疾患、自己免疫疾患、神経障害疾患、線維化疾患、循環器疾患、及びがん等が挙げられる。
- [0102] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患は、眼疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる眼疾患は、網膜疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる網膜疾患は、網膜変性疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる網膜変性疾患は、網膜色素変性症、加齢黄斑変性及び／又は糖尿病性網膜症である。
- [0103] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患は肺疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる肺疾患は、急性肺疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる急性肺疾患は、急性呼吸促進症候群及び／又は急性肺障害である。
- [0104] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患は自己免疫疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデスである。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる自己免疫疾患は、多発性硬化症である。
- [0105] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患は、各種臓器移植時の拒絶反応である。
- [0106] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患は循環器疾患である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の

対象となる循環器疾患は、アテローム性動脈硬化症である。1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる循環器疾患は、虚血性疾患である。

[0107] 1つの実施形態において、本発明による予防又は治療の対象となる疾患はがんである。予防又は治療の対象となるがんは、特に限定されないが、例えば、種々のがん細胞の腹膜播種、胃がん、肺がん、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、ホジキンリンパ腫、ノンホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞リンパ腫等の血液がん、骨髄異形成症候群、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、中皮腫、皮膚がん、皮膚T細胞リンパ腫、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、頭頸部がん、子宮がん、子宮頸がん、肝臓がん、胆のうがん、胆管がん、腎臓がん、膵臓がん、結腸がん、大腸がん、直腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、精巣がん、卵巣がん、脳腫瘍等の固形がん、並びに骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんの他、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫や、膠芽腫、多形性膠芽腫、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。

[0108] <本発明の抗Me r T K抗体の診断用途>

本発明の抗Me r T K抗体、その抗原結合フラグメント若しくは本発明の融合体等、又はそれらを含有する診断用テストキット（以下、「本発明のテストキット」とも称する）は、Me r T Kの検出に使用することができる。本発明のテストキットは、必要によって、検出可能な標識、例えば指標酵素、放射性標識、蛍光色素分子或いは常磁性粒子を含んでもよい。本発明のテストキットは、情報提供用小冊子、例えば試薬を用いて本明細書に記載の方法を実施する手順を知らせる小冊子を含んでもよい。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K抗体は、体液（血液等）中の可溶型Me r T Kを検出することにより炎症状態を診断することができる。1つの実施形態にお

いて、本発明の複合体は、血液中の可溶型M e r T Kを検出・解析することにより炎症状態やM e r T Kの糖鎖修飾状態を診断することができる。

[0109] また、本発明には、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント、及び本発明の融合体等を用いた、診断、予防又は治療有効量を対象に投与する工程を包含する、アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ若しくはP t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患を、診断、予防又は治療する方法が含まれる。また、本発明には、アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ若しくはP t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患の、診断、予防又は治療に使用するための、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント、又は本発明の融合体等が含まれる。また、本発明には、アポトーシス細胞、アポトーシス細胞由来のデブリ若しくはP t d S e rを高発現する細胞、組織若しくはデブリの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患の、診断、予防又は治療用医薬組成物の製造における、本発明の抗M e r T K抗体、その抗原結合フラグメント又は本発明の融合体等の使用が含まれる。

[0110] <本発明の抗M e r T K二重特異性抗体>

本発明はまた、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを任意のM e r T K以外の抗原に対する抗体又はその抗原結合フラグメント（以下、合わせて「他の抗体」とも称する）に連結することにより、本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを含む二重特異性抗体（以下、「本発明の抗M e r T K二重特異性抗体」とも称する）を提供する。本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、本発明の抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域並びに他の抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。

[0111] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、以下に示す抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号1のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号2のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるC D R 3を含む

重鎖可変領域、並びに

配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域。

[0112] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、以下の(1)～(6)からなる群より選択される、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；又は

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0113] 本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、例えば、文献(m A b s, 2017, 9:182-212、F i g. 2)に記載の任意の構造であってよい。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は対称型

又は非対称型の構造を取ってもよい。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、抗体融合型（例えば、I g G₂型）、可変領域のみ型（例えば、D A R T型、D i a b o d y型）、C H 1 / C L融合蛋白質型（例えば、s c F v₂-C H 1 / C L型）、F a b融合蛋白質型（例えば、F a b-s c F v型）、非免疫グロブリン融合蛋白質型（例えば、s c F v₂-a l u b u m i n型）、F c領域修飾I g G型（例えば、I g G (k i h)型、C r o s s M a b (I g G-k i h)型、D u e t M a b型）、付加及びF c領域修飾I g G型（例えば、I g G (k i h)-s c F a b型、C r o s s M a b-F a b型）、修飾F c領域及びC H 3融合蛋白質型（例えば、s c F v-F c (k i h)型、F a b-s c F v-F c (k i h)型）、付加I g G s-重鎖融合型（例えば、I g G-H C-s c F v型）、付加I g G s-軽鎖融合型、付加I g G s-重鎖及び軽鎖融合型、F c領域融合型、C H 3融合型、I g E / I g M及びC H 2融合型、F (a b')₂融合型、C H 1 / C L融合蛋白質型、修飾I g G型、又は、非免疫グロブリン融合型である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は非対称の構造である。

[0114] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、I g G抗体である本発明の抗Me r T K抗体の重鎖又は軽鎖のN末端又はC末端にさらに他の抗体又はその抗原結合フラグメントが連結された構造であってよい。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、片腕抗体である本発明の抗Me r T K抗体の重鎖のN末端若しくは第二F cポリペプチドのN末端、F c領域のC末端、又は軽鎖のN末端若しくはC末端にさらに他の抗体又はその抗原結合フラグメントが連結された構造である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、片腕抗体である本発明の抗Me r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介してさらに他の抗体又はその抗原結合フラグメントが連結された構造である。

[0115] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体は、D u

e t M a b 型、C r o s s M a b 型 (I g G - k i h) 型、F a b - s c F v - F c (k i h) 型、I g G (k i h) - s c F a b 型、C r o s s M a b - F a b 型又は I g G - H C - s c F v 型であってよい。

[0116] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、F (a b ') ₂融合型、D i a b o d y 型、D A R T 型、及びF a b - s c F v 型であってよい。

[0117] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体に含まれる本発明の抗M e r T K抗体の抗原結合フラグメントは、s c F v、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b ') ₂フラグメント、V H H 抗体であってよい。

[0118] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体に含まれる他の抗体の抗原結合フラグメントは、s c F v、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b ') ₂フラグメント、V H H 抗体であってよい。

[0119] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、抗M e r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、抗M e r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一F c ポリペプチド及び第二F c ポリペプチドからなる1つのF c 領域を含む片腕抗体（以下、「片腕抗M e r T K抗体」とも称する）、並びに他の抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体、及び他の抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v 又はF a b 領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体の第二F c ポリペプチドのN末端に、ヒンジ領域を介して他の抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v 又はF a b 領域のC末端が連結された、二重特異性抗体である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特

異性抗体は、F a b－s c F v－F c (k i h) 型である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、C r o s s M a b (I g G－k i h) 型である。

[0120] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、下記(1)～(6)からなる群より選択される重鎖フラグメント及び軽鎖を含む片腕抗M e r T K抗体を含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0121] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は上記の構造に限られるものではなく、一価又は多価の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント及び一価又は多価のM e r T K以外の抗原に対する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む二重特異性抗体であってよい。また、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体に、さらに第三、第四の抗原に対する抗体を組み合わせることにより、三重特異性抗体又は四重特異性抗体等の多重特異性抗体を提供することができる。

[0122] 本発明の二重特異性抗体で用いられるリンカーの種類及び長さは特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能である。例えば、本発明の抗M e r T K抗体又はその他の抗体がs c F vである場合、当該抗体の重鎖可変

領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーの長さは、好ましくは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。ペプチドリンカーとして、例えば、グリシン-セリンリンカー（GSリンカー）や、グリシン-リジン-プロリン-グリシン-セリンリンカー（GKPGSリンカー）を使用することができる。このようなリンカーとしては、例えば、以下が挙げられる。

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly

Gly-Gly-Gly-Ser （配列番号46）

Ser-Gly-Gly-Gly （配列番号47）

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser （配列番号48）

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly （配列番号49）

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser （配列番号50）

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly （配列番号51）

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser （配列番号52）

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly （配列番号53）

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n （n=3の場合、配列番号54）

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n

Gly-Lys-Pro-Gly-Ser （配列番号55）

(Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n

上記のnは1以上の整数を示す。ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0123] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体が他の抗体のs c F vを含む場合、他の抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは配列番号48に記載のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、他の抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) nのアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、他の抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは配列番号54に記載のアミノ酸配列を有する。

[0124] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体がF c領域を含む場合、該二重特異性抗体におけるF c領域は、抗体依存性細胞傷害活性(A D C C)、抗体依存性細胞貪食活性(A D C P)や補体依存性傷害活性(C D C)を低下させる変異を含んでもよい。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、L 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異(L A L A変異)(ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である)を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、P 3 2 9 A変異又はP 3 3 1 G変異(ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である)を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、L 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異(L A L A変異)並びにP 3 3 1 G変異(ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である)を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、ノブズ・イントゥー・ホールズ(k n o b s i n t o h o l e s)変異を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、L A L A変異、P 3 3 1 G変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ変異を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体に含まれるノブズ・イントゥー・ホールズ変異は、F c領域を形成する1つのF cポリペプ

チドにおけるT366W変異、並びにFc領域を形成するもう1つのFcポリペプチドにおけるT366S、L368A及びY407V変異である（ここで、前記変異位置はヒトIg γ 1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）。本発明の抗MerTK二重特異性抗体に含まれるノブズ・イントゥー・ホールズ変異は、第一FcポリペプチドにT366W変異が、第二FcポリペプチドにT366S、L368A及びY407V変異が入っていても良く、第一FcポリペプチドにT366S、L368A及びY407V変異が、第二FcポリペプチドにT366W変異が入っていても良い。

[0125] 他の抗体又は抗原結合フラグメントとしては特に限定されないが、例えば、ミスフォールド蛋白質、アミロイド、ミエリンデブリ、A β 、免疫細胞（例えばT細胞）、免疫細胞に発現する受容体、若しくはがん細胞上の腫瘍関連抗原に対する抗体又は抗原結合フラグメントが挙げられる。

[0126] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、MerTK並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する二重特異性抗体（以下、「本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体」とも称する）である。本明細書において、「ミスフォールディング」又は「ミスフォールディングされた」とは生体内で正しくフォールディングされなかったことを意味する。また「ミスフォールド蛋白質（misfolded protein）」とはミスフォールディングされた、本来の機能を有していない蛋白質であり、「アミロイド」とは該ミスフォールド蛋白質が凝固したものである。

[0127] ミスフォールド蛋白質になることが知られている蛋白質としては、例えば、免疫グロブリン軽鎖（Immunoglobulin Light Chain、IgL）、IgH、SAA、TTR、 β 2ミクログロブリン、アポリポ蛋白質AⅠ、アポリポ蛋白質AⅡ、アポリポ蛋白質AⅣ、アポリポ蛋白質CⅠⅠ、アポリポ蛋白質CⅠⅡ、ゲルゾリン、リゾチーム、LECT2、フィブリノーゲン α 鎖、シスタチンC、ABri（前駆）蛋白質、A

Dan（前駆）蛋白質、A β 前駆蛋白質、 α シヌクレイン、タウ蛋白質、プリオン蛋白質、TMEM106B、（プロ）カルシトニン、アミリン、ANP、プロラクチン、（プロ）ソマトスタチン、グルカゴン、PTH、インスリン、エンフビルチド（Enfuvirtide）、GLP1、IL1RAP、肺サーファクタント蛋白質、コルネオデスモシン、MFG-E8、ケラトエピセリン、ラクトフェリン、OAAp、セメノゲリン1、カテプシンK、EFEMP1、ハンチンチン、ミエリン、TDP43及びSOD1等が知られている（Amyloid, 2022, 4:213-219; J. Neurosci., 2006, 26:328-332; Neurobiology of Disease, 2023, 184:106218）。1つの実施形態において、ミスフォールド蛋白質となる蛋白質はTTRである。1つの実施形態において、ミスフォールド蛋白質となる蛋白質はIgLである。

[0128] 本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、本発明の抗MerTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、以下に示す抗MerTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号1のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、並びに

配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域。

[0129] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、以下の（1）～（6）からなる群より選択される、抗MerTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

（1）配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる

重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；又は

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0130] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる1つのFc領域を含む片腕抗Me r T K抗体を含む。さらなる実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体に含まれる片腕抗Me r T K抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントがヒンジ領域を介して第一FcポリペプチドのN末端に連結された1つの重鎖を含む。さらなる実施形態において、該抗Me r

T K 抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントはヒンジ領域を介して該第一 F c ポリペプチドの N 末端に連結されている。1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一 F c ポリペプチド及び第二 F c ポリペプチドからなる 1 つの F c 領域を含む片腕抗 M e r T K 抗体を含み、該片腕抗 M e r T K 抗体が、該重鎖フラグメントがヒンジ領域を介して該第一 F c ポリペプチドの N 末端に連結された 1 つの重鎖を含む、二重特異性抗体である。1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一 F c ポリペプチド及び第二 F c ポリペプチドからなる 1 つの F c 領域を含む片腕抗 M e r T K 抗体を含み、該重鎖フラグメントがヒンジ領域を介して該第一 F c ポリペプチドの N 末端に連結されている、二重特異性抗体である。

[0131] 1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、下記 (1) ~ (6) からなる群より選択される重鎖フラグメント及び軽鎖を含む片腕抗 M e r T K 抗体を含む：

- (1) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (2) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (3) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (4) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (5) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに
- (6) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 2 1 7 までのアミノ酸配列からなる

重鎖フラグメント、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0132] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体、並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端に、さらにヒンジ領域を介してミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域が連結された二重特異性抗体である。

[0133] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、蛋白質のミスフォールド蛋白質、ミエリンデブリ若しくはA β 又はそのアミロイドに結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。ミスフォールド蛋白質、ミエリンデブリ若しくはA β 又はそのアミロイドを形成する蛋白質としては、例えば、I g L、I g H、S A A、T T R、 β 2ミクログロブリン、アポリポ蛋白質A I、アポリポ蛋白質A I I、アポリポ蛋白質A I V、アポリポ蛋白質C I I、アポリポ蛋白質C I I I、ゲルゾリン、リゾチーム、L E C T 2、フィブリノーゲン α 鎖、シスタチンC、A B r i（前駆）蛋白質、A D a n（前駆）蛋白質、A β 、A β 前駆蛋白質、 α シヌクレイン、タウ蛋白質、プリオン蛋白質、T M E M 1 0 6 B、（プロ）カルシトニン、アミリン、A N P、プロラクチン、（プロ）ソマトスタチン、グルカゴン、P T H、インスリン、エンフビルチド（E n f u v r i t i d e）、G L P 1、I L 1 R A P、肺サーファクタント蛋白質、コルネオデスモシン、M F G－E 8、ケラトエピセリン、ラクトフェリン、O A A P、セメノゲリン1、カテプシンK、E F E M P 1、ハンチンチン、ミエリンデブリ、T D P 4 3又はS O D 1等が挙げられる。

[0134] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体に用いられる他の抗体は、抗S A A抗体、抗アミリン抗体

、抗A β 抗体、抗ハンチンチン抗体、抗TTR抗体、若しくは抗IgL抗体、又はそれらの抗原結合フラグメントであってよい。1つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体に用いられる他の抗体は、ミスフォールドTTRに選択的に結合する抗TTR抗体又はミスフォールドIgLに選択的に結合する抗IgL抗体であってよい。

[0135] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメント及び抗TTR抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、MerTK及びミスフォールドTTRに対する結合活性を有する二重特異性抗体（本明細書において、「抗MerTK-抗TTR二重特異性抗体」と称する）である。1つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体は、本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメント及び抗IgL抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、MerTK及びミスフォールドIgLに対する結合活性を有する二重特異性抗体（本明細書において、「抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体」と称する）である。

[0136] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、T細胞受容体に対する抗体又は抗原結合フラグメントを含む。

[0137] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、MerTK及び腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗体又は抗原結合フラグメントを含む二重特異性抗体（以下、「本発明の抗MerTK-抗TAA二重特異性抗体」と称する）であってよい。

[0138] 本発明の抗MerTK-抗TAA二重特異性抗体に用いられる抗体又はその抗原結合フラグメントとしては、例えば、HER2、HER3、HER4、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD40、CD44、CD70、CD123、CD138、CXCR3、CXCR5、CCR3、CCR4、CCR9、CRTH2、PMCH、CD4、CD25、CD200、endoplasmic、BCMA、CD276、TSPAN8、

CLDN4、CLDN6、CLDN18. 2、ENPP3、SLC34A2、TROP2、Nectin-4、ASGR1、mesothelin、PSMA、LIV-1、MUC1、MUC2、MUC4、MUC16、CDH6、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM16、CEACAM18、CEACAM19、CEACAM20、CEACAM21、URLC10、NY-ESO-1、GAA、OFA、cyclinB1、WT-1、CEF、VEGRR1、VEGFR2、TTK、HPV16、HPV16E7、HPV18、CEA1MA910、KOC1、SL-701、MART-1、gp100、tyrosinase、survivin、MAGE-3. 1、MAGE-10. A2、OVA BiP、gp209-2M、melan-A、NA17. A2、KOC1、CO16、DEPDC1、MPHOSH1、MAGE12、ONT-10、GD2L、GD3L、URLC10、CDCA1、TF、PSA、TERT、STF-11、G17DT、ICT-107、Dex2、hTERT、PAP、TRP2、LRRC15、c-Met、PD-L1、FAP、EGFR、B3-H3、GPC3、5T4が挙げられる。

[0139] 本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、ADCC、CDC、ADCPを低下させる変異及び／又はヘテロ二量体の形成を促進する変異を含んでもよい。当該変異は前述の＜本発明の抗MerTK抗体＞の記載に準ずる。

[0140] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、翻訳後修飾されていてもよい。当該翻訳後修飾は前述の＜本発明の抗MerTK抗体＞の記載に準ずる。1つの実施形態において、翻訳後修飾はN-結合型又はO-結合型糖鎖の付加、N末端又はC末端のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、及び／又はメチオニンの酸化である。

[0141] 本発明の抗MerTK二重特異性抗体は、本明細書に開示される、本発明の抗MerTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列情報等、並びに公知の他の抗体又は抗原結合フラグメントの配列情報等に基づいて、当該分

野で公知の方法を使用して、当業者であれば作製し得る。

[0142] <本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の融合体及び複合体、並びに本発明の抗M e r T K二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞>

本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、M e r T K及び他の抗体が結合する抗原以外の蛋白質（ポリペプチドを含む）、並びに抗M e r T K抗体及び他の抗体以外の抗体（抗原結合フラグメントを含む）と連結した、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の融合体を提供する。また本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、修飾剤と結合した本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の複合体を提供する。さらに本発明の抗M e r T K二重特異性抗体は、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体を細胞（例えば免疫担当細胞又はエフェクター細胞）の表面に提示させた細胞（例えばT a n d e m C A R）（本明細書において、「本発明の抗M e r T K二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞」と称する）を提供する（O n c o l o g y R e p o r t s , 2 0 1 9 , 4 2 : 2 1 8 3 - 2 1 9 5）。当該融合体、当該複合体及び当該細胞表面に提示させた細胞は、前述の<本発明の融合体、本発明の複合体、及び本発明の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞>の記載に準ずる。

[0143] <本発明の抗M e r T K二重特異性抗体のポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換された宿主細胞、生産する方法>

本発明はまた、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の生産に用いるポリヌクレオチドを提供する。当該ポリヌクレオチドは、当業者であれば、前述の<本発明のポリヌクレオチド>、後述の<本発明の抗M e r T K-抗T T R二重特異性抗体のポリヌクレオチド>の記載に準じて実施し得る。

[0144] 本発明はまた、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体のポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の生産方法を提供する。これらは、当業者であれば、前述の<本発明の発現ベクター>及び<本発明の抗M e r T K抗体を生産する方法>に準じて実施し得る。

[0145] 本発明はまた、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の形質転換された宿

主細胞を提供する。当該宿主細胞は、当業者であれば、前述＜本発明の形質転換された宿主細胞＞及び後述の＜本発明のM e r T K－抗T T R二重特異性抗体の形質転換された宿主細胞＞に準じて実施し得る。

[0146] ＜本発明の抗M e r T K二重特異性抗体の医薬用途＞

本発明はまた、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。当該医薬組成物は、当業者であれば、前述の＜本発明の医薬組成物＞の記載に準じて実施し得る。

[0147] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物は、ミスフォールド蛋白質の蓄積を原因とする疾患の予防又は治療のために用いることができる。

[0148] 本発明の抗M e r T K抗二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物は、貪食細胞及び被貪食物に結合し、貪食細胞と被貪食物の物理的距離を近づけ、M e r T Kの活性化を介して貪食細胞を活性化することにより、効率的に貪食細胞に被貪食物を取り込ませて、被貪食物を消化させることができる。

[0149] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体によって活性化される貪食細胞は、前述の＜本発明の抗M e r T K抗体の医薬用途＞の記載に準じる。本発明の抗M e r T K二重特異性抗体による貪食細胞の貪食除去機能の活性化によって除去が亢進される被貪食物としては、ミスフォールド蛋白質、アミロイド及び／又はがん細胞が挙げられる。1つの実施形態において、被貪食物は、ミスフォールド蛋白質である。1つの実施形態において、被貪食物は、アミロイドである。1つの実施形態において、被貪食物はミスフォールディングされたT T R（以下、「ミスフォールドT T R」（m i s f o l d e d T T R）と称する）である。1つの実施形態において、被貪食物はミスフォールディングされたI g L（以下、「ミスフォールドI g L」（m i s f o l d e d I g L）と称する）である。1つの実施形態において、被貪食物はミエリンデブリである。1つの実施形態において、被貪食物はA β である。

[0150] 本発明の抗M e r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物は

、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患、アミロイドの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患の、予防又は治療のために用いることができる。また、本発明には、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体の治療有効量を対象に投与する工程を包含する、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患、アミロイドの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患を、予防又は治療する方法が含まれる。また、本発明には、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患、アミロイドの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患の、予防又は治療に使用するための、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体が含まれる。また、本発明には、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患、アミロイドの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患の、予防又は治療用医薬組成物の製造における、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体の使用が含まれる。本発明による予防又は治療の対象となる、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患、アミロイドの蓄積由来の疾患又は貪食除去機能低下由来の疾患は、特に限定されないが、例えば、種々のアミロイドーシス、心疾患、神経障害疾患、眼疾患又は内分泌・代謝疾患等が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体及びそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、アミロイドーシス、心疾患、神経障害疾患、眼疾患又は内分泌・代謝疾患である。

[0151] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、アミロイドーシス（例えば、限局性アミロイドーシス又は全身性アミロイドーシス）である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となるアミロイドーシスは、限局性アミロイドーシスである。本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる限局性アミロイドーシスは、アルツハイマー病、脳アミロイドアンギオパチー、クロイツフェルト・ヤコブ病、遺伝性脳アミロイドアンギオパチー、家族性英国型認知症、家族性デンマーク型認知症、限局性心房アミロイド

ーシス、プロラクチン産生腫瘍、インスリンアミロイドーシス、角膜アミロイドーシス、大動脈中膜アミロイドーシス、又は限局性結節性アミロイドーシスである（Circ. J., 2020, 84:1610-1671）。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となるアミロイドーシスは、全身性アミロイドーシス（例えば、トランスサイレチン型心アミロイドーシス（A T T R - C M）又は多発性神経障害アミロイドーシス（A T T R - P N）、A Lアミロイドーシス、A Hアミロイドーシス、A β 2 Mアミロイドーシス（透析関連アミロイドーシス）、A Aアミロイドーシス、A A p o A Iアミロイドーシス、A A p o A I Iアミロイドーシス、A A p o A I Vアミロイドーシス、A A p o C I Iアミロイドーシス、A A p o C I I Iアミロイドーシス、A G e Iアミロイドーシス、A L y sアミロイドーシス、A L E C T 2アミロイドーシス、A F i bアミロイドーシス、A C y sアミロイドーシス、A B r iアミロイドーシス、A P r Pアミロイドーシス、A C a lアミロイドーシス）である（Heart Int., 2023, 17:27-35; Amyloid, 2022, 4:213-219; Lancet, 2016, 387:2641-2654）。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる全身性アミロイドーシスは、A T T R - C M及びA T T R - P Nである。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる全身性アミロイドーシスは、A Lアミロイドーシスである。

[0152] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、神経障害疾患である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる神経障害疾患は、多発性硬化症又は／及びアルツハイマー病である。

[0153] 本発明の抗Me r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物は

、がんの予防又は治療のためにも用いることができ、前述の＜本発明の医薬用途＞の記載に準じて当業者であれば実施し得る。また、本発明の抗M e r T K二重特異性抗体又は該抗体を含有する医薬組成物の、予防又は治療の対象となるがんは、前述の＜本発明の医薬用途＞の記載のがんが挙げられる。

[0154] ＜本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体＞

本発明は、M e r T KとミスフォールドT T Rに結合する抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体を提供する。

[0155] 本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域並びにミスフォールドT T Rに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、以下に示す抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号1のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号2のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるC D R 3を含む重鎖可変領域、並びに

配列番号4のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号5のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるC D R 3を含む軽鎖可変領域。

[0156] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、以下の(1)～(6)からなる群より選択される、抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる

重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；又は

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0157] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、以下の(4)～(6)からなる群より選択される、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；又は

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0158] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる1つのFc領域を含む片腕抗Me r T K抗体を含む。

[0159] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗

体は、下記（１）～（６）からなる群より選択される重鎖フラグメント及び軽鎖を含む片腕抗M e r T K抗体を含む：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１０のアミノ酸配列からなる軽鎖；

（２）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１２のアミノ酸配列からなる軽鎖；

（３）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１４のアミノ酸配列からなる軽鎖；

（４）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１６のアミノ酸配列からなる軽鎖；

（５）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１８のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

（６）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号２０のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0160] １つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、下記（４）～（６）からなる群より選択される重鎖フラグメント及び軽鎖を含む片腕抗M e r T K抗体を含む：

（４）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１６のアミノ酸配列からなる軽鎖；

（５）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号１８のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

（６）配列番号８のアミノ酸番号１から２１７までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号２０のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0161] １つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体、並びにミスフォールドT T Rに結合する抗T T R抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域を含む。１つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端にヒンジ

領域を介してミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む s c F v 又は F a b 領域が連結された、二重特異性抗体である。

[0162] 本発明の抗 M e r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体は、ミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。当該抗 T T R 抗体は、ミスフォールド T T R に結合する抗体であれば特に限定されるものではないが、例えば、371M 抗体（国際公開第 2015/115332 号）を使用することができる。

[0163] 1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体は、以下に示すミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号 27 のアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 28 のアミノ酸配列からなる C D R 2、及び配列番号 29 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域；並びに

配列番号 30 のアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 31 のアミノ酸配列からなる C D R 2、及び配列番号 32 のアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域。

[0164] 1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体は、以下のミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号 43 のアミノ酸番号 1 から 119 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号 43 のアミノ酸番号 135 から 245 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0165] 1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体は、ミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の抗原結合フラグメントを含む。1 つの実施形態において、本発明の抗 M e r T K - 抗 T T R 二重特異性抗体に含まれる、ミスフォールド T T R に結合する抗 T T R 抗体の抗

原結合フラグメントはs c F v、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、F (a b')₂フラグメント、V H H抗体であってよい。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、ミスフォールドT T Rに結合する抗T T R抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v（本明細書において、「抗T T R－s c F v」と称する）を含む。

[0166] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、配列番号43のアミノ酸配列からなる抗T T R－s c F vを含む。

[0167] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、F a b－s c F v－F c (k i h)型である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端に、さらにヒンジ領域を介して抗T T R－s c F vのC末端が連結された、二重特異性抗体である。

[0168] 1つの実施形態において、抗T T R－s c F vにおいて、抗T T R抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは配列番号48のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、抗T T R抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは(G l y－G l y－G l y－G l y－S e r)_nのアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、抗T T R抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するペプチドリンカーは配列番号54のアミノ酸配列を有する。

[0169] 本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体がF c領域を含む場合、該二重特異性抗体におけるF c領域は、抗体依存性細胞傷害活性(A D C C)、抗体依存性細胞貪食活性(A D C P)や補体依存性傷害活性(C D C)を低下させる変異を含んでもよい。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、L 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異(L A L A変異)（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体は、P 3 3 1 G変異又はP 3 2 9 A変異（ここで、前記変異位置はヒトI

g γ 1 定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である)を含むFc領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、L A L A変異、P 3 3 1 G変異及びP 3 2 9 A変異のうちの1つ以上の変異を含むFc領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、L A L A変異並びにP 3 3 1 G変異を含むFc領域を含む。

[0170] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、第一Fcポリペプチド及び第二FcポリペプチドからなるFc領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、配列番号39のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列又は配列番号39のアミノ酸配列において1~10個の置換を有するアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドを含む。

[0171] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、ノブズ・イントゥー・ホールズ変異を含むFc領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体は、L A L A変異、P 3 3 1 G変異、P 3 2 9 A変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ変異のうちの1つ以上の変異を含むFc領域を含む。

[0172] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体に含まれるノブズ・イントゥー・ホールズ変異は、Fc領域を形成する1つのFcポリペプチドにおけるT 3 6 6 W変異、並びにFc領域を形成するもう1つのFcポリペプチドにおけるT 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V変異である(ここで、前記変異位置はヒトIg γ 1 定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である)。

[0173] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K-抗T T R二重特異性抗体のFc領域に含まれる第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドは、下記(1)又は(2)から選択されるポリペプチドを含む：

(1) 配列番号40のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配

列番号41のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド；又は

(2) 配列番号41のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号40のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド。

[0174] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、ヒンジ領域を含んでもよい。ヒンジ領域は、当業者によって一般的に使用されうる配列であれば特に限定されない。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、配列番号42に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域及び／又は配列番号70のアミノ酸配列からなるヒンジ領域を含む。

[0175] 当業者であれば、上述の＜本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体＞に記載の抗Me r T K抗体、抗T T R－s c F v、ヒンジ領域、Fc領域等の配列を組み合わせることにより、容易に完全長のF a b－s c F v－Fc (k i h) 型抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体を作製し得る。

[0176] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、翻訳後修飾されていてもよい。当該翻訳後修飾は前述の＜本発明の抗Me r T K二重特異性抗体＞の記載に準ずる。

[0177] ＜本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の融合体及び複合体、並びに本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞＞

本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、Me r T K及びミスフォールドT T R以外の蛋白質（ポリペプチドを含む）、並びに抗Me r T K抗体及び抗T T R抗体以外の抗体（抗原結合フラグメントを含む）と連結した、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の融合体を提供する。また本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、修飾剤と結合した本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の複合体を提供する。さらに本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体は、発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体を細胞（例えば免疫担当細胞又はエフェクター細胞）の表面に提示させた細胞（例えばT a n d e m C A R）（本明細書

において、「本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞」と称する）を提供する（O n c o l o g y R e p o r t s , 2 0 1 9 , 4 2 : 2 1 8 3－2 1 9 5）。当該融合体、当該複合体及び当該細胞表面に提示させた細胞は、前述の＜本発明の融合体、本発明の複合体、及び本発明の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞＞の記載に準じて実施し得る。

[0178] ＜本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体のポリヌクレオチド＞

本発明はまた、抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の生産に用いるポリヌクレオチドを提供する。当業者であれば、前述の＜本発明のポリヌクレオチド＞及び＜本発明の抗Me r T K二重特異性抗体のポリヌクレオチド＞の記載に準じて実施し得る。

[0179] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の生産に用いるポリヌクレオチドは、以下の（１）～（９）からなる群より選択されるポリヌクレオチドである：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（２）配列番号１０のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（３）配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（４）配列番号１４のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（５）配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレ

オチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(9) 配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0180] 本項に記載のポリヌクレオチドは、当業者であれば、その塩基配列に基づき、当該分野で公知の方法を使用して作製し得る。

[0181] <本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の発現ベクター、生産する方法>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の生産に用いる発現ベクター及び生産方法を提供する。当該ベクター及び当該方法は、当業者であれば、前述の<本発明のポリヌクレオチド>、<本発明の発現ベクター>、<本発明の抗Me r T K抗体を生産する方法>、及び<本発明の抗Me r T K二重特異性抗体のポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換された宿主細胞、生産する方法>の記載に準じて実施し得る。

[0182] <本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の形質転換された宿主細胞>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の形質転換された宿主細胞（以降、「本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の宿主細胞」と称する）を提供する。本発明の抗Me r T K－抗T T R二

重特異性抗体の宿主細胞内に含まれるポリヌクレオチド以外は、当業者であれば、前述の＜本発明の形質転換された宿主細胞＞の記載に準じて実施し得る。

[0183] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体の宿主細胞は、以下の（１）～（３）からなる群より選択されるポリヌクレオチド含む：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号４３のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号４３のアミノ酸番号１３５から２４５までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（２）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号１８のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号４３のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号４３のアミノ酸番号１３５から２４５までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

（３）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号２０のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

ド、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗TTR抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗TTR抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0184] <本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の医薬用途>

本発明はまた、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物（以下「本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物」と称する）を提供する。当該医薬組成物は、前述の<本発明の抗Me r T K二重特異性抗体の医薬用途>の記載に準じて実施し得る。

[0185] 本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物はミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療のために用いることができる。

[0186] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、神経障害疾患、心疾患、眼疾患又は内分泌・代謝性疾患である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、アミロイドーシス（例えば、限局性アミロイドーシス又は全身性アミロイドーシス）である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となるアミロイドーシスは、全身性アミロイドーシスである。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる全身性アミロイドーシスは、A T T R－C M及びA T T R－P Nである。

[0187] <本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体>

本発明は、Me r T KとミスフォールドI g Lに結合する抗Me r T K－

抗IgL二重特異性抗体を提供する。

- [0188] IgLは、210個のアミノ酸からなる分子量25kDaの蛋白質である。骨髓の中にある白血球の一種からできた形質細胞から産生される。通常、形質細胞から同様に産生された免疫グロブリン重鎖（IgH）とヘテロダイマーを形成し、獲得免疫系の体液性免疫を担っている。しかしながら、異常形質細胞によってミスフォールドIgLを過剰に産生することにより、IgL由来のアミロイドが心臓、腎臓、消化管、神経など多臓器への沈着を引き起こす（Drugs, 2023, 83:203-216）。ミスフォールドIgLは全身性アミロイドーシスの一種であるALアミロイドーシスの原因となる蛋白質である。ミスフォールドIgLに対する抗体が当該ミスフォールドIgLの沈着を阻害し、機能改善する可能性が示唆されている（Br. J. Haematol., 2020, 189:228-238）が、当該抗体もモノクローナル抗TTR IgG1抗体と同様にFc領域を介して貪食細胞の貪食作用を活性化することから、サイトカイン放出症候群の発症を惹起する可能性がある。

- [0189] 本発明の抗Me rTKー抗IgL二重特異性抗体は、抗Me rTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域並びにミスフォールドIgLに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。本発明の抗Me rTKー抗IgL二重特異性抗体は、以下に示す抗Me rTK抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号1のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、並びに

配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域。

- [0190] 1つの実施形態において、本発明の抗Me rTKー抗IgL二重特異性抗体は、以下の（1）～（6）からなる群より選択される、抗Me rTK抗体

の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；又は

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0191] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一F cポリペプチド及び第二F cポリペプチドからなる1つのF c領域を含む片腕抗Me r T K抗体を含む。

[0192] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、下記(1)～(6)からなる群より選択される重鎖フラグメント及び

軽鎖を含む片腕抗Me r T K抗体を含む：

- (1) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (2) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (3) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (4) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖；
- (5) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに
- (6) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[0193] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、片腕抗Me r T K抗体、並びにミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、片腕抗Me r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介してミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域が連結された、二重特異性抗体である。

[0194] 本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、ミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。当該抗I g L抗体は、ミスフォールドI g Lに結合する抗体であれば特に限定されるものではないが、例えば、2 A 4抗体（特許第5 7 3 0 0 2 0号）を使用することができる。

[0195] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、以下に示すミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変

領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号57のアミノ酸番号26から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号57のアミノ酸番号50から68までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号57のアミノ酸番号101から108までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域；並びに

配列番号59のアミノ酸番号24から39までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号59のアミノ酸番号55から61までのアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号59のアミノ酸番号94から103までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域。

[0196] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、以下のミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：

配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び

配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[0197] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、ミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の抗原結合フラグメントを含む。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体に含まれる、ミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の抗原結合フラグメントは、s c F v、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、F (a b')₂フラグメント、V H H抗体であってよい。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、ミスフォールドI g Lに結合する抗I g L抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むF a bフラグメント（本明細書において、「抗I g L－F a b」と称する）を含む。

[0198] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体は、C r o s s M a b (I g G－k i h) 型である。1つの実施形態にお

いて、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、片腕抗M e r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端に、さらにヒンジ領域を介して抗I g L－F a bのC末端が連結された、二重特異性抗体である。

[0199] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、配列番号57のアミノ酸番号1から226までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と軽鎖定常領域からなるフラグメント及び配列番号59からなる軽鎖可変領域とC H 1ドメインからなるフラグメントを含む抗I g L－F a bを含む。

[0200] 本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体がF c領域を含む場合、該二重特異性抗体におけるF c領域は、A D C C、C D C、A D C Pを低下させる変異及び／又はヘテロ二量体の形成を促進する変異を含んでいてもよい。当該変異は前述の＜本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体＞の記載に準ずる。

[0201] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、第一F cポリペプチド及び第二F cポリペプチドからなるF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、配列番号39のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列又は配列番号39のアミノ酸配列において1～10個の置換を有するアミノ酸配列からなる第一F cポリペプチド及び第二F cポリペプチドを含む。

[0202] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、ノブズ・イントゥー・ホールズ変異を含むF c領域を含む。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体は、L A L A変異、P 3 3 1 G変異、P 3 2 9 A変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ変異のうちの1つ以上の変異を含むF c領域を含む。当該ノブズ・イントゥー・ホールズ変異は前述の＜本発明の抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体＞の記載に準ずる。

[0203] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗

体のFc領域に含まれる第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドは、下記（１）又は（２）から選択されるポリペプチドを含む：

（１）配列番号４０のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号４１のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド；又は

（２）配列番号４１のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号４０のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド。

[0204] １つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、ヒンジ領域を含んでもよい。１つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、配列番号４２のアミノ酸配列からなるヒンジ領域を含む。

[0205] 当業者であれば、上述の＜本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体＞に記載の抗MerTK抗体、抗IgL-Fab、ヒンジ領域、Fc領域等の配列を組み合わせることにより、容易に完全長の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体（例えば、CrossMab（IgG-kih）型抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体）を作製し得る。

[0206] １つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、翻訳後修飾されていてもよい。当該翻訳後修飾は前述の＜本発明の抗MerTK二重特異性抗体＞の記載に準ずる。

[0207] ＜本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体の融合体及び複合体、並びに本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞＞

本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、MerTK及びミスフォールドIgL以外の蛋白質（ポリペプチドを含む）、並びに抗MerTK抗体及び抗IgL抗体以外の抗体（抗原結合フラグメントを含む）と連結した、本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体の融合体を提供する。また本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、修飾剤と結合した本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体の複合体を提供する。さらに本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体は、発明の抗MerTK

K-抗IgL二重特異性抗体を細胞（例えば免疫担当細胞又はエフェクター細胞）の表面に提示させた細胞（例えばTandem CAR）（本明細書において、「本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞」と称する）を提供する（Oncology Reports, 2019, 42:2183-2195）。当該融合体、当該複合体及び当該細胞表面に提示させた細胞は、前述の＜本発明の融合体、本発明の複合体、及び本発明の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞＞の記載に準じて実施し得る。

[0208] ＜本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体のポリヌクレオチド＞

本発明はまた、抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体の生産に用いるポリヌクレオチドを提供する。当業者であれば、前述の＜本発明のポリヌクレオチド＞及び＜本発明の抗MerTK二重特異性抗体のポリヌクレオチド＞の記載に準じて実施し得る。

[0209] 1つの実施形態において、本発明の抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体の生産に用いるポリヌクレオチドは、以下の（１）～（９）からなる群より選択されるポリヌクレオチドである：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗MerTK抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（２）配列番号１０のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗MerTK抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（３）配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗MerTK抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（４）配列番号１４のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗MerTK抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(9) 配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0210] 本項に記載のポリヌクレオチドは、当業者であれば、その塩基配列に基づき、当該分野で公知の方法を使用して作製し得る。

[0211] <本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の発現ベクター、生産する方法>

本発明はまた、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の生産に用いる発現ベクター及び生産方法を提供する。当該ベクター及び当該方法は、当業者であれば、前述の<本発明のポリヌクレオチド>、<本発明の発現ベクター>、<本発明の抗M e r T K抗体を生産する方法>、及び<本発明の抗M e r T K二重特異性抗体のポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換された宿主細胞、生産する方法>の記載に準じて実施し得る。

[0212] <本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の形質転換された宿主細胞>

本発明はまた、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の形質転

換された宿主細胞（以降、「本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の宿主細胞」と称する）を提供する。本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の宿主細胞内に含まれるポリヌクレオチド以外は、当業者であれば、前述の＜本発明の形質転換された宿主細胞＞の記載に準じて実施し得る。

[0213] 1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体の宿主細胞は、以下の（１）～（４）からなる群より選択されるポリヌクレオチド含む：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号５７のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号５９のアミノ酸番号１から１１２までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（２）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号５７のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号５９のアミノ酸番号１から１１２までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（３）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９のアミノ酸配列からなる抗M e r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

（4）配列番号8のアミノ酸番号1から119のアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号57のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号59のアミノ酸番号1から112までのアミノ酸配列からなる抗I g L抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0214] ＜本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体の医薬用途＞

本発明はまた、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物（以下「本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物」と称する）を提供する。当該医薬組成物は、前述の＜本発明の抗Me r T K二重特異性抗体の医薬用途＞の記載に準じて実施し得る。

[0215] 本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物はミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療のために用いることができる。

[0216] 1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、腎疾患である。1つの実施形態において、本発明の抗Me r T K－抗I

g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる疾患は、アミロイドーシス（例えば、限局性アミロイドーシス又は全身性アミロイドーシス）である。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となるアミロイドーシスは、全身性アミロイドーシスである。1つの実施形態において、本発明の抗M e r T K－抗I g L二重特異性抗体又はそれらを含有する医薬組成物による、予防又は治療の対象となる全身性アミロイドーシスは、A Lアミロイドーシスである。

[0217] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0218] [実施例1：抗M e r T K抗体の作製]

[実施例1－1：抗M e r T K抗体の取得]

(1) M e r T K－F c融合蛋白質及びM e r T K－H i s蛋白質の作製

ヒトM e r T K細胞外領域（U n i P r o t：Q 1 2 8 6 6のアミノ酸番号21から505までのアミノ酸配列からなる）をコードするポリヌクレオチド又はマウスM e r T K細胞外領域（U n i P r o t：Q 6 0 8 0 5のアミノ酸番号19から497までのアミノ酸配列からなる）をコードするポリヌクレオチドにF a c t o r X a P r o t e a s e（N e w E n g l a n d B i o l a b s社、P 8 0 1 0 L）によって切断されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを連結したポリヌクレオチドをそれぞれp F U S E－h i g G 1－F c 1ベクター（I n v i v o G e n社、p f u s e－h g 1 f c 1）に挿入し、ヒトM e r T KにヒトF cを融合させた蛋白質（以下、「ヒトM e r T K－ヒトF c融合蛋白質」と称する）及びマウスM e r T KにヒトF cを融合させた蛋白質（以下、「マウスM e r T K－ヒトF c融合蛋白質」と称する）をそれぞれコードする発現用ベクターを作製した。さらに前述のヒトM e r T K細胞外領域をコードするポリヌクレオチ

ドを、Hisタグをコードするポリヌクレオチド（配列番号21）にタンデムに連結し、pcDNA3.4 TOPO（登録商標）ベクター（Thermo Fisher scientific社）に挿入して、ヒトMerTKにHisタグを結合させた蛋白質（以下、「ヒトMerTK-His蛋白質」と称する）をコードする発現用ベクターを作製した。作製した発現ベクターをExpiCHO-S細胞（Thermo Fisher Scientific社、A29127）にそれぞれトランスフェクションし、常法に従いリコンビナント蛋白質を取得した。

[0219] （2）完全ヒト型抗MerTKアゴニスト抗体の取得

AlivaMabマウス（Ablexis社、米国特許9346873号）に、Human MerTK/Mer Protein, His Tag（ACROBiosystems社、MEK-H52H6）及びマウスMerTK-ヒトFc融合蛋白質をFactor Xa Proteaseにより切断及び精製したマウスMerTK蛋白質を数回投与して免疫を行った。常法に従い、免疫したマウスのリンパ節からリンパ球を回収した。論文（BMC Biol., 2012, 10:80）の記載に基づき、マウスから回収したリンパ球の中から、蛍光標識されたヒトMerTK-His蛋白質及びマウスMerTK-ヒトFc融合蛋白質に結合するB細胞をセルソーター（Becton Dickinson社、FACSMelody）でソートした。常法に従い、ソートされたB細胞から抽出した抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする核酸をクローニングした。その配列情報から、常法に従い抗体のモノクローナル抗体を作製した。作製した抗体をヒト及びマウスMerTKリコンビナント蛋白質への結合活性、マウス骨髓由来マクロファージ細胞膜上MerTKに対する結合活性、細胞内へのMerTK内在化誘導能及びMerTKの下流シグナルであるAKTリン酸化誘導活性を指標に評価した。その結果、ヒト及びマウスMerTKリコンビナント蛋白質に対する結合活性、マウス骨髓由来マクロファージ細胞膜上MerTKに対する結合活性、細胞内へのMerTK内在化誘導能及びAKTリン酸化

誘導活性を有する完全ヒト型抗M e r T K アゴニスト抗体を取得した。当該抗M e r T K アゴニスト抗体の重鎖可変領域の配列は配列番号8のアミノ酸番号1から119に、軽鎖可変領域の配列を配列番号16のアミノ酸番号1から110と一致する。

[0220] (3) F c 変異を導入した完全ヒト型抗M e r T K 抗体の作製及び取得

(2) で取得した完全ヒト型抗M e r T K アゴニスト抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列に基づき、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を設計した。具体的には、軽鎖可変領域のC末側にヒトλ鎖の定常領域のアミノ酸配列を連結したポリペプチドを設計し、重鎖可変領域のC末側にヒトI g γ 1 の定常領域のアミノ酸配列を連結したポリペプチドを設計した。さらに、重鎖定常領域にL 2 3 4 A、L 2 3 5 A及びP 3 3 1 Gのアミノ酸変異を導入した。これにより、配列番号8の重鎖及び配列番号10の軽鎖からなる完全ヒト型抗M e r T K 抗体であるt A 3 - 2 0を設計した。

[0221] 一般的に抗体可変領域におけるN-結合型糖鎖修飾は、抗体を製造する際に品質不安定の要因となる可能性がある。そのためt A 3 - 2 0の軽鎖可変領域のフレームワーク上に起こり得る糖鎖修飾を回避する目的でt A 3 - 2 0のアミノ酸配列に変異を導入した。具体的には、t A 3 - 2 0について配列番号10の18番目のフレームワーク上のアミノ酸であるアスパラギンをトレオニンに置換した軽鎖（配列番号12）及び配列番号10の18番目のアミノ酸のアスパラギンをセリンに置換した軽鎖（配列番号14）を設計した。さらに、配列番号10、配列番号12及び配列番号14の軽鎖のN末端にアスパラギンを付加した、配列番号16、配列番号18及び配列番号20の軽鎖を設計した。このようにして、配列番号8の重鎖、及び配列番号12、14、16、18又は20の軽鎖からなるヒト抗M e r T K 抗体を設計した。配列番号8の重鎖及び配列番号12、14、16、18又は20の軽鎖からなる完全ヒト型抗M e r T K 抗体を、それぞれt A 3 - 2 0. 1、t A 3 - 2 0. 2、t A 3 - 2 0. 3、t A 3 - 2 0. 4又はt A 3 - 2 0. 5と称する。完全ヒト型抗M e r T K 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の

アミノ酸配列の情報を表 1 に示す。

[0222] [表1]

完全ヒト型抗Me r TK抗体	重鎖可変領域のアミノ酸配列	軽鎖可変領域のアミノ酸配列
t A 3-2 0	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 1 0 のアミノ酸番号 1 から 1 0 9
t A 3-2 0. 1	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 1 2 のアミノ酸番号 1 から 1 0 9
t A 3-2 0. 2	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 1 4 のアミノ酸番号 1 から 1 0 9
t A 3-2 0. 3	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 1 6 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0
t A 3-2 0. 4	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 1 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0
t A 3-2 0. 5	配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9	配列番号 2 0 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0

[0223] 配列番号 8 の C D R 1 ～ 3 のアミノ酸配列を配列番号 1 ～ 3、配列番号 1 0、1 2、1 4、1 6、1 8 及び 2 0 の C D R 1 ～ 3 のアミノ酸配列を配列番号 4 ～ 6 にそれぞれ示す。

[0224] 特許文献 4 の配列番号 5 の重鎖可変領域及び配列番号 3 4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に基づき、(3)と同様にマウスーヒトキメラ抗Me r TK抗体(以下、「MTK 2 0 1」と称する)を設計した。国際公開第 2 0 1 6 / 1 0 6 2 2 1 号の配列番号 4 9 の重鎖可変領域及び配列番号 5 0 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に基づき、(3)と同様にマウスーヒトキメラ抗Me r TK抗体(以下、「M6」と称する)を設計した。

[0225] t A 3-2 0、t A 3-2 0. 1、t A 3-2 0. 2、t A 3-2 0. 3、t A 3-2 0. 4、t A 3-2 0. 5、MTK 2 0 1 及び M6 の重鎖又は軽鎖をコードするポリヌクレオチドを作製し、それぞれのポリヌクレオチドを常法に従い p c D N A 3. 4 T O P O ベクターに挿入して t A 3-2 0、t A 3-2 0. 1、t A 3-2 0. 2、t A 3-2 0. 3、t A 3-2 0. 4、t A 3-2 0. 5、MTK 2 0 1 又は M6 の重鎖の発現ベクター及び軽鎖の発現ベクターを作製した。t A 3-2 0、t A 3-2 0. 1、t A 3-2 0. 2、t A 3-2 0. 3、t A 3-2 0. 4、t A 3-2 0. 5、MTK 2 0 1 及び M6 それぞれの抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレ

オチド配列の組み合わせを表2に示す。トランスフェクションキット（ExpiFectamine CHO Transfection Kit、Thermo Fisher Scientific社、A29129）を用いて、等量の重鎖及び軽鎖の発現ベクターをExpiCHO-S細胞に導入し、37℃、5% CO₂インキュベーターにて培養を開始した。翌日、キットに同封されている試薬（ExpiCHO Enhancer及びExpiCHO Feed）をプロトコルに従い添加し、培養することで抗体を培養上清中に分泌させた。

[0226] [表2]

完全ヒト型抗MerTK抗体	重鎖をコードするポリヌクレオチド配列	軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列
tA3-20	配列番号7	配列番号9
tA3-20.1	配列番号7	配列番号11
tA3-20.2	配列番号7	配列番号13
tA3-20.3	配列番号7	配列番号15
tA3-20.4	配列番号7	配列番号17
tA3-20.5	配列番号7	配列番号19
MTK201	配列番号23	配列番号25
M6	配列番号66	配列番号68

[0227] 得られた培養上清から、MabSelect SuRe（Cytiva社、175438）を用いたアフィニティ精製法により、又はMabSelect SuRe pcc（Cytiva社、17549102）を用いたアフィニティ精製法とSartobind（登録商標）Lab Q100（sartorius stedim社、931EXQ42BC-12）を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー精製法の併用により抗体を精製した。精製した抗体は、還元及び非還元条件下においてSDS-PAGE又はACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column（Waters社、186005225）を用いたサイズ排除クロマトグラフィー法により蛋白質発現の有無及び精製度を確認した。

[0228] [実施例1-2：抗MerTK抗体のヒトMerTKへの結合活性の評価]
tA3-20、tA3-20.1及びtA3-20.2のヒトMerTKへの結合性をELISA法で評価した。

実施例1-1(1)で調製したヒトMerTK-His蛋白質をPBSにて $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、ウェルプレート(Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 384-Well Plate、Thermo Fisher Scientific社、464718)に1ウェルあたり $20\mu\text{L}$ 添加し、 4°C で一晩静置することで蛋白質をプレートに固相化した。その後、ヒトMerTK-His蛋白質を除去した。終濃度0.05%のTween-20を含有するTBS(0.5% Tween-20含有TBS、ニッポンジーン社、310-07375を10倍希釈して調製、以下、「TBS-T」と称する)に、終濃度20%のBlocking One(ナカライテスク社、03953-95)を加えたブロッキング溶液を調製し、1ウェルあたり $50\mu\text{L}$ 添加し1時間静置することでブロッキングした。その後TBS-Tで1回ウェルの洗浄操作を行った。各種抗MerTK抗体、及びアイソタイプコントロール抗体として抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体(LYS__1c3-m1__h1i、社内調製)を10,000ng/mLから0.006ng/mLまで段階希釈した。抗体の希釈にはBlocking Oneを5%含有するTBS-Tを用いた。希釈した各種抗体を各ウェルに $20\mu\text{L}$ ずつ添加して、室温で1時間反応させた。各種抗体を除去した後、TBS-Tでウェルの洗浄を3回行った後、2次抗体 Goat Anti-Human IgG Fc, Multi-Species SP ads-HRP (SouthernBiotech社、2014-05)をBlocking Oneを5%含有するTBS-Tにて4,000倍希釈して調製した)を $15\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに添加して室温で1時間反応させた。TBS-Tでウェルの洗浄操作を3回行った後、TMB-Plus Substrate-Chromogen (Dako社、S1599)を $15\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに添加して室温で5分静置した。 1mol/L 硫酸(富士フイルム和光純薬社、198-09595)を加えて反応を停止させ、450nm及び570nmの吸光度をInfinite M200 PRO (Tecan社)で測定した。また、上記と同様の方法により

、tA3-20.3、tA3-20.4、tA3-20.5のヒトMerTKへの結合性を評価した。

[0229] 測定の結果、図1に示すようにtA3-20、tA3-20.1及びtA3-20.2はいずれもヒトMerTKに対して濃度依存的に結合活性を有し、それらの結合活性は同等であった。また、tA3-20.3、tA3-20.4及びtA3-20.5もヒトMerTKに対してtA3-20と同等の結合活性を有することを確認した。

[0230] [実施例1-3：抗MerTKアゴニスト抗体tA3-20の種交差反応性の解析]

各種動物（ヒト、マウス、ラット及びサル）のMerTK蛋白質に対する、tA3-20の結合活性を、ELISA法で評価した。実施例1-1で取得したヒトMerTK-ヒトFc融合蛋白質、マウスMerTK-ヒトFc融合蛋白質、Recombinant Rat MERTK protein (His tag) (abcam社、ab267966) 及びRecombinant Cynomolgus Monkey Mer Fc Chimera Protein, CF (R&D Systems社、10576-MR-050) をPBSで1 µg/mLに希釈した。希釈液をウェルプレート (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 384-Well Plate) に1ウェル当たり20 µL添加し、一晚4℃で蛋白質をプレートに固相化した。翌日、固相化したプレートをTBS-T (Thermo Fisher Scientific社、28360) で3回洗浄した。Blocking Oneを1ウェル当たり100 µL添加し、室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング後のプレートは、TBS-Tで3回洗浄した。10% Blocking Oneを含むTBS-T（以下、「10%希釈液」と称する）を用いて、tA3-20は最高濃度20 µg/mLから4倍公比で段階希釈し、1ウェルあたり20 µL添加した。抗体を添加したプレートは、室温で1時間インキュベーションしたのち、TBS-Tで3回洗浄した。2次抗体として10%希釈液で

10,000倍希釈したHRP標識抗ヒトIgG F(ab')₂ (abcam社、ab98535)を、1ウェル当たり20μL添加した。室温で1時間インキュベーションした後、TBS-Tで3回洗浄し、1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific社、34028)を1ウェル当たり20μL添加した。室温で15分のインキュベーションの後、1mol/L硫酸を加えて反応を停止させ、450nmの吸光度をSpectraMax (Molecular Devices社)で測定した。

[0231] 測定の結果、tA3-20は、ヒト、マウス、ラット及びサルMerTK蛋白質のいずれに対しても濃度依存的に結合活性を有することが確認された。tA3-20と同一のCDR配列を有するtA3-20.1、tA3-20.2、tA3-20.3、tA3-20.4及びtA3-20.5も、tA3-20と同様に、ヒトMerTKだけでなく、マウス、ラット及びサルMerTK蛋白質のいずれに対しても結合活性を有すると考えられる。

[0232] [実施例2：ヒト網膜色素上皮(RPE)細胞による貪食作用に対するtA3-20の活性確認]

[実施例2-1：ヒトRPE細胞によるアポトーシス細胞の貪食作用に対するtA3-20の活性確認]

tA3-20による貪食細胞の貪食除去機能の活性化を、貪食細胞の一つであるRPE細胞によるアポトーシス細胞の貪食作用の活性化を指標にして評価した。

[0233] ヒトRPE細胞は、iPS細胞由来のRPE細胞であるiCell (登録商標)網膜色素上皮細胞-01279 (富士フイルム和光純薬社、C1046)を使用した。培地には、MEMα (Thermo Fisher Scientific社、12571-063)にそれぞれ終濃度25μg/mLのGentamicin (Thermo Fisher Scientific社、15750-060)、1倍濃度のN-2 supplement (Thermo Fisher Scientific社、17502-

048)、1倍濃度のB-27 supplement (Thermo Fisher Scientific社、17504-044)、55 nMのヒドロコルチゾン (Merck社、H0888-1G)、0.25 mg/mLのタウリン (Merck社、T8691-25G) 及び14 pg/mLの3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (Merck社、T5516-1MG) を使用した。iCell (登録商標) 網膜色素上皮細胞-01279の1バイアルの細胞をCell Carrier-96 (PerkinElmer社、6055300) の96ウェルに均等に播種し、37℃、5%CO₂で5週間培養したものをiPS-RPE細胞培養プレートとして、以後の検討に使用した。Jurkat細胞 (ATCC、TIB-152) を、RPMI 1640 (Merck社、R8758-500ML) に、それぞれ終濃度10%のFBS (Cytiva社、SH30084.03)、1%のペニシリンストレプトマイシン (Merck社、P4458-100ML) を加えた培養用培地 (以下、「培養用培地」と称する) にて、 1×10^6 cells/mL濃度に調製した。濃度調製したJurkat細胞を終濃度100 ng/mLのSUPERFASLIGAND (登録商標) Protein (soluble) (human), (recombinant) (Enzo Life Sciences社、ALX-522-020-3005) にて37℃、3時間処理し、アポトーシスを誘導させた。アポトーシスが誘導されたJurkat細胞 (以下、「アポトーシスJurkat細胞」と称する) は、20 mM CHES/PBS buffer、pH 9.0 (社内調製) で 2×10^6 cells/mL濃度に調製したのち、終濃度400 ng/mLのpHrodo Red, SE (Thermo Fisher Scientific社、P36600) を用いて20分間室温で標識した。標識されたアポトーシスJurkat細胞を、培養用培地を用いて 6×10^6 cells/mL濃度に調製した。

[0234] 被験抗体として、tA3-20、MTK201及びLYS__1c3-m1__h1i (アイソタイプコントロール) を使用した。これらの抗体は、培養

用培地を用いて $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度に調製した。

各種被験抗体と pHrodo 標識されたアポトーシス Jurkat 細胞を、RPMI 1640 で 1 回洗浄した iPS-RPE 細胞培養プレートへ、それぞれ 1 ウェル当たり $50 \mu\text{L}$ ずつ添加した。iPS-RPE 細胞培養プレートを、5% CO_2 、 37°C インキュベーター内に設置した Incucyte S3 ライブセル解析装置 (Sartorius 社) にセットした。画像測定は 1 時間おきに 24 時間、明視野と赤色レーザーを用いて実施した。測定した画像を、Incucyte システムソフトウェアに搭載された解析ツールとアルゴリズムを用いて解析し、総赤色蛍光強度 (Red Calibrated Unit [RCU] $\times \mu\text{m}^2/\text{Image}$) を貪食量の指標とした。

[0235] 貪食作用の活性化評価の結果を図 2-1 に示す。解析の結果、tA3-20 は、評価開始後約 16 時間をピークに、蛍光強度が上昇しており、顕著な貪食作用の活性化が認められた。この結果は、tA3-20 が、MerTK の結合を介して RPE 細胞による貪食作用を活性化させることを示す。さらに、tA3-20 の貪食作用の活性化は、MTK201 の同活性よりも顕著に高かった。この結果より、tA3-20 は MTK201 に比べて強い貪食除去機能の活性化作用を有することが示唆された。抗 MerTK アゴニスト抗体が、マクロファージ等の貪食細胞の貪食除去機能を活性化できることを示唆した報告 (特許文献 4、非特許文献 1) があることから、tA3-20 は、RPE 細胞だけでなく、その他の貪食細胞 (例えば、マクロファージ等) においても貪食除去機能を活性化させ得ることが期待される。

[0236] [実施例 2-2 : ヒト RPE 細胞による POS の貪食作用に対する tA3-20 の活性確認]

tA3-20 による RPE 細胞の貪食除去機能の活性化を、ブタ POS の貪食作用の活性化を指標にして評価した。

[0237] ブタ POS は、S. Alemedawar らの方法 (Stem Cell Reports, 2020, 14 : 374-389) に準じて調製した。

調製したPOSを100mM Sodium bicarbonate (pH 8.2、社内調製)で 3×10^7 POS/mL濃度に調製したのち、終濃度1 μ MのpHrodo Red, SEを用いて1時間室温で攪拌させながら標識した。標識されたPOSを、培養用培地を用いて 6×10^6 POS/mL濃度に調製した。

[0238] 被験抗体として、tA3-20、MTK201、M6及びLYS-1c3-m1-h1i (アイソタイプコントロール)を使用した。これらの抗体は、培養用培地を用いて10 μ g/mL濃度に調製した。

各種被験抗体とpHrodo標識されたPOSを、DMEMで1回洗浄したiPS-RPE細胞培養プレートへ、それぞれ1ウェル当たり50 μ Lずつ添加した。iPS-RPE細胞培養プレートを、5% CO₂、37°Cインキュベーター内に設置したIncucyte S3ライブセル解析装置にセットした。画像測定は1時間おきに60時間、明視野と赤色レーザーを用いて実施した。測定した画像を、Incucyteシステムソフトウェアに搭載された解析ツールとアルゴリズムを用いて解析し、総赤色蛍光強度 (Red Calibrated Unit [RCU] $\times \mu\text{m}^2/\text{Image}$) を算出し、食食量の指標とした。

[0239] POS食食作用の活性化評価の結果を図2-2に示す。解析の結果、tA3-20は、POSにおいても食食作用の活性化を示した。この結果より、POSにおいても食食除去機能の活性化作用を有することが示唆された。

[0240] 実施例2-2の結果より、tA3-20はMTK201やM6に比べて強力な食食作用の活性化が認められ、MTK201やM6に比べて強い食食除去機能の活性化作用を有することが示唆された。

[0241] [実施例3：硝子体内投与したtA3-20のRPEにおけるMerTK及びAKTのリン酸化誘導作用の確認]

tA3-20が*in vivo*においてもRPE上のMerTKに対してアゴニストとして作用できるかどうかを、マウスを用いて、MerTK下流シグナル経路の活性化を指標に評価した。

[0242] [実施例3-1：被験抗体の硝子体内投与とRPEの採取]

8週齢の雄性C57BL6/Jマウス（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社）にミドリン（登録商標）P点眼液（参天製薬）を点眼して散瞳した後、三種混合麻酔（ドミトール、日本全薬工業；ドルミカム（登録商標）注射液10mg、丸石製薬；ベトルファール（登録商標）5mg、明治アニマルヘルス）を腹腔内投与して全身麻酔した。続いて、キシロカイン（登録商標）点眼液4%（サンド株式会社）を点眼して局所麻酔した。顕微鏡（Zeiss OPMI LUMERA 300）にて眼底を観察しつつ、マイクロシリンジ（伊藤製作所、MS-N05）と37ゲージ針（伊藤製作所）を使用して、1μLの被験抗体を硝子体内に投与した。被験抗体（溶媒にはPBSを使用）として、tA3-20（0.1447mg/mL、1.447mg/mL及び14.47mg/mL）及びLYS_1c3-m1_h1i（アイソタイプコントロール、14.47mg/mL）を用いた。硝子体内投与終了後、投与眼にはクラビット（登録商標）点眼液0.5%（参天製薬）を点眼し、タリビッド（登録商標）眼軟膏0.3%（参天製薬）を塗布し、アンチセダン（登録商標）（日本全薬工業）を皮下注射して覚醒させた。

被験抗体の硝子体内投与の1時間後に、マウスを安楽死させ眼球を摘出し、RPEを採取し、使用時まで凍結保存した。なお、本実験はN=4/群で実施した。

[0243] [実施例3-2：SDS-PAGE泳動用サンプルの調製]

採取したマウスRPEを、Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100X) (Thermo Fisher Scientific社、78441)を含むRIPA Buffer (Merck社、R0278) 10μLによりホモジネートした。作製したホモジネートを9,200×g、1分間遠心し、その上清をサンプリングチューブに回収した。回収した上清7.8μLを3μLのNuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific社、

NP0007)、1.2 μ LのNuPAGE Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific社、NP0004)と混合し、70℃で10分間熱処理した後、SDS-PAGE泳動用サンプルとした。

SDS-PAGE泳動用サンプル4 μ Lを、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific社、NP0329BOX)を用いてSDS-PAGEに供した。その後のゲルを、iBlot2 Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific社、IB21001)によってPVDF膜 (Thermo Fisher Scientific社、IB24002)に転写した。転写後のPVDF膜 (以下、「メンブレン」と称する)をブロッキング試薬 (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal、TOYOBO社、NYPB01)を用いて室温で1時間以上ブロッキングした。その後、Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO社、NKB-201)で1,000倍希釈した抗リン酸化MerTK抗体 (Merck社、SAB4504621-100UG)又は抗リン酸化AKT抗体 (Cell Signaling Technology社、#4060)と4℃にて一晩反応させた。抗体反応させたメンブレンを1%Block Ace (雪印メグミルク社、UKB40)含有TBS-T (以下、「洗浄バッファー」と称する)で洗浄操作の後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO社、NKB-301)で10,000倍希釈したHRP標識抗ウサギ抗体 (Cytiva社、NA9340V)と室温1時間反応させた。抗体反応させたメンブレンを洗浄バッファーで洗浄した。メンブレンをECL Select (Cytiva社、RPN2235)溶液に浸漬しChemiDocイメージングシステム (BioRad社)を用いてリン酸化MerTK又はリン酸化AKTを検出した。同一のメンブレンで総MerTK又は総AKTを検出するために、検出後のメンブレンを、ストリ

ッピングバッファー (Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer、Thermo Fisher Scientific社、46430) を用いて抗体を剥離し、ブロッキング試薬 (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal) による室温1時間のブロッキングを施した。その後、Can Get Signal Solution 1で3,000倍希釈した抗MerTK抗体 (Cell Signaling Technology社、#38102) 又は抗AKT抗体 (Cell Signaling Technology社、#4691) と4℃にて一晩反応させた。総MerTK又は総AKTの検出は、ECL Prime (Cytiva社、RPN2236) を用いて上述と同様の方法にて実施した。

[0244] [実施例3-3: 解析]

検出されたバンドをImage Lab software version 6.0.0 build 25 (BioRad社) ソフトウェアを用いて数値化した。各リン酸化蛋白質バンドの数値は、各総蛋白質バンドの数値で除し、補正值とした。

[0245] MerTKリン酸化の結果を図3-1に示す。アイソタイプコントロール抗体LYS__1c3-m1__h1iの14.47mg/mL (1μL/眼) 投与の値に対して、tA3-20は0.1447mg/mL (1μL/眼) 投与からMerTKリン酸化の亢進活性を示した。

AKTリン酸化の結果を図3-2に示す。MerTKリン酸化の結果と同様、LYS__1c3-m1__h1iの14.47mg/mL (1μL/眼) 投与の値に対して、tA3-20は0.1447mg/mL (1μL/眼) 投与からAKTリン酸化の亢進活性を示し、その活性は投与量依存的だった。tA3-20は、*in vivo*条件下において、RPEに発現するMerTK及びMerTKの下流のAKTのリン酸化亢進活性を有することが明らかになった。

[0246] 実施例2及び実施例3の結果から、tA3-20は、生体においても、M

erTK下流シグナル経路を介するRPEによる貪食除去機能を亢進することが期待され、RPEの貪食除去機能低下に伴う疾患の予防又は治療に有用であることが示唆された。

[0247] [実施例4：マウス型抗MerTK-抗TTR二重特異性抗体、マウス型抗TTR抗体及びTTR蛋白質の調製]

マウス型抗MerTK-抗TTR二重特異性抗体、マウス型抗TTR抗体及びミスフォールド組換えヒトTTR V30M蛋白質の調製を行った。

[0248] [実施例4-1：組換えヒトTTR V30M蛋白質の調製]

Matsubaraらの方法(Protein Expr. Purif., 2003, 30:55-61)を参考に、精製組換えヒトTTR V30M蛋白質の調製を行った。ヒトTTR V30M(ヒトTTRのmature peptide領域から成り、30番目のバリンをメチオニンに変えた変異体)をコードする遺伝子配列を発現ベクターpQE-30(QIAGEN社、N-Terminus pQE Vector Set、32915)に挿入し、pQE30_G01_02を得た。E. coli JM109 Competent Cells(タカラバイオ社、9052)にpQE30_G01_02を導入し、形質転換した。LB液体培地(社内調製)に終濃度1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(ナカライテスク社、19742-94)を加えて37℃、約16時間で形質転換した大腸菌の液体培養を行った。培養後に回収した大腸菌を、xTractor Buffer Kit(Clontech社、635623)を用いて可溶化した。可溶化液を、10,000×gで10分間遠心し、その上清のみを回収した。

回収した上清から、TALON(登録商標)Metal Affinity Resin(Clontech社、635502)とHis Buffer Kit(Cytiva社、11-0034-00)を用いて、His標識されたヒトTTR V30M蛋白質を精製した。組換えヒトTTR V30M蛋白質が含まれた溶出画分はAmicon Ultra-4(Mer

ck社、C7719)又はPD-10 Desalting Column (Cytiva社、17-0851-01)を用いて20mMリン酸バッファー(pH7.0、社内調製)に置換し精製組換えヒトTTR V30M蛋白質を取得した。マウスへの投与に用いる精製組換えヒトTTR V30M蛋白質の一部については、さらにPierce High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns (Thermo Fisher Scientific社、88276)を用いて、添付マニュアルに従いエンドトキシン除去を行った。

バッファー置換、及び／又はエンドトキシン除去操作を行った精製組換えヒトTTR V30M蛋白質の濃度を、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社、23225)もしくはNanoDrop A280測定法(Thermo Fisher Scientific社)を用いて測定した。

[0249] [実施例4-2: ミスフォールド組換えヒトTTR V30M蛋白質の調製]

ミスフォールディングさせた組換えヒトTTR V30M蛋白質(本明細書において、「ミスフォールド組換えヒトTTR V30M蛋白質」と称する)を作製するため、200 μ Lの精製組換えヒトTTR V30M蛋白質(10mg/mL)を、800 μ Lの50mMリン酸バッファー(pH2.7、社内調製)と混合し、37℃、4日間以上インキュベーションして(以下、「ミスフォールド処理」と称する)ミスフォールド処理済み組換えヒトTTR V30M蛋白質(本明細書において、「misTTR」と称する)溶液を調製した。調製したmisTTR溶液の一部を用いて、misTTR溶液と4M水酸化ナトリウムとを100:1の割合で混合させたもの(以降、「中和処理misTTR」と称する)を調製した。

misTTRと中和処理misTTRが共にミスフォールディングを形成していることを確認するため、ミスフォールド処理前の精製組換えヒトTTR V30M蛋白質をコントロールとしてアミロイド特異的蛍光色素である

チオフラビンTアッセイを行った。蛋白質：チオフラビンT（社内調製）の比を1：5として混合し、室温で15分間のインキュベーションの後、Excitation/Emission：430/480nmの条件下で蛍光測定を行った。その結果、misTTRと中和処理misTTRにおいて顕著な蛍光強度の亢進を確認したことから、これらのTTRはミスフォールディングを形成していることが示された。上記の実験からmisTTRと中和処理misTTRをミスフォールドTTRとして以降の検討に使用した。

[0250] [実施例4-3：ミスフォールド組換えヒトTTR V30M蛋白質へのラベル化]

50 μ Lの中和処理misTTR（2mg/mL）、950 μ Lの100mM Sodium bicarbonate（pH8.2、社内調製）、5 μ Lの10mM pHrodoを混合し、37℃で15分間インキュベーションしpHrodo標識misTTR（本明細書において、「pHrodo-misTTR」と称する）を調製した。遠心により過剰なpHrodoを含む上清を除去後、PBSで懸濁し再度遠心により上清を除去した。沈殿したpHrodo-misTTRをPBSで再懸濁し、所定濃度に調製した。

250 μ Lの中和処理misTTR（2mg/mL）、250 μ Lの50mM Borate（pH8.5、Thermo Fisher Scientific社、28341）、16.75 μ Lの10mM DyLight800 NHS Ester（Thermo Fisher Scientific社、46421）を混合し、25℃で1時間インキュベーションすることでDyLight800標識misTTR（本明細書において、「DL800-misTTR」と称する）を調製した。遠心により過剰なDyLight800を含む上清を除去後、PBSで懸濁し再度遠心により上清を除去した。沈殿したDL800-misTTRをPBSで再懸濁し所定濃度に調製した。

[0251] [実施例4-4：マウス型抗Me rTK-抗TTR二重特異性抗体の作製]

抗M e r T K 抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、ヒンジ領域及びマウス第一F c ポリペプチドからなる重鎖、抗M e r T K 抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び抗T T R - s c F v、ヒンジ領域にマウス第二F c ポリペプチドが連結したポリペプチドからなる二重特異性抗体（以下、「マウス型抗M e r T K - 抗T T R 二重特異性抗体」と称する）の作製を、以下の方法で行った。

（１）マウス型抗M e r T K 抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターの作製

マウス型抗M e r T K 抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を設計した。t A 3 - 2 0 の重鎖可変領域、ヒンジ領域及びマウス重鎖I g G 2 a の定常領域（E U インデックス：2 1 5 から4 4 7）を連結させて重鎖（配列番号3 4）を、t A 3 - 2 0、3 の軽鎖可変領域にマウス軽鎖L a m b d a 鎖の定常領域（E U インデックス：1 0 8 から2 1 3）をそれぞれ連結させて軽鎖（配列番号3 6）をそれぞれ設計した。前述の重鎖にさらに（i）アミノ酸番号2 3 6 及び2 3 7（E U インデックス：2 3 4 及び2 3 5）のアミノ酸をそれぞれロイシン（L）からアラニン（A）に置換させたL A L A 変異（L 2 3 4 A 及びL 2 3 5 A）、（i i）アミノ酸番号3 5 8、3 6 6、3 7 0、3 7 2、4 0 1 及び4 1 3（E U インデックス：3 5 6、3 6 4、3 6 8、3 7 0、3 9 9 及び4 1 1）のアミノ酸をそれぞれグルタミン酸（E）からリジン（K）、スレオニン（T）からセリン（S）、メチオニン（M）からロイシン（L）、スレオニン（T）からリジン（K）、アスパラギン酸（D）からリジン（K）、アルギニン（R）からスレオニン（T）に置換させた静電ステアリング変異及びヘテロ二量体化抗体分子を安定化させるための変異（m A b s, 2 0 1 9, 1 2 : 1 - 1 2）、並びに（i i i）アミノ酸番号3 3 1（E U インデックス：3 2 9）のアミノ酸をプロリン（P）からアラニン（A）に置換させた変異、を含むアミノ酸配列となるよう設計した。設計したマウス型抗M e r T K 抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3 3 及び3 5）を人工遺伝子合成し、それぞれ

p c D N A 3.4 T O P Oベクターに挿入してベクターMHC、ベクターMLCを作製した。

[0252] (2) マウス型抗TTR-s c F v-F cをコードするベクターの作製

マウス第二FcポリペプチドのN末端にヒンジ領域及び抗TTR-s c F vを連結させたポリペプチド（以降「マウス型抗TTR-s c F v-F c」と称する）（配列番号38）を、国際公開第2015/115332の配列番号13のミスフォールドTTRに結合する抗TTR抗体である371M抗体の重鎖可変領域、GSリンカー（配列番号54）、国際公開第2015/115332の配列番号14の371M抗体の軽鎖可変領域、ヒンジ領域及びマウス重鎖IgG2aの定常領域（EUインデックス：215から447）の順に連結させたアミノ酸配列からなるように設計した。当該マウス型抗TTR-s c F v-F cは、さらに（i）N末端側に位置する抗TTR-s c F vの安定化（Protein Engineering, Design and Selection, 2019, 25:321-329）を目的として、配列番号38のアミノ酸番号44（EUインデックス：44）のグリシン（G）をシステイン（C）に、アミノ酸番号237（EUインデックス：100）のグリシン（G）をシステイン（C）に置換させた変異、（ii）配列番号38のアミノ酸番号265及び266（EUインデックス：234及び235）のアミノ酸をそれぞれロイシン（L）からアラニン（A）に置換させたLALA変異（L234A及びL235A）、（iii）配列番号38のアミノ酸番号395、399、401、440、442及び470（EUインデックス：364、368、370、409、411及び439）をそれぞれスレオニン（T）からセリン（S）、メチオニン（M）からロイシン（L）、スレオニン（T）からリジン（K）、リジン（K）からグルタミン酸（E）、アルギニン（R）からスレオニン（T）、リジン（K）からアスパラギン酸（D）に置換させた静電ステアリング変異及びヘテロ二量体化抗体分子を安定化させるための変異、並びに（iv）配列番号38のアミノ酸番号360（EUインデックス：329）のアミノ酸をプロリン

(P) からアラニン (A) に置換させる変異、を含むアミノ酸配列 (配列番号 38) となるよう設計した。設計したマウス型抗 TTR-s c F v-F c のアミノ酸配列をコードする塩基配列を人工遺伝子合成し、p c D N A 3.4 T O P O ベクターに挿入してベクター T s c F v F c を作製した。

[0253] (3) マウス型抗 M e r T K-抗 T T R 二重特異性抗体の作製

上記 (1) 及び (2) で作製したベクターを用いてマウス型抗 M e r T K-抗 T T R 二重特異性抗体を作製した。具体的には、E x p i F e c t a m i n e C H O T r a n s f e c t i o n K i t を用いて E x p i C H O-S 細胞にベクター M H C、ベクター M L C、及びベクター T s c F v F c を共導入し、常法に従ってマウス型抗 M e r T K-抗 T T R 二重特異性抗体を培養上清中に分泌させた。得られた培養上清から、M a b S e l e c t S u R e p c c を用いたアフィニティ精製法と H i T r a p S P H P (C y t i v a 社、17115201) を用いたイオン交換クロマトグラフィー精製法又は S u p e r d e x 200 I n c r e a s e 10/300 G L (C y t i v a 社、28990944) を用いたサイズ排除クロマトグラフィー精製法の併用により抗体を精製した。

以下、作製したマウス型抗 M e r T K-抗 T T R 二重特異性抗体を t A-009 と称する。

[0254] [実施例 4-5: マウス型抗 T T R 抗体の作製]

ヒト由来の抗 T T R 抗体の可変領域及びマウス由来の定常領域を有する抗 T T R 抗体である 371M 抗体 (本明細書において、「マウス型 371M」と称する) の作製を、以下の方法で行った。

重鎖として、国際公開第 2015/115332 号の配列番号 13 の抗 T T R 抗体である 371M 抗体の重鎖可変領域にマウス重鎖 I g G 2 a の定常領域 (E U インドックス: 118 から 447) を連結させたアミノ酸配列を設計した (配列番号 44)。軽鎖として、国際公開第 2015/115332 の配列番号 14 の 371M 抗体の軽鎖可変領域にマウス軽鎖 L a m b d a 1 (E U インドックス: 108 から 213) を連結させたアミノ酸配列を設

計した（配列番号45）。設計した上記のアミノ酸配列をコードする塩基配列を人工遺伝子合成し、p c D N A 3.4 T O P Oベクターに挿入した。作製したベクターを用いてマウス型371Mを作製した。具体的には、E x p i F e c t a m i n e C H O T r a n s f e c t i o n K i tを用いてE x p i C H O - S細胞にベクターを導入し、常法に従って抗体を培養上清中に分泌させた。得られた培養上清から、M a b S e l e c t S u R e p c cを用いたアフィニティ精製法とH i L o a d 26/600 s u p e r d e x（登録商標）200 p g（C y t i v a社、28-9893-36）を用いたサイズ排除クロマトグラフィー精製法の併用により抗体を精製した。

[0255] [実施例5：t A - 009のi n v i t r o活性評価]

[実施例5-1：t A - 009のヒトM e r T K及びm i s T T Rへの結合活性の評価]

t A - 009のヒトM e r T K及びm i s T T Rの結合活性をE L I S A法で評価した。

実施例1-1（1）で調製したヒトM e r T K - F c蛋白質及び実施例4-2で調製したm i s T T RをP B Sにてそれぞれ1 μ g / m L及び2 μ g / m Lに調製し、C l e a r F l a t - B o t t o m I m m u n o N o n s t e r i l e 384-Well Plateに1ウェルあたり20 μ L添加し、室温で1時間静置することでプレートを固相化した。その後、ヒトM e r T K - F c蛋白質及びm i s T T Rをそれぞれ除去した。T B S - Tに、終濃度20%のB l o c k i n g O n eを加えたブロッキング溶液を調製し、1ウェルあたり50 μ L添加し1時間静置することでブロッキングした。その後T B S - Tで1回ウェルの洗浄操作を行った。t A - 009及びアイソタイプコントロール抗体として抗K e y h o l e L i m p e t H e m o c y a n i n (K L H) 抗体 (K L H _ 173A1 _ m a 0、自社作製) を 2×10^4 から 1×10^{-2} n g / m Lまで段階希釈した。抗体の希釈にはB l o c k i n g O n eを5%含有するT B S - Tを用いた。希

釈した各種抗体を各ウェルに15 μ Lずつ添加して、室温で1時間反応させた。各種抗体を除去し、TBS-Tでウェルの洗浄を3回行った後、2次抗体 (Goat Anti-Mouse IgG, Human ads-HRP (SouthernBiotech社、1030-05) をBlocking Oneを5%含有するTBS-Tにて4,000倍希釈して調製した) を15 μ Lずつ各ウェルに添加して室温で1時間反応させた。TBS-Tでウェルの洗浄操作を3回行った後、TMB-Plus Substrate-Chromogenを15 μ Lずつ各ウェルに添加して室温で5分静置した。1 mol/L硫酸を加えて反応を停止させ、450 nm及び570 nmの吸光度をInfinite M200 PROで測定した。

[0256] 測定の結果、tA-009はヒトMerTK-Fc蛋白質及びmistrRに対して濃度依存的に結合活性を有していることが明らかとなった (図4-1及び4-2)。

[0257] [実施例5-2: tA-009によるマウス骨髄由来マクロファージ細胞の食食除去機能の活性化]

tA-009による食食細胞の食食作用を、食食細胞の一つであるマウス骨髄由来マクロファージ細胞によるmistrRの食食作用を指標にして評価した。

[0258] マウス骨髄由来マクロファージ細胞は以下の方法で調製した。雄性C57BL/6/Jマウス (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン社) の大腿骨及び脛骨から骨髄系細胞を採取し、10%のFBS (Cytiva社、SH30070.03) 及び40 ng/mlのRecombinant Mouse M-CSF Protein (R&D Systems社、416-ML-010) を含むRPMI-1640培地 (Sigma-Aldrich社、R8758-500ML) (以下、「FBS等含有RPMI-1640」と称する) で37℃、5%CO₂の条件下で3日間培養した。その後0.1 μ Mデキサメタゾン (Sigma-Aldrich社、D4902-100MG) を含むFBS等含有RPMI-1640に置換して1 $\times$ 10⁴ cells

／We l l の細胞濃度で37℃、5%CO₂の条件下で3日間培養し、RPM I－1640培地で1回洗浄しマウス骨髄由来マクロファージ細胞培養プレートを作製した。被験抗体として、tA－009、コントロール抗体として tA3－20.3を使用した。終濃度5μg／mLのpHrodo－misTTR及び終濃度0.7μmol／LのtA－009又はコントロール抗体としてtA3－20.3（配列番号8、16）を含むRPM I－1640培地をマウス骨髄由来マクロファージ細胞培養プレートへ1ウェル当たり50μL添加した。マウス骨髄由来マクロファージ細胞培養プレートを、5%CO₂、37℃インキュベーター内に設置したIncucyte S3ライブセル解析装置にセットし、実施例2と同様に測定及び解析をおこなった。

[0259] 解析の結果、抗Me rTK－抗TTR二重特異性抗体であるtA－009は、抗Me rTK抗体であるtA3－20.3よりも顕著にマウス骨髄由来マクロファージ細胞によるmisTTRの貪食作用を活性化させることが示された。この結果から、tA－009はmisTTRとマウス骨髄由来マクロファージ細胞を近接させることで、効率良くマウス骨髄由来マクロファージ細胞によるmisTTRの貪食除去機能を活性化させることが示唆された。

[0260] [実施例6：マウスin vivoにおけるtA－009によるmisTTRに対する貪食細胞の貪食除去機能の活性化]

tA－009が貪食細胞によるmisTTRの貪食作用を活性化できるかを、pHrodo－misTTRをマウスの皮下に投与し、その蛍光強度を経時的にin vivoイメージング法によって測定することにより評価した。pHrodo－misTTRは、貪食細胞に貪食されると蛍光を発する。また、tA－009による貪食作用の活性化がMe rTK依存的であることを確認するために、Me rTK阻害薬との併用試験を実施した。

13週齢の雌性BALB／c－nu（nu／nu）マウス（ジャクソン・ラブラトリー・ジャパン）の背側部の皮下に、実施例4－3の通り調製したpHrodo－misTTRと中和処理misTTRとを1：4の蛋白質質量

比で混合した溶液を40 μ L投与した。投与後、1、6、12、24、48、72、120、168、240及び336時間にマウスをイソフルラン（マイラン製薬）で麻酔し、IVIS Imaging System（LuminaII；PerkinElmer）により投与部位周辺の蛍光強度（photons/second, [p/s]）を測定することで、集積してきた貪食細胞によるpHrodo-misTTRの貪食量を定量した。上記測定時点の蛍光強度の積算値を観察期間（14日間）中の総貪食量（[p/s]・h）として算出することで貪食作用を評価した。被験抗体tA-009（100mg/kg）又はコントロールである溶媒（PBS）をpHrodo-misTTRの皮下投与の1時間前に腹腔内投与した。MerTK阻害薬であるONO7475（10mg/kg、MedChemExpress、HY-114358）を、day0からday5まで1日1回、計6回経口投与した。なお、試験開始日（day0）にはtA-009投与の0.5時間前にONO7475を経口投与した。本試験は5例/群で実施した。pHrodo-misTTRの総貪食量の平均値及び標準誤差の算出及び有意差検定はGraphPad Prism（GraphPad Software社、ver8.0.2）で実施した。溶媒群とtA-009群との比較及びtA-009群とtA-009+ONO7475群との比較はStudent's t-testを用いて行い、P値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。

[0261] マウスin vivoにおけるtA-009によるMerTK依存的な貪食作用をpHrodo-misTTRの蛍光強度を指標に評価した。結果、溶媒投与群に比して、tA-009投与群では、pHrodo-misTTRの蛍光強度の有意な増加が認められた（図5）。この結果は、tA-009投与群では貪食細胞によるpHrodo-misTTRの貪食作用の活性化が認められたことを示す。一方で、tA-009投与によるpHrodo-misTTRに対する貪食作用の活性化は、MerTK阻害薬であるONO7475によりほぼ完全に抑制された。これらの結果から、tA-009

によってM e r T K 依存的に貪食除去機能の活性化が認められることが示唆された。

[0262] [実施例7：老齢マウス *in vivo*におけるt A-009又はマウス型371Mによるm i s T T Rに対する貪食細胞の貪食除去機能の活性化]

ミスフォールドT T Rが全身の臓器に沈着することを原因とするT T R型アミロイドーシスは、加齢関連疾患として広く知られている（F r o n t . C a r d i o v a s c . M e d . , 2022, 9:863179）。また、加齢によりマクロファージ等の貪食細胞の貪食除去機能が低下すること及びその機能不全が種々の疾患の発症の一因となっていることも報告されている（I m m u n o l . L e t t . , 2021, 230:1-10）。加齢により貪食除去機能が低下した条件において、M e r T K 依存的な貪食除去機能の活性化とF c γ 受容体依存的な貪食除去機能の活性化のいずれがミスフォールドT T Rの除去に対して有効であるか評価するために、老齢マウスにおけるD L 800-m i s T T Rの貪食除去活性を指標に評価した。

[0263] [実施例7-1：若齢マウスを用いたt A-009又はマウス型371Mの用量設定]

M e r T K 依存的に貪食細胞の貪食除去機能を活性化するt A-009とF c γ 受容体依存的に活性化するマウス型371M（F cは野生型マウスI g G 2 a（I m m u n o l R e v . , 2015, 268:25-51））によるm i s T T Rの貪食除去機能を比較するため、D L 800-m i s T T Rを貪食除去機能が正常である若齢マウスの皮下に投与し、その蛍光強度の変化を経時的に *in vivo* イメージング法によって測定した。D L 800-m i s T T Rの蛍光強度はその残存量に比例する。

6週齢（若齢）の雌性B A L B / c - n u（n u / n u）マウス（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン）の背側部の皮下に、実施例4-3の通り調製したD L 800-m i s T T Rと中和処理m i s T T Rとを1:4の蛋白質質量比で混合した溶液を40 μ L投与した。投与後、1、6、12、22、46、71、118、168、240及び336時間にマウスをイソフルラ

ン（マイラン製薬）で麻酔し、I V I S Imaging System（Lumina II；PerkinElmer）により投与部位周辺の蛍光強度（photons/second, [p/s]）を測定することで、misTTRの残存量を定量した。上記測定時点の蛍光強度の積算値を観察期間（14日間）中の総残存量（[p/s]・h）として算出することで貪食除去機能を評価した。被験抗体tA-009（100mg/kg）又はマウス型371M（30mg/kg）を、コントロールとして溶媒（PBS）をDL800-misTTRの皮下投与の1時間前に腹腔内投与した。本試験は4例/群で実施した。DL800-misTTRの総残存量の平均値及び標準誤差の算出及び有意差検定はGraphPad Prism（GraphPad Software社、ver 8.0.2）で実施した。溶媒群と被験抗体（マウス型371M又はtA-009）群との比較はDunnett's testを用いて行い、P値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。

[0264] マウスin vivoにおけるtA-009又はマウス型371MによるDL800-misTTRの貪食除去機能の評価結果を図6-1に示す。結果、溶媒投与群に比して、tA-009（100mg/kg）投与群又はマウス型371M（30mg/kg）では、DL800-misTTRの総残存量の有意かつほぼ同一の減少が認められた。この結果は、in vivoにおいて、100mg/kgのtA-009と30mg/kgのマウス型371Mは、ほぼ同等のDL800-misTTR貪食除去機能を有することを示している。

[0265] 以上の結果より、マクロファージ等の貪食細胞の貪食除去機能が保たれている若齢マウスにおいてはtA-009の100mg/kgとマウス型371Mの30mg/kgが、貪食細胞に対してほぼ同等の貪食除去機能を誘導するものとして、後の実験を行った。

[0266] [実施例7-2：老齢マウスin vivoにおけるDL800-misTTRに対するtA-009又はマウス型371Mによる貪食除去機能の活性

化]

老齢マウスにおいては加齢によりマクロファージ等の貪食細胞の貪食除去機能が低下していることが示唆される (Clin. Exp. Immunol. 2008, 152 (3) : 448-455、Immunol. Lett. 2021, 230 : 1-10)。本発明者らは、Fc γ 受容体依存的に活性化する薬剤よりもMe r T K依存的に貪食細胞の貪食除去機能を活性化する薬剤の方が疾患の治療に有用ではないかとの仮説を立て、若齢マウスにおいて同等の効果を示したt A-009とマウス型371Mの用量にて、貪食除去機能の活性化を評価するための検討を実施した。

[0267] 実施例7-1の結果に従い、20週齢（若齢）又は103週齢（老齢）の雄性C57BL/6Jマウス（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン）に被験抗体であるt A-009（100mg/kg）、マウス型371M（30mg/kg）又はコントロールである溶媒（PBS）を腹腔内投与した。その後、実施例4-3の通り調製したDL800-misTTRと中和処理misTTRとを1:4の蛋白質量比で混合した溶液を上述マウスの背側部の皮下に40 μ L投与した。投与後、1、6、12、24、48、72、120及び168時間にマウスをイソフルラン（マイラン製薬）で麻酔し、IVIS Imaging System（Luminall; PerkinElmer）により投与部位周辺の蛍光強度（photons/second, [p/s]）を測定することで、DL800-misTTRの残存量を定量した。本試験は5~6例/群で実施した。DL800-misTTRの総残存量の平均値及び標準誤差の算出及び有意差検定はGraphPad Prism（GraphPad Software社、ver8.0.2）で実施した。若齢マウス・溶媒群と老齢マウス・溶媒群との比較はStudent's t-testを用い、老齢マウス・溶媒群と老齢マウス・被験抗体（マウス型371M又はt A-009）群との比較はDunnett's testを用いて行い、それぞれP値が0.05未満の場合に統計的有意とみなした。

老齢マウス *in vivo* における DL800-misTTR に対する tA-009 及びマウス型 371M の貪食除去機能の活性化の評価結果を図 6-2 に示す。若齢マウスに比して老齢マウスでは、DL800-misTTR の総残存量の有意な増加が認められ、老齢マウスでは貪食細胞の異物に対する貪食除去機能が低下していることが確認された。

本老齢マウスを用いた試験では、溶媒投与群に比して tA-009 (100 mg/kg) 投与群では、DL800-misTTR の総残存量の有意な低下が認められた。一方、マウス型 371M (30 mg/kg) 投与群では作用は認められなかった。

以上の結果から、Me r T K 依存的に貪食除去機能を活性化できる tA-009 は、Fc γ 受容体依存的に貪食除去機能を活性化できるマウス型 371M と比較して、加齢により貪食除去機能が低下した貪食細胞に対して顕著に貪食除去機能を活性化できることを示している。

[0268] 本検討により Me r T K 依存的に貪食除去機能を活性化する抗 Me r T K-抗 T T R 二重特異性抗体である tA-009 は、Fc γ 受容体依存的に貪食除去機能を活性化するマウス型 371M に比して、老齢マウスにおいても顕著に貪食除去機能を活性化できることを見出した。このことは、加齢性のミスフォールド蛋白質の蓄積を原因とする疾患において、抗 Me r T K-抗ミスフォールド蛋白質二重特異性抗体による貪食除去機能の活性化が非常に有用である可能性を示唆するものと考えられる。

[0269] [実施例 8：完全ヒト型抗 Me r T K-抗 T T R 二重特異性抗体の設計]

(1) 完全ヒト型抗 Me r T K 片腕抗体の設計

実施例 4 で取得したマウス型抗 Me r T K-抗 T T R 二重特異性抗体の配列を参考に、完全ヒト型抗体の抗 Me r T K-抗 T T R 二重特異性抗体（以下、「完全ヒト型抗 Me r T K-抗 T T R 二重特異性抗体」と称する）を設計した。まず完全ヒト型抗体の Me r T K 片腕抗体（以下、「完全ヒト型 Me r T K 片腕抗体」と称する）を設計した。完全ヒト型抗 Me r T K 片腕抗体の重鎖フラグメントには、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 217 までのア

ミノ酸配列を用いた。また完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体の第一又は第二F cポリペプチドにL A L A変異及びP 3 3 1 Gのアミノ酸変異を導入した（配列番号39）。当該第一F cポリペプチド及び当該第二F cポリペプチドに先行特許文献（国際公開第1998/050431号）に基づきノブズ・イントゥー・ホールズ（K n o b s i n t o h o l e s）変異を導入した。具体的には第一又は第二F cポリペプチドの一方にk n o b sを形成させるために配列番号39のアミノ酸番号136（E Uインデックス：366）のアミノ酸をそれぞれトレオニン（T）からトリプトファン（W）に置換させた配列（配列番号40）、また残りの一方のF cポリペプチドにh o l e sを形成させるために配列番号39のアミノ酸番号136、138及び177（E Uインデックス：366、368及び407）のアミノ酸をそれぞれトレオニン（T）からセリン（S）、L（ロイシン）からA（アラニン）、チロシン（Y）からバリン（V）に置換された配列（配列番号41）を設計した。完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体の軽鎖には配列番号16、18又は20のアミノ酸配列を用いた。完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体の重鎖フラグメント、完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体の軽鎖、ヒンジ領域（配列番号42）、及び第一及び第二F cポリペプチド（配列番号40及び41）を組み合わせることで完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体を設計した。

[0270] （2）完全ヒト型抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体の設計

抗T T R－s c F vのアミノ酸配列（配列番号43）及びヒンジ領域（配列番号70）を（1）で設計した完全ヒト型抗M e r T K片腕抗体の第二F cポリペプチドのN末端に連結させて、完全ヒト型抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体を設計した。設計した完全ヒト型抗M e r T K－抗T T R二重特異性抗体における各パーツのアミノ酸配列の組み合わせを表3に示す。

[0271]

[表3]

完全ヒト型抗Me r TK片腕抗体の重鎖フラグメント	完全ヒト型抗Me r TK片腕抗体の軽鎖	第一又は第二Fcポリペプチド	抗TTRー s c F v	ヒンジ領域
配列番号8のアミノ酸番号1～217	配列番号16 配列番号18 配列番号20	配列番号40又は41	配列番号43	配列番号42及び70

[0272] 本発明の抗Me r TK抗体は、食機能の低下を原因とする様々な疾患の予防又は治療に有用であると期待される。

[0273] [実施例9：抗Me r TKー抗I g L二重特異性抗体、抗I g L抗体及びミスフォールドI g L蛋白質の調製]

ミスフォールドI g L蛋白質、抗Me r TKー抗I g L二重特異性抗体、及び抗I g L抗体の調製を行った。

[0274] [実施例9－1：組換えヒトI g L蛋白質の調製]

J. Wallら (Biochemistry, 1999, 38: 14101－14108、Figure 1) の報告に記載のヒトI g L Vλ6W i l lアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を参考に6×ヒスチジン（配列番号22）をコードする遺伝子配列を発現ベクターp c D N A 3. 4 TOP Oベクターに挿入し、V l a m b d a 6 W i l lベクターを得た。V l a m b d a 6 W i l lベクターを、E x p i F e c t a m i n e CHO T r a n s f e c t i o n K i tを用いてE x p i CHO－S細胞に導入し、常法に従って組換え蛋白質を培養上清中に分泌させた。TALON（登録商標）Metal Affinity Resin (Clontech社、635502) とHis Buffer Kit (Cytiva社、11－0034－00) を用いて、得られた培養上清からHis標識されたヒトI g L蛋白質を精製した。組換えヒトI g L蛋白質が含まれた溶出画分をNAP－25 Column (Cytiva社、17－0852－01) やAmicon Ultra－15 (Merck社、UFC901096) を用いてPBSに置換、濃縮し精製組換えヒトI g L蛋白質を取得した。

[0275] [実施例9－2：ミスフォールドI g L蛋白質の調製]

ミスフォールドさせた組換えヒトIgG蛋白質（本明細書において、「ミスフォールドIgG蛋白質」と称する）を作製するため、200 μ Lの精製組換えヒトIgG蛋白質（1.3mg/mL）を、800 μ Lの50mMリン酸バッファー（pH2.7、社内調製）と混合し、37℃、4日間以上インキュベーションしてミスフォールド処理済み組換えヒトIgG蛋白質溶液を調製した。

[0276] [実施例9-3：抗MerTK-抗IgG二重特異性抗体の作製]

抗MerTK抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、ヒンジ領域及びヒト第一Fcポリペプチドからなる重鎖、抗MerTK抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、抗IgG抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、ヒンジ領域及びヒト第二Fcポリペプチドが連結したポリペプチドからなる重鎖並びに抗IgG抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなる二重特異性抗体（以下、「抗MerTK-抗IgG二重特異性抗体」と称する）の作製を、以下の方法で行った。

[0277] (1) 抗IgG抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターの作製

抗IgG抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターの作製は論文（mAbs, 2016, 8(6):1010-1020）の記載に基づいておこなった。特許第5730020号に記載のマウス由来の抗IgG抗体である2A4抗体のVH及びCL、ヒンジ領域、並びにノブズ・イントゥー・ホールズ変異、LALA変異及びP331Gのアミノ酸変異を導入したヒト由来のFcポリペプチドからなるマウス-ヒトキメラの重鎖（配列番号57）（以降「抗IgG抗体の重鎖」と称する）を設計した。また2A4抗体のVL、及びヒト由来のCH1ドメインを有するマウス-ヒトキメラの軽鎖（配列番号59）（以降「抗IgG抗体の軽鎖」と称する）を設計した。設計した抗IgG抗体の重鎖、及び抗IgG抗体の軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号56及び配列番号58）を人工遺伝子合成し、pcDNA3.4 TOPOベクターにそれぞれ挿入して抗IgG抗体の重鎖をコードするベクター及び抗IgG抗体の軽鎖をコードするベクターを作製した。

[0278] (2) 完全ヒト抗Me r T K抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターの作製

配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなるヒトMe r T K片腕抗体の重鎖フラグメント、ヒンジ領域（配列番号42）及び第一Fcポリペプチド（配列番号41）の順に連結させ、完全ヒト抗Me r T K片腕抗体の重鎖（配列番号61）を設計した。設計した完全ヒト抗Me r T K片腕抗体の重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列を人工遺伝子合成し、p c D N A 3.4 T O P Oベクターに挿入して、完全ヒト抗Me r T K抗体の重鎖をコードするベクターを作製した。

実施例1-1で設計したt A 3-20.1の軽鎖（配列番号12）をコードする塩基配列を人工遺伝子合成し、p c D N A 3.4 T O P Oベクターに挿入して、完全ヒト抗Me r T K抗体の軽鎖をコードするベクターを作製した。

[0279] (3) 抗Me r T K-抗I g L二重特異性抗体の作製

上記(1)及び(2)で作製した4種類のベクターを用いて抗Me r T K-抗I g L二重特異性抗体を作製した。具体的には、E x p i F e c t a m i n e C H O T r a n s f e c t i o n K i tを用いてE x p i C H O-S細胞に抗I g L抗体の重鎖をコードするベクター、抗I g L抗体の軽鎖をコードするベクター、完全ヒト抗Me r T K抗体の重鎖をコードするベクター及び、完全ヒト抗Me r T K抗体の軽鎖をコードするベクターを共導入し、常法に従って抗Me r T K-抗I g L二重特異性抗体を培養上清中に分泌させた。得られた培養上清から、M a b S e l e c t S u R eを用いたアフィニティ精製を用いて抗体を精製した。以下、作製した抗Me r T K-抗I g L二重特異性抗体をt A 3-20__2 A 4__h 1 xと称する。

[0280] [実施例9-4：抗I g L抗体の作製]

先行特許文献（特許第5730020号）の配列番号152及び154のマウス由来の抗I g L抗体の可変領域、並びにヒト由来の定常領域を有する抗I g L抗体（本明細書において、「マウス-ヒトキメラ2 A 4」と称する

)の作製を、以下の方法で行った。

特許第5730020号に記載の2A4抗体の配列を参考に、配列番号63に記載の重鎖及び配列番号65に記載の軽鎖を設計した。設計した上記2つのアミノ酸配列をコードする塩基配列(配列番号62及び64)を人工遺伝子合成し、実施例1-1と同様の方法を用いて常法に従いマウス-ヒトキメラ2A4を作製した。

[0281] [実施例10:抗MerTK-抗IgL二重特異性抗体のヒトMerTK及びミスフォールドIgL蛋白質への結合活性の評価]

tA3-20__2A4__h1xのヒトMerTK及びミスフォールドIgL蛋白質の結合活性をELISA法で評価した。

実施例9-2で調製したミスフォールドIgL蛋白質をPBSにて2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、Ni-NTA HisSorb Plates (QIAGEN社、35061)に1ウェルあたり50 μL 添加し、4℃で一晩静置することで蛋白質をプレートに固相化した。その後、ミスフォールドIgL蛋白質を除去した後、PBSTでウェルの洗浄操作を3回行った。評価抗体にはtA3-20__2A4__h1x、コントロール抗体としてtA3-20.1、マウス-ヒトキメラ2A4及びLYS__1c3-m1__h1i(アイソタイプコントロール)を使用し、0.5%のBlocking Oneを含む0.05%のTween-20含有PBS(Thermo Scientific社、28352)を20倍希釈して調製、以下、「PBST」と称する)を用いて20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から6.4 ng/mLまで段階希釈し、各ウェルに50 μL ずつ添加後、室温で1時間反応させた。その後PBSTでウェルの洗浄操作を3回行った。実施例1で作製したMerTK-Fc融合蛋白質をBiotin Labeling Kit(同人化学研究所、LK03)を用いてビオチン標識した後、0.5%のBlocking Oneを含むPBSTで2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、各ウェルに50 μL ずつ添加後、室温で1時間反応させた。PBSTでウェルの洗浄操作を3回行った後、200倍希釈したStreptavidin-HRP(R&D System

s社、DY998)を各ウェルに50 μ Lずつ添加し、室温で1時間反応させた。PBSTでウェルの洗浄操作を3回行った後、TMB-Plus Substrate-Chromogenを50 μ Lずつ各ウェルに添加して室温で5分静置した。1mol/L硫酸を50 μ Lずつ各ウェルに加えて反応を停止させ、450nm及び570nmの吸光度をInfinite M200 PROで測定した。

[0282] 結果、tA3-20__2A4__h1xは、ヒトMerTK及びミスフォールドIgL蛋白質に同時に結合できること、また、その活性は抗体の濃度依存적であることが明らかとなった(図7)。

[0283] さらに、実施例4-3と同様な方法で標識したpHrodomisフォールドIgL蛋白質を用いて、実施例5-2と同様な方法でマウス骨髓由来マクロファージによる貪食作用を確認した。その結果、tA3-20__2A4__h1xはMerTK依存的に貪食作用を活性化することが明らかとなった。この結果からtA3-20__2A4__h1xはマウス骨髓由来マクロファージ細胞によるミスフォールドIgL蛋白質の貪食除去機能を活性化させることが示唆された。

配列表フリーテキスト

[0284] 配列番号1~3はそれぞれtA3-20~tA3-20.5の重鎖CDR1~3のアミノ酸配列であり、配列番号4~6はそれぞれtA3-20~tA3-20.5の軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列である。配列番号8はtA3-20~tA3-20.5の重鎖のアミノ酸配列であり、配列番号7は、配列番号8に示されるtA3-20~tA3-20.5の重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号10はtA3-20の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号9は、配列番号10に示されるtA3-20の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号12はtA3-20.1の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号11は、配列番号12に示されるtA3-20.1の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号14はtA3-20.2の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号13

は、配列番号 14 に示される t A 3 - 2 0, 2 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 16 は t A 3 - 2 0, 3 の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号 15 は、配列番号 16 に示される t A 3 - 2 0, 3 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 18 は t A 3 - 2 0, 4 の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号 17 は、配列番号 18 に示される t A 3 - 2 0, 4 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 20 は t A 3 - 2 0, 5 の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号 19 は、配列番号 20 に示される t A 3 - 2 0, 5 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 22 はヒスチジントグのアミノ酸配列であり、配列番号 21 は、配列番号 22 に示されるヒスチジントグのアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 24 は M T K 2 0 1 の重鎖のアミノ酸配列であり、配列番号 23 は、配列番号 24 に示される M T K 2 0 1 の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 26 は M T K 2 0 1 の軽鎖のアミノ酸配列であり、配列番号 25 は、配列番号 26 に示される M T K 2 0 1 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 27 ~ 29 は、それぞれ 371 M 抗体の重鎖 C D R 1 ~ 3 のアミノ酸配列であり、配列番号 30 ~ 32 はそれぞれ 371 M 抗体の軽鎖 C D R 1 ~ 3 のアミノ酸配列である。配列番号 34 はマウス型抗 M e r T K 抗体 t A 3 - 2 0, 3 の重鎖アミノ酸配列であり、配列番号 33 は配列番号 34 に示されるマウス型抗 M e r T K 抗体 t A 3 - 2 0, 3 の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 36 は、マウス型抗 M e r T K 抗体 t A 3 - 2 0, 3 の軽鎖アミノ酸配列であり、配列番号 35 は配列番号 36 に示されるマウス型 t A 3 - 2 0, 3 の軽鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号 38 はマウス第二 F c ポリペプチド及び抗 T T R - s c F v を含むポリペプチドのアミノ酸配列であり、配列番号 37 は、配列番号 38 に示されるマウス第二 F c ポリペプチド及び抗 T T R - s c F v を含むポリペプチドをコードする塩基配列である。配列番号 39 は t A 3 - 2 0 ~ t A 3 - 2 0, 5 の第一 F c ポリペプチド又は第二 F c ポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号40及び／又は41は抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体の第一Fcポリペプチド及び／又は第二Fcポリペプチドのアミノ酸配列である。配列番号42はt A 3－20～t A 3－20. 5及び抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体における抗Me r T K－F a bに連結するヒンジ領域のアミノ酸配列である。配列番号43は抗T T R－s c F vのアミノ酸配列である。配列番号44は、マウス重鎖I g G 2 aの定常領域を含む371M抗体の重鎖のアミノ酸配列であり、配列番号45は、マウス軽鎖L a m b d a 1を含む371M抗体の軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号46～55は、各種リンカーのアミノ酸配列である。配列番号57及び59は、それぞれマウスーヒトキメラ抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号56及び58は、それぞれ配列番号57及び59に示されるマウスーヒトキメラ抗Me r T K－抗I g L二重特異性抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号61はヒト抗Me r T K片腕抗体の重鎖のアミノ酸配列である。配列番号60は配列番号61に示されるヒト抗Me r T K片腕抗体の重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号63はマウスーヒトキメラ2A4の重鎖のアミノ酸配列である。配列番号62は配列番号63に示されるマウスーヒトキメラ2A4の重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号65は、マウスーヒトキメラ2A4の軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号64は配列番号65に示される2A4抗体の軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号67及び69はそれぞれM6の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列である。配列番号66及び68はそれぞれ配列番号67及び69に示されるM6の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号70は抗Me r T K－抗T T R二重特異性抗体における抗T T R－s c F vに連結するヒンジ領域のアミノ酸配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、並びに
- 配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、
- 抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項2] 以下の(1)～(6)からなる群より選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗MerTK抗体又はその抗原結合フラグメント：
- (1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (2) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (3) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (4) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；
- (5) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに
- (6) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号20のアミノ酸番号1から110

までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[請求項3] 重鎖可変領域を含む重鎖及び軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、請求項1又は2に記載の抗Me r T K抗体。

[請求項4] 重鎖にL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異（L A L A変異）（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、請求項3に記載の抗Me r T K抗体。

[請求項5] 重鎖にP 3 3 1 G変異（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、請求項3に記載の抗Me r T K抗体。

[請求項6] 重鎖にL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aのアミノ酸変異（L A L A変異）並びにP 3 3 1 G変異（ここで、前記変異位置はヒトI g γ 1定常領域におけるE Uインデックスに従うアミノ酸位置である）を含む、請求項3に記載の抗Me r T K抗体。

[請求項7] 以下の（1）～（6）からなる群より選択される、請求項6に記載の抗Me r T K抗体：

（1）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（2）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（3）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（4）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；

（5）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体；並びに

（6）配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗Me r T K抗体。

- [請求項8] IgG抗体（抗Me r T K IgG抗体）である、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗Me r T K抗体。
- [請求項9] 抗原結合フラグメントが一本鎖可変領域フラグメント（s c F v）、F a bフラグメント、F a b' フラグメント、又はF（a b'）₂フラグメントである、請求項1又は2に記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項10] 翻訳後修飾された、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項11] 請求項1～10のいずれか一項に記載の抗Me r T K抗体若しくはその抗原結合フラグメントの融合体若しくは複合体、又は請求項1～10のいずれか一項に記載の抗Me r T K抗体若しくはその抗原結合フラグメントを細胞表面に提示させた細胞。
- [請求項12] 以下の（1）～（7）からなる群より選択される、抗Me r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの重鎖可変領域又は軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド：
- （1）配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
 - （2）配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
 - （3）配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
 - （4）配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
 - （5）配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド

;

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;
及び

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。
。

[請求項13] 以下の(1)～(7)からなる群より選択される、抗MerTK抗体の重鎖又は軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド:

(1) 配列番号8のアミノ酸配列からなる重鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;

(2) 配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;

(3) 配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;

(4) 配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;

(5) 配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド;

(6) 配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド; 及び

(7) 配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

[請求項14] 請求項12又は13に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[請求項15] 請求項14に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

[請求項16] 以下の(1)～(13)からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、宿主細胞:

- (1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (2) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (8) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (9) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列

からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(10) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(11) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(12) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(13) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び、配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項17] 請求項15又は16に記載の宿主細胞を培養し、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを発現させる工程を包含する、抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントを生産する方法。

[請求項18] 請求項1～10のいずれか一項に記載の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

- [請求項19] 眼疾患の予防及び／又は治療に用いるための、請求項18に記載の医薬組成物。
- [請求項20] 眼疾患が、網膜疾患である、請求項19に記載の医薬組成物。
- [請求項21] 網膜疾患が、網膜変性疾患である、請求項20に記載の医薬組成物。
- [請求項22] 網膜変性疾患が、網膜色素変性症又は加齢黄斑変性である、請求項21に記載の医薬組成物。
- [請求項23] 眼疾患の予防及び／又は治療に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項24] 請求項1～10のいずれか一項に記載の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの治療有効量を対象に投与する工程を含む、眼疾患を予防及び／又は治療する方法。
- [請求項25] 眼疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物の製造における、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗M e r T K抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。
- [請求項26] 抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、M e r T K並びにミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する二重特異性抗体であって、
抗M e r T K抗体の重鎖可変領域が配列番号1のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号2のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号3のアミノ酸配列からなるC D R 3を含み、
抗M e r T K抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号5のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配列番号6のアミノ酸配列からなるC D R 3を含む、
二重特異性抗体。
- [請求項27] 抗M e r T K抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が以下の（1）

～（６）からなる群より選択される、請求項２６に記載の二重特異性抗体：

（１）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１０のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（２）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１２のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（３）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１４のアミノ酸番号１から１０９までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（４）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１６のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；

（５）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号１８のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域；並びに

（６）配列番号８のアミノ酸番号１から１１９までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号２０のアミノ酸番号１から１１０までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[請求項28] 抗Me r T K抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる１つのFc領域を含む片腕抗体（片腕抗Me r T K抗体）を含む、請求項２７に記載の二重特異性抗体。

[請求項29] 片腕抗Me r T K抗体の重鎖フラグメント及び軽鎖が、下記（１）～（６）からなる群より選択される、請求項２８に記載の二重特異性抗体：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(2) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(3) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(4) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖；

(5) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号18のアミノ酸配列からなる軽鎖；並びに

(6) 配列番号8のアミノ酸番号1から217までのアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント、及び配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖。

[請求項30] 片腕抗M e r T K抗体の第二F cポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介してミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むs c F v又はF a b領域のC末端が連結された、請求項29に記載の二重特異性抗体。

[請求項31] ミスフォールド蛋白質及び／又はアミロイドに結合する抗体が、ミスフォールドT T Rに結合する抗T T R抗体である、請求項26～30のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

[請求項32] 請求項31に記載の二重特異性抗体であって、
抗T T R抗体の重鎖可変領域が配列番号27のアミノ酸配列からなるC D R 1、配列番号28のアミノ酸配列からなるC D R 2、及び配

列番号29のアミノ酸配列からなるCDR3を含み、

抗TTR抗体の軽鎖可変領域が配列番号30のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号31のアミノ酸配列からなるCDR2、及び配列番号32のアミノ酸配列からなるCDR3を含む、
二重特異性抗体。

[請求項33] 抗TTR抗体の重鎖可変領域が、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であり、

抗TTR抗体の軽鎖可変領域が、配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域である、
請求項32に記載の二重特異性抗体。

[請求項34] 抗TTR抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むscFv（抗TTR-scFv）を含む、請求項33に記載の二重特異性抗体。

[請求項35] 抗TTR-scFvが配列番号43のアミノ酸配列からなる、請求項34に記載の二重特異性抗体。

[請求項36] 請求項34又は35に記載の二重特異性抗体であって、抗Me rTK抗体の重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び抗Me rTK抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドからなる1つのFc領域を含む片腕抗体（片腕抗Me rTK抗体）を含み、片腕抗Me rTK抗体の第二FcポリペプチドのN末端にヒンジ領域を介して抗TTR-scFvのC末端が連結された、二重特異性抗体。

[請求項37] L234A及びL235Aのアミノ酸変異（LALA変異）並びにP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）を含むFc領域を含む、請求項28～36のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

[請求項38] 第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドが配列番号39のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列又は配列番号39のアミノ酸配列において1～10個の置換を有するアミノ酸配

列を含む、請求項37に記載の二重特異性抗体。

[請求項39] ノブズ・イントゥー・ホールズ (k n o b s i n t o h o l e s) 変異を含むFc領域を含む、請求項38に記載の二重特異性抗体。

[請求項40] L A L A 変異、P 3 3 1 G 変異及びノブズ・イントゥー・ホールズ変異を含むFc領域を含む、請求項38に記載の二重特異性抗体。

[請求項41] ノブズ・イントゥー・ホールズ変異がFc領域を形成する1つのFcポリペプチドにおけるT 3 6 6 W変異、並びにFc領域を形成するもう1つのFcポリペプチドにおけるT 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V変異である（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）、請求項39又は40に記載の二重特異性抗体。

[請求項42] 第一Fcポリペプチド及び第二Fcポリペプチドの配列が以下の（1）又は（2）のいずれかの配列からなるポリペプチドである、請求項38に記載の二重特異性抗体：

（1）配列番号40のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号41のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド；又は

（2）配列番号41のアミノ酸配列からなる第一Fcポリペプチド、及び配列番号40のアミノ酸配列からなる第二Fcポリペプチド。

[請求項43] 配列番号42に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域及び／又は配列番号70に示されるアミノ酸配列からなるヒンジ領域を含む、請求項42に記載の二重特異性抗体。

[請求項44] 翻訳後修飾された、請求項26～43のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

[請求項45] 請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の融合体若しくは複合体、又は請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を細胞表面に提示させた細胞。

[請求項46] 請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の生産に用いる、以下の(1)～(9)からなる群より選択されるポリヌクレオチド：

(1) 配列番号8のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号10のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(3) 配列番号12のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(4) 配列番号14のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(5) 配列番号16のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(6) 配列番号18のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(7) 配列番号20のアミノ酸番号1から110までのアミノ酸配列からなる抗Me r T K抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(8) 配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(9) 配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸

配列からなる抗 T T R 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項47] 請求項 4 6 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[請求項48] 請求項 4 7 に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

[請求項49] 請求項 2 7 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の生産に用いる、以下の (1) ～ (3) からなる群より選択されるポリヌクレオチド含む、宿主細胞：

(1) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9 のアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 1 6 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0 までのアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 4 3 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9 までのアミノ酸配列からなる抗 T T R 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号 4 3 のアミノ酸番号 1 3 5 から 2 4 5 までのアミノ酸配列からなる抗 T T R 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(2) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9 のアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 1 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0 までのアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 4 3 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9 までのアミノ酸配列からなる抗 T T R 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号 4 3 のアミノ酸番号 1 3 5 から 2 4 5 までのアミノ酸配列からなる抗 T T R 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；並びに

(3) 配列番号 8 のアミノ酸番号 1 から 1 1 9 のアミノ酸配列からなる抗 M e r T K 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 2 0 のアミノ酸番号 1 から 1 1 0 までのアミ

ノ酸配列からなる抗M e r T K 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号43のアミノ酸番号1から119までのアミノ酸配列からなる抗T T R 抗体の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び配列番号43のアミノ酸番号135から245までのアミノ酸配列からなる抗T T R 抗体の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

- [請求項50] 請求項48又は49に記載の宿主細胞を培養し、M e r T K 及びT T R に結合する二重特異性抗体を発現させる工程を含む、該二重特異性抗体を生産する方法。
- [請求項51] 請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
- [請求項52] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に用いるための、請求項51に記載の医薬組成物。
- [請求項53] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患がアミロイドーシスである、請求項52に記載の医薬組成物。
- [請求項54] アミロイドーシスが全身性アミロイドーシスである、請求項53に記載の医薬組成物。
- [請求項55] 全身性アミロイドーシスがT T R 型アミロイドーシス又は多発性神経障害アミロイドーシスである、請求項54に記載の医薬組成物。
- [請求項56] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療に使用するための、請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
- [請求項57] 請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の治療有効量を対象に投与する工程を含む、ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患を予防及び／又は治療する方法。
- [請求項58] ミスフォールド蛋白質の蓄積由来の疾患の予防及び／又は治療のための医薬組成物の製造における、請求項26～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。