

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-537896

(P2017-537896A)

(43) 公表日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	Z N A	4 B 0 6 4
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22		4 C 0 8 5
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46		4 H 0 4 5
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40		
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00	C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-525022 (P2017-525022)	(71) 出願人	591003013 エフ・ホフマン-ラ・ロシュ・アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラッセ124
(86) (22) 出願日	平成27年11月6日 (2015.11.6)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月7日 (2017.7.7)	(72) 発明者	ペドゥーシャ、マルク フランス国、エフ-68220 ランシュ パッハール-オー、リュ・デ・スルス 7
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/075879	(72) 発明者	ブロイナー、セバスティアン ドイツ国、82377 ペンツベルク、ハ ーゼルベルクシュトラーセ 6
(87) 國際公開番号	W02016/075037		最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		
(31) 優先権主張番号	14192517.2		
(32) 優先日	平成26年11月10日 (2014.11.10)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】二重特異性抗体及び眼科に使用する方法

## (57) 【要約】

本明細書において、ヒトANG2、ヒトVEGF、ヒトIL-1ベータ、及びヒトPDGF-Bからなる群より選択される2種類の抗原に特異的に結合する、新規な二重特異性抗体が報告される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトIL-1ベータと、ヒトANG2、ヒトVEGF、及びヒトPDGF-Bからなる群より選択される第2の抗原とに特異的に結合し、

a )

( a ) 配列番号：02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：03のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：05のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

( a ) 配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

( a ) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む重鎖可変ドメインと、

( a ) 配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、

あるいは、

a ) 配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、

二重特異性抗体。

## 【請求項 2】

ヒトPDGF-Bと、ヒトANG2、ヒトVEGF、及びヒトIL-1ベータからなる群より選択される第2の抗原とに特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：33のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b ) ( a ) 配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：42のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：46のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c ) ( a ) 配列番号：48のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：49のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、

二重特異性抗体。

## 【請求項 3】

ヒトANG-2に更に特異的に結合し、更に、

a ) ( a ) 配列番号：57のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：58のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：60のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：62のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：63のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番

10

20

30

40

50

号：64のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は  
 b) (a)配列番号：66のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：67のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：69のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：71のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：72のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：73のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c) (a)配列番号：75のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：76のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：78のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：80のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：81のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：82のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

d) (a)配列番号：84のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：85のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：87のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：89のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：90のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：91のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、請求項1又は2記載の二重特異性抗体。  
 10

#### 【請求項4】

ヒトVEGFに更に特異的に結合し、更に、

a)配列番号：107の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3と、配列番号：108の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3とを含むか、又は

b)配列番号：109の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3と、配列番号：110の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3とを含む、請求項1又は2記載の二重特異性抗体。  
 20

#### 【請求項5】

ヒトIL-1ベータ及びヒトPDGF-Bに特異的に結合し、

-  
 a) (a)配列番号：02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：03のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：05のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

(a)配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

(a)配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む重鎖可変ドメインと、

(a)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、

あるいは、

a)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、ヒトIL-1ベータに特異的に結合する第1の結合部位と、

-

a) (a)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：31

50

30

40

50

のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び(c)配列番号：33のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b) (a)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：42のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：46のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c) (a)配列番号：48のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：49のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：51のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する第2の結合部位とを含む、10

二重特異性抗体。

#### 【請求項6】

抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。20

#### 【請求項7】

抗体が、

i) a) の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、リシン(K)、アルギニン(R)、又はヒスチジン(H)により独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)により独立して)置換されており、a) の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)により独立して置換されているか、又は30

ii) b) の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、リシン(K)、アルギニン(R)、又はヒスチジン(H)により独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)により独立して)置換されており、b) の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)により独立して置換されている、請求項6記載の抗体。

#### 【請求項8】

抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。40

#### 【請求項9】

抗体が、第1のFc領域ポリペプチド及び第2のFc領域ポリペプチドを含み、

i) 第1のFc領域ポリペプチドが、ヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、ヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、50

i i ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235Aを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235Aを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

i i i ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、P329Gを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、P329Gを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

i v ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、S354C、T366Wを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであるか、又は

v ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、P329G、S354C、T366Wを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

v i ) 第1のFc領域ポリペプチドが、ヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、ヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

v i i ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235Eを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235Eを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

v i i i ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、P329Gを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、P329Gを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

i x ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、S354C、T366Wを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであるか、又は、

x ) 第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、P329G、S354C、T366Wを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドであり、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異S228P、L235E、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチドである、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。

#### 【請求項10】

抗体が、第1のFc領域ポリペプチド及び第2のFc領域ポリペプチドを含み、

抗体が、第1のFc領域ポリペプチド及び第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせ

i ) I253A、H310A、及びH435A、又は

i i ) H310A、H433A、及びY436A、又は

i i i ) L251D、L314D、及びL432D、又は

i v ) i)～i ii)の組み合わせ

を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の抗体。

#### 【請求項11】

請求項1～10のいずれか一項記載の抗体と、場合により、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬製剤。

#### 【請求項12】

医薬として使用するための、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体。

#### 【請求項13】

医薬の製造における、請求項1～10のいずれか一項記載の抗体の使用。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 4】**

医薬が、眼血管疾患の処置、好ましくは、黄斑変性の処置のためのものである、請求項12又は13記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****[発明の分野]**

本発明は、二重特異性抗体及び、例えば、眼科にそれを使用する方法に関する。

**【0 0 0 2】****[背景]**

10

眼血管疾患、例えば、加齢黄斑変性（A M D）及び糖尿病性網膜症（D R）はそれぞれ、異常な脈絡膜又は網膜の血管新生による。これらは、先進国における失明の主因である。網膜は、ニューロン、グリア、及び血管の構成要素の十分に定義された層からなるため、比較的小さい障害、例えば、血管増殖又は浮腫に見られる障害より、視覚的機能の著しい損失がもたらされるおそれがある。遺伝性の網膜変性、例えば、網膜色素変性症（R P）も、血管異常、例えば、動脈狭窄及び血管萎縮に関連している。これらは、3,500人に1人もの数で発症し、多くの場合、完全な失明に進行する、進行性の夜盲症、視野喪失、視神経萎縮、動脈衰弱、及び視野中心の喪失により特徴付けられる。

**【0 0 0 3】**

20

うつ血性網膜症は、網膜血管構造の損失又は機能障害により特徴付けられる。同損失又は機能障害は、血流減少及び低酸素がもたらす。網膜は、低酸素に対して、新たな血管を成長させるシグナルを生じさせることにより応答するが、これらの新たな血管は、通常、脆く、無秩序である。これらの異常な新しい血管の成長により、視野に対するほとんどの脅威を作っている。この成長は、リークし、出血をもたらし、又は、瘢痕をもたらし、網膜剥離となるおそれがある。うつ血性網膜症のための現在の処置は、異常な血管の成長を停止させることに努めているが、血管成長を引き起こしている基礎となるうつ血を解決していない。さらに、多数が発症するうつ血性網膜症である糖尿病性網膜症のための標準的な処置は、新たな血管成長を停止させ、中心視野を保護するための試みにおけるレーザーによる網膜の一部の破壊に関連している。血管成長の主なプロモーターである血管内皮成長因子（V E G F）の機能を妨害する戦略が利用されている。短期間では、抗V E G F治療により、視野が改善されるが、基礎となるうつ血を解決されず、実際には、有益な側枝を含めた全ての血管成長を阻害してしまった場合、この状態を悪化させるおそれがある。また、年配及び／又は糖尿病の患者におけるこれらの薬剤の全身性曝露の重大な懸念も存在する。この場合、新たな血管成長が、うつ血性の脳、心臓、又は手足に必要となる場合がある。

30

**【0 0 0 4】**

典型的には、眼疾患について、F a b 又はF a b<sub>2</sub>などのより小型の抗体フラグメントが、多くの場合、硝子体内適用により使用される。これらのフラグメントは、短い血清半減期しか有さず、全身毒性のリスクが低いためである。しかしながら、これらより小型のフラグメントは、典型的には、（例えば、血清内でより早い拡散による）より短い硝子体内での半減期も有し、典型的には、より頻繁に投与される必要がある。

40

**【0 0 0 5】**

1つの結合アームにおいてドメイン置換／交換を有する多重特異性抗体（C r o s s M a b V H - V L）が、国際公開公報第2009/080252号及びSchaefer, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191（これらの文献は、参照により本明細書に組み入れられる）に、詳細に記載されている。これらの多重特異性抗体は、（このようなドメイン交換を伴わないアプローチと比較して）第2の抗原に対する不適当な重鎖を伴った、第1の抗原に対する軽鎖のミスマッチにより生じる副次的結果を、明らかに減少させる。しかしながら、その調製において、副次的結果を完全には無くせない。主な副次的結果は、B e n c e - J o n e s型相互作用に基づいている。Schaefer, W. et

50

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191 ; 添付の図 S 1 I ) も参照のこと。

### 【0006】

国際公開公報第 2011 / 117329 号には、二重特異性で二価の抗 VEGF / 抗 ANG2 抗体が報告されている。ヒト FcRn 結合改変抗体及び使用方法が、国際公開公報第 2014 / 177460 号に報告されている。Kienast, Y., et al. (Clin. Canc. Res. 19 (2013) 6730-6740) には、Ang-2 - VEGF - A Cross Mab が、VEGF - A 及び Ang-2 の機能を同時に妨害し、強力な抗腫瘍、抗血管新生、及び抗転移効果を媒介する、新規な二重特異性ヒト IgG1 抗体として報告されている。

10

### 【発明の概要】

### 【0007】

本発明は、新規な二重特異性抗体及びそれを使用する方法を提供する。

### 【0008】

本明細書において、ヒト ANG2 、ヒト VEGF 、ヒト IL-1 ベータ、及び PDGF - B からなる群より選択される、2 種類の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体が報告されている。

### 【0009】

一実施態様において、抗体は、抗 ANG2 / VEGF 抗体ではない。

### 【0010】

一実施態様において、抗体は、ヒト IL-1 ベータに特異的に結合し、

a )

( a ) 配列番号 : 02 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 04 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 05 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 、又は

( a ) 配列番号 : 07 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 08 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 10 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 、又は

( a ) 配列番号 : 12 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 13 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3

20

を含む重鎖可変ドメインと、

( a ) 配列番号 : 17 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 、 ( b ) 配列番号 : 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 、及び ( c ) 配列番号 : 19 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、

あるいは、

a ) 配列番号 : 21 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 22 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 24 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む重鎖可変ドメインと、 ( a ) 配列番号 : 26 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 、 ( b ) 配列番号 : 27 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 、及び ( c ) 配列番号 : 28 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

30

### 【0011】

一実施態様において、抗体は、ヒト PDGF - B に特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号 : 30 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 31 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 33 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む重鎖可変ドメインと、 ( a ) 配列番号 : 35 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 、 ( b ) 配列番号 : 36 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 、及び ( c ) 配列番号 : 37 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b ) ( a ) 配列番号 : 39 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 、 ( b ) 配列番号 : 40 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 、及び ( c ) 配列番号 : 42 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む重鎖可変ドメインと、 ( a ) 配列番号 : 44 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 、 ( b ) 配列番号 : 45 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 、及び ( c ) 配列番号 : 47 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

40

50

R - L 1、( b ) 配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：46のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c ) ( a ) 配列番号：48のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：49のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：53のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：55のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

#### 【0012】

一実施態様において、抗体は、ヒトANG2に特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号：57のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：58のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：60のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：62のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：63のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：64のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b ) ( a ) 配列番号：66のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：67のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：69のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：71のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：72のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：73のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c ) ( a ) 配列番号：75のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：76のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：78のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：80のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：81のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：82のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

d ) ( a ) 配列番号：84のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：85のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：87のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：89のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：90のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：91のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

#### 【0013】

一実施態様において、抗体は、ヒトVEGFに特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号：93のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：94のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：96のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：97のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：98のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：99のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b ) ( a ) 配列番号：101のアミノ酸配列を含むHVR - H 1、( b ) 配列番号：102のアミノ酸配列を含むHVR - H 2、及び( c ) 配列番号：104のアミノ酸配列を含むHVR - H 3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：106のアミノ酸配列を含むHVR - L 1、( b ) 配列番号：107のアミノ酸配列を含むHVR - L 2、及び( c ) 配列番号：108のアミノ酸配列を含むHVR - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

#### 【0014】

一実施態様において、抗体は、

a ) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b ) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である。

#### 【0015】

好みしい一実施態様では、抗体は、

10

20

30

40

50

i ) a ) の第1の軽鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位におけるアミノ酸( K a b a t に従ってナンバリング)が、リシン( K )、アルギニン( R )、又はヒスチジン( H )により独立して(好ましい一実施態様では、リシン( K )又はアルギニン( R )により独立して)置換されており、a ) の第1の重鎖の定常ドメインC H 1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸( E )又はアスパラギン酸( D )により独立して置換されているか、又は

i i ) b ) の第2の軽鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位におけるアミノ酸( K a b a t に従ってナンバリング)が、リシン( K )、アルギニン( R )、又はヒスチジン( H )により独立して(好ましい一実施態様では、リシン( K )又はアルギニン( R )により独立して)置換されており、b ) の第2の重鎖の定常ドメインC H 1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸( E )又はアスパラギン酸( D )により独立して置換されている。

#### 【0016】

一実施態様において、抗体は、

a ) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、  
b ) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインC L及びC H 1が、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である。

#### 【0017】

一実施態様において、抗体は、第1のF c 領域ポリペプチドと第2のF c 領域ポリペプチドとを含み、

i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、ヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、ヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 Aを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 Aを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 Gを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 Gを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i v ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vを有するヒトI g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、ヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、ヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異S 2 2 8 P、L 2 3 5 Eを有するヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異S 2 2 8 P、L 2 3 5 Eを有するヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i i i ) 第1のF c 領域ポリペプチドが、突然変異S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 Gを有するヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第2のF c 領域ポリペプチドが、突然変異S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 Gを有するヒトI g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

10

20

30

40

50

i x ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

x ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドである。

#### 【 0 0 1 8 】

— 実施態様において、抗体は、第 1 の F c 領域ポリペプチドと第 2 の F c 領域ポリペプチドとを含み、

抗体は、第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせ

i ) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及び H 4 3 5 A、又は

i i ) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及び Y 4 3 6 A、又は

i i i ) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及び L 4 3 2 D、又は

i v ) i ) ~ i i i ) の組み合わせ

を含む。

#### 【 0 0 1 9 】

本明細書で報告された一態様は、本明細書で報告された抗体と、場合により、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬製剤である。

#### 【 0 0 2 0 】

本明細書で報告された一態様は、医薬として使用するための、本明細書で報告された抗体である。

#### 【 0 0 2 1 】

本明細書で報告された一態様は、医薬の製造における、本明細書で報告された抗体の使用である。

#### 【 0 0 2 2 】

— 実施態様において、医薬は、眼血管疾患の処置のためのもの、好ましくは、黄斑変性の処置のためのものである。

#### 【 0 0 2 3 】

#### [ 本発明の実施態様の詳細な説明 ]

##### I . 定義

本明細書における目的で、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義されているヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク由来の軽鎖可変ドメイン (VL) フレームワーク又は重鎖可変ドメイン (VH) フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含んでもよいし、又は、同フレームワークは、アミノ酸配列の変化を含有してもよい。一部の実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。一部の実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して同一の配列である。

#### 【 0 0 2 4 】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の1つの結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間における非共有的相互作用の総計強度を意味する。特に断りない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対メンバー（例えば、抗体と抗原）間ににおける1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を意味する。分子XとそのパートナーYとの親和性は、一般的には、解離定数 ( $k_d$ ) により表現することができる。親和

10

20

30

40

50

性は、本明細書に記載されているものを含めて、当技術分野において公知の一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な実例となり、かつ、例示的な実施態様は、以下に記載されている。

#### 【0025】

「親和性成熟」抗体は、変化を有さない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）において、1つ以上の変化を有する抗体を意味する。このような変化は、抗原に対する抗体の親和性における改善をもたらす。

#### 【0026】

「抗IL-1ベータ抗体」及び「IL-1ベータに結合する抗体」という用語は、IL-1ベータに十分な親和性を有して結合可能な抗体を意味する。このため、該抗体は、IL-1ベータをターゲットとする診断剤及び/又は治療剤として有用である。一実施態様において、関連しない非IL-1ベータタンパク質に対する抗IL-1ベータ抗体の結合の度合いは、例えば、ELISA又は表面プラズモン共鳴により測定された場合、IL-1ベータに対する抗体の結合性の約10%未満である。特定の実施態様では、IL-1ベータに結合する抗体は、1μM以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下、又は0.1nM以下（例えば、10<sup>-8</sup>M以下、例えば、10<sup>-8</sup>M～10<sup>-10</sup>M、例えば、10<sup>-9</sup>M～10<sup>-10</sup>M）の解離定数（KD）を有する。特定の実施態様では、抗IL-1ベータ抗体は、異なる種からのIL-1ベータ間で保存されているIL-1ベータのエピトープに結合する。

10

#### 【0027】

本明細書において、「抗体」という用語は、最も広い意味に使用され、種々の抗体構造を包含し、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び、所望の抗原結合活性を示す限りにおいて抗体フラグメントを含むが、これらに限定されない。

20

#### 【0028】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を意味する。抗体フラグメントの例は、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；ダイアボディ；直線抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0029】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、参照抗体と少なくとも同じアミノ酸残基と相互作用を有する抗体を意味する。これらの相互作用は、例えば、荷電アミノ酸残基間のイオン性相互作用、又は、疎水性アミノ酸残基間の疎水性相互作用である。

#### 【0030】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定のソース又は種に由来し、一方、重鎖及び/又は軽鎖の残り部分が、異なるソース又は種に由来する抗体を意味する。

#### 【0031】

抗体の「クラス」は、その重鎖により保有されている定常ドメイン又は定常領域の種類を意味する。5つの主なクラスの抗体：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>に更に分割することができる。種々のクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、γ、δ、ε、α、及びμと呼ばれる。

40

#### 【0032】

「免疫コンジュゲート」という用語は、抗体と非抗体部分との間の共有コンジュゲートを意味する。このような非抗体部分は、検出可能なラベル、エフェクター分子、又は細胞毒剤であることができる。

#### 【0033】

50

本明細書で使用する場合、「細胞毒剤」という用語は、細胞機能を阻害するかもしくは妨害し、及び／又は、細胞の死もしくは障害を引き起こす物質を意味する。細胞毒剤は、放射性同位体（例えば、 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 、及び $\text{Lu}$ の放射性同位体）；化学療法剤もしくは薬物（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド、（ビンクリスチン、ビンプラスチニン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシン、又は他の挿入剤）；成長阻害剤；酵素およびそのフラグメント、例えば、核酸分解酵素；抗生物質；細菌、真菌、植物、もしくは動物起源のトキシン、例えば、小分子トキシンもしくは酵素活性トキシン（そのフラグメント及び／もしくは変異体を含む）；ならびに、以下に開示された種々の抗腫瘍もしくは抗癌剤を含む、これらに限定されない。

10

## 【0034】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因する、それらの生物学的活性を意味する。同Fc領域は、抗体クラスにより変化する。抗体のエフェクター機能の例としては、C1q結合性及び補体依存性細胞毒性（CDC）；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）；食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンリギュレーション；及びB細胞活性化を含む。

20

## 【0035】

薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、必要な用量及び期間において、所望の治療的又は予防的結果を達成するのに有用な量を意味する。

## 【0036】

本明細書において、「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するのに使用される。この用語は、ネイティブな配列のFc領域及び変異型のFc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端に広がっている。ただし、Fc領域のC末端リシン（Lys447）又はC末端グリシン-リシンジペプチド（Gly446Lys447）は、存在してもよいし、又は、存在しなくてもよい。本明細書において特に断りない限り、Fc領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されており、EUインデックスとも呼ばれる、EUナンバリングシステムに従う。

30

## 【0037】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を意味する。可変ドメインのFRは、一般的には、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般的には、VH（又はVL）における下記配列：FR1 - H1（L1）- FR2 - H2（L2）- FR3 - H3（L3）- FR4で表される。

## 【0038】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、ネイティブな抗体構造と実質的に同じ構造を有するか、又は、本明細書で定義されたFc領域を含有する重鎖を有する抗体を意味するのに、本明細書において互換的に使用される。

40

## 【0039】

「ホスト細胞」、「ホスト細胞株」、及び「ホスト細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入されている細胞を意味し、このような細胞の子孫を含む。ホスト細胞は、「トランスフォーマント」及び「トランスフォーメーションされた細胞」を含む。トランスフォーメーションされた細胞は、初代のトランスフォーメーションされた細胞と、継代回数に関わらずそれ由来の子孫とを含む。子孫は、核酸含量において、親細胞と完全に同一でなくともよく、突然変異を含有してもよい。元のトランスフォーメーションされた細胞についてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生体活性を

50

有する突然変異子孫は、本明細書に含まれる。

【0040】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により生成された抗体のアミノ酸配列に対応するか、又は、ヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒトソースから得られたアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を、具体的に除外している。

【0041】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選択において、最も一般的に出現するアミノ酸残基を表現するフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列の選択は、サブグループの可変ドメイン配列からである。一般的には、サブグループの配列は、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3におけるのと同じサブグループである。一実施態様において、V Lについて、サブグループは、前記Kabat et al., におけるのと同じサブグループカッパIである。一実施態様において、V Hについて、サブグループは、前記Kabat et al., におけるのと同じサブグループカッパIIである。

10

【0042】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基と、ヒトFR由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を意味する。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むであろう。その中で、HVR(例えば、CDR)の全部又は実質的に全部が、非ヒト抗体のそれらに対応し、FRの全部又は実質的に全部が、ヒト抗体のそれらに対応する。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含むことができる。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を意味する。

20

【0043】

本明細書で使用する場合、「超可変領域」又は「HVR」という用語は、配列において超可変性であり(「相補性決定領域」又は「CDR」)、及び/又は、構造的に規定されたループ(「超可変ループ」)を形成し、及び/又は、抗原接触残基(「抗原コンタクト」)を含有する、抗体の可変ドメインの各領域を意味する。一般的には、抗体は、6つのHVR; VHに3つ(H1、H2、H3)及びVLに3つ(L1、L2、L3)を含む。

30

【0044】

本明細書において、HVRは、

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

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

40

(c) アミノ酸残基27c~36(L1)、46~55(L2)、89~96(L3)、30~35b(H1)、47~58(H2)、及び93~101(H3)において生じる抗原コンタクト(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))と、

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

含む。

【0045】

特に断りない限り、可変ドメイン中のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は

50

、本明細書において、前記Kabat et al., に従ってナンバリングされる。

【0046】

「免疫コンジュゲート」は、1つ以上の異種分子にコンジュゲートした抗体である。

【0047】

「個体」又は「対象」は、哺乳類である。哺乳類は、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、靈長類（例えば、ヒト及び非ヒト靈長類、例えば、サル）、ウサギ、ならびにげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含むがこれらに限定されない。特定の実施態様では、個体又は対象は、ヒトである。

【0048】

「単離された抗体」は、その本来の環境の成分から分離されているものである。一部の実施態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換もしくは逆相HPLC）により決定された場合、95%又は99%より高い純度に精製される。抗体純度を評価するため方法のレビューについては、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照のこと。

10

【0049】

「単離された核酸」は、その本来の環境の成分から分離されている核酸分子を意味する。単離された核酸は、核酸分子を通常含有する細胞中に含有されるが、この核酸分子が、染色体外又はその本来の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

20

【0050】

抗IL-1ベータ抗体をコードする単離された核酸」は、抗体重鎖及び軽鎖（又は、それらのフラグメント）をコードする1つ以上の核酸分子を意味し、1つのベクター又は別箇のベクター中のこのような核酸分子およびホスト細胞中の1つ以上の位置に存在するこのような核酸分子を含む。

【0051】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味する。すなわち、この集団に含まれる個々の抗体は、自然発生的に生じる突然変異を含有し、又は、モノクローナル抗体調製物の產生中に生じる可能性ある変異型抗体を除いて、同一であり、及び／又は、同じエピトープに結合する。このような変異体は、一般的には、少量しか存在しない。種々の決定因子（エピトープ）に対する種々の抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定因子を対象にする。このため、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とすると解釈されるものではない。例えば、本発明に基づいて使用されるモノクローナル抗体は、各種の技術により調製することができる。同技術は、ハイブリドーマ法、リコンビナントDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリンローカスの全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない。モノクローナル抗体を調製するためのこのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

30

【0052】

「ネイキッドな抗体」は、異種部分（例えば、細胞毒部分）又は放射性ラベルにコンジュゲートしていない抗体を意味する。ネイキッドな抗体は、医薬製剤中に存在することができる。

40

【0053】

「ネイティブな抗体」は、変化する構造を有する、天然の免疫グロブリン分子を意味する。例えば、ネイティブなIgG抗体は、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合している、2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖とから構成される。N末端からC末端にかけて、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続けて、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端にかけて、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイ

50

ン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（V L）、続けて、定常軽鎖（C L）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ $\kappa$ ）及びラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる2種類の内の1つに割り当てることができる。

#### 【0054】

「添付文書」という用語は、治療剤製品の商業的な梱包に習慣的に含まれる説明書を意味するのに使用され、適用症、用途、用量、投与、組み合わせ治療、禁忌、及び／又はこのような治療剤製品の使用に関する警告についての情報を含有する。

#### 【0055】

参照ポリペプチド配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列同一性の一部として保存的置換を何ら考慮せずに、配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入して、最大のパーセント同一性を達成した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的でのアライメントは、当業者の範囲内にある種々の方法で、例えば、公衆に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegaalign (DNASTAR) ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、配列をアライメントするための適切なパラメータを決定することができる。同パラメータは、比較される配列の全長に対する最大アライメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む。ただし、本明細書の目的で、% アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムであるALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc., により作製され、ソースコードは、U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559にユーザ文書としてファイルされており、同ソースコードは、著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公衆に利用可能であり、又は、ソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIX (登録商標) オペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定されており、変更しない。

10

20

30

40

#### 【0056】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に利用される状況において、所定のアミノ酸配列Bに対する、同配列Bと共に、又は、同配列Bに対する、所定のアミノ酸配列Aの% アミノ酸配列同一性（% アミノ酸配列同一性は、所定のアミノ酸配列Bに対する、同配列Bと共に、又は、同配列Bに対する、特定の% アミノ酸配列同一性を有する又は含む所定のアミノ酸配列Aとして代替的に表現することができる）は、下記のように算出される。

$$100 \times \frac{X}{Y}$$

#### 【0057】

式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2により、A及びBのそのプログラムアライメントにおいて、同一マッチとしてスコアされたアミノ酸残基数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合には、Bに対するAの% アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの% アミノ酸配列同一性と等しくないであろうことを理解されたい。特に断りない限り、本明細書において使用される全ての% アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載されているように得られる。

#### 【0058】

「医薬製剤」という用語は、有効であるようにそれに含有される活性成分の生物学的活性を可能にするような形態にあり、この製剤が投与されるであろう対象に許容できない毒性を有する更なる成分を含有しない調製物を意味する。

#### 【0059】

「薬学的に許容し得る担体」は、活性成分以外の医薬製剤中の成分を意味し、対象に対して毒性を有さない。薬学的に許容し得る担体は、バッファー、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含むが、これらに限定されない。

50

## 【0060】

本明細書で使用する場合、「IL-1ベータ」という用語は、ヒトIL-1ベータを意味する。この用語は、「全長」の非加工IL-1ベータ及び細胞中の処理により生じる任意の形態のIL-1ベータを包含する。また、この用語は、IL-1ベータの天然の変異体、例えば、スプライス変異体又はアレル変異体も包含する。ヒトIL-1ベータのアミノ酸配列は、配列番号：92に示される。

## 【0061】

本明細書で使用する場合、「処置」(及びその文法上のバリエーション、例えば、「処置する」又は「処置すること」)は、処置される個体の本来の経過を変化させる試みにおける臨床的介在を意味し、予防又は臨床病理の経過中のいずれかにおいて行うことができる。処置の望ましい効果は、疾患の発生又は再発を予防すること、兆候の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減弱、転移の予防、疾患の進展速度の低下、疾患状態の改善又は寛解、及び緩和又は改善された予後を含むが、これらに限定されない。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾患の進行を遅延させ、又は、疾患の進展を遅れさせるのに使用される。

10

## 【0062】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原に抗体を結合させるのに関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを意味する。ネイティブな抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は、一般的には、4つの保存フレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(HVR)とを含む各ドメインを有する類似構造を有する(例えば、Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと)。1つのVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であることができる。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、相補なVL又はVHドメインそれぞれのライブラリをスクリーニングするための抗原に結合する抗体からのVH又はVLドメインを使用して単離することができる(例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照のこと)。

20

## 【0063】

本明細書で使用する場合、「ベクター」という用語は、それが連結している別の核酸を伝播可能な核酸分子を意味する。この用語は、自己複製核酸構築物としてのベクターと、それが導入されるホスト細胞のゲノム内に組み込まれるベクターとを含む。特定のベクターは、それらが操作可能に連結している核酸の発現に向けさせることができる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。

30

## 【0064】

## I I . 組成物及び方法

本明細書において、(ヒト)ANG2、(ヒト)VEGF、(ヒト)IL-1ベータ、及び(ヒトPDGF-B)からなる群より選択される種々の抗原に特異的に結合する新規な二重特異性抗体が報告される。この場合、本抗体は、抗ANG2/VEGF二重特異性抗体ではない。本発明の抗体は、例えば、眼血管疾患、例えば、黄斑変性の処置に有用である。

40

## 【0065】

## A . 例示的な抗体

A . 1 本明細書で報告された二重特異性抗体の抗IL-1ベータ結合部位を得ることができる抗IL-1ベータ抗体

本明細書において、4つの新規な抗ヒトIL-1ベータ抗体が提供される。

## 【0066】

第1の抗ヒトIL-1ベータ抗体は、配列番号：20のVHと配列番号：25のVLとを有する、新規なマウス抗ヒトIL-1ベータ抗体である。この抗体は、以下、IL-1ベータ-mumAbと呼ばれる。この抗体は、ヒト、カニクイザル、ウサギ、及びマウスのIL-1ベータに結合し、IL-1ベータとヒトIL-1レセプターI及びIIとの間

50

の相互作用を阻害する。

【0067】

この抗体は、下記特性を有する。

【0068】

【表1】

ヒトIL-1ベータに対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
IL-1ベータ-mumAb	1.12	0.75	0.07

【0069】

10

【表2】

カニクイザルIL-1ベータに対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
IL-1ベータ-mumAb	1.15	0.95	0.08

【0070】

20

【表3】

マウスIL-1ベータに対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
IL-1ベータ-mumAb	2.47	12.2	0.49
ゲボキズマブ	2.48	5.35	0.22

【0071】

【表4】

ラットIL-1ベータに対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
IL-1ベータ-mumAb	2.04	6.36	0.31
ゲボキズマブ	2.79	0.20	0.007

30

【0072】

【表5】

ウサギIL-1ベータに対する結合性	KD [nM]
mumAb (配列番号：9及び10)	1.4
ゲボキズマブ	n.a.

上記データは、BIAcoreにより決定された。

40

【0073】

【表6】

IL-1ベータの起源	EC <sub>50</sub> [ng/mL]	EC <sub>50</sub> (MWC 150kDa に基づく) [10 <sup>-10</sup> M]	実施例
ヒト1	34.02	2.27	4 変異体1
ヒト2	15.16	1.01	4 変異体2
マウス	23.07	1.54	6
カニクイザル	21.27	1.42	5

10

上記データは、ELISAにより決定された。

【0074】

【表7】

IL-1レセプターI及びIIに対するIL-1ベータの結合阻害：

	IC <sub>50</sub> [ng/mL]	IC <sub>50</sub> (MWC 150kDaに基づく) [10 <sup>-9</sup> M]	実施例
IL-1ベータレセプターI	230.9	1.54	7
IL-1ベータレセプターII	132.4	0.88	8

20

上記データは、ELISAにより決定された。

【0075】

30

刺激実験において、本明細書で報告されたマウス抗体は、A549細胞のIL-1刺激に基づくICAM-1発現を阻害することができることを示すことができた（以下の表を参照のこと）。

【0076】

【表8】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
IL-1ベータ-mumAb	0.7

40

【0077】

下記表に、HUVVEC細胞のIL-1ベータ刺激に基づくICAM-1発現阻害についてのIC<sub>50</sub>値が示される。

【0078】

【表9】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
IL-1ベータ-mumAb	16.50

50

【0079】

刺激実験において、本明細書で報告されたヒト化抗体は、A549細胞のIL-1ベー

タ刺激に基づくIL-6発現を低下させることを示すことができた（以下の表を参照のこと）。

【0080】

【表10】

抗体	EC <sub>50</sub> [nM]
IL-1ベータ-mumAb	1.09

【0081】

加えて、マウス抗体は、ストレス試験において安定性を示した。結合活性は、表面プラズモン共鳴を使用して決定されている（以下の表を参照のこと）。 10

【0082】

【表11】

抗体	相対結合活性	
	37°C、pH 7.5で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
IL-1ベータ-mumAb	103 %	102 %

100% = -80°Cで保存されたサンプル

20

【0083】

同じ安定性は、高分子量含量が決定された際に見ることができる（以下の表を参照のこと）。

【0084】

【表12】

抗体	高分子量の割合		
	開始	37°C、pH 7.4で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
IL-1ベータ-mumAb	0.97 %	1.24 %	1.00 %

30

【0085】

同じ安定性は、CE-SDS分析において見ることができる（以下の表を参照のこと）。

【0086】

【表13】

抗体	相対面積%		
	開始	37°C、pH 7.4で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
IL-1ベータ-mumAb	91.9 %	86.5 %	90.0 %

40

【0087】

マウス抗体の熱安定性は、凝集開始温度（T<sub>agg</sub>）及び融解温度（T<sub>m</sub>）を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

【0088】

## 【表14】

抗体	Tagg [°C]	Tm [°C]
I L - 1 ベータ - m u m A b	約 6 0	約 6 4

## 【0089】

他の3つの抗体は、マウス抗 I L - 1 ベータ抗体 H 3 4 のヒト化変異体：h u H 3 4 - 1（配列番号：0 1 ~ 0 5 及び 1 6）、h u H 3 4 - 2（配列番号：0 6 ~ 1 0 及び 1 6）及び h u H 3 4 - 3（配列番号：1 1 ~ 1 6）である。

## 【0090】

本明細書において、ヒト化抗 I L - 1 ベータ抗体が報告される。この抗体は、マウス抗 I L - 1 ベータ抗体 H 3 4 から得られる。

## 【0091】

マウス H 3 4 抗体のアミノ酸配列に基づいて、対応するヒト化抗 I L - 1 抗体が生成された（h u H 3 4 - 2）。このヒト化変異体の V H は、ヒト V B a s e \_ V H 1 \_ 1 及びヒト I G H J 4 - 0 1 - 3 生殖系の J - エレメント（h u H 3 4 - 1）に基づいている。親和性を回復させるために、1つの逆突然変異が、フレームワーク領域2の4 8位に導入された（M 4 8 I）。フレームワーク領域中の3、4か所：V 6 7 A、M 6 9 F、R 7 1 V、及び A 9 3 V が逆突然変異された。加えて、H V R - H 2 の 5 2 a 位におけるシステインが、セリンに置き換えられた。V L について、ヒト化変異体は、I G K J 2 - 0 1

J - エレメントを有するヒト I M G T \_ h V K \_ 3 \_ 1 1 生殖系に基づいている。1つの逆突然変異が、フレームワーク領域2の3 6位に導入された（Y 3 6 S）。ヒト化 V H のアミノ酸配列は、配列番号：0 4 に示される。ヒト化 V L のアミノ酸配列は、配列番号：0 6 に示される。

## 【0092】

マウス抗 I L - 1 ベータ抗体 H 3 4 は、大規模に製造することができる治療候補としての開発のために除去される必要がある H V R - H 2 におけるシステイン（C 5 2 a、K a b a t ナンパリング）を含有する。マウス抗体中のこの C y s を C 5 2 a S 突然変異により除去することにより、約 6 ~ 7 倍の I L - 1 ベータに対する低下した親和性がもたらされる（以下の表を参照のこと）。

## 【0093】

## 【表15】

ヒト I L - 1 ベータ抗体に対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
H 3 4	1.85	1.27	0.07
H 3 4 + C 5 2 a S 変異	1.60	6.45	0.40
カニクイザル I L - 1 ベータ抗体に対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
H 3 4	1.99	0.98	0.05
H 3 4 + C 5 2 a S 変異	1.43	7.28	0.51

上記データは、BIAcore により決定された。

## 【0094】

H 3 4 のヒト化版（h u H 3 4 - 2）について、C 5 2 a S 突然変異に基づく親和性の損失は補償される。この抗体は、マウス親抗体 H 3 4 と同等の親和性（及び、細胞アッセイ法における同等の機能活性）を有する。

## 【0095】

この補償効果は、ヒト化に選択された生殖系配列及びフレームワーク I G H J 4 - 0 1 - 3 及び I M G T \_ h V K \_ 3 \_ 1 1 内の逆突然変異の選択に説明できる。更なる変異体

10

20

30

40

50

が、V H ( I G H J 4 - 0 1 - 3 ) 及び V L ( I M G T \_ h V K \_ 3 \_ 1 1 ) それぞれについて、同じヒト生殖系に基づいて設計された。h u H 3 4 - 2 について記載された逆突然変異は、V H 及び V L 配列（配列番号：7 及び 8）から省略された。

## 【0096】

【表16】

ヒト I L - 1 ベータ抗体に対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
H 3 4	1.85	1.27	0.07
H 3 4 + C 5 2 a S 変異	1.60	6.45	0.40
h u H 3 4 - 1	1.49	15.1	1.02
h u H 3 4 - 2	1.93	1.10	0.06
h u H 3 4 - 2 F A B	1.81	1.11	0.06
h u H 3 4 - 3	1.97	3.02	0.15
ゲボキズマブ	3.01	0.52	0.02
カナキヌマブ	2.78	0.52	0.02
カニクイザル I L - 1 ベータ抗体に対する結合性	ka [1/Ms * 10 <sup>6</sup> ]	kd [1/s * 10 <sup>-4</sup> ]	KD [nM]
H 3 4	1.99	0.98	0.05
H 3 4 + C 5 2 a S 変異	1.43	7.28	0.51
h u H 3 4 - 1	1.61	21.2	1.31
h u H 3 4 - 2	2.20	1.18	0.05
h u H 3 4 - 3	2.21	4.91	0.22
ゲボキズマブ	3.21	0.67	0.02
カナキヌマブ	2.15	284	13.2

上記データは、BIAcore により決定された。

## 【0097】

— 実施態様において、ヒト化抗 I L - 1 ベータ抗体は、ヒト及びカニクイザルの I L - 1 ベータに結合する。

## 【0098】

ヒト I L - 1 ベータの存在下において、表面プラズモン共鳴実験における結合シグナルは、ゲボキズマブから大きくなっている。このため、抗体に結合した I L - 1 b は、I L - 1 レセプター I に結合したままである。したがって、ゲボキズマブについての作用方式は、I L - 1 R A c 結合のアロステリック阻害である（アロステリック抗体）。

## 【0099】

カナキヌマブについては、I L - 1 レセプター I に対する H 3 4 及び m u m A b の I L - 1 ベータ結合は、抗体結合後に妨害される。このため、カナキヌマブ、H 3 4 、及び m u m A b についての作用方式は、レセプターブロッキングである（競合的抗体）。

## 【0100】

【表17】

抗体	@ 10 nM I L - 1 ベータの存在下における I C <sub>50</sub> [nM]
カナキヌマブ	1.6
m u m A b	2.5
H 3 4	3.5

## 【0101】

10

20

30

40

50

刺激実験において、本明細書で報告されたヒト化抗体は、マウス親抗体と同じ活性を有することを示すことができた。下記表に、A549細胞のIL-1ベータ刺激に基づくICAM-1発現阻害についてのIC<sub>50</sub>値が、種々の抗体について示される。

## 【0102】

【表18】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H34	0.18
huH34-1	>7
huH34-2	0.23
huH34-3	2.23
ゲボキズマブ	0.94
カナキヌマブ	0.31

10

## 【0103】

下記表に、HUVCE細胞のIL-1ベータ刺激に基づくICAM-1発現阻害についてのIC<sub>50</sub>が示される。

【表19】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H34	0.24
huH34-2	0.30
カナキヌマブ	9.02

20

## 【0104】

刺激実験において、本明細書で報告されたヒト化抗体が、A549細胞のIL-1ベータ刺激に基づくIL-6発現を低下させることを示すことができた（以下の表を参照のこと）。

## 【0105】

【表20】

抗体	EC <sub>50</sub> [nM]
huH34-1	5.52
huH34-2	0.11
huH34-3	1.09
ゲボキズマブ	0.11
カナキヌマブ	0.12

30

## 【0106】

増殖阻害実験において、本明細書で報告されたヒト化抗体が、D10細胞の増殖を阻害することを示すことができた（以下の表を参照のこと）。

## 【0107】

【表21】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
huH34-2	0.83
ゲボキズマブ	3.36
カナキヌマブ	1.99

40

50

## 【0108】

下記表に、THP1細胞のMSU刺激に基づくTNFアルファ発現阻害についてのIC<sub>50</sub>値が、種々の抗体について示される。

## 【0109】

## 【表22】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H34	0.43
huH34-2	2.38
カナキヌマブ	0.41

10

## 【0110】

加えて、ヒト化抗体は、マウスH34親抗体と比較して、ストレス試験において、改善された安定性を示す。結合活性は、表面プラズモン共鳴を使用して決定されている（以下の表を参照のこと）。

## 【0111】

## 【表23】

抗体	相対結合活性	
	37°C、pH7.4で 2週間	40°C、pH6.0で 2週間
H34	70%	101%
huH34-1	96%	99%
huH34-2	94%	99%
huH34-3	96%	100%

20

100% = -80°Cで保存されたサンプル

## 【0112】

同じ安定性は、高分子量含量が決定された際に見ることができる（以下の表を参照のこと）。

30

## 【0113】

## 【表24】

抗体	高分子量の割合		
	開始	37°C、pH7.4で 2週間	40°C、pH6.0で 2週間
huH34-1	4.57%	4.13%	4.39%
huH34-2	0.21%	0.15%	0.13%
huH34-3	0.19%	0.17%	0.13%

40

## 【0114】

同じ安定性は、CE-SDS分析において見ることができる（以下の表を参照のこと）。

## 【0115】

## 【表25】

抗体	相対面積%		
	開始	37°C、pH 7.4で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
h u H 3 4 - 1	96.1 %	92.9 %	93.8 %
h u H 3 4 - 2	96.4 %	92.5 %	95.2 %
h u H 3 4 - 3	96.0 %	92.1 %	95.1 %

## 【0116】

10

種々のヒト化抗体の熱安定性は、凝集開始温度（Tagg）及び融解温度（Tm）を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

## 【0117】

## 【表26】

抗体	Tagg [°C]	Tm [°C]
h u H 3 4 - 1	61.5	69.1
h u H 3 4 - 2	63.0	72.0
h u H 3 4 - 3	63.0	70.6

## 【0118】

20

ヒトIL-1ベータに結合したh u H 3 4 - 2 Fabフラグメントの高解像結晶構造は、この抗体の機能的なエピトープにおける詳細な情報を示した。この構造は、IL-1シグナル伝達複合体（IL-1レセプター1に結合したヒトIL-1b、IL-1R1、及びIL-1アクセサリータンパク質であるIL-1RAcP、PDBコード4DEP）の三元構造と比較された。h u H 3 4 のエピトープが、IL-1R1及びIL-1RAcPの両方の相互作用部位と重複していることが見出された。このため、この抗体は、IL-1ベータとIL-1R1とが会合する、その構築の第1工程において、IL-1ベータシグナル伝達複合体の形成を妨害する。

## 【0119】

抗体0031は、IL-1ベータ結合特異性として、h u H 3 4 - 2 のVH及びVLドメインを含む、二重特異性抗ANG2/IL-1ベータ抗体である。

30

## 【0120】

抗体0032は、IL-1ベータ結合特異性として、h u H 3 4 - 2 のVH及びVLドメインを含む、二重特異性抗VEGF/IL-1ベータ抗体である。

## 【0121】

動力学結合値の決定のために、実施例52に報告されたアッセイ法が使用された。

## 【0122】

## 【表27】

ANG2	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
抗体0031	1.45E+05	1.15E-03	8	604

40

## 【0123】

## 【表28】

VEGF	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
抗体0032	2.77E+04	<1E-06	<0.1	-

## 【0124】

## 【表29】

I L - 1 ベータ	$k_a$ [1/Ms]	$k_d$ [1/s]	$KD^*$ [nM]	t1/2 [秒]
h u H 3 4 - 2 二価	2.43E+06	1.15E-04	0.05	101
抗体 0 0 3 1	2.56E+06	3.02E-04	0.12	38
抗体 0 0 3 2	2.49E+06	3.05E-04	0.12	38

## 【0125】

全ての二重特異性抗体が、その抗原両方に同時に結合する特性を有することが、S P R 分析により示されている。 10

## 【0126】

ANG 2 特異性 p T i e 2 - E L I S Aにおいて、抗体 0 0 3 1 は、国際公開公報第 2 0 1 4 / 0 9 4 6 5 号に報告された抗 ANG 2 / V E G F 抗体より、6 倍活性である。

## 【0127】

一実施態様において、ヒト化抗 I L - 1 ベータ抗体は、ヒト及びカニクイザル I L - 1 ベータに結合する。

## 【0128】

下記表に、A 5 4 9 細胞の I L - 1 ベータ刺激に基づく I C A M - 1 発現阻害についての I C<sub>50</sub> 値が示される。 20

## 【0129】

## 【表30】

抗体	I C <sub>50</sub> [ng/mL]
抗体 0 0 3 1	103.9
ゲボキズマブ	204.4

## 【0130】

下記表に、H U V E C 細胞の I L - 1 ベータ刺激に基づく I C A M - 1 発現阻害についての I C<sub>50</sub> 値が示される。 30

## 【0131】

## 【表31】

抗体	I C <sub>50</sub> [ng/mL]
h u H 3 4 - 2	1.2-0.9
h u H 3 4 - 2 F a b	1.1-2.5
抗体 0 0 3 1	2.0-5.5
抗体 0 0 3 2	3.5-6.3

## 【0132】

刺激実験において、本明細書で報告されたヒト化抗体が、A 5 4 9 細胞の I L - 1 ベータ刺激に基づく I L - 6 発現を低下させることを示すことができた（以下の表を参照のこと）。

## 【0133】

## 【表32】

抗体	EC <sub>50</sub> [ng/mL]
抗体0031	17.0
抗体0032	38.7
ゲボキズマブ	62.0
カナキヌマブ	86.4

## 【0134】

10

種々の二重特異性抗体の熱安定性は、凝集開始温度（T<sub>agg</sub>）及び融解温度（T<sub>m</sub>）を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

## 【0135】

## 【表33】

抗体	T <sub>agg</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]
0031	61	67.5
0032	55	62.5

## 【0136】

20

配列番号：06～10及び16（結合部位、HVR、VH、VL）の配列を有する抗体huH34-2が記載されている。二重特異性フォーマットの抗体huH34-2が、配列番号：102～103及び182～189の配列に記載されている。これらの配列は全て、本発明の単独及び組み合わせの態様を構成する。

## 【0137】

20

好ましい一実施態様では、抗IL-1ベータ抗体は、（a）配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、この抗体は、（d）配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

## 【0138】

30

好ましい一実施態様では、抗体は、配列番号：06及び配列番号：16それぞれにおけるVH及びVL配列を含み、同VH及びVL配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

## 【0139】

好ましい一実施態様では、抗ヒトIL-1ベータ抗体は、ヒト及びカニクイザルのIL-1ベータに特異的に結合し、（a）配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。好ましい一実施態様では、抗ヒトIL-1ベータ抗体は、配列番号：06のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：16のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインとを有する。

40

## 【0140】

A.2 本明細書で報告された二重特異性抗体の抗PDGF-B結合部位を得ることができる抗PDGF-B抗体

本明細書において、種々の新規な抗ヒトPDGF-B抗体が提供される。

## 【0141】

第1の抗ヒトPDGF-B抗体は、配列番号：29のVHと配列番号：34のVLとを有する、新規なマウス抗ヒトPDGF-B抗体である。この抗体は、以下、PDGF-B-mumAbと呼ばれる。この抗体は、ヒト、カニクイザル、ラット、及びマウスのPD

50

G F - B に結合し、P D G F - B とそのレセプターとの間の相互作用を阻害する。

【0142】

この抗体は、以下の表に列記された下記特性を有する。

【0143】

【表34】

	ヒトP D G F -B B (E C 5 0) [ng/mL]	マウスP D G F -B B (E C 5 0) [ng/mL]	ラットP D G F -B B (E C 5 0) [ng/mL]	ヒトP D G F - A A (E C 5 0) [ng/mL]
PDGF-B-mumAb	16.3	8.8	5.124	2.04

10

【0144】

【表35】

	P P I I    ヒトP D G F - B B : : ヒトP D G F - R $\beta$ I C 5 0 [ng/ml]
PDGF-B-mumAb	12.16

20

【0145】

【表36】

	収量 [m g]	スケール [ 1 ]	収量 [mg/L 上清]	モノマー (分析的 S E C) [%]	主なビーグ (C E - S D S / S D S P A G E) [%]
PDGF-B-mumAb	6.4	0.2	32	99	98

30

【0146】

【表37】

	I C <sub>50</sub> ホスホ阻害 [ng/ml]	I C <sub>50</sub> 増殖 3 T 3 [ng/ml]
PDGF-B-mumAb	1.7	55.1

40

【0147】

【表38】

	周皮細胞			Balb-C3T3		
	遊走 EC <sub>50</sub> [nM]	増殖 EC <sub>50</sub> [nM]		増殖 EC <sub>50</sub> [nM]		
ヒト P D G F - B B	0.02/0.03/0.03			0.03/0.02/0.019		
	IC50[nM]	% 中和	IC50[nM]	% 中和	IC50[nM]	% 中和
R&D ポリクローナル参照抗体	1.13/0.78/0.4	100	0.49/0.36/0.41	100	0.79/0.69/0.65	100
PDGF-B-mumAb	0.08	100	0.21	100	0.179	100

【0148】

【表39】

	周皮細胞		Balb-C3T3
	F a b 遊走 [nM]	F a b 増殖 [nM]	F a b 増殖 [nM]
PDGF-B-mumAb	0.24	2.17	2.3

【0149】

【表40】

	kd [1/s]	t1/2 [分]
PDGF-B-mumAb	4.50E-04	26

【0150】

【表41】

Fab	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [nM]	t1/2 [秒]
PDGF-B-mumAb Fab	4.39E+05	2.01E-03	5	345

【0151】

【表42】

	見掛けの K D [nM]	T1/2 [秒]		見掛けの K D ** [nM]	T1/2 (秒)
PDGF-B-mumAb FAB	5	345	mumAb	0.042	2867

【0152】

抗体の保存安定性が、以下の表に示される（参照表面との活性濃度）。

【0153】

10

20

30

40

## 【表43】

	参照と共に、2w／4 0°C pH 6.0 [%]	参照と共に、2w／3 7°C pH 7.4 [%]
PDGF-B-mumAb	103	103

## 【0154】

この抗体の熱安定性は、凝集開始温度（T<sub>agg</sub>）及び融解温度（T<sub>m</sub>）を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

## 【0155】

## 【表44】

10

抗体	Tagg [°C]	Tm [°C]
PDGF-B-mumAb	57	62 – 63.5

## 【0156】

他の抗体は、ヒトIgローカストラנסジェニックウサギから得られたヒト抗体である。これらの抗体は、以下の表に列記された下記特性を有する。

## 【0157】

抗体0085は、配列番号：38のVH及び配列番号：43のVLを含む抗PDGF-B抗体である。抗体0086は、配列番号：47のVH及び配列番号：52のVLを含む抗PDGF-B抗体である。

20

## 【0158】

## 【表45】

	ヒトPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	マウスPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	ラットPDGF-BB [EC50] [ng/mL]	カニクイザル PDGF-B [EC50] [ng/mL]	ヒトPDGF-AA [EC50] [ng/mL]	ヒトPDGF-CC [EC50] [ng/mL]
抗体0085	7.55	24.96	15.96	15.33	n.d.	n.d.
抗体0086	12.04	14.08	10.57	16.19	n.d.	n.d.

30

## 【0159】

## 【表46】

40

	S P R によるヒト P D G F - B B - 結合活性 [M]	S P R によ るヒトP D G F - B B - k o n [M-1s-1]	S P R によ るヒトP D G F - B B - k o f f [s-1]	S P R によ るカニ クイザル P D G F - B B - 結合活性 [M]	S P R によ るカニクイ ザルP D G F - B B - k o n [M-1s-1]	S P R によ るカニクイ ザルP D G F - B B - k o f f [s-1]
抗体0085	4.76E-11	0.93E6	0.44E-4	4.78E-11	0.94E6	4.52E-5
抗体0086	2.18E-11	1.04E6	0.23E-4	1.78E-11	1.04E6	1.84E-5

## 【0160】

## 【表47】

	P P I I ヒトP D G F - B B : : ヒトP D G F - R $\beta$ I C 5 0 [ng/ml]
抗体0085	17.76
抗体0086	11.73

50

## 【0161】

—実施態様において、ヒト化抗PDGF-B抗体は、ヒト、ラット、マウス、及びカニクイザルのPDGF-Bに結合する。

## 【0162】

【表48】

	収量 [mg]	スケール [1]	収量 [mg/L 上清]	モノマー (分析的 SEC)	主なピーク (CE- SDS/ SDS PAG E) [%]
抗体 0085	22.5	0.25	90	99	96
抗体 0086	20.8	0.25	83	99	96
抗体 0106	12.0	0.3	40	98	99
抗体 0107	10.5	0.3	35	98	99
抗体 0144	37.7	1.5	25.1	>98	>95
抗体 0117	46.3	1	46.3	>98	>95
抗体 0145	21.5	1	21.5	>98	>95
抗体 0146	14.6	0.5	29.2	>98	>95

## 【0163】

【表49】

	I C <sub>50</sub> ホスホ阻害	I C <sub>50</sub> 増殖 3T3	
抗体0085	n.d.	n.d.	31.8 ng/ml
抗体0086	n.d.	n.d.	56.0 ng/ml

## 【0164】

多様な活性アッセイ法において、抗体は、以下の表に表わされたデータから分かる生物学的活性を示す。

## 【0165】

10

20

30

40

【表 5 0】

	周皮細胞		Balb-C3T3	
	遊走 EC50[nM]	増殖 EC50[nM]	増殖 EC50[nM]	
ヒト PD G F - B B	0.03/0.04		0.02/0.03	
	IC50(nM) % 中和		IC50(nM) % 中和	IC50(nM) % 中和
R&D ホ リクロー ナル抗体	0.56/0.32 100	0.36/0.41 100	0.69/0.65 100	
抗体 0 0 8 5	0.15 90	0.11 100	0.06 100	
抗体 0 0 8 6	0.09 100	0.09 100	0.11 100	

10

20

30

【0 1 6 6】

【表 5 1】

	F a b 遊走 阻害 [nM]	F a b 增殖 阻害 [nM]	F a b 増殖 阻害 [nM]
抗体 0 0 8 5	0.41	1.02	1.36
抗体 0 0 8 6	0.14	0.62	1.18

40

【0 1 6 7】

種々の抗体の動力学結合特性は、表面プラズモン共鳴技術を使用して決定されている（以下の表を参照のこと）。

【0 1 6 8】

【表 5 2】

	kd (1/s)	t1/2 [分]
抗体 0 0 8 5	1.02E-04	114
抗体 0 0 8 6	7.93E-05	146

【0 1 6 9】

【表 5 3】

Fab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD* (nM)	t1/2 (秒)
抗体 0 1 0 6	2.02E+05	3.74E-04	2	1853
抗体 0 1 0 7	1.95E+05	3.62E-04	2	1915

【0 1 7 0】

## 【表 5 4】

Fab	見掛けのKD* (nM)	T1/2 (秒)	IgG	見掛けのKD** (nM)	T1/2 (秒)
抗体 0 1 0 6	2	1853	抗体 0 0 8 5	0.023	8739
抗体 0 1 0 7	2	1915	抗体 0 0 8 6	0.030	2461

## 【0 1 7 1】

抗体 0 0 8 6 の保存安定性が、以下の表に示される（参照表面との活性濃度）。

## 【0 1 7 2】

10

## 【表 5 5】

	参照と共に、2w/4 0°C pH 6.0 (%)	参照と共に、2w/3 7°C pH 7.4 (%)
抗体 0 0 8 6	99	98

## 【0 1 7 3】

この抗体の熱安定性は、凝集開始温度（T<sub>agg</sub>）及び融解温度（T<sub>m</sub>）を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

## 【0 1 7 4】

20

## 【表 5 6】

	Tagg [°C]	Tm [°C]
抗体 0 0 8 6	64	64.5-68

## 【0 1 7 5】

抗体 0 1 4 4 は、PDGF-B 結合親和性として、抗体 0 0 8 5 の VH 及び VL ドメインを含む、二重特異性抗 ANG2 / PDGF-B 抗体である。

## 【0 1 7 6】

抗体 0 1 1 7 は、PDGF-B 結合親和性として、抗体 0 0 8 5 の VH 及び VL ドメインを含む、二重特異性抗 VEGF / PDGF-B 抗体である。

30

## 【0 1 7 7】

動力学結合値の決定のために、実施例 5 2 に報告されたアッセイ法が使用された。

## 【0 1 7 8】

## 【表 5 7】

ANG2	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
抗体 0 1 4 4	9.06E+04	1.55E-03	17	446

## 【0 1 7 9】

## 【表 5 8】

VEGF	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
抗体 0 1 1 7	2.46E+04	<1E-06	<0.1	-

40

## 【0 1 8 0】

## 【表 5 9】

PDGF-BB	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
抗体 0 1 0 6	2.94E+05	2.91E-04	1	40
抗体 0 1 1 7	7.67E+04	2.45E-04	3	47
抗体 0 1 4 4	8.31E+04	2.15E-04	3	53

50

## 【0181】

全ての二重特異性抗体が、その抗原両方に同時に結合する特性を有することが、S P R 分析により示されている。

## 【0182】

二重特異性抗体は、細胞系アッセイ法において、結合活性及び生物学的活性を示す。

## 【0183】

## 【表60】

	I C <sub>50</sub> 増殖 ヒト周皮細胞		I C <sub>50</sub> 增殖 3T3	
抗体0117	0.016	nM	0.019	nM
抗体0144	0.030	nM	0.020	nM
抗体0085 FAB	0.012	nM	未測定	

## 【0184】

## 【表61】

	I C <sub>50</sub> ホスホ阻害 ヒト周皮細胞		I C <sub>50</sub> 遊走阻害 ヒト周皮細胞	
抗体0117	0.055	nM	0.06	nM
抗体0144	0.055	nM	0.06	nM
抗体0085 FAB	未測定		0.27	nM

## 【0185】

ANG2特異性pTie2-ELISAにおいて、抗体0144は、国際公開公報第2014/09465号に報告された抗ANG2/VEGF抗体より、6倍活性である。

## 【0186】

VEGF特異性レポーターアッセイ法において、抗体0117は、国際公開公報第2014/09465号に報告された抗ANG2/VEGF抗体と同様の活性を有する。

## 【0187】

配列番号：38～46（結合部位、HVR、VH、VL）の配列を有する抗体0085が記載されている。二重特異性フォーマットの抗体0085が、配列番号：129～130、150～153、162～165、及び174～177の配列に記載されている。これらの配列は全て、本発明の単独及び組み合わせの態様を構成する。

## 【0188】

配列番号：47～55（結合部位、HVR、VH、VL）の配列を有する抗体0086が記載されている。二重特異性フォーマットの抗体0086が、配列番号：131、154～157、166～169、及び178～181の配列に記載されている。これらの配列は全て、本発明の単独及び組み合わせの態様を構成する。

## 【0189】

配列番号：162～165（CrossMabフォーマット、2つの重鎖、2つの軽鎖）の配列を有する抗体0144が記載されている。

## 【0190】

抗体0144及び0145は、種々のpH値において、2週間インキュベーションされ、その後、PDGF-BB及びANG2それぞれに対するそれらの結合性が決定される。

## 【0191】

10

20

30

40

【表62】

抗体0144	結合性	相対結合性 [%]	SD
開始時の参照値	PDGF-BB	100	
pH 6でのインキュベーション		101	4
pH 7.4でのインキュベーション		94	6
開始時の参照値	ANG2	100	
pH 6でのインキュベーション		100	1
pH 7.4でのインキュベーション		91	4

10

【0192】

【表63】

抗体0145	結合性	相対結合性 [%]	SD
開始時の参照値	PDGF-BB	100	
pH 6でのインキュベーション		99	1
pH 7.4でのインキュベーション		95	2
開始時の参照値	ANG2	100	
pH 6でのインキュベーション		99	2
pH 7.4でのインキュベーション		94	0

20

【0193】

好ましい一実施態様では、抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：33のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、この抗体は、(d)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

【0194】

一実施態様において、抗体は、配列番号：29及び配列番号：34それぞれにおけるVH及びVL配列のヒト化変異体を含み、同VH及びVL配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

30

【0195】

好ましい一実施態様では、抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：42のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、この抗体は、(d)配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：46のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

40

【0196】

好ましい一実施態様では、本明細書で報告された抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号：41のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号：43のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。また、好ましい一実施態様では、本明細書で報告された抗PDGF-B抗体は、配列番号：38のアミノ酸配列を有するVHと、配列番号：43のアミノ酸配列を有するVLとを含む。また、好ましい一実施態様では、抗PDGF-B抗体は、二重特異性抗体である。

50

【0197】

一実施態様において、抗体は、配列番号：3 8 及び配列番号：4 3 それにおけるV H及びV L配列を含み、同V H及びV L配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0198】

好ましい一実施態様では、抗P D G F - B 抗体は、(a)配列番号：4 8 のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b)配列番号：4 9 のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c)配列番号：5 1 のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。一実施態様において、この抗体は、(d)配列番号：5 3 のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(e)配列番号：5 4 のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(f)配列番号：5 5 のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を更に含む。

【0199】

好ましい一実施態様では、抗P D G F - B 抗体は、(a)配列番号：4 8 のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b)配列番号：5 0 のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、(c)配列番号：5 1 のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、(d)配列番号：5 3 のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(e)配列番号：5 4 のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(f)配列番号：5 5 のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。また、好ましい一実施態様では、本明細書で報告された抗P D G F - B 抗体は、配列番号：4 7 のアミノ酸配列を有するV Hと、配列番号：5 2 のアミノ酸配列を有するV Lとを含む。また、好ましい一実施態様では、抗P D G F - B 抗体は、二重特異性抗体である。

【0200】

一実施態様において、抗体は、配列番号：4 7 及び配列番号：5 2 それにおけるV H及びV L配列を含み、同V H及びV L配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0201】

A . 3 本明細書で報告された二重特異性抗体の抗A N G 2 結合部位を得ることができる抗A N G 2 抗体

【表64】

ヒトANG 2結合動力学：

分子	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)*	t1/2 (秒)
0009	1.92E+06	0.07565	39	9
0041	3.85E+06	3.17E-03	1	219
0075	2.22E+06	3.10E-02	14	22
0090	2.16E+06	2.53E-03	1	274
0098	1.56E+07	1.58E-04	10*	
0099	2.61E+07	1.10E-04	4*	
0100	2.06E+07	1.67E-04	8*	
0101	1.83E+07	1.20E-04	7*	

\*結合活性

【0202】

【表65】

カニクイザルANG 2結合動力学：

分子	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)*	t1/2 (秒)
0009	1.45E+06	8.81E-02	61	8
0041	2.14E+06	3.60E-03	2	193
0075	1.34E+06	3.25E-02	24	21
0090	2.02E+06	3.08E-03	2	225

【0203】

10

20

30

40

50

本明細書で報告された抗体の相対的な生物学的活性は、以下の表に与えられる。

【0204】

【表66】

分子	相対的な生物学的活性 (nM)
0009	72
0041	838
0075	128
0090	706
0098	100

10

【0205】

種々の抗体の熱安定性は、凝集開始温度 (Tagg) 及び融解温度 (Tm) を決定することにより評価されている（以下の表を参照のこと）。

【0206】

【表67】

分子	Tagg [°C]	Tm [°C]
0009	62.2	65.9
0041	63.1	66.0
0075	63.6	67.0
0090	64.0	67.4

20

【0207】

加えて、抗体は、ストレス試験において、良好な安定性を示す。結合活性は、表面プラズモン共鳴を使用して決定されている（以下の表を参照のこと）。

【0208】

【表68】

分子	相対結合活性	
	37°C、pH 7.4で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
0009	99 %	91 %
0041	100 %	101 %
0075	101 %	105 %
0090	112 %	100 %

30

100% = -80°Cで保存されたサンプル

【0209】

同じ安定性は、CE-SDS分析において見ることができる（以下の表を参照のこと）。

40

【0210】

【表69】

分子	相対面積%		
	開始	37°C、pH 7.4で 2週間	40°C、pH 6.0で 2週間
0009	98.9	98.5	98.8
0041	98.9	98.6	98.6
0090	99.2	98.5	98.2

50

【0211】

好ましい一実施態様では、抗ANG2抗体は、(a)配列番号：75のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：76のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：78のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、この抗体は、(d)配列番号：80のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：81のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：82のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

## 【0212】

一実施態様において、抗体は、配列番号：74及び配列番号：79それぞれにおけるVH及びVL配列を含み、同VH及びVL配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

## 【0213】

A.4 本明細書で報告された二重特異性抗体の抗VEGF結合部位を得ることができる抗VEGF抗体

好ましい一実施態様では、抗VEGF抗体は、配列番号：107の重鎖可変ドメインに含まれる、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。HVRは、Kabatに従ったCDRを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号：108の重鎖可変ドメインに含まれる、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を更に含む。HVRは、Kabatに従ったCDRを含む。

## 【0214】

一実施態様において、抗体は、配列番号：107及び配列番号：108それぞれにおけるHC及びLC配列を含み、同HC及びLC配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

## 【0215】

好ましい一実施態様では、抗VEGF抗体は、配列番号：109の重鎖可変ドメインに含まれる、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。HVRは、Kabatに従ったCDRを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号：110の重鎖可変ドメインに含まれる、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。HVRは、Kabatに従ったCDRを含む。

## 【0216】

一実施態様において、抗体は、配列番号：109及び配列番号：110それぞれにおけるHC及びLC配列を含み、同HC及びLC配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

## 【0217】

A.5.二重特異性抗体

本明細書で報告された一態様は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含み、

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG2、(ヒト)VEGF、(ヒト)IL-1ベータ、及び(ヒト)PDGF-Bからなる群より選択される種々の抗原である、二価の二重特異性抗体である。

## 【0218】

抗体は、a)において、b)で報告された修飾を含有せず、a)の重鎖及び軽鎖は、分離した鎖である。

## 【0219】

b)の抗体では、軽鎖内において、可変軽鎖ドメインVLは、前記抗体の可変重鎖ドメインVHにより置き換えられており、重鎖内において、可変重鎖ドメインVHは、前記抗体の可変軽鎖ドメインVLにより置き換えられている。

## 【0220】

一実施態様では、

i) a)の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、正に荷電したアミノ酸により置換されており、a)

10

20

30

40

50

の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、負に荷電したアミノ酸により置換されているか、又は

i i ) b ) の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、正に荷電したアミノ酸により置換されており、b ) の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、負に荷電したアミノ酸により置換されている。

#### 【0221】

好ましい一実施態様では、

i ) a ) の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、リシン(K)、アルギニン(R)、又はヒスチジン(H)により独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)により独立して)置換されており、a ) の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)により独立して置換されているか、又は

i i ) b ) の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、リシン(K)、アルギニン(R)、又はヒスチジン(H)により独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)により独立して)置換されており、b ) の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)により独立して置換されている。

#### 【0222】

一実施態様では、第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124及び123位におけるアミノ酸は、Kにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

#### 【0223】

一実施態様では、第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147及び213位におけるアミノ酸は、Eにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

#### 【0224】

好ましい一実施態様では、第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124及び123位におけるアミノ酸は、Kにより置換されているおり、第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147及び213位におけるアミノ酸は、Eにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

#### 【0225】

一実施態様では、第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124及び123位におけるアミノ酸は、Kにより置換されており、第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147及び213位におけるアミノ酸は、Eにより置換されており、第1の軽鎖の可変ドメインVLにおいて、38位におけるアミノ酸は、Kにより置換されており、第1の重鎖の可変ドメインVHにおいて、39位におけるアミノ酸は、Eにより置換されており、第2の重鎖の可変ドメインVLにおいて、38位におけるアミノ酸は、Kにより置換されており、第2の軽鎖の可変ドメインVHにおいて、39位におけるアミノ酸は、Eにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

#### 【0226】

本明細書で報告された一態様は、

a ) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b ) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の

10

20

30

40

50

軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインV L及びV Hが、互いに置き換えられており、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインC L及びC H 1が、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含み、

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG 2、(ヒト)V E G F、(ヒト)I L - 1ベータ、及び(ヒト)P D G F - Bからなる群より選択される種々の抗原である、二価の二重特異性抗体である。

#### 【0227】

抗体は、a)において、b)で報告された修飾を含有せず、a)の重鎖及び軽鎖は、分離した鎖である。

#### 【0228】

抗体のb)では、軽鎖内において、可変重鎖ドメインV Lは、前記抗体の可変重鎖ドメインV Hにより置き換えられており、定常軽鎖ドメインC Lは、前記抗体の定常重鎖ドメインC H 1により置き換えられており、重鎖内において、可変重鎖ドメインV Hは、前記抗体の可変軽鎖ドメインV Lにより置き換えられており、定常重鎖ドメインC H 1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインC Lにより置き換えられている。

10

#### 【0229】

本明細書で報告された一態様は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインC L及びC H 1が、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含み、

20

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG 2、(ヒト)V E G F、(ヒト)I L - 1ベータ、及び(ヒト)P D G F - Bからなる群より選択される種々の抗原である、二価の二重特異性抗体である。

#### 【0230】

抗体は、a)において、b)で報告された修飾を含有せず、a)の重鎖及び軽鎖は、分離した鎖である。

#### 【0231】

抗体のb)では、軽鎖内において、定常軽鎖ドメインC Lは、前記抗体の定常重鎖ドメインC H 1により置き換えられており、重鎖内において、定常重鎖ドメインC H 1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインC Lにより置き換えられている。

30

#### 【0232】

本明細書で報告された一態様は、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖及び2つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

b) 1~4つの更なる抗原に特異的に結合する(すなわち、第2及び/又は第3及び/又は第4及び/又は第5の抗原、好ましくは、1つの更なる抗原、すなわち、第2の抗原に特異的に結合する)、1、2、3、又は4つの一本鎖F a b フラグメントとを含み、

前記b)の一本鎖F a b フラグメントが、前記a)の全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端において融合しており、

40

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG 2、(ヒト)V E G F、(ヒト)I L - 1ベータ、及び(ヒト)P D G F - Bからなる群より選択される種々の抗原である、多重特異性抗体である。

#### 【0233】

一実施態様において、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖F a b フラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端において融合している。

#### 【0234】

一実施態様において、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖F a b フラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンcanoを介して、前記全長抗体の重鎖のC末端に

50

おいて融合している。

【0235】

一実施態様において、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖F<sub>a</sub>bフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の軽鎖のC末端において融合している。

【0236】

一実施態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖F<sub>a</sub>bフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖それぞれのC末端において融合している。

【0237】

一実施態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖F<sub>a</sub>bフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の各重鎖のC末端において融合している。

【0238】

一実施態様において、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖F<sub>a</sub>bフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の各軽鎖のC末端において融合している。

【0239】

本明細書で報告された一態様は、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖及び2つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

b)

b a) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)、又は

b b) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体定常ドメイン1(CH1)からなる第1のポリペプチドであって、前記第1のポリペプチドが、そのVHドメインのN末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の方のC末端に融合している第1のポリペプチドと、

c)

c a) 抗体軽鎖可変ドメイン VL)、又は

c b) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体軽鎖定常ドメイン(CL)からなる第2のポリペプチドであって、前記第2のポリペプチドが、VLドメインのN末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の方のC末端に融合している第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)と第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが共に、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成しており、

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG2、(ヒト)VEGF、(ヒト)IL-1ベータ、及び(ヒト)PDGF-Bからなる群より選択される種々の抗原である、三価の二重特異性抗体である。

【0240】

一実施態様において、b)のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)と、c)のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが連結しており、下記位置：

i) 重鎖可変ドメインの44位と軽鎖可変ドメインの100位、又は

i i) 重鎖可変ドメインの105位と軽鎖可変ドメインの43位、又は

i i i) 重鎖可変ドメインの101位と軽鎖可変ドメインの100位(通常、Kabat-EUインデックスに従ってナンバリング)

の間へのジスルフィド結合の導入による鎖間ジスルフィド架橋により安定化されている。

【0241】

安定化のための非天然ジスルフィド架橋を導入するための技術は、例えば、国際公開公報第94/029350号、Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Koba

10

20

30

40

50

yashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393 ; 又は、Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721に記載されている。一実施態様において、b)及びc)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの44位と、軽鎖可変ドメインの100位との間にある。一実施態様において、b)及びc)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの105位と、軽鎖可変ドメインの43位（通常、KabatのEUインデックスに従ってナンバリング）との間にある。一実施態様において、一本鎖Fabフラグメントの可変ドメインVHとVLとの間の前記任意のジスルフィド安定化を含まない三価の二重特異性抗体が好ましい。

## 【0242】

10

本明細書で報告された一態様は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、  
b) 第2の抗原に特異的に結合する全長抗体の第2の（改変）軽鎖及び第2の（改変）重鎖であって、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、及び/又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられている第2の（改変）軽鎖及び第2の（改変）重鎖と、

c) 1~4つの抗原結合ペプチドであって、これらが、1つ又は2つの更なる抗原に（すなわち、第3及び/又は第4の抗原に）特異的に結合し、ペプチドリンカーを介して、a)及び/又はb)の軽鎖又は重鎖のC末端又はN末端に融合している1~4つの抗原結合ペプチドとを含み、

第1及び第2の抗原が、（ヒト）ANG2、（ヒト）VEGF、（ヒト）IL-1ベータ、及び（ヒト）PDGF-Bからなる群より選択される種々抗原である、三重特異性又は四重特異性抗体である

20

## 【0243】

抗体は、a)において、b)で報告された改変を含有せず、a)の重鎖及び軽鎖は、分離した抗体である。

## 【0244】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、c)において、1つ又は2つの更なる抗原に特異的に結合する、1つ又は2つの抗原結合ペプチドを含む。

30

## 【0245】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、scFvフラグメント及びscFabフラグメントからなる群より選択される。

## 【0246】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、scFvフラグメントである。

## 【0247】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、scFabフラグメントである。

## 【0248】

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、a)及び/又はb)の重鎖のC末端に融合している。

## 【0249】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、c)において、1つの更なる抗原に特異的に結合する、1つ又は2つの抗原結合ペプチドを含む。

40

## 【0250】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、c)において、第3の抗原に特異的に結合する2つの同一の抗原結合ペプチドを含む。好ましい一実施態様では、このような2つの抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドリンカーを介して、a)及びb)の重鎖のC末端に融合している。好ましい一実施態様では、2つの同一の抗原結合ペプチドは、scFvフラグメント又はscFabフラグメントのいずれかである。

## 【0251】

一実施態様において、三重特異性又は四重特異性抗体は、c)において、第3及び第4

50

の抗原に特異的に結合する2つの抗原結合ペプチドを含む。一実施態様において、前記2つの抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドコネクターを介して、a)及びb)の重鎖のC末端に融合している。好ましい一実施態様では、前記2つの抗原結合ペプチドは、scFvフラグメント又はscFabフラグメントのいずれかである。

#### 【0252】

本明細書で報告された一態様は、

a) 抗体の2つの軽鎖及び2つの重鎖であって、これらが、第1の抗原に特異的に結合する(かつ、2つのFabフラグメントを含む)2つの軽鎖及び2つの重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の2つの更なるFabフラグメントであって、前記更なるFabフラグメントが両方とも、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はN末端のいずれかに融合している2つの更なるFabフラグメントを含み、

Fabフラグメントにおいて、下記改変が行われている、

i) a)の両Fabフラグメント及びb)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、及び/又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、

又は

ii) a)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、かつ

b)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、又は

iii) a)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、かつ

b)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、又は

iv) a)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、b)の両Fabフラグメントにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、

又は

v) a)の両Fabフラグメントにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、b)の両Fabフラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、

第1及び第2の抗原が、(ヒト)ANG2、(ヒト)VEGF、(ヒト)IL-1ベータ、及び(ヒト)PDGF-Bからなる群より選択される種々の抗原である、二重特異性の四価抗体である。

#### 【0253】

一実施態様において、前記更なるFabフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はa)の重鎖のN末端のいずれかに融合している。

#### 【0254】

一実施態様において、前記更なるFabフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端のいずれかに融合している。

#### 【0255】

一実施態様において、前記更なるFabフラグメントは両方とも、ペプチドコネクターを介して、a)の重鎖のN末端に融合している。

#### 【0256】

一実施態様では、Fabフラグメントにおいて、下記改変が行われている。

i) a)の両Fabフラグメント又はb)の両Fabフラグメントにおいて、可変ド

10

20

30

40

50

メイン V L 及び V H が、互いに置き換えられており、及び / 又は、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている。

#### 【 0 2 5 7 】

一実施態様では、F a b フラグメントにおいて、下記改変が行われている。

i ) a ) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が、互いに置き換えられており、及び / 又は、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている。

#### 【 0 2 5 8 】

一実施態様では、F a b フラグメントにおいて、下記改変が行われている。

i ) a ) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている。 10

#### 【 0 2 5 9 】

一実施態様では、F a b フラグメントにおいて、下記改変が行われている。

i ) b ) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が、互いに置き換えられており、及び / 又は、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている。

#### 【 0 2 6 0 】

一実施態様では、F a b フラグメントにおいて、下記改変が行われている。

i ) b ) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている。 20

#### 【 0 2 6 1 】

本明細書で報告された一態様は、

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合し、第 1 の V H - C H 1 ドメインペアを含む第 1 の抗体の（改変）重鎖であって、前記重鎖の C 末端に、前記第 1 の抗体の第 2 の V H - C H 1 ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第 1 の抗体の（改変）重鎖と、

b ) 前記 a ) の第 1 の抗体の 2 つの軽鎖と、

c ) 第 2 の抗原に特異的に結合し、第 1 の V H - C L ドメインペアを含む第 2 の抗体の（改変）重鎖であって、前記重鎖の C 末端に、前記第 2 の抗体の第 2 の V H - C L ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第 2 の抗体の（改変）重鎖と、 30

d ) 前記 c ) の第 2 の抗体の 2 つの（改変）軽鎖であって、それぞれが、C L - C H 1 ドメインペアを含む第 2 の抗体の 2 つの（改変）軽鎖とを含み、

第 1 及び第 2 の抗原が、（ヒト）ANG 2 、（ヒト）VEGF 、（ヒト）IL - 1 ベータ、及び（ヒト）PDGF - B からなる群より選択される種々の抗原である、二重特異性の四価抗体である。

#### 【 0 2 6 2 】

本明細書で報告された一態様は、

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の全長抗体の重鎖及び軽鎖と、

b ) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の全長抗体の重鎖及び軽鎖であって、重鎖の N 末端が、軽鎖の C 末端に、ペプチドリンカーを介して連結している第 2 の全長抗体の重鎖及び軽鎖とを含み、 40

第 1 及び第 2 の抗原が、（ヒト）ANG 2 、（ヒト）VEGF 、（ヒト）IL - 1 ベータ、及び（ヒト）PDGF - B からなる群より選択される種々の抗原である、二重特異性抗体である。

#### 【 0 2 6 3 】

抗体は、a ) において、b ) で報告された改変を含有せず、重鎖及び軽鎖は、分離した抗体である。

#### 【 0 2 6 4 】

本明細書で報告された一態様は、

10

20

30

40

50

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合し、2 つの抗体重鎖及び2 つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

b ) 第 2 の抗原に特異的に結合し、V H<sup>2</sup> ドメイン及びV L<sup>2</sup> ドメインを含むF v フラグメントであって、両ドメインが、ジスルフィド架橋を介して、互いに連結しているF v フラグメントとを含み、

V H<sup>2</sup> ドメイン又はV L<sup>2</sup> ドメインのいずれかのみが、ペプチドリンカーを介して、第1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合しており、

第1 及び第2 の抗原が、(ヒト)ANG 2、(ヒト)V E G F、(ヒト)I L - 1 ベータ、及び(ヒト)P D G F - B からなる群より選択される種々の抗原である、二重特異性抗体である。

10

#### 【0265】

この二重特異性抗体において、a ) の重鎖及び軽鎖は、単離された鎖である。

#### 【0266】

一実施態様において、V H<sup>2</sup> ドメイン又はV L<sup>2</sup> ドメインの他方は、ペプチドリンカーを介して、第1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合していない。

#### 【0267】

本明細書で報告された全ての態様では、第1 の軽鎖は、V L ドメイン及びC L ドメインを含み、第1 の重鎖は、V H ドメイン、C H 1 ドメイン、ヒンジ領域、C H 2 ドメイン、及びC H 3 ドメインを含む。

#### 【0268】

全ての態様の一実施態様では、本明細書で報告された抗体は、多重特異性抗体である。同多重特異性抗体は、少なくとも2 つの重鎖ポリペプチドのヘテロ二量体化を必要とし、この抗体は、ヒトI L - 1 ベータ及び第2 の非ヒトI L - 1 ベータ抗原に特異的に結合する。

20

#### 【0269】

ヘテロ二量体化を支援するためのC H 3 改変についての複数のアプローチが、例えば、国際公開公報第96 / 27011号、同第98 / 050431号、欧洲特許第1870459号、国際公開公報第2007 / 110205号、同第2007 / 147901号、同第2009 / 089004号、同第2010 / 129304号、同第2011 / 90754号、同第2011 / 143545号、同第2012 / 058768号、同第2013 / 157954号、同第2013 / 096291号に記載されている。これらの文献は、参考により本明細書に組み入れられる。典型的には、当技術分野において公知のアプローチにおいて、第1 の重鎖のC H 3 ドメイン及び第2 の重鎖のC H 3 ドメインは両方とも、相補的な方法において操作される。これにより、1 つの操作されたC H 3 ドメインを含む重鎖は、もはや、同じ構造の別の重鎖とホモ二量体化できない( 例えば、C H 3 操作された第1 の重鎖は、もはや、別のC H 3 操作された第1 の重鎖とホモ二量体化できない。C H 3 操作された第2 の重鎖は、もはや、別のC H 3 操作された第2 の重鎖とホモ二量体化できない)。これにより、1 つの操作されたC H 3 ドメインを含む重鎖は、相補的な方法で操作されているC H 3 ドメインを含む別の重鎖とヘテロ二量体化させられる。本発明のこの実施態様について、第1 の重鎖のC H 3 ドメイン及び第2 の重鎖のC H 3 ドメインは、アミノ酸置換により、相補的な方法で操作されている。これにより、第1 の重鎖と第2 の重鎖とは、ヘテロ二量体化させられる。一方、第1 の重鎖と第2 の重鎖とは、( 例えば、立体障害の理由で) もはやホモ二量体化できない

30

#### 【0270】

上記で引用され、上記に含まれた、当技術分野において公知の重鎖ヘテロ二量体化を支援するための種々のアプローチが、本発明の多重特異性抗体に使用される種々の代替手段として想到される。同多重特異性抗体は、第1 の抗原に特異的に結合する第1 の抗体から得られる「非架橋F a b 領域」と、第2 の抗原に特異的に結合する第2 の抗体から得られる「架橋F a b 領域」とを、本発明について上記された特定のアミノ酸置換との組み合わせにおいて含む。

40

50

## 【0271】

本明細書で報告された多重特異性抗体のCH3ドメインは、「ノブ - i n t o - ホール」技術により改変することができる。同技術は、例えば、国際公開公報第96/027011号、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; 及び、Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681において、複数の例示により詳細に記載されている。この方法において、2つのCH3ドメインの相互作用表面は、これらの2つのCH3ドメインを含有する両重鎖のヘテロ二量体化を向上させるように改変される。(2つの重鎖の)2つのCH3ドメインそれぞれが、「ノブ」であることができ、一方、他のものが「ホール」である。ジスルフィド架橋の導入は、ヘテロ二量体を更に安定化し(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)、収量を増大させる。

10

## 【0272】

好ましい一実施態様では、本明細書で報告された多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるT366W突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるT366S、L368A、Y407V突然変異とを含む(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。また、CH3ドメイン間の更なる鎖間ジスルフィド架橋も、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるY349C突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるE356C突然変異又はS354C突然変異を導入することにより使用することができる(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681)。このため、別の好ましい実施態様では、本明細書で報告された多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの一方におけるY349C及びT366W突然変異と、2つのCH3ドメインの他方におけるE356C、T366S、L368A、及びY407V突然変異とを含むか、又は、本明細書で報告された多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの一方におけるY349C及びT366W突然変異と、2つのCH3ドメインの他方におけるS354C、T366S、L368A、及びY407V突然変異とを含む(一方のCH3ドメインにおける更なるY349C突然変異と他方のCH3ドメインにおける更なるE356C又はS354C突然変異とは、鎖間ジスルフィド架橋を形成する)(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

20

## 【0273】

ただし、欧州特許第1870459号に記載された他のノブ - i n t o - ホール技術も、代替的又は付加的に使用することができる。一実施態様において、本明細書で報告された多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるR409D及びK370E突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるD399K及びE357K突然変異とを含む(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

30

## 【0274】

一実施態様において、本明細書で報告された多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるT366W突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるT366S、L368A、及びY407V突然変異とを含み、付加的に、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるR409D及びK370E突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるD399K及びE357K突然変異とを含む(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

40

## 【0275】

一実施態様において、本明細書で報告された多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの一方におけるY349C及びT366W突然変異と、2つのCH3ドメインの他方におけるS354C、T366S、L368A、及びY407V突然変異とを含むか、又は、本明細書で報告された多重特異性抗体は、2つのCH3ドメインの一方におけるY349C及びT366W突然変異と、2つのCH3ドメインの他方におけるS354C、T366S、L368A、及びY407V突然変異とを含み、付加的に、「ノブ鎖」のCH3ドメインにおけるR409D及びK370E突然変異と、「ホール鎖」のCH3ドメインにおけるD399K及びE357K突然変異とを含む(Kabat EUインデックスに従

50

ってナンバリング)。

【0276】

「ノブ - i n t o - ホール技術」とは別に、ヘテロ二量体化させるために多重特異性抗体の重鎖のCH3ドメインを改変するための他の技術は、当技術分野において公知である。これらの技術、特に、国際公開公報第96/27011号、同第98/050431号、欧洲特許第1870459号、国際公開公報第2007/110205号、同第2007/147901号、同第2009/089004号、同第2010/129304号、同第2011/90754号、同第2011/143545号、同第2012/058768号、同第2013/157954号、及び同第2013/096291号に記載されている技術が、本明細書において、本明細書で報告された多重特異性抗体との組み合わせにおいて、「ノブ - i n t o - ホール技術」の代替技術として想到される。10

【0277】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、欧洲特許第1870459号に記載されたアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。このアプローチは、第1及び第2の重鎖の両方の間のCH3/CH3ドメイン界面における特定のアミノ酸位置に、反対電荷を有する荷電アミノ酸を導入することに基づいている。

【0278】

したがって、この実施態様は、抗体の三次構造において、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインが、各抗体CH3ドメイン間に位置する界面を形成しており、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインそれぞれの各アミノ酸配列が、抗体の三次構造において、前記界面内に位置しているアミノ酸のセットを含み、界面に位置しているこのアミノ酸のセットから、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、第1のアミノ酸が、正に荷電したアミノ酸により置換されており、界面に位置しているこのアミノ酸のセットから、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、第2のアミノ酸が、負に荷電したアミノ酸により置換されている、本明細書で報告された多重特異性抗体に関する。この実施態様の多重特異性抗体は、本明細書において、「CH3(+/-)操作多重特異性抗体」とも呼ばれる(この場合、「+/-」の略称は、各CH3ドメインに導入された反対の荷電アミノ酸を意味する)。20

【0279】

本明細書で報告された前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に荷電したアミノ酸は、K、R、及びHから選択され、負に荷電したアミノ酸は、E又はDから選択される。30

【0280】

本明細書で報告された前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に荷電したアミノ酸は、K及びRから選択され、負に荷電したアミノ酸は、E又はDから選択される。

【0281】

本明細書で報告された前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正に荷電したアミノ酸は、Kであり、負に荷電したアミノ酸は、Eである。40

【0282】

本明細書で報告された前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、409位におけるアミノ酸Rは、Dにより置換されており、位におけるアミノ酸Kは、Eにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、399位におけるアミノ酸Dは、Kにより置換されており、357位におけるアミノ酸Eは、Kにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

【0283】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2013/157953号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖の

10

20

30

40

50

ヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位におけるアミノ酸Tは、Kにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位におけるアミノ酸Lは、Dにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位におけるアミノ酸Tは、Kにより置換されており、351位におけるアミノ酸Lは、Kにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位におけるアミノ酸Lは、Dにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

## 【0284】

10

本明細書で報告された前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位におけるアミノ酸Tは、Kにより置換されており、351位におけるアミノ酸Lは、Kにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位におけるアミノ酸Lは、Dにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。加えて、下記置換の内の少なくとも1つが、他方の重鎖のCH3ドメインに含まれる。349位におけるアミノ酸Yは、Eにより置換されており、349位におけるアミノ酸Yは、Dにより置換されており、368位におけるアミノ酸Lは、Eにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。一実施態様において、368位におけるアミノ酸Lは、Eにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

20

## 【0285】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2012/058768号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位におけるアミノ酸Lは、Yにより置換されており、407位におけるアミノ酸Yは、Aにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位におけるアミノ酸Tは、Aにより置換されており、409位におけるアミノ酸Kは、Fにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。別の実施態様では、前述の置換に加えて、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、411位(元はT)、399位(元はD)、400位(元はS)、405位(元はF)、390位(元はN)、及び392位(元はK)における少なくとも1つのアミノ酸が置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。好ましい置換は、

30

- 411位におけるアミノ酸Tを、N、R、Q、K、D、E、及びWから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、
- 399位におけるアミノ酸Dを、R、W、Y、及びKから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、
- 400位におけるアミノ酸Sを、E、D、R、及びKから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、
- 405位におけるアミノ酸Fを、I、M、T、S、V、及びWから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、
- 390位におけるアミノ酸Nを、R、K、及びDから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、及び
- 392位におけるアミノ酸Kを、V、M、R、L、F、及びEから選択されるアミノ酸により置換すること(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)である。

40

## 【0286】

(国際公開公報第2012/058768号に従って操作された)本明細書で報告された前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位におけるアミノ酸Lは、Yにより置換されており、407位におけるアミノ酸Yは、Aにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位におけるアミ

50

ノ酸 T は、 V により置換されており、 409 位におけるアミノ酸 K は、 F により置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 407 位におけるアミノ酸 Y は、 A により置換されており、他方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 366 位におけるアミノ酸 T は、 A により置換されており、 409 位におけるアミノ酸 K は、 F により置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。前記最後の前述の実施態様では、前記他方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 392 位におけるアミノ酸 K は、 E により置換されており、 411 位におけるアミノ酸 T は、 E により置換されており、 399 位におけるアミノ酸 D は、 R により置換されており、 400 位におけるアミノ酸 S は、 R により置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。

10

## 【0287】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第 2011/143545 号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の一実施態様では、両重鎖の CH3 ドメインにおけるアミノ酸改変は、 368 及び / 又は 409 位に導入される (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。

20

## 【0288】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第 2011/090762 号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。国際公開公報第 2011/090762 号は、「ノブ - into - ホール」技術に基づくアミノ酸改変に関する。本明細書で報告された前記 CH3 (KiH) 操作された多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 366 位におけるアミノ酸 T は、 W により置換されており、他方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 407 位におけるアミノ酸 Y は、 A により置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。本明細書で報告された前記 CH3 (KiH) 操作された多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 366 位におけるアミノ酸 T は、 Y により置換されており、他方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 407 位におけるアミノ酸 Y は、 T により置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。

30

## 【0289】

IgG2 アイソタイプである、本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第 2011/090762 号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。

## 【0290】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第 2009/089004 号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第 1 の重鎖及び第 2 の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 392 位におけるアミノ酸 K 又は N は、負に荷電したアミノ酸により (好ましい一実施態様では、 E 又は D により、好ましい一実施態様では、 D により) 置換されており、他方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 399 位におけるアミノ酸 D 、 356 位におけるアミノ酸 E もしくは D 、又は 357 位におけるアミノ酸 E は、正に荷電したアミノ酸により (好ましい一実施態様では、 K 又は R により、好ましい一実施態様では、 K により、好ましい一実施態様では、 399 又は 356 位におけるアミノ酸は、 K により置換されている) 置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。更なる一実施態様では、前述の置換に加えて、一方の重鎖の CH3 ドメインにおいて、 409 位におけるアミノ酸 K 又は R は、負に荷電したアミノ酸により (好ましい一実施態様では、 E 又は D により、好ましい一実施態様では、 D により) 置換されている (Kabat EU インデックスに従ってナンバリング)。更なる一実施態様では、前述の置換に加えて又は代替的に、一方の重鎖の CH3 ドメイ

40

50

ンにおいて、439位におけるアミノ酸K及び/又は370位におけるアミノ酸Kは、それぞれ独立して、負に荷電したアミノ酸により(好ましい一実施態様では、E又はDにより、好ましい一実施態様では、Dにより)置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

【0291】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2007/147901号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。本明細書で報告された前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、253位におけるアミノ酸Kは、Eにより置換されており、282位におけるアミノ酸Dは、Kにより置換されており、322位におけるアミノ酸Kは、Dにより置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、239位におけるアミノ酸Dは、Kにより置換されており、240位におけるアミノ酸Eは、Kにより置換されており、292位におけるアミノ酸Kは、Dにより置換されている(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)。

10

【0292】

本明細書で報告された多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2007/110205号に記載されたアプローチが、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するのに使用される。

【0293】

全ての態様の一実施態様及び本明細書で報告された実施態様では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体又は三重特異性抗体である。本発明の好ましい一実施態様では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。

20

【0294】

本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、抗体は、二価又は三価の抗体である。一実施態様において、抗体は、二価抗体である。

【0295】

本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、多重特異性抗体は、IgG型抗体の定常ドメイン構造を有する。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG1のもの又は突然変異L234A及びL235Aを有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG2のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG3のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG4のもの又は更なる突然変異S228Pを有するヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が突然変異L234A及びL235A(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)を有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が突然変異L234A、L235A、及びP329G(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)を有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が突然変異S228P及びL235E(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)を有するヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする。本明細書で報告された全ての態様の更なる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が突然変異S228P、L235E、及びP329G(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)を有するヒトサブク

30

40

50

ラス I g G 4 のものであることを特徴とする。

【 0 2 9 6 】

本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、本明細書で特定された C H 3 ドメインを含む重鎖を含む抗体は、更なる C 末端グリシン - リシンジペプチド ( G 4 4 6 及び K 4 4 7 、 Kabat EU インデックスに従ってナンバリング ) を含む。本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、本明細書で特定された C H 3 ドメインを含む重鎖を含む抗体は、更なる C 末端グリシン残基 ( G 4 4 6 、 Kabat EU インデックスに従ってナンバリング ) を含む。

【 0 2 9 7 】

一実施態様において、抗体は、第 1 の F c 領域ポリペプチドと第 2 の F c 領域ポリペプチドとを含み、

i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i v ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 S 3 5 4 C 、 T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 Y 3 4 9 C 、 T 3 6 6 S 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 P 3 2 9 G 、 S 3 5 4 C 、 T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 A 、 P 3 2 9 G 、 Y 3 4 9 C 、 T 3 6 6 S 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i i i ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i x ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 S 3 5 4 C 、 T 3 6 6 W を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 Y 3 4 9 C 、 T 3 6 6 S 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

x ) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 P 3 2 9 G 、 S 3 5 4 C 、 T 3 6 6 W を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P 、 L 2 3 5 E 、 P 3 2 9 G 、 Y 3 4 9 C 、 T 3 6 6 S 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドである。

【 0 2 9 8 】

一実施態様において、抗体は、第 1 の F c 領域ポリペプチドと第 2 の F c 領域ポリペプチドとを含み、

10

20

30

40

50

抗体は、第1のFc領域ポリペプチド及び第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせ

- i) I253A、H310A、及びH435A、又は
- ii) H310A、H433A、及びY436A、又は
- iii) L251D、L314D、及びL432D、又は
- iv) i) ~ iii) の組み合わせ

を含む。

#### 【0299】

本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、本明細書で報告された抗体は、エフェクターサイレントな抗体である。本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、抗体は、エフェクターサイレントな抗体であり、ヒトFcRnに結合しない。本明細書で報告された全ての態様の好ましい一実施態様は、ヒトサブクラスIgG1の抗体であり、両重鎖において、突然変異L234A、L235A、P329G、I253A、H310A、及びH434A(カバットインデックスに従ってナンバリング)を有する。

10

#### 【0300】

更なる態様では、上記実施態様のいずれかの抗IL-1ベータ抗体は、以下のセクション1~4に記載された特徴のいずれかを、単独で又は組み合わせにおいて包含してもよい。

20

#### 【0301】

##### 1. 抗体親和性

KD値を決定するための方法は、以下の実施例に概説されている。

#### 【0302】

BIACORE(登録商標)表面プラズモン共鳴アッセイ法を使用する場合、KD値を、下記のように代替的に測定することができる。BIACORE(登録商標)-2000又はBIACORE(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用するアッセイ法を、25において、固定抗原CM5チップにより、約10応答単位(RU)において行う。一実施態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ(CM5, BIACORE, Inc.)を、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)により、供給元の説明に従って活性化させる。抗原を、流速5μl/分での注入前に、約10応答単位(RU)のカップリングされたタンパク質を達成するために、10mM酢酸ナトリウム、pH4.8により、5μg/ml(約0.2μM)に希釈する。抗原の注入後に、1Mエタノールアミンを、反応しなかった基をブロックするために注入する。動力学測定のために、2倍系列希釈のFab(0.78nM~500nM)を、0.05%ポリソルベート20(TWEEN-20(商標))界面活性剤を含むPBS(PBST)中に、25において、流速約25μl/分で注入する。会合速度( $k_a$ )及び解離速度( $k_d$ )を、単純な1対1ラングミュア結合モデル(BIACORE(登録商標)Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を使用して、会合及び解離のセンサグラムを同時に当て嵌めることにより算出する。平衡解離定数(KD)を、比 $k_d/k_a$ として算出する(例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881を参照のこと)。上記表面プラズモン共鳴アッセイ法によるon速度が $10^6 M^{-1}s^{-1}$ を超える場合には、会合速度を、25において、PBS、pH7.2中の20nM抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295nm; 放出=340nm、バンドパス16nm)における増大又は減少を、分光計、例えば、ストップフローを備える分光計(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備える8000-シリーズ SLM-AMINCO(商標)分光計(ThermoSpectronic)において測定した場合、増大する濃度の抗体の存在下において測定する蛍光クエンチ技術を使用することにより決定することができる。

30

#### 【0303】

##### 2. キメラ及びヒト化抗体

特定の実施態様では、本明細書で提供された抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号; 及び、Morrison, S.L. et al., Proc

40

50

. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト靈長類、例えば、サル由来の可変領域）と、ヒト定常領域とを含む。更なる例では、キメラ抗体は、「クラススイッチ」抗体である。同抗体では、クラス又はサブクラスが、親抗体のクラス又はサブクラスから変更されている。キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

#### 【0304】

特定の実施態様では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する抗原性を低下させるためにヒト化される。一般的には、ヒト化抗体は、1つ以上の可変ドメインを含む。同ドメインにおいて、HVR、例えば、CDR（又はその一部）は、非ヒト抗体から得られ、FR（又はその一部）は、ヒト抗体配列から得られる。また、ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むであろう。一部の実施態様では、ヒト化抗体中の一部のFR残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が得られる抗体）からの対応する残基により置換される。

10

#### 【0305】

ヒト化抗体及びそれらを製造する方法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633にレビューされており、例えば、Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、  
同第6,982,321号、及び同第7,087,409号; Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34（特異性決定領域（SDR）グラフト化を記載）; Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498（「表面再生」を記載）; Dall'Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60（「FRシャッフリング」を記載）；ならびに、Osbourne, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68及びKlimka, A. et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260（FRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記載）に更に記載されている。  
。

20

#### 【0306】

ヒト化に使用することができるヒトフレームワーク領域は、「ベスト・フィット」法（例えば、Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308を参照のこと）を使用して選択されるフレームワーク領域、軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列から得られるフレームワーク領域（例えば、Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及び、Presta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632を参照のこと）、ヒト成熟（体細胞性に成熟）フレームワーク領域又はヒト生殖系フレームワーク領域（例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633を参照のこと）及び、FRライブリのスクリーニングから得られるフレームワーク領域（例えば、Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及びRosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618）を参照のこと）を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0307】

##### 3. 多重特異性抗体

本明細書で提供された抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2種類の部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、一方の結合特異性は、IL-1ベータに対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。特定の実施態様では、二重特異性抗体は、IL-1ベータの2種類のエピトープに結合することができる。また、二重特異性抗体は、細胞毒剤を、IL-1ベータを発現している細胞に局在させるのにも使用することができる。

40

#### 【0308】

50

二重特異性抗体を製造するための技術は、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖ペアのリコンビナント共発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540、国際公開公報第93/08829号、及びTraunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659を参照のこと) 及び「ノブ - in to - ホール」操作 (例えば、米国特許第5,731,168号を参照のこと) を含むが、これらに限定されない。また、多重特異性抗体は、抗体Fcヘテロ二量体分子を製造するための静電ステアリング効果を操作すること (国際公開公報第2009/089004)、2つ以上の抗体又はフラグメントを架橋させること (例えば、米国特許第4,676,980号及びBrennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83を参照のこと)、二重特異性抗体を製造するためのロイシンジッパーを使用すること (例えば、Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553を参照のこと)、二重特異性抗体フラグメントを製造するための「ディアボディ」技術を使用すること (例えば、Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993) 6444-6448を参照のこと)、及び一本鎖Fv(sFv)二量体を使用すること (例えば、Gruber, M. et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374を参照のこと) 及び、例えば、Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69に記載された三重特異性抗体を調製することによっても製造することができる

### 【0309】

また、「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的な抗原結合部位を有する操作された抗体も、本明細書に含まれる (例えば、米国特許出願公開公報第2006/0025576号を参照のこと)。

### 【0310】

また、本明細書における抗体又はフラグメントは、IL-1ベータ及び別の種類の抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」又は「DAF」も含む (例えば、米国特許出願公開公報第2008/0069820号を参照のこと)。

### 【0311】

また、本明細書における抗体又はフラグメントは、国際公開公報2009/080251号、同第2009/080252号、同第2009/080253号、同第2009/080254号、同第2010/112193号、同第2010/115589号、同第2010/136172号、同第2010/145792号、及び同第2010/145793号に記載された多重特異性抗体も含む。

### 【0312】

#### 4. 抗体変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供された抗体のアミノ酸変異体が想到される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善するのが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な改変を、抗体をコードするヌクレオチド配列に導入することにより又はペプチド合成により調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸残基からの欠失、及び/又は、同配列内への挿入、及び/又は、同配列内の残基の置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終的な構築物を得るのに行うことができる。ただし、最終的な構築物が所望の特徴、例えば、抗原結合性を有するという条件である。

### 【0313】

#### a) 置換、挿入、及び欠失変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換変異原性の対象となる部位は、HVR及びFRを含む。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下の表に示す。更なる置換的変更は、表1中の「例示的な置換」の見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラスへの言及において更に以下に記載される。アミノ酸置換は、対象となる抗体、ならびに、所望の活性、例えば、保持/改善された抗原結合性、低下した免疫原性、又は改善されたADCもしくはCDCについてスクリーニングされた生成物に導入することができる。

### 【0314】

10

20

30

40

50

## 【表 70】

表

元の残基	例示的な置換	例示的な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

## 【0315】

アミノ酸は、共通する側鎖の特性に基づいてグループ化することができる。

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 天然の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎌の配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族性：Trp、Tyr、Phe

## 【0316】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを他のクラスのものに交換する必要があるであろう。

## 【0317】

ある種の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究に選択される得られた変異体は、親抗体に対する特定の生物学的特性（例えば、向上した親和性、低下した免疫原性）における改変（例えば、改善）を有し、及び／又は、親抗体の実質的に保持された特定の生物学的特性を有するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、同抗体は、例えば、ファージディスプレイ系親和性成熟技術、例えば、本明細書で記載されたものを使用して、都合良く生成することができる。簡潔に、1つ以上のHVR残基が成熟され、変異型抗体は、ファージ上に提示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

## 【0318】

変異（例えば、置換）は、例えば、抗体親和性を改善するために、HVR中にすることができる。このような突然変異は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を受けるコドンによりコードされる残基（例えば、Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196を参照のこと）、及び／又は、抗原と

50

接触する残基にすることができる。得られた変異V H又はV Lは、結合親和性について試験される。二次ライプラリを構築及び二次ライプラリから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al. in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37に記載されている。親和性成熟の一部の実施態様では、多様性が、各種の方法（例えば、エラープローンP C R、鎖シャッフリング、又はオリゴスクレオチド指定突然変異）のいずれかにより、成熟について選択される可変遺伝子内に導入される。ついで、二次ライプラリが調製される。ついで、このライプラリが、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定するのにスクリーニングされる。多様性を導入する別の方法は、H V R 指定アプローチを含む。そのアプローチにおいて、複数のH V R 残基（例えば、一度に4～6個の残基）がランダム化される。抗原結合性に関するH V R 残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発を使用して、又は、モデリングして、特異的に特定することができる。特に、CDR - H 3 及びCDR - L 3 が、多くの場合、ターゲッティングされる。

10

## 【0319】

特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、このような変異が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のH V R 内に起こすことができる。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変化（例えば、本明細書で提供された保存的置換）を、H V R 中にすることができる。このような変化は、例えば、H V R 中の抗原接觸残基の外側でもよい。上記で提供された変異V H及びV L配列の特定の実施態様では、各H V R は、変化していないか、又は、2つ以下、2つもしくは3つのアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

20

## 【0320】

突然変異誘発のためにターゲッティングすることができる抗体の残基又は領域を特定するのに有用な方法は、Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085に記載されている、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、ターゲット残基の残基又は基（例えば、荷電残基、例えば、arg、asp、his、lys、及びglu）が特定され、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けたかどうかを決定する。更なる置換は、最初の置換に対する機能的感受性を証明するアミノ酸位置に導入することができる。代替的に又は付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原との間の接觸点を特定する。このような接觸残基及び隣接する残基は、置換のための候補としてターゲッティングすることができ、又は、除去することができる。変異体は、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定するのにスクリーニングすることができる。

30

## 【0321】

アミノ酸配列挿入は、長さが1つの残基から100個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲で、アミノ末端融合及び/又はカルボキシル末端融合、ならびに、1つ又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を長くする、（例えば、ADEPTのための）酵素又はポリペプチドへの抗体のN末端又はC末端に対する融合物を含む。

40

## 【0322】

## b ) グリコシリ化変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供された抗体は、抗体がグリコシリ化されている度合いを向上又は低下させるように改変される。抗体に対するグリコシリ化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を改変させることにより、都合良く達成することができる。これにより、1つ以上のグリコシリ化部位が形成又は除去される。

## 【0323】

抗体がFc領域を含む場合、それに付着した炭水化物を改変することができる。哺乳類細胞により產生されるネイティブな抗体は、典型的には、二分岐したオリゴ糖を含む。同オリゴ糖は、一般的には、Fc領域におけるCH2ドメインのAsn297にN-結合に

50

より付着する（例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32を参照のこと）。オリゴ糖は、二分岐したオリゴ糖構造の「幹」において、G 1 c N A c に付着した、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン ( G 1 c N A c ) 、ガラクトース、及びシアル酸ならびにフコースを含むことができる。一部の実施態様では、本発明の抗体中のオリゴ糖の改変を、特定の改善した特性を有する抗体変異体を形成するためにすることができる。

#### 【 0 3 2 4 】

一実施態様において、（直接又は間接的に）F c 領域に付着したフコースを欠いた炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、このような抗体におけるフコース量は、1%～80%、1%～65%、5%～65%、20%～40%であることができる。  
10 フコース量は、例えば、国際公開公報第2008/077546号に記載された、MALDI-TOF質量分光法により測定された、A s n 2 9 7 に付着した全ての糖構造の合計に対する、A s n 2 9 7 における糖鎖（例えば、複雑で、ハイブリッドで、高いマンノース構造）内のフコースの平均量を算出することにより決定される。A s n 2 9 7 は、F c 領域におけるおよそ297位（F c 領域残基のE U ナンバリング）に位置するアスパラギン残基を意味する。ただし、A s n 2 9 7 は、抗体中の小さな配列突然変異により、297位の上流又は下流の約±3個のアミノ酸、すなわち、294～300位の間に位置することもできる。このようなフコシル化変異体は、改善されたADC C機能を有する場合がある。例えば、米国特許出願公開公報第2003/0157108号；同第2004/0093621号を参照のこと。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例は、米国特許出願公開公報第2003/0157108号；国際公開公報第20000/61739号；同第2001/29246号；米国特許出願公開公報第2003/0115614号；同第2002/0164328号；同第2004/0093621号；同第2004/0132140号；同第2004/0110704号；同第2004/0110282号；同第2004/0109865号；国際公開公報第2003/085119号；同第2003/084570号；同第2005/035586号；同第2005/035778号；同第2005/053742号；同第2002/031140号；Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249；Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622を含む。脱フコシル化抗体を產生可能な細胞株の例は、タンパク質のフコシル化を欠損しているL e c 1 3 C H O 細胞 (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545；米国特許出願公開公報第2003/0157108号；及び国際公開公報第2004/056312号、特に実施例11）及びノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるF U T 8 ノックアウトC H O 細胞（例えば、Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688；及び、国際公開公報第2003/08510号を参照のこと）を含む。  
20  
30

#### 【 0 3 2 5 】

二分岐したオリゴ糖を含む抗体変異体が更に提供される。例えば、同抗体において、抗体のF c 領域に付着した二分岐したオリゴ糖は、G 1 c N A c により二分岐される。このような抗体変異体は、低下したフコシル化及び/又は改善されたADC C機能を有する場合がある。このような抗体変異体の例は、例えば、国際公開公報第2003/011878号；米国特許第6,602,684号；及び米国特許出願公開第2005/0123546号に記載されている。また、F c 領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有する場合がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開公報第1997/30087号；同第1998/58964号；及び同第1999/22764号に記載されている。  
40

#### 【 0 3 2 6 】

##### c ) F c 領域変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸改変を、本明細書で提供された抗体のF c 領

10

20

30

40

50

域に導入することにより、Fc領域変異体を生成することができる。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置において、アミノ酸改変（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のFc領域）を含んでもよい。

### 【0327】

特定の実施態様では、本発明は、全てのエフェクター機能の一部を有するが全ては有さない抗体変異体を考慮する。同変異体は、in vivoにおける抗体の半減期が重要である用途の望ましい候補となる。更なる特定のエフェクター機能（例えば、相補性及びADCC）は必須でないか、又は、有害である。in vitro及び/又はin vivoにおける細胞毒アッセイ法は、CDC及び/又はADCC活性の減少/欠損を確認するのに行うことができる。例えば、Fcレセプター（FcR）結合アッセイ法は、抗体がFcR結合性を欠いている（このため、おそらくADCC活性を欠いている）が、FcRn結合能を保持していることを確保するのに行うことができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現しているが、単球は、FcRI、FcRIII、及びFcRIVを発現している。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492における第464頁の表3中に概説されている。対象となる分子のADCC活性を評価するin vitroアッセイ法の非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063；及びHellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502を参照のこと）；米国特許第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361を参照のこと）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を利用することができる（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞毒アッセイ法（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA）及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞毒アッセイ法（Promega, Madison, WI）を参照のこと）。このようなアッセイ法に有用なエフェクター細胞は、末梢血単核球（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。代替的に又は付加的に、対象となる分子のADCC活性は、例えば、Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656に開示されているもの等の動物モデルにおいて、in vivoで評価することができる。Cq1結合アッセイ法も、抗体がC1qと結合できないため、CDC活性を欠いているのを確認するのに行うことができる（例えば、国際公開公報第2006/029879号及び同第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと）。補完的な活性化を評価するために、CDCアッセイ法を行うことができる（例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171；Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052；及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743を参照のこと）。FcRn結合性及びin vivoクリアランス/半減期決定も、当技術分野において公知の方法を使用して行うことができる（例えば、Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769を参照のこと）。

### 【0328】

低下したエフェクター機能を有する抗体は、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、及び329の1つ以上の置換を有するものを含む（米国特許第6,737,056号）。このようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297、及び327の2つ以上に置換を有するFc領域変異体を含む（米国特許第7,332,581号）。

### 【0329】

改善又は減少したFcRに対する結合性を有する特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開公報第2004/056312号、及びShields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604を参照のこと）。

### 【0330】

10

20

30

40

50

特定の実施態様では、抗体変異体は、A D C Cを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、F c領域の298位、333位、及び/又は334位(残基のE Uナンバリング)における置換を有するF c領域を含む。

### 【0331】

一部の実施態様では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開公報第99/51642号、及びIdusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に記載されているように、突然変異は、変化した(すなわち、改善したか又は減少したかのいずれかの)C1q結合性及び/又は補体依存性細胞傷害性(C D C)をもたらすF c領域中になされる。

### 【0332】

延長した半減期及び、胎児への母方のIgG輸送を担う(Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593及びKim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)新生児型F cレセプター(F cRn)に対する改善した結合性を有する抗体は、米国特許出願公開公報第2005/0014934号に記載されている。それらの抗体は、F c領域のF cRnへの結合性を改善する、1つ以上の置換をその中に有するF c領域を含む。このようなF c変異体は、F c領域残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、又は434の1つ以上における置換、例えば、F c領域残基434の置換を有するものを含む(米国特許第7,371,826号)。

10

20

### 【0333】

F c領域変異体の他の例に関して、Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; 米国特許第5,648,260号; 同第5,624,821号; 及び国際公開公報第94/29351号も参照のこと。

### 【0334】

#### d) システイン操作抗体変異体

特定の実施態様では、システイン操作抗体、例えば、「チオM A b」を形成するのが望ましい場合がある。同抗体において、抗体の1つ以上の残基は、システイン残基により置換されている。特定の実施態様では、置換された残基は、抗体のアクセシブル部位において起こる。システインによりそれらの残基を置換することにより、反応性チオール基は、抗体のアクセシブル部位に位置することで、抗体を他の部分、例えば、薬剤部分又はリンカー-薬剤部分にコンジュゲートして、本明細書で更に記載された免疫コンジュゲートを形成するのに使用することができる。特定の実施態様では、任意の1つ以上の下記残基:軽鎖のV205(Kabatナンバリング);重鎖のA118(EUナンバリング);及び重鎖F c領域のS400(EUナンバリング)は、システインにより置換することができる。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されているように生成することができる。

30

### 【0335】

#### e) 抗体誘導体

特定の実施態様では、本明細書で提供された抗体は、当技術分野において公知であり、容易に利用できる、更なる非タンパク質性部分を含有するよう更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、水溶性ポリマーを含むが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例は、ポリエチレングリコール(P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/マレイン酸無水物コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、及びこれらの混合物を含むが、これらに限定さ

40

50

れない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために、製造中での利点を有する場合がある。このポリマーは、任意の分子量のものであることができ、分岐鎖又は非分岐鎖であることができる。抗体に付着するポリマー数は変化させることができ、2つ以上のポリマーが付着する場合、それらは、同じか又は異なる分子であることができる。一般的には、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が規定条件下での治療に使用されるであろうかどうか等を含むがこれらに限定されない考慮に基づいて決定することができる。

### 【0336】

別の実施態様では、抗体と、放射への曝露により選択的に加熱することができる非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射は、任意の波長のものでよく、通常の細胞に有害でないが、非タンパク質性部分を、抗体 - 非タンパク質性部分近くの細胞が殺傷される温度に加熱する波長を含むが、これに限定されない。

10

### 【0337】

#### B. リコンビナント法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているリコンビナント法及び組成物を使用して産生することができる。一実施態様において、本明細書で記載された抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列及び／又はV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードすることができる。更なる実施態様では、このような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。更なる実施態様では、このような核酸を含むホスト細胞が提供される。1つのこのような実施態様では、ホスト細胞は、(1)抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列及び抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は、(2)抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクター及び抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクターを含む（例えば、(1)又は(2)によりトランスフォーメーションされている）。一実施態様において、ホスト細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はリンパ球細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施態様において、本明細書で報告された抗体を製造する方法が提供される。ここで、同方法は、抗体の発現に適した条件下において、本明細書で提供された抗体をコードする核酸を含むホスト細胞を培養することと、場合により、ホスト細胞（又はホスト細胞培養培地）から、抗体を回収することとを含む。

20

### 【0338】

抗体のリコンビナント産生のために、例えば、上記された抗体をコードする核酸が単離され、ホスト細胞中で更なるクローニング及び／又は発現のために、1つ以上のベクター内に挿入される。このような核酸は、容易に単離することができ、（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）従来の手法を使用してシークエンシングすることができる。

30

### 【0339】

抗体コードベクターのクローニング又は発現に適したホスト細胞は、本明細書で記載された原核生物又は真核生物の細胞を含む。例えば、特に、グリコシリ化及びFcエフェクター機能を必要としない場合、抗体は、細菌中で産生することができる。細菌中の抗体フラグメント及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号を参照のこと（E. coli中の抗体フラグメントの発現が記載されている、Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照のこと）。発現後、抗体は、細菌細胞のペーストから、可溶性画分中に単離することができ、更に精製することができる。

40

50

## 【0340】

原核生物に加えて、真核生物の微生物、例えば、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす真菌及び酵母株を含む、糸状菌又は酵母が、抗体コードベクター用のクローニング又は発現ホストに適している。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 及びLi, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照のこと。

## 【0341】

グリコシル化抗体の発現に適したホスト細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫細胞を含む。数多くのバキュロウイルス株が特定されており、特にSpodoptera frugiperda細胞のトランسفエクション用の昆虫細胞に関して使用することができる。10

## 【0342】

植物細胞培養物も、ホストとして利用することができる。（（トランسفエクション植物中で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている）例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号を参照のこと）。

## 【0343】

脊椎動物細胞も、ホストとして使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖させるのに適合した哺乳類の細胞株が有用であることができる。有用な哺乳類ホスト細胞株の他の例は、SV40によりトランسفォーメーションされるサル腎臓CV1株（COS-7）；ヒト胚性腎臓株（例えば、Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載されている293又は293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載されているTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカグリーンモンキー腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸ガン細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳房腫瘍（MMT 060562）；例えば、Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載されているTRI細胞；MRC5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳類ホスト細胞株は、DHFR-CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220）ならびにメラノーマ細胞株、例えば、Y0、NS0、及びSp2/0を含む。20

抗体産生に適した特定の哺乳類ホスト細胞株のレビューについては、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照のこと。30

## 【0344】

## C. アッセイ法

本明細書で報告された抗体は、当技術分野において公知の種々のアッセイ法により、その物理的/化学的特性及び/又は生体活性を特定し、スクリーニングし、又は、特徴付けることができる。例示的なアッセイ法は、実施例に報告されている。

## 【0345】

## D. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、1つ以上の細胞毒剤、例えば、化学療法剤又は薬剤、増殖阻害剤、トキシン（例えば、タンパク質トキシン、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性トキシン、またはそれらのフラグメント）又は放射性同位体にコンジュゲートした、本明細書で報告された抗体を含む免疫コンジュゲートも提供する。

## 【0346】

一実施態様において、免疫コンジュゲートは、抗体が1つ以上の薬剤にコンジュゲートした、抗体-薬剤コンジュゲート（ADC）である。同薬剤は、メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号、及び欧洲特許第0425235号を参照のこと）；オーリスタチン、例えば、モノメチルオーリスタチン薬剤部分DE

10

20

30

40

50

及び D F ( M M A E 及び M M A F ) (米国特許第 5 , 6 3 5 , 4 8 3 号、同第 5 , 7 8 0 , 5 8 8 号、及び同第 7 , 4 9 8 , 2 9 8 号を参照のこと) ; ドラスタチン ; カリチアマイシン又はその誘導体 (米国特許第 5 , 7 1 2 , 3 7 4 号、同第 5 , 7 1 4 , 5 8 6 号、同第 5 , 7 3 9 , 1 1 6 号、同第 5 , 7 6 7 , 2 8 5 号、同第 5 , 7 7 0 , 7 0 1 号、同第 5 , 7 7 0 , 7 1 0 号、同第 5 , 7 7 3 , 0 0 1 号、及び同第 5 , 8 7 7 , 2 9 6 号 ; Hinman, L.M. et al., Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342 ; 及び、Lode, H.N. et al., Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928 を参照のこと) ; アントラサイクリン、例えば、ダウノマイシン又はドキソルビシン (Kratz, F. et al., Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523 ; Jeffrey, S.C., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362 ; Torgov, M.Y. et al., Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721 ; Nagy, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834 ; Dubowchik, G.M., et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532 ; King, H.D., et al., J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343 ; 及び、米国特許第 6 , 6 3 0 , 5 7 9 号を参照のこと) ; メトレキサート ; ピンデシン ; タキサン、例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル ; トリクロテセン ; ならびに C C 1 0 6 5 を含むが、これらに限定されない。

10

## 【 0 3 4 7 】

別の実施態様では、免疫コンジュゲートは、酵素活性トキシン又はそのフラグメントにコンジュゲートした、本明細書で記載された抗体を含む。同酵素活性トキシンは、ジフテリア A 鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性フラグメント、(Pseudomonas aeruginosa 由来の)エキソトキシン A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデクシン A 鎖、アルファ - サルシン、Aleurites fordii タンパク質、dianthin タンパク質、Phytolaca americana タンパク質 (PAP I、PAP II、及び PAP - S) 、momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaponaria officinalis 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクロチン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンを含むが、これらに限定されない。

20

## 【 0 3 4 8 】

別の実施態様では、免疫コンジュゲートは、放射性原子にコンジュゲートして、放射性コンジュゲートを形成している、本明細書で記載された抗体を含む。各種の放射性同位体が、放射性コンジュゲートを生成するのに利用できる。例には、At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>、及び Lu の放射性同位体を含む。放射性コンジュゲートが検出に使用される場合、シンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば、Tc<sup>99m</sup> もしくは I<sup>123</sup>、又は、核磁気共鳴 (NMR) 映像法 (磁気共鳴映像法、MRI としても公知) 用のスピニラベル、例えば、再度ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン、又は鉄を含んでもよい。

30

## 【 0 3 4 9 】

抗体と細胞毒剤とのコンジュゲートは、各種の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロパノアート (SPDP) 、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート (SMCC) 、イミノチオラン (IT) 、イミドエステルの二官能誘導体 (例えば、ジメチルアジピミダート HCl ) 、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスペラート) 、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド) 、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン) 、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン) 、ジイソシアート (例えば、トルエン 2 , 6 - ジイソシアート) 、及びビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン) を使用して調製することができる。例えば、リシン免疫トキシンは、Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104 に記載されたように調製することができる。炭素 - 14 ラベル 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチド

40

50

を抗体にコンジュゲートさせるための例示的なキレート剤である。国際公開公報第94/11026号を参照のこと。リンカーは、細胞中で細胞毒剤の放出を容易にする「開裂性リンカー」であることができる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー、又はジスルフィド含有リンカー(Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; 米国特許第5,208,020号)を使用することができる。

#### 【0350】

本明細書における免疫コンジュゲート又はADCは、架橋試薬により調製されたこのようなコンジュゲートに明確に想到するが、これに限定されない。同架橋試薬は、BMPs、EMCs、GMBs、HBVs、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCs、スルホ-GMBs、スルホ-KMUs、スルホ-MBs、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾアート)を含むが、これらに限定されない。これらの試薬は、(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから)市販されている。

10

#### 【0351】

##### E. 医薬製剤

本明細書で記載された多重特異性抗体の医薬製剤は、所望の度合いの純度を有するこのような抗体を、1つ以上の任意の薬学的に許容し得る担体と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液の状態で調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980))。薬学的に許容し得る担体は、一般的には、利用される用量及び濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、バッファー、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸; アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤; 保存剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; ヘキサメトニウムクロリド; ベンザルコニウムクロリド; ベンゼトニウムクロリド; フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール; アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサンオール; 3-ペンタノール; 及びm-クレゾール); 低分子量(約10残基未満の)ポリペプチド; タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン; 親水性ポリマー、例えば、ポリ(ビニルピロリドン); アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシン; グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物; キレート剤、例えば、EDTA; 糖、例えば、ショ糖、マニトール、トレハロース、もしくはソルビトール; 塩形成カウンターイオン、例えば、ナトリウム; 金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体); ならびに/又は非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含むが、これらに限定されない。本明細書において、例示的な薬学的に許容し得る担体は、間質薬分散剤、例えば、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(SHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rhuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)を更に含む。rhuPH20を含む特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開公報第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様において、SHASEGPは、1つ以上の更なるグリコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

20

#### 【0352】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第6,171,586号及び国際公開公報第2006/044908号に記載されているものを含む。後者の製剤は、ヒスチジン-アセタートバッファーを含む。

30

#### 【0353】

また、本明細書における製剤は、処置される特定の適応症に必要な場合、2つ以上の活

40

50

性成分、好ましくは、互いに有害に影響しない補完的な活性を有するものも含有することができる。例えば、抗ANG2抗体又は抗VEGF抗体を更に提供するのが望ましい場合がある。このような活性成分は、意図した目的に効果的な量で、組み合わせ中に適切に存在する。

【0354】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術により、又は、界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリラート)マイクロカプセルそれに、コロイド状薬剤送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)の状態又はマイクロエマルジョンの状態で封入することができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)に開示されている。10

【0355】

持続放出型製剤が調製される場合がある。持続放出型製剤の適切な例は、抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを含む。同マトリックスは、造形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの状態である。

【0356】

in vivo投与に使用される製剤は、一般的には、無菌である。無菌は、例えば、ろ過滅菌膜によるろ過により容易に達成することができる。

【0357】

F. 治療法及び組成物

本明細書で提供された多重特異性抗体のいずれかを、治療法に使用することができる。

【0358】

一態様において、医薬として使用するための、多重特異性抗体が提供される。更なる態様では、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を処置するのに使用するための、多重特異性抗体が提供される。特定の実施態様では、処置方法に使用するための、多重特異性抗体が提供される。特定の実施態様では、本発明は、有効量の多重特異性抗体を、個体に投与することを含む、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を有する個体を処置する方法における使用のための、多重特異性抗体を提供する。このような一実施態様では、該方法は、更に、有効量の、例えば、以下に記載された少なくとも1つの更なる治療剤を、個体に投与することを含む。更なる実施態様では、本発明は、血管新生を阻害するのに使用するための、多重特異性抗体を提供する。特定の実施態様では、本発明は、個体中の血管新生を阻害する方法であって、血管新生を阻害するのに有効量の多重特異性抗体を個体に投与することを含む方法に使用するための、多重特異性抗体を提供する。上記実施態様のいずれかの「個体」は、好ましくは、ヒトである。30

【0359】

更なる態様では、本発明は、医薬の製造又は調製における、多重特異性抗体の使用を提供する。一実施態様において、医薬は、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を処置するためのものである。更なる実施態様では、医薬は、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を有する個体に有効量の該医薬を投与することを含む、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を処置する方法に使用するためのものである。このような一実施態様では、該方法は、更に、有効量の、例えば、以下に記載された少なくとも1つの更なる治療剤を、個体に投与することを含む。更なる実施態様では、医薬は、血管新生を阻害するためのものである。更なる実施態様では、医薬は、個体中の血管新生を阻害する方法であって、血管新生を阻害するのに有効量の該医薬を個体に投与することを含む方法に使用するためのものである。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトであることができる。40

【0360】

更なる態様では、本発明は、眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を処置するための方法を提供する。一実施態様において、該方法は、このような眼血管疾患、好ましくは、黄斑変性を有する個体に、有効量の多重特異性抗体を投与することを含む。このような一実施

10

20

30

40

50

態様では、該方法は、更に、有効量の、以下に記載された少なくとも1つの更なる治療剤を、個体に投与することを含む。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトであることができる。

#### 【0361】

更なる態様では、本発明は、個体中の血管新生を阻害するための方法を提供する。一実施態様において、該方法は、血管新生を阻害するのに有効量の多重特異性抗体を個体に投与することを含む。一実施態様において、「個体」はヒトである。

#### 【0362】

更なる態様では、本発明は、例えば、上記治療法のいずれかに使用するための、本明細書で提供された多重特異性抗体のいずれかを含む医薬製剤を提供する。一実施態様において、医薬製剤は、本明細書で提供された多重特異性抗体のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む。別の実施態様では、医薬製剤は、本明細書で提供された多重特異性抗体のいずれかと、例えば、以下で記載された少なくとも1つの更なる治療剤とを含む。

10

#### 【0363】

本発明の抗体は、治療において、単独又は他の治療剤との組み合わせのいずれかで使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの更なる治療剤と共に投与することができる。特定の実施態様では、更なる治療剤は、抗VEGF抗体又は抗ANG2抗体である。

#### 【0364】

上記されたこのような組み合わせの治療法は、組み合わせられた投与（この場合、2つ以上の治療剤が同じ又は別箇の製剤に含まれる）及び別箇の投与を包含する。この場合、本発明の抗体の投与を、1つ以上の更なる治療剤の投与前、同投与と同時に、及び／又は、同投与後に行うことができる。一実施態様において、多重特異性抗体の投与及び更なる治療剤の投与は互いに、約1か月以内又は約1、2、もしくは3週間以内、又は、約1、2、3、4、5、もしくは6日以内に行う。

20

#### 【0365】

本発明の抗体（及び任意の更なる治療剤）は、任意の適切な手段により投与することができる。同手段は、非経口、肺内、及び鼻内、及び局所処置の必要に応じて、病巣内投与を含む。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投与は、一部、投与が短期間であるか、又は、慢性的であるかに応じて、任意の適切な経路により、例えば、静脈内又は皮下注入などの注入によることができる。種々の投与計画は、種々の時点にわたる単回又は複数回の投与、ボーラス投与を含むが、これらに限定されない。パルス注入が、本明細書において考慮される。

30

#### 【0366】

本発明の抗体は、適性診療規範（good medical practice）に合致する方法で、配合、製剤化、及び投与されるであろう。この文脈において考慮すべき要因は、処置される特定の障害、処置される特定のほ乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療実務家に公知の他の要因を含む。抗体は、対象となる障害を予防又は治療するのに現在使用されている1つ以上の薬剤と共に、任意選択的に配合されるが、同配合は必ずしも必要ではない。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類、及び上記で検討された他の要因により決まる。これらは、一般的には、同じ用量で、本明細書で記載された投与経路により使用される。また、約1～99% 本明細書で記載された用量で、又は、経験的に／臨床的に適切であると決定される任意の用量および任意の経路で使用される。

40

#### 【0367】

疾患の予防又は治療のために、適切な用量の本発明の抗体（単独又は1つ以上の他の更なる治療剤との組み合わせ時に）は、処置される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防又は治療目的で投与されるかどうか、以前の治療、患者の既往歴、及び抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量により決まるであろう。抗体は、1回又は一連の処置にわたって、患者に適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約1

50

$\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1.5\text{ mg}/\text{kg}$  ( 例えば、 $0.5\text{ mg}/\text{kg} \sim 1.0\text{ mg}/\text{kg}$  ) 抗体が、例えば、1回以上の別箇の投与によるか又は連続的な注入によるかに関わらず、患者に投与するための最初の候補用量であることができる。1つの典型的な日量は、上記された要因に応じて、約  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1.00\text{ mg}/\text{kg}$  以上の範囲であることができる。数日以上にわたる繰返しでの投与のために、症状に応じて、処置は、一般的には、疾患兆候の所望のサプレッションが生じるまで、持続されるであろう。抗体の1つの例示的な用量は、約  $0.05\text{ mg}/\text{kg} \sim 1.0\text{ mg}/\text{kg}$  の範囲であろう。このため、約  $0.5\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{ mg}/\text{kg}$ 、又は  $1.0\text{ mg}/\text{kg}$  の内の1つ以上の用量 ( 又は、それらの任意の組み合わせ ) を、患者に投与することができる。このような用量は、例えば、毎週又は三週間毎に断続的に投与することができる ( 例えば、これにより、患者は、約2～約20回、又は、例えば、約6回の抗体の投与を受ける )。最初のより大きいローディング用量、続けて、1つ以上のより小さい用量が投与されてもよい。ただし、他の投与計画も有用であることができる。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイ法により、容易にモニターされる。

10

### 【 0368 】

上記製剤又は治療法のいずれかが、多重特異性抗体に代えて、又は、同多重特異性抗体に加えて、本発明の免疫コンジュゲートを使用して行うことができることが理解される。

### 【 0369 】

#### I II I . 製品

本発明の別の態様では、上記された障害の治療、予防、及び / 又は診断に有用な材料を含有する製品が提供される。本製品は、容器と、該容器上又は該容器に関連するラベル又は添付文書を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリング、IV溶液バッグ等を含む。容器は、各種の材料、例えば、ガラス又はプラスチックから形成することができる。容器は、組成物自体、又は、症状を治療、予防、及び / 又は診断するのに有効な別の組成物との組み合わせで、組成物を保持し、無菌アクセスポートを有してもよい ( 例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針により突き刺し可能なストッパーを有するバイアルでもよい )。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が選択された症状を処置するのに使用されることを示す。さらに、本製品は、( a ) 本製品に含有される組成物を含む第1容器であって、同組成物が本発明の抗体を含む第1容器と、( b ) 本製品に含有される組成物を含む第2容器であって、同組成物が更なる細胞毒又はその他の方法での治療剤を含む第2容器とを含んでもよい。本発明のこの実施態様における製品は、組成物が特定の症状を処置するのに使用することができることを示す添付文書を更に含んでもよい。代替的に又は付加的に、本製品は、薬学的に許容し得るバッファー、例えば、注射用静菌水 ( B W F I )、リン酸緩衝生理食塩水、リングル液、及びデキストロース溶液を含む第2 ( 又は第3 ) 容器を更に含む。他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針、及びシリングを含む、商業的及びユーザ視点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

20

### 【 0370 】

上記製品のいずれかが、抗IL-1ベータ抗体に代えて、又は、同抗体に加えて、本発明の免疫コンジュゲートを含むことができることが理解される。

30

### 【 0371 】

#### I V . 具体的な実施態様

1. ヒトANG2、ヒトVEGF、ヒトIL-1ベータ、及びヒトPDGF-Bからなる群より選択される2種類の抗原に特異的に結合する、二重特異性抗体。

40

### 【 0372 】

2. i) ヒトANG2と、ii) ヒトIL-1ベータ又はヒトPDGF-Bとに特異的に結合する、二重特異性抗体。

### 【 0373 】

3. i) ヒトVEGFと、ii) ヒトIL-1ベータ又はヒトPDGF-Bとの2つに特異的に結合する、二重特異性抗体。

### 【 0374 】

50

4. ヒトIL-1ベータとヒトPDGF-Bとに特異的に結合する、二重特異性抗体。

【0375】

5. 抗体が、ヒトIL-1ベータに特異的に結合し、

a )

( a ) 配列番号：02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：04のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：05のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

( a ) 配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

( a ) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H3

を含む重鎖可変ドメインと、

( a ) 配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、

あるいは、

a ) 配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～4のいずれか1つ記載の抗体。

【0376】

6. 抗体が、ヒトIL-1ベータに特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号：07のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：08のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、

( a ) 配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～5のいずれか1つ記載の抗体。

【0377】

7. 抗体が、ヒトPDGF-Bに特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：33のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b ) ( a ) 配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：42のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：46のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c ) ( a ) 配列番号：48のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b ) 配列番号：49のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び( c ) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号：53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( b ) 配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び( c ) 配列番号：55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～6のいずれか1つ記載の抗体。

10

20

30

40

50

## 【0378】

8. 抗体が、ヒトP D G F - Bに特異的に結合し、

(a) 配列番号：30のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：31のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：33のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：35のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：36のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：37のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～7のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0379】

9. 抗体が、ヒトP D G F - Bに特異的に結合し、

(a) 配列番号：39のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：40のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：42のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：44のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：45のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：46のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～7のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0380】

10. 抗体が、ヒトP D G F - Bに特異的に結合し、

(a) 配列番号：48のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：49のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：53のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：54のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：55のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1～7のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0381】

11. 抗体が、ヒトA N G 2に特異的に結合し、

a) (a) 配列番号：57のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：58のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：60のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：62のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：63のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：64のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

b) (a) 配列番号：66のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：67のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：69のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：71のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：72のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：73のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

c) (a) 配列番号：75のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：76のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：78のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：80のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：81のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：82のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含むか、又は

d) (a) 配列番号：84のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：85のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号：87のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列番号：89のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号：90のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号：91のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1、2、及び5～10のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0382】

12. 抗体が、ヒトA N G 2に特異的に結合し、

(a) 配列番号：75のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号：76のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：78のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメインと、(a)配列番号：80のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号：81のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号：82のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメインとを含む、実施態様1、2、及び5～11のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0383】

13. 抗体が、ヒトVEGFに特異的に結合し、

a) 配列番号：107の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3と、配列番号：108の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3とを含むか、又は

b) 配列番号：109の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3と、配列番号：110の重鎖可変ドメインに含有されるHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3とを含む、実施態様1、3、及び5～12のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0384】

14. 抗体が、ヒトVEGFに特異的に結合し、

配列番号：107及び配列番号：108それぞれにおけるHC及びLC配列を含み、同HC及びLC配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む、実施態様1、3、及び5～13のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0385】

15. 抗体が、ヒトVEGFに特異的に結合し、

配列番号：109及び配列番号：110それぞれにおけるHC及びLC配列を含み、同HC及びLC配列が、それらの配列の翻訳後修飾を含む、実施態様1、3、及び5～13のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0386】

16. 抗体が、ヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4のものである、実施態様1～15のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0387】

17. 抗体が、カッパ軽鎖を有するヒトサブクラスIgG1のものである、実施態様1～16のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0388】

18. 抗体が、モノクローナル抗体である、実施態様1～17のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0389】

19. 抗体が、二重特異性抗体である、実施態様1～18のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0390】

20. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられている第2の軽鎖及び第2の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0391】

21. 抗体は、

i) a)の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位におけるアミノ酸(Kabatに従ってナンバリング)が、リシン(K)、アルギニン(R)、又はヒスチジン(H)により独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)により独立して)置換されており、a)の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位におけるアミノ酸又は213位におけるアミノ酸(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)により独立して

10

20

30

40

50

置換されているか、又は

i i ) b ) の第 2 の軽鎖の定常ドメイン C L において、1 2 4 位におけるアミノ酸 (K a b a t に従ってナンバリング) が、リシン (K) 、アルギニン (R) 、又はヒスチジン (H) により独立して (好ましい一実施態様では、リシン (K) 又はアルギニン (R) により独立して) 置換されており、b ) の第 2 の重鎖の定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 位におけるアミノ酸又は 2 1 3 位におけるアミノ酸 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) が、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D) により独立して置換されている、実施態様 2 0 記載の抗体。

#### 【 0 3 9 2 】

2 2 . 抗体は、第 2 の重鎖の定常ドメイン C L において、1 2 4 及び 1 2 3 位におけるアミノ酸 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) が、K により置換されている、実施態様 2 0 又は 2 1 記載の抗体。 10

#### 【 0 3 9 3 】

2 3 . 抗体は、第 2 の軽鎖の定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 及び 2 1 3 位におけるアミノ酸 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) が、E により置換されている、実施態様 2 0 ~ 2 2 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 3 9 4 】

2 4 . 抗体は、第 1 の軽鎖の定常ドメイン C L において、1 2 4 及び 1 2 3 位におけるアミノ酸が、K により置換されており、第 1 の重鎖の定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 及び 2 1 3 位におけるアミノ酸 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) が、E により置換されている、実施態様 2 0 ~ 2 3 のいずれか 1 つ記載の抗体。 20

#### 【 0 3 9 5 】

2 5 . 抗体は、第 2 の重鎖の定常ドメイン C L において、1 2 4 及び 1 2 3 位におけるアミノ酸が、K により置換されており、第 2 の軽鎖の定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 及び 2 1 3 位におけるアミノ酸が、E により置換されており、第 1 の軽鎖の可変ドメイン V L において、3 8 位におけるアミノ酸が、K により置換されており、第 1 の重鎖の可変ドメイン V H において、3 9 位におけるアミノ酸が、E により置換されており、第 2 の重鎖の可変ドメイン V L において、3 8 位におけるアミノ酸が、K により置換されており、第 2 の軽鎖の可変ドメイン V H において、3 9 位におけるアミノ酸が、E により置換されている (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) 、実施態様 2 0 ~ 2 4 のいずれか 1 つ記載の抗体。 30

#### 【 0 3 9 6 】

2 6 . 抗体が、

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合する抗体の第 1 の軽鎖及び第 1 の重鎖と、

b ) 第 2 の抗原に特異的に結合する抗体の第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖であって、第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖の可変ドメイン V L 及び V H が、互いに置き換えられており、第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖の定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 3 9 7 】

2 7 . 抗体が、

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合する抗体の第 1 の軽鎖及び第 1 の重鎖と、

b ) 第 2 の抗原に特異的に結合する抗体の第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖であって、第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖の定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられている第 2 の軽鎖及び第 2 の重鎖とを含む、二価の二重特異性抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 3 9 8 】

2 8 . 抗体が、

a ) 第 1 の抗原に特異的に結合し、2 つの抗体重鎖及び 2 つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

10

20

30

40

50

b) 1～4つの更なる抗原に特異的に結合する（すなわち、第2及び／又は第3及び／又は第4及び／又は第5の抗原、好ましくは、1つの更なる抗原、すなわち、第2の抗原に特異的に結合する）、1、2、3、又は4つの一本鎖Fabフラグメントとを含み、

前記b)の一本鎖Fabフラグメントが、前記a)の全長抗体に、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端において融合している、多重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0399】

29. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖及び2つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

10

b)

b a) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)、又は

b b) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体定常ドメイン1(CH1)からなる第1のポリペプチドであって、前記第1のポリペプチドが、そのVHドメインのN末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の方のC末端に融合している第1のポリペプチドと、

c)

c a) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、又は

c b) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体軽鎖定常ドメイン(CL)からなる第2のポリペプチドであって、前記第2のポリペプチドが、VLドメインのN末端により、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の方のC末端に融合している第2のポリペプチドとを含み、

20

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)と第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが共に、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成している、三価の二重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0400】

30. b) のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)と、c) のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが連結しており、下記位置：

i) 重鎖可変ドメインの44位と軽鎖可変ドメインの100位、又は

30

i i) 重鎖可変ドメインの105位と軽鎖可変ドメインの43位、又は

i i i) 重鎖可変ドメインの101位と軽鎖可変ドメインの100位（通常、Kabat-EUインデックスに従ってナンバリング）、

の間へのジスルフィド結合の導入による鎖間ジスルフィド架橋により安定化されている、実施態様29記載の抗体。

#### 【0401】

31. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する全長抗体の第2の（改変）軽鎖及び第2の（改変）重鎖であって、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、及び／又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられている第2の（改変）軽鎖及び第2の（改変）重鎖と、

40

c) 1～4つの抗原結合ペプチドであって、これらが、1つ又は2つの更なる抗原に（すなわち、第3及び／又は第4の抗原に）特異的に結合し、ペプチドリンカーを介して、a)及び／又はb)の軽鎖又は重鎖のC末端又はN末端に融合している1～4つの抗原結合ペプチドとを含む、三重特異性又は四重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0402】

32. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する（かつ、2つのFabフラグメントを含む）抗体の2つの軽鎖及び2つの重鎖と、

50

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の2つの更なるF(ab)フラグメントであって、前記更なるF(ab)フラグメントが、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はN末端のいずれかに融合している2つの更なるF(ab)フラグメントを含み、

F(ab)フラグメントにおいて、下記改変が行われている、

i) a)の両F(ab)フラグメント及びb)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、及び/又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、

又は

ii) a)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、かつ

b)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、又は

iii) a)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、又は、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、かつ

b)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、

又は

iv) a)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられており、b)の両F(ab)フラグメントにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、

又は

v) a)の両F(ab)フラグメントにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、互いに置き換えられており、b)の両F(ab)フラグメントにおいて、可変ドメインVL及びVHが、互いに置き換えられている、

二重特異性の四価抗体である、実施態様1~19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0403】

33. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、第1のVH-CH1ドメインペアを含む第1の抗体の(改変)重鎖であって、前記重鎖のC末端に、前記第1の抗体の第2のVH-CH1ドメインペアのN末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第1の抗体の(改変)重鎖と、

b) 前記a)の第1の抗体の2つの軽鎖と、

c) 第2の抗原に特異的に結合し、第1のVH-CLドメインペアを含む第2の抗体の(改変)重鎖であって、前記重鎖のC末端に、前記第2の抗体の第2のVH-CLドメインペアのN末端が、ペプチドリンカーを介して融合している第2の抗体の(改変)重鎖と、

d) 前記c)の第2の抗体の2つの(改変)軽鎖であって、それぞれが、CL-CH1ドメインペアを含む第2の抗体の2つの(改変)軽鎖とを含む、二重特異性の四価抗体である、実施態様1~19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0404】

34. 抗体が、

a) 第1の抗原に特異的に結合する第1の全長抗体の重鎖及び軽鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する第2の全長抗体の重鎖及び軽鎖であって、重鎖のN末端が、軽鎖のC末端に、ペプチドリンカーを介して連結している、二重特異性抗体である、実施態様1~19のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0405】

35. 抗体が、

10

20

30

40

50

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖及び2つの抗体軽鎖からなる全長抗体と、

b) 第2の抗原に特異的に結合し、VH<sup>2</sup>ドメイン及びVL<sup>2</sup>ドメインを含むFvフラグメントであって、両ドメインが、ジスルフィド架橋を介して、互いに連結しているFvフラグメントとを含み、

VH<sup>2</sup>ドメイン又はVL<sup>2</sup>ドメインのいずれかのみが、ペプチドリンクーを介して、第1の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合している、二重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つ記載の抗体。

【 0 4 0 6 】

36. 抗体が、第1のFc領域ポリペプチドと第2のFc領域ポリペプチドとを含み、

i ) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、

- ヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
  - ヒト Ig G 2 Fc 領域ポリペプチド、
  - ヒト Ig G 3 Fc 領域ポリペプチド、
  - ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 1

## Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト IgG1c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト IgG

リペチド、突然変異 P 3 2 9 C X 3 4 9 C T 3 6 6 S L 3 6 8 A X 4 0 7 V 有する

IgG1 Fc 領域ポリペプチド、突然変異 P329G, S354C, T366S, I368A, Y407V を有する

- 突然変異 I 2 3 4 A I 2 3 5 A P 3 2 9 G Y 3 4 9 C T 3 6 6 S I 3 6

Y407Vを有するヒトTgG1-Fc領域ポリペプチド

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A Y 4 0 7 V を有するヒト Tg G 1 E c 領域ポリペプチド

- 突然変異 S 228 P | 235 E を有するヒト T g G 4

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト IgG4 Fc 領域ポリペプチド

- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト IgG4c 領域ポリペプチド

- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト IgG4 Fc 領域ポリペプチド

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 を有するヒト Tg G 4 E c 領域ポリペプチド。

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド。

- 突然変異 P 329G を有するヒト IgG4 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト IgG4 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有する

ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 K 3 9 2 D を有するヒト Ig G 1、Ig G 2、又は Ig G 4、及び
- 突然変異 N 3 9 2 D を有するヒト Ig G 3 を含む群より選択され、

i i ) 第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、

- ヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- ヒト Ig G 2 Fc 領域ポリペプチド、
- ヒト Ig G 3 Fc 領域ポリペプチド、
- ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチド、
- 突然変異 D 3 9 9 K、D 3 5 6 K、及び / 又は E 3 5 7 K を有するヒト Ig G 1、ならびに

10

20

30

40

50

- 突然変異 D 3 9 9 K、E 3 5 6 K、及び / 又は E 3 5 7 K を有するヒト Ig G 2、Ig G 3、又は Ig G 4 を含む群より選択される、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【0407】

37. 抗体が、第 1 の Fc 領域ポリペプチドと第 2 の Fc 領域ポリペプチドとを含み、

i) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、ヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、ヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

ii) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

iii) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

iv) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

v) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 1 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

vi) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、ヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

vii) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

viii) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

ix) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、又は

x) 第 1 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドであり、第 2 の Fc 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 Fc 領域ポリペプチドである、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【0408】

38. 抗体が、第 1 の Fc 領域ポリペプチドと第 2 の Fc 領域ポリペプチドとを含み、

抗体が、第 1 の Fc 領域ポリペプチド及び第 2 の Fc 領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせ

i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及び H 4 3 5 A、又は

ii) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及び Y 4 3 6 A、又は

iii) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及び L 4 3 2 D、又は

iv) i) ~ iii) の組み合わせ

を含む、実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つ記載の抗体。

10

20

30

40

50

## 【0409】

39. 抗体が、第1のFc領域ポリペプチドと第2のFc領域ポリペプチドとを含み、

a) 第1及び第2のFc領域ポリペプチドが両方とも、ヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(ヒト起源由来)であり、第1及び第2のFc領域ポリペプチドにおける全ての突然変異がまとまった際に、突然変異i) I253A、H310A、及びH435A、又は、ii) H310A、H433A、及びY436A、又は、iii) L251D、L314D、及びL432Dが突然変異(ヒト)IgGクラスFc領域に含まれるように、第1のFc領域ポリペプチドにおいて、i)群I253A、H310A、及びH435A、又は、ii)群H310A、H433A、及びY436A、又は、iii)群L251D、L314D、及びL432D(Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従ってナンバリング)から選択される1つ又は2つの突然変異と、第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異L251D、I253A、H310A、L314D、L432D、H433A、H435A、及びY436A(Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従ってナンバリング)を含む群から選択される1つ又は2つの突然変異とを含み、あるいは

b) 第1及び第2のFc領域ポリペプチドが両方とも、ヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(すなわち、ヒト起源由来)であり、第1及び第2のFc領域ポリペプチドにおける全ての突然変異がまとまった際に、突然変異i) I253A、H310A、及びH435A、又は、ii) H310A、H433A、及びY436A、又は、iii) L251D、L314D、及びL432DがFc領域に含まれるように、第1及び第2のFc領域ポリペプチドの両方が、Fc領域において、突然変異I253A/H310A/H435AもしくはH310A/H433A/Y436AもしくはL251D/L314D/L432D、又はそれらの組み合わせ(Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従ってナンバリング)を含み、全ての突然変異が、第1又は第2のFc領域ポリペプチドにおけるものであるか、又は、1つもしくは2つの突然変異が、第1のFc領域ポリペプチドにおけるものであり、1つもしくは2つの突然変異が、第2のFc領域ポリペプチドにおけるものであるかのいずれかであり、あるいは、

c) 第1及び第2のFc領域ポリペプチドが両方とも、ヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(すなわち、ヒト起源由来)であり、第1及び第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異I253A/H310A/H435AもしくはH310A/H433A/Y436AもしくはL251D/L314D/L432D(Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従ってナンバリング)を含むか、又は、第1のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異I253A/H310A/H435Aの組み合わせを含み、第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異H310A/H433A/Y436Aの組み合わせ(Kabat EUインデックスナンバリングシステムに従ってナンバリング)を含む、実施態様1~37のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0410】

40. 抗体が、第1のFc領域ポリペプチドと第2のFc領域ポリペプチドとを含み、

a) 第1の突然変異Fc領域ポリペプチドが、第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドから得られ、第2の突然変異Fc領域ポリペプチドが、第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドから得られ、第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドが、第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドと同一であるか、又は、第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドとは異なり、

b) 第1の突然変異Fc領域ポリペプチドが、第2の突然変異Fc領域ポリペプチドとは、第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドが第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドとは異なるそれらのアミノ酸残基以外の1つ以上のアミノ酸残基において異なり、

c) 第1の突然変異Fc領域ポリペプチド及び第2の突然変異Fc領域ポリペプチドを含むIgGクラスFc領域が、a)の第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチド及びa)の第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドを含むIgGクラスFc領域の親和性とは異なるヒトFcレセプターに対する親和性を有し、

10

20

30

40

50

第1のFc領域ポリペプチドもしくは第2のFc領域ポリペプチドのいずれか又は両方のFc領域ポリペプチドが、それぞれ独立して、下記突然変異：

- T 3 0 7 H、又は
- Q 3 1 1 H、又は
- E 4 3 0 H、又は
- N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H、又は
- T 3 0 7 H 及び E 4 3 0 H、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び E 4 3 0 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y、又は
- T 3 0 7 Q 及び V 3 0 8 P 及び N 4 3 4 Y 及び Y 4 3 6 H、又は
- T 3 0 7 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E の内の1つ又は同突然変異の組み合わせを含む、実施態様1～37のいずれか1つ記載の抗体。

【0411】

41. 抗体が、第1のFc領域ポリペプチドと第2のFc領域ポリペプチドとを含み、第1のFc領域ポリペプチドが、突然変異Y349C、T366S、L368A、及び

10

20

30

40

50

Y 4 0 7 V (ホール鎖)を含み、第2のFc領域ポリペプチドが、突然変異S 3 5 4 C及びT 3 6 6 W (ノブ鎖)を含み、

第1のFc領域ポリペプチド(ホール鎖)が、突然変異

i ) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G 、及び

i i ) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D を含み、

第1のFc領域ポリペプチドと第2のFc領域ポリペプチドとが、1つ以上のジスルフィド架橋により連結されており、

第1のポリペプチドのCH3ドメイン及び第2のポリペプチドのCH3ドメインが両方とも、プロテインAに結合するか、又は、両方ともプロテインAに結合しない(Kabat EUインデックスに従ってナンバリング)、実施態様1～37のいずれか1つ記載の抗体。 10

#### 【0412】

42. 抗体が、突然変異

i ) I 2 5 3 A もしくは I 2 5 3 G 、及び

i i ) L 3 1 4 A もしくは L 3 1 4 G もしくは L 3 1 4 D 、及び

i i i ) T 2 5 0 Q 、及び / 又は

i v ) T 2 5 6 E もしくは T 2 5 6 A を含む、実施態様41記載の抗体。

#### 【0413】

43. 抗体が、突然変異

i ) I 2 5 3 A もしくは I 2 5 3 G 、及び

i i ) L 3 1 4 A もしくは L 3 1 4 G もしくは L 3 1 4 D 、及び

i i i ) 場合により、 a ) T 2 5 0 Q 及び / もしくは T 2 5 6 E もしくは T 2 5 6 A 、及び

i v ) a ) L 2 5 1 A もしくは L 2 5 1 G もしくは L 2 5 1 D 、及び / 又は b ) H 3 1 0 A もしくは H 3 1 0 G を含む、実施態様41又は42記載の抗体。 20

#### 【0414】

44. 抗体が、突然変異

i ) I 2 5 3 A もしくは I 2 5 3 G 、及び

i i ) L 3 1 4 A もしくは L 3 1 4 G もしくは L 3 1 4 D 、及び

i i i ) a ) T 2 5 0 Q 及び / 又は T 2 5 6 E もしくは T 2 5 6 A 、及び

i v ) a ) L 2 5 1 A もしくは L 2 5 1 G もしくは L 2 5 1 D 、及び / 又は b ) H 3 1 0 A もしくは H 3 1 0 G 、 30

v ) 場合により、 a ) T 3 0 7 A もしくは T 3 0 7 H もしくは T 3 0 7 Q もしくは T 3 0 7 P 、及び / 又は b ) Q 3 1 1 H 、及び / 又は c ) M 2 5 2 Y 、及び / 又は d ) S 2 5 4 T を含む、実施態様41～43のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0415】

45. 抗体が、突然変異

i ) T 2 5 0 Q 、及び / 又は

i i ) M 2 5 2 Y 、及び / 又は

i i i ) S 2 5 4 T 、及び / 又は

i v ) T 2 5 6 E もしくは T 2 5 6 A 、及び / 又は

v ) T 3 0 7 A もしくは T 3 0 7 H もしくは T 3 0 7 Q もしくは T 3 0 7 P 、及び / 又は

v i ) Q 3 1 1 H を含む、実施態様41～44のいずれか1つ記載の抗体。 40

#### 【0416】

46. 医薬として使用するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体。

#### 【0417】

47. 眼血管疾患の処置に使用するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体。  
。

#### 【0418】

10

20

30

40

50

48. 眼疾患、特に、眼血管疾患の処置のための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体の使用。

【0419】

49. 眼疾患を処置するのに使用するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体。

【0420】

50. 眼疾患、特に、眼血管疾患を処置するのに使用するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体。

【0421】

51. 眼血管疾患有する個体を処置する方法であって、

有効量の実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体を、個体に投与することを含む、方法。

【0422】

52. 実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体を含む、医薬製剤。

【0423】

53. 眼血管疾患の処置に使用するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体を含む、医薬製剤。

【0424】

54. 眼血管疾患の処置のための医薬を製造するための、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体の使用。

【0425】

55. 眼血管疾患有する患者を処置する方法であって、

実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体を、このような処置を必要とする患者に投与することにより、眼血管疾患有する患者を処置する、方法。

【0426】

56. 抗体が、ガラス体内適用により投与される、実施態様52又は53記載の実施態様に記載の医薬製剤。

【0427】

57. 投与が、ガラス体内適用である、実施態様55又は56記載の投与。

【0428】

58. 実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体をコードする、核酸。

【0429】

59. 実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体をコードする1つ以上の核酸を含む、細胞。

【0430】

60. 下記工程：

a) 場合により、実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体をコードする1つ以上の核酸により、哺乳類細胞をトランスフェクションする工程と、

b) この細胞を、この抗体を発現するように培養する工程と、

c) この抗体を、細胞又は培養培地から回収することにより、この抗体を製造する工程とを含む、

実施態様1～45のいずれか1つ記載の抗体を製造するための方法。

【実施例】

【0431】

V. 実施例

下記は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上記で提供された全体的な説明から、種々の他の実施態様が実施することができる事が理解される。

【0432】

実施例1

マウス抗IL1ベータ抗体H34の元の生成及び特徴決定

10

20

30

40

50

材料 - メスのBALB/cマウスを、Banting and Kingman (Freemont, CA) から得た。完全及び不完全フロイントアジュバント (CFA and IFA) を、Difco (Detroit, MI) から得た。HB101を、Hana Biologics, Inc. (Berkeley, CA) から得た。カルシウム及びマグネシウムを含まないダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) ならびにグルタミンを、GIBCO Labs (Grand Island, NY) から得た。ウシ胎児血清を、Hyclone Labs (Logan, UT) から得た。ヒポキサンチン - アミノブテリン - チミジン (HAT) 及びヒポキサンチン - チミジン (HT) 補助剤ならびに50% ポリエチレングリコール (PEG) 1450を、Bethesda Research Labs (Gaithersburg, MD) から得た。ウサギ抗マウスIgG + A + Mペルオキシダーゼコンジュゲート、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ、マウスIgGアイソタイプ特定キット、及びオルトフェニレンジアミン (OPD) を、Zymed Labs (South San Francisco, CA) から得た。セファロースプロテイン - A 及びSephadex G-25を、Pharmacia (Piscataway, NJ) から得た。プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンデカン) を、Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI) から得た。<sup>125I</sup>Bolton-Hunter試薬を、New England Nuclear (Boston, MA) から得た。他の全ての化学薬品を、Sigmaからの分析グレードとした。

10

20

30

## 【0433】

ハイブリドーマ生成 - IL-1ベータに対するハイブリドーマを、Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54: 347に以前に記載された、Kohler及びMilsteinの方法を使用して生成した。12週齢のメスのBALB/cマウスの腹腔内及び後ろ足蹠に、CFA中の5μg IL-1ベータ (精製されたMW 17, 500型) を注入した。不完全なフロイントアジュバント (IFA) 中の5回の追加免疫注入を、3~4週間間隔で与えた。血清抗体力値を、ELISAにより、定期的に決定した。5回の注入後に、力値を検出可能であった。融合用に選択された動物に、無菌PBS中の10μg IL-1ベータの静脈内 (IV) 追加免疫を受けさせた。脾臓を、4日後に摘出し、脾細胞を、P3X63-Ag8.653骨髄腫細胞と、50% PEG 1450を使用して融合させた。細胞を、96ウェルプレート (1×10<sup>6</sup>個/ウェル)において、HAT培地中で培養した。ハイブリドーマ上清を、固相抗原ELISA、<sup>125I</sup>IL-1ベータによる固相抗体RIA、及びIL-1ベータ誘引性胸腺細胞増殖の阻害 (以下を参照のこと)により、抗IL-1ベータ活性についてアッセイした。ハイブリドーマを、胸腺細胞 (5×10<sup>5</sup>個/ウェル) を含むHAT培地中で、少なくとも3回の限界希釈によりクローニングした。

30

40

50

## 【0434】

抗体生成及び精製 - モノクローナル抗体を、プリスタン処置マウス (前記Kohler et al.,) の腹腔内に2×10<sup>6</sup>個 ハイブリドーマ細胞を注入することにより、腹水中に生成した。腹水を収集し、抗体を、セファロースプロテインAクロマトグラフィー (Goding, J. Immunol. Methods 20 (1978) 241) により精製した。

## 【0435】

モノクローナル抗体ILB1-H34を、上記された対応する細胞株から調製した。

## 【0436】

IL-1ベータ抗体のELISA - ビニルアッセイプレート (Costar) を、PBS中の5μg/ml 希釈抗原溶液により、50μL/ウェルでコートし、4(摂氏)Cで一晩インキュベーションした。ウェルを、5% 脱脂粉乳 / 0.05% チオメルサール / PBSを使用して、室温で1時間対比コートした。ウェルを、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) / 0.05% チオメルサール / PBSで洗浄し、50μL/ウェル 抗IL-1ベータ抗体を、室温で2時間インキュベーションした。抗体を、ウサギ抗マウスIgG + Mペルオキシダーゼコンジュゲート及びOPD基質溶液を使用する間接ELISAにより検出した。あるいは、精製されたモノクローナル抗体をビオチン化し (Geusdon et al., J. Histochem. Cytochem. 27 (1979) 1131)、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ及びOPD基質溶液を使用して検出した。モノクローナル抗体のアイソタイプを、マウスIgGアイソタイプ特定キットを使用する間接ELISAにより特定した。

## 【0437】

胸腺細胞増殖アッセイ法 - I L - 1 ベータ及び P H A ( 1 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) を、 M E M / 5 % 牛胎児血清 ( F B S ) / 1 0 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ゲンタマイシン、 2 - メルカプトエタノール ( 2  $\times$  1 0  $^{-5}$  M ) 、 2 5 mM H e p e s 培地中の C3H/HeJ マウス胸腺細胞 ( 1  $\times$  1 0  $^6$  個 / ウェル ) の培養物に加えた。 3 7 において 4 8 時間後、 0 . 5  $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$   $^3\text{H}$  チミジンを加え、培養物を、一晩インキュベーションした。細胞を、ガラス纖維フィルタ上で、細胞採取器を使用して収集し、シンチレーション計測用に処理した。

## 【 0 4 3 8 】

レセプター結合アッセイ法 - 1 7 , 5 0 0 型の I L - 1 ベータを、ジヨード  $^{125}\text{I}$  Bolton-Hunter試薬を使用し、製造メーカーの説明に従ってラベルした。 P B S 1 0  $\mu\text{L}$  中の 1  $\mu\text{g}$  I L - 1 ベータを、 1 mCi 試薬と、 4 で 4 時間反応させた。 P B S / 0 . 2 % ゼラチン 5 0 0  $\mu\text{L}$  を加え、ラベルされた I L - 1 ベータを、遊離した Bolton-Hunter 試薬から、 P B S / 0 . 2 % ゼラチンを含む Sephadex G-25 の 2 0  $\times$  1 cm カラムにおけるクロマトグラフィーにより分離した。  $^{125}\text{I}$  I L - 1 ベータを、 2 4 ウェル培養プレートにおける D M E M / 1 % B S A / 0 . 1 % アジ化ナトリウム / 0 . 0 1 % Triton X-100 中の BALB/c 3T3 細胞のコンフルエントな単層に加えた。 3 7 における 1 時間後、单層を、ラベルされた I L - 1 ベータを含まない培地中で、徹底的に洗浄した。单層を、ガンマカウントのために、 0 . 1 N N a O H を使用して取り出した。  $^{125}\text{I}$  I L - 1 ベータの非特異的結合を、 2 0 0 倍モル過剰のラベルされていない I L - 1 ベータの存在下において、インキュベーションすることにより測定した。

## 【 0 4 3 9 】

抗体親和性の決定 - モノクローナル抗体の親和性を、免疫沈降放射性免疫アッセイ法を使用して得られたデータから決定した。簡潔に、 5 0 0 0 cpm / チューブ  $^{125}\text{I}$  I L - 1 ベータを、精製されたモノクローナル抗体の希釈液と共に、 1 % 脱脂粉乳 / 0 . 5 % チオメルサール / P B S 0 . 3 ml 中において、 4 で一晩インキュベーションした。抗原 - 抗体複合体を、 1 0 % 正常マウス血清 / P B S 及び P B S 中の 4 m g / ml ヤギ抗マウス I g G 血清を、 1 0 0  $\mu\text{L}$  / チューブでそれぞれ加えることにより沈殿させた。 4

における 4 時間後、 1 ml / チューブ 氷冷 2 % ポリエチレングリコール - 6 0 0 0 を加え、このチューブを、 3 0 0 0  $\times$  g で 4 において 2 0 分間遠心分離した。上清を吸引し、ペレットについて、ガンマカウンターにおいて計測した。親和性定数を、抗体の種々の濃度における結合 / 遊離比から算出した ( Berson et al. , Clin. Chim. Acta. 22 (1969) 51-69 ) 。

## 【 0 4 4 0 】

親和性定数を、上記された種々の抗体濃度における  $^{125}\text{I}$  I L - 1 ベータ結合の免疫沈降放射性免疫アッセイ法 ( R I A ) から得られたデータを使用して算出した。抗 I L - 1 ベータ抗体 H 3 4 は、 I L - 1 ベータについて、  $6 4 \times 1 0 ^9 \text{ L/mol}$  の親和性を有する。

## 【 0 4 4 1 】

## 実施例 2

## マウスの免疫化

N M R I マウスの免疫化について、 R I M M S ( 「急速な免疫化、複数個所」 ) スケジュールを使用した。

## 【 0 4 4 2 】

## 実施例 3

## 抗 I L - 1 ベータ抗体血清力価の決定

ヒトリコンビナント I L - 1 ベータを、 9 6 ウェル NUNC Maxisorb プレートにおいて、 P B S 中の 2 . 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  、 1 0 0  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$  で免疫化した。続けて、このプレートを、 P B S 中の 2 % CroteinC により、 2 0 0  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$  でブロッキングした。抗血清の系列希釈を、 P B S 中の 0 . 5 % CroteinC に、 1 0 0  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$  において、ダブリケートで加えた。 P B S 中の 0 . 5 % CroteinC に 1 : 1 6 , 0 0 0 希釈した H R P コンジュゲートヤギ抗マウス I g G 抗体 ( Jackson Immunoresearch ) により、 1 0 0  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$  で検

10

20

30

40

50

出した。全ての工程について、プレートを、37℃で1時間インキュベーションした。全ての工程間において、プレートを、PBS中の0.05%Tween 20で3回洗浄した。シグナルを、100μl/ウェルで、BM Blue POD Substrate soluble (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を加えることにより発色させ、100μl/ウェルで、1M HC1を加えることにより停止させた。吸光度を、参照としての690nmに対して、450nmにおいて読み取った。力値を、最大半値シグナルをもたらす抗血清の希釈として定義した。

#### 【0443】

##### 実施例4

###### ヒトIL-1ベータ結合ELISA

###### 変異体1

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)系技術を使用して行った。抗原であるヒトIL-1ベータ(Peprotech Cat. No 200-01B)を、384ウェルマイクロタイタープレート(Thermo Scientific, Cat. No. 464718)において、濃度500ng/mLでPBS 25μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1)プロッキング工程：結合していない表面を飽和させる(1時間、2%BSA)。2)抗IL-1ベータ抗体の濃度を1時間増大させる。3)検出抗体、希釈=1:2000(ロバF(ab)2抗ウサギIgG POD、Amersham, NA9340V又はヒツジIgG抗マウスIgG POD、Amersham RPN4201)。基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 11835033001)を加えた20~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。EC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

10

20

30

40

50

#### 【0444】

###### 変異体2

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)系技術を使用して行った。抗原であるHisタグ付きヒトIL-1ベータ(Sino Biologics, Cat. No. 10139-H07E)を、384ウェルマイクロタイタープレート(Thermo Scientific, Cat. No. 464718)において、濃度0.25μg/mLでPBS 25μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS、0.5%BSA、0.05%Tween 90μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1)プロッキング工程：結合していない表面を飽和させる(1時間、2%BSA)。2)抗IL-1ベータ抗体の濃度を1時間増大させる。3)検出抗体、希釈=1:2000(ロバF(ab)2抗ウサギIgG POD、Amersham, NA9340V又はヒツジIgG抗マウスIgG POD、Amersham RPN4201)。基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 11835033001)を加えた20~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。EC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0445】

##### 実施例5

###### カニクイザルIL-1ベータ結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)系技術を使用して行った。抗原であるヒトIL-1ベータ(Sino Biologics, Cat. No. 90010CNAE)を、384ウェルマイクロタイタープレート(Thermo Scientific, Cat. No. 464718)において、濃度0.5μg/mLでPBS 25μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS、0.5%BSA、0.05%Tween 90μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1)プロッキング工程：結合していない表面を飽和させる(1時間、2%BSA)。2)抗IL-1ベータ抗体の濃度を1時間増大させる。3)検出抗体、希釈=1:2000(ロバF(ab)2抗ウサギIgG POD、Amersham, NA9340V又はヒツジIgG抗マウスIgG POD、Amersham RPN4201)。基質である3,3',5,5'-テトラ

50

メチルベンジジン (TMB、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 11835033001) を加えた 20 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。EC<sub>50</sub> を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0446】

##### 実施例 6

###### マウス IL - 1 ベータ結合 E L I S A

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (E L I S A) 系技術を使用して行った。抗原であるマウス IL - 1 ベータ (Sino Biologics, Cat. No. 50101-MNAE) を、384 ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific, Cat. No. 464718) において、濃度 0.5 μg/mL で PBS 25 μL 中において固定した。全ての下記工程を、PBS、0.5% BSA、0.05% Tween 90 μL の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行つた。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる (1 時間、2% BSA)。2) 抗 IL - 1 ベータ抗体の濃度を 1 時間増大させる。3) 検出抗体、希釈 = 1 : 2000 (ロバ F(ab)<sub>2</sub> 抗ウサギ IgG POD、Amersham, NA9340V 又はヒツジ IgG 抗マウス IgG POD、Amersham RPN4201)。基質である 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 11835033001) を加えた 20 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。EC<sub>50</sub> を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0447】

##### 実施例 7

###### タンパク質 - タンパク質相互作用阻害アッセイ法：ヒト IL - 1 ベータ : ヒト IL - 1 レセプター 1 型

ヒト IL - 1 ベータのヒト IL - 1 レセプター 1 型に対するタンパク質 - タンパク質相互作用阻害分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (E L I S A) 系技術を使用して行った。ヒト His タグ付き IL - 1 ベータタンパク質 (Sino Biologics, Cat. No. 10139-H07E) を、384 ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific Cat. No. 464718) において、濃度 1 μg/mL で PBS、0.5% BSA 及び 0.05% Tween 25 μL 中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90 μL の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行つた。1) ブロッキング工程、結合していない表面を飽和させる (1 時間、2% BSA)。2) 濃度を増大させる抗 IL - 1 ベータ抗体 12.5 μL を、300 ng/mL Fc タグ付きヒト IL - 1 ベータレセプター (Sino Biologics, Cat. No. 10126-H02H) 12.5 μL と、容量 250 μL 中で 1 時間インキュベーションした。3) 検出を、ペルオキシダーゼラベルされた抗 hu Fc 抗体 (ヤギ F(ab)<sub>2</sub> 抗ヒト Fc POD、Jackson, Cat. No. 109-036-098) を使用して達成した。基質である 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB、Roche Diagnostics GmbH, Cat. No. 11835033001) を加えた 10 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。IC<sub>50</sub> を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0448】

##### 実施例 8

###### タンパク質 - タンパク質相互作用阻害アッセイ法：ヒト IL - 1 ベータ : ヒト IL - 1 レセプター 2 型

ヒト IL - 1 ベータのヒト IL - 1 レセプター 1 II 型に対するタンパク質 - タンパク質相互作用阻害分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (E L I S A) 系技術を使用して行った。ヒト His タグ付き IL - 1 ベータタンパク質 (Sino Biologics, Cat. No. 10139-H07E) を、384 ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific, Cat. No. 464718) において、濃度 1 μg/mL で PBS、0.5% BSA 及び 0.05% Tween 25 μL 中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90 μL の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行つた。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる (1 時

10

20

30

40

50

間、2% BSA）。2)濃度を増大させる抗IL-1ベータ抗体 12.5 μLを、30ng/mL Fcタグ付きヒトIL-1ベータレセプター(RnD, Cat.No.663-2R-50) 12.5 μLと、容量250 μL中で1時間インキュベーションした。3)検出を、ペルオキシダーゼラベルされた抗huFc抗体(ヤギFab<sub>2</sub>)抗ヒトFc POD(Jackson, Cat. No 109-036-098)を使用して達成した。基質である3',3',5',5' - テトラメチルベンジジン(TM B、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No. 11835033001)を加えた10~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。IC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0449】

##### 実施例9

マウスハイブリドーマH34マウス抗IL-1ベータ抗体生成ハイブリドーマの発現  
培地には、下記試薬：RPMI(PAN)、20%牛胎児血清、2mMグルタミン(PAN)、1×ピルビン酸ナトリウム(PAN)、1×NEAS(PAN)が含まれている。

#### 【0450】

凍結させた細胞含有バイアルを、そのチューブを37°の水浴に60秒間入れることにより予め融解させる。予め温めた(37°)培地に、細胞を、素早く再懸濁させ、バイアルから、培地8mLを予め含有する10mLフラスコ(CellStar)に移す。フラスコを、1000rpm(25°)で5分間遠心分離する。ついで、上清を捨て、細胞ペレットを、ピペットで上下させることにより、予め温めた(37°)培地10mL中に穏やかに再懸濁させる。溶液全体をT25-フラスコに入れる。フラスコを、インキュベーター(37°、7%CO<sub>2</sub>、85%湿度)に2日間置いておく。

#### 【0451】

細胞を、新たな培地中に希釈することにより、密度1~2×10<sup>5</sup>個/mlで、次の5日間で2~3日毎に分割する。ついで、翌日、ウシ胎児血清部を、20%から1回目の工程において10%に減少させるのを開始する。10%牛胎児血清での2回の分割後、培地(RPMI(PAN)、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミン(PAN)、1×ピルビン酸ナトリウム(PAN)、1×NEAS(PAN))を、Hyclone-ADCF-MAb-培地(Thermo-Schientific)と1:1で混合する。この培地を、更に2回分割するのに使用する。ついで、Hyclone:10%ウシ胎児血清を含むRPMIの比を3:1に上昇させる。細胞を、2~3×10<sup>5</sup>個/mlのより高い密度で播種する。Nutridoma CS(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)により加えられた100%Hyclone-培地において、少なくとも細胞を分割する。

#### 【0452】

ついで、細胞溶液の量を、5回分割するために、20ml(T75フラスコ)に増やす。抗体生成のために、細胞15mlを、密度2×10<sup>6</sup>個/mlで、Cellline CL1000リアクタ中に充填し、8~9日間インキュベーションする(37°、7%CO<sub>2</sub>、85%湿度)。収集のために、上清を、50mlのfalcon中に充填し、4000rpmで4回遠心分離する(各サイクル後、上清を、新たな50mlのfalconに充填するものとする)。最後に、細胞フリー上清を、-20°で凍結させる。

#### 【0453】

##### 実施例10

##### マウスハイブリドーマからの抗体精製

抗体含有H34ハイブリドーマ上清をろ過し、2回のクロマトグラフィー工程により精製した。抗体を、PBS(1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137mM NaCl、2.7mM KCl)、pH7.4で平衡化させた、HiTrapプロテインG(GE Healthcare)を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去した。抗体を、25mMクエン酸バッファー、pH3.0で回収し、溶出直後に、1M Tris-塩基、pH9.0で、pH6.0に中和した。Superdex 200(商標)(GE Healthcare)におけるサイズ排除クロマト

10

20

30

40

50

グラフィーを、2番目の精製工程として使用した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、2.0 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0において行った。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンブラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存した。

#### 【0454】

抗体含有ハイブリドーマ上清をろ過し、2回のクロマトグラフィー工程により精製した。上清を、2 M グリシン、pH 8.6、600 mM NaClと、50% v/vで混合し、1 M グリシン、pH 8.6、300 mM NaClで平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去した。抗体を、100 mM クエン酸バッファー、pH 2.8で回収し、溶出直後に、1 M Tris - 塩基、pH 8.5で、pH 6.0に中和した。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを、2番目の精製工程として使用した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、2.0 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0において行った。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンブラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存した。

10

#### 【0455】

##### 実施例 1 1

##### H E K 細胞におけるヒト化抗体のトランスフェクション及び一過性発現

トランスフェクション試薬である293-free (Novagen) による懸濁液適合HEK293F (Free Style 293-F細胞; Invitrogen) 細胞における、抗体の一過性発現

20

#### 【0456】

細胞を、125 ml振とうフラスコ中で融解させた後に、希釈により、少なくとも4回(容量 30 ml)継代した(37°、7% CO<sub>2</sub>、85% 湿度、135 rpmにおいて、インキュベーション / 振とう)。

#### 【0457】

細胞を、容量 250 ml 中で、3 × 10<sup>5</sup> 個 / ml に増殖させた。3日後に、細胞を分割し、新たに、1リットル振とうフラスコにおける容量 250 ml 中に、密度 7 × 10<sup>5</sup> 個 / ml で播種した。トランスフェクションを、約 1.4 ~ 2.0 × 10<sup>6</sup> 個 / ml の細胞密度で、24時間後に行うものとする。

30

#### 【0458】

トランスフェクション前に、250 µg プラスミドDNA (122 µg 軽鎖及び 128 µg 重鎖) を、終容量 10 ml に、予め温めた(水浴: 37°) Opti-MEM (Gibco) で希釈する。溶液を穏やかに混合し、室温で 5 分以内にインキュベーションする。ついで、293-freeトランスフェクション試薬 333.3 µl を、DNA-OptiMEM溶液に加える。穏やかに混合し、室温で 15 ~ 20 分間インキュベーションする。混合物の全量を、HEK細胞培養量 250 ml を含む 1 L 振とうフラスコに加える。

30

#### 【0459】

37°、7% CO<sub>2</sub>、85% 湿度、135 rpmにおいて、6又は7日間インキュベーション / 振とうする。

40

#### 【0460】

2000 rpm、4°、10 分間での1回目の遠心分離工程により、上清を収集する。ついで、4000 rpm、4°、20 分間での2回目の遠心分離のために、この上清を、新たな遠心分離フラスコ中に移す。その後、細胞フリー上清を、0.22 µm ボトルトップフィルタによりろ過し、フリーザー (-20°) において保存する。

#### 【0461】

##### 実施例 1 2

##### H E K 上清からの抗体精製

抗体含有培養上清をろ過し、2回のクロマトグラフィー工程により精製した。PBS (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137 mM NaCl、2.7 mM KCl) 、

50

pH 7.4で平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去した。抗体を、50 mM クエン酸バッファー、pH 2.8で回収し、溶出直後に、1 M Tris-塩基、pH 9.0で、pH 6.0に中和した。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを、2番目の精製工程として使用した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0において行った。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンブラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存した。

## 【0462】

10

## 実施例 13

## 抗体調製物の分析

抗体調製物のタンパク質濃度を、280 nmでの光学密度 (OD) を測定し、アミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用することにより決定した。

## 【0463】

抗体の純度及び完全性を、Protein Expressチップ及びHT Protein Express試薬キットを備えるLabChip GX II (PerkinElmer) を使用するCE-SDSにより分析した。

## 【0464】

抗体調製物の凝集含量を、TSK-GEL QC-PAK GFC 300を使用し、ランニングバッファーとして2×PBS、pH 7.4を使用する高性能SECにより、又は、BioSuite高解像SEC、250、5 μm分析用サイズ排除カラム (Waters GmbH) を使用し、ランニングバッファーとして200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、250 mM KC1、pH 7.0を使用する高性能SECにより決定した。

20

## 【0465】

## 実施例 14

## 抗体からのFabフラグメントの調製及び分析：

12 mg 抗体 (20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0中の1 mg/ml) を、L-システイン溶液 240 μl (Merck Millipore; 20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0中の250 mM) 及びパパイン 327 μl (Roche Life Science; 0.01 U/mg 抗体)と共に、37°で120分間インキュベーションした。開裂後、PBS (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137 mM NaCl、2.7 mM KC1)、pH 7.4で平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーを、インタクトなIgG及びFcフラグメントを除去するのに使用した。その後、MabSelectSuReクロマトグラフィーのフロースルーを、2回目の精製工程としてのSuperdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを使用して更に精製した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0において行った。Fabフラグメント含有溶液を、Biomax-SKメンブラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存した。

30

## 【0466】

40

Fabフラグメントのタンパク質濃度を、280 nmでの光学密度 (OD) を測定し、アミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用することにより決定した。

## 【0467】

Fabフラグメントの純度及び完全性を、還元剤 (5 mM 1,4-ジチオスレイトール) の存在及び不存在下における、SDS-PAGE (NuPAGE 4~12% Bis-Trisゲル、Invitrogen) により、Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) で染色して分析した。

## 【0468】

Fab調製物の凝集含量を、BioSuite高解像SEC、250、5 μm分析用サイズ排除カラム (Waters GmbH) を使用し、ランニングバッファーとして200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

50

/ K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、250mM K C l、pH 7.0 を使用する高性能S E Cにより決定した。

#### 【0469】

##### 実施例15

A 5 4 9 細胞の I L - 1 ベータ刺激後の I C A M - 1 発現

A 5 4 9 細胞 (10,000個 / ウェル)を、10% F C Sを加えたR P M I 1 6 4 0 中で、一晩増殖させた。その後、この培地を、0.5% 血清を加えたHunger培地に置き換えた。

#### 【0470】

抗 I L - 1 ベータ抗体を、250pg/ml I L - 1 ベータ及び種々の濃度の抗体 (100 10 0、100、10、1、0.1、0ng/ml)と共に、2時間インキュベーションした。その後、A 5 4 9 細胞を、I L - 1 ベータ / 抗体混合物と共に、クアドルプリケートで一晩インキュベーションした。

#### 【0471】

細胞を、氷冷したP B Sで4回洗浄し、その後、P F Aで20分間固定した。その後、細胞を、非透過性のG S D Bでブロックした。抗 I C A M - 1 抗体 (R&D Systems、5 μg /ml)との2時間のインキュベーション後、サンプルを、P B Sで4回洗浄した。染色のために、サンプルを、1:1000希釈した抗マウス抗体 - H R P コンジュゲート (Amer sham)と共に、1時間インキュベーションした。その後、サンプルを、P B Sで4回洗浄し、A B T Sと共に2時間インキュベーションした。吸光を、495nmでの参照と共に4 20 0 5nmで測定した。

#### 【0472】

##### 実施例16

A 5 4 9 細胞の I L - 1 ベータ刺激後の I L - 6 決定 (Quantikine ELISA, R&D System s)

A 5 4 9 細胞 (10,000個 / ウェル)を、10% F C Sを加えたR P M I 1 6 4 0 中で、一晩増殖させた。その後、この培地を、0.5% 血清を加えたHunger培地に置き換え、培養を、96時間継続した。

#### 【0473】

抗 I L - 1 ベータ抗体 (1 μg/ml)を、250pg/ml I L - 1 ベータと共に、2時間インキュベーションした。その後、A 5 4 9 細胞を、I L - 1 ベータ / 抗体混合物と共に、ダブリケートで一晩インキュベーションした。

#### 【0474】

培養上清のサンプル 100 μlを、更なる分析用に採取した。

#### 【0475】

モノクローナル抗ヒト I L - 6 抗体でコートした96ウェルプレートを、アッセイ希釈液RD1Wにより、15分間ブロッキングした。その後、上清サンプルを加え、R Tで2時間インキュベーションした。ウェルを、それぞれ洗浄バッファー 200 μlで4回洗浄した。その後、ウェルを、H R Pにコンジュゲートさせたポリクローナル抗ヒト I L - 6 抗体により、R Tで2時間インキュベーションした。ウェルを、それぞれ洗浄バッファー 2 40 0 0 μlで4回洗浄した。その後、ウェルを、テトラメチルベンジジン及びH 2 O 2により、20分間インキュベーションした。反応を、2N シュウ酸の添加により、20分後に停止させた。吸光を、570nmの参照波長と共に、450nmで決定した。

#### 【0476】

##### 実施例17

生物活性アッセイ法

マウスのヘルパーTリンパ球 (T h - 2 ) D10.G4.1株が、I L - 1 (インターロイキン - 1 )の生物活性についての、信頼性があり、好感度のアッセイ法として広く使用されている。D10細胞は、I L - 1 又はフィーダー細胞の不存在下において、c o n Aに対して最少にのみ増殖するであろうためである (Symons, J.A., et al. in Lymphokines and 50

Interferons, a Practical Approach. Clemens, M.J. et al. (Eds): IRL Press. 272 (1987)を参照のこと）。この効果についての E D<sub>50</sub> は、典型的には、1 2 pg/mL未満である。

#### 【0477】

(新鮮に融解させた) 35,000 個のD10.G4.1 T - 細胞 / ウェルを、IL - 1ベータ (1 ng/ml) 含有培地 (RPMI / 2.5 μg/ml Con A / 10% FCS) 中において、72時間刺激した。

#### 【0478】

リードアウトを、CellTiterGlo (登録商標) Luminescent Cell Viabilityアッセイ法により、製造メーカーの説明に従って決定した。 10

#### 【0479】

##### 実施例 18

IL - 1ベータにより誘引された H U V E C 細胞での I C A M - 1 アップレギュレーション

対応する培地 E B M / E G M (Cat# CC-4176) 中の H U V E C 細胞 (Lonza, Cat#00191 027) を、96 ウェル培養プレート (Costar, Cat#3596) に、40,000 個 / ウェルで、E B M + 2 % B S A 中に、200 μl / ウェルで播種した。細胞を、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中において、37 度 24 時間インキュベーションして、回収した。最終的に要求されるものの 40 倍濃縮された、2 つの希釈系列を行った。E B M + 2 % B S A 中に、一方は、抗 IL - 1b 抗体 huH34-2 を含み、他方は、リコンビナントヒト IL - 1ベータ (R&D Systems, Cat#201-LB) を含む。2 つの系列を、互いに 1 : 1 で混合し、RT で 1 時間インキュベーションした。この IL - 1ベータ / 抗 IL - 1ベータ抗体混合物 10 μl を、細胞に加え、穏やかに混合した。インキュベーションを、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中において、37 度 20 時間行った。その後、全ての培地を、細胞から除去し、細胞を、PBS で 2 回洗浄した。1 × Cell Dissociation Solution Non-enzymatic (Sigma, Cat# C5914) での 1 回の洗浄後、Cell Dissociation Solution 100 μl とのインキュベーションを、37 度行った。5 分毎に顕微鏡で観察することにより、剥離をチェックした。80 % 細胞が球状になった時点で、細胞を、FACS プレート (96 ウェル、容量 340 μl、PP、V 底プレート (Falcon Cat#353263)) に移した。残りの細胞を、PBS + 1 % B S A 100 μl で、4 回吸引することにより、培養プレートから剥離した。これも、FACS プレートに加えた。300 × g による 5 分の遠心分離後、上清を捨てた。ペレットを、PBS + 1 % B S A + 10 μg/ml ヒト IgG (Sigma; Cat#I2511) 100 μl 中に再懸濁させ、RT で 15 分間インキュベーションした。抗ヒト I C A M - 1 フルオレセインコンジュゲート (CD54) (R&D Systems, Cat#BBA20) 10 μl を加え、続けて、4 度 30 ~ 45 分間インキュベーションした。300 × g による 5 分の遠心分離後、上清を捨てた。ペレットを、PBS + 1 % B S A 110 μl 中に再懸濁させ、LSRII において測定した。 20 30

#### 【0480】

##### 実施例 19

##### T H P 1 細胞における M S U 誘引 T N F アルファ生成

T H P 1 細胞 (Invitrogen, Cat. No. thp-null) を、10 % F B S (熱不活性化) を加えた増殖培地 RPMI 1640 (Gibco, Cat#A10491) 中で、密度 1 × 10<sup>6</sup> 個 / ml まで増殖させ、Falcon チューブに移した。P M A (ホルボールミリスチン酸酢酸、Invitrogen, Cat# t1rl-pma) を、終濃度 300 ng/ml で加え、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中において、37 度 3 時間インキュベーションした。細胞を、PBS で 1 回洗浄し (300 × g での 5 分の遠心分離、上清を廃棄)、2 mM L - グルタミン及び 10 % F B S (熱不活性化) を加えた Hunger RPMI (Gibco, Cat#31870-025) 中に、密度 1.33 × 10<sup>6</sup> 個 / ml で再懸濁させた。150 μl / ウェル 細胞懸濁液を、96 ウェル培養プレート (Costar, Cat#3596) において、2 × 10<sup>5</sup> 個 / ウェルで播種した。一晩のインキュベーションを、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中において、37 度行った。4 倍濃縮した M 40 50

S U 懸濁液（尿酸一ナトリウム結晶、Invitrogen, Cat# t1rl-msu）50 μlを、Hunger 培地中に終濃度250 μg/mlで加え、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中において、37で6時間インキュベーションした。抗IL-1ベータ抗体の希釈系列を、増殖培地中で行った。THP1細胞からの上清を捨て、ウェルを、PBSで1回洗浄した。ついで、調製された抗IL-1b抗体の希釈系列を、このウェルに加えた。一晩のインキュベーションを、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中において、37で行った。上清を収集し、TNFアルファシングルプレックスにより分析した。

## 【0481】

## 実施例20

## 化学的分解試験

10

サンプルを、3つのアリコートに分割し、20mM His/His<sup>\*</sup>HCl、140mM NaCl、pH 6.0又はPBS中にそれぞれ再度緩衝させ、40(His/NaCl)又は37(PBS)で保存した。対照サンプルを、-80で保存した。

## 【0482】

インキュベーションの完了後、サンプルを、相対活性濃度(BIAcore)、凝集(SEC)、及びフラグメント化(キャピラリー電気泳動又はSDS-PAGE)について分析し、未処置対照と比較した。

## 【0483】

## 実施例21

## 熱安定性

20

サンプルを、濃度1mg/mLで、20mM ヒスチジン/ヒスチジン塩酸、140mM NaCl、pH 6.0中において調製し、0.4 μmフィルタプレートを通した遠心分離により、光学384ウェルプレートに移し、パラフィンオイルで覆った。流体力学半径を、動的光散乱により、サンプルを0.05/分の速度で、25から80に加熱しながら、DynaProプレートリーダー(Wyatt)において繰返し測定した。

## 【0484】

あるいは、サンプルを、10 μLマイクロ-キュベットアレイに移し、静的光散乱データ及び266 nmレーザーでの励起に基づく蛍光データを、Optim1000機器(Avacta Inc.)により、サンプルを0.1/分の速度で、25から90に加熱しながら記録した。

30

## 【0485】

凝集開始温度を、流体力学半径(DLS)又は散乱光強度(Optim1000)が増大し始める温度として定義する。

## 【0486】

融点を、蛍光強度vs波長グラフにおける変曲点として定義する。

## 【0487】

## 実施例22

## 免疫化

マウス(NMRIマウス)及びウサギ(ヒトIgローカストラנסジェニックウサギ)の免疫化のために、RIMMS(「急速な免疫化、複数の部位」)に基づくスケジュールを使用した。抗原を、ヒトPDGF-BB(Cell Signaling Tech.)とした。

40

## 【0488】

## 実施例23

## 抗PDGF-B抗体の血清力価の決定

ヒトリコンビナントPDGF-Bを、96ウェルNUNC Maxisorbプレートにおいて、2.5 μg/ml(マウス)又は1.0 μg/ml(ウサギ)で、PBS中に100 μl/ウェルで免疫化し、続けて、PBS中の2% CroteinCにより、200 μl/ウェルでブロッキングし、抗血清の系列希釈を、PBS中の0.5% CroteinCに、100 μl/ウェルで、ダブリケートにおいて加えた。マウス血清について、PBS中の0.5% CroteinCに1:16,000希釈したHRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG抗体(Jackson Immunoresearch)により、又は、ウサギ血清について、PBS中の0.5% CroteinCに、1:5,

50

000希釈したビオチン化ヤギ抗ヒトカッパ抗体 (Southern Biotech) 及び 1 : 8, 000希釈したHRP - コンジュゲートストレプトアビシンにより、100 μL / ウェルで検出した。全ての工程について、プレートを、37 °C で 1 時間インキュベーションした。全ての工程間において、プレートを、PBS 中の 0.05% Tween 20 で 3 回洗浄した。シグナルを、100 μL / ウェルで、BM Blue POD Substrate soluble (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を加えることにより発色させ、100 μL / ウェルで、1 M HCl を加えることにより停止させた。吸光度を、参照としての 690 nm に対して、450 nm において読み取った。力値を、最大半値シグナルをもたらす抗血清の希釈として定義した。

## 【0489】

10

## 実施例 24

ウサギからの B 細胞クローニング

ウサギ末梢血単核球 (PBMC) の単離

血液サンプルを、3匹の免疫化ウサギから採取した。EDTA 含有白血球を、lympholyte mammal (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) を使用し、製造メーカーの仕様に従って、密度遠心分離する前に、1 × PBS (PAA, Pasching, Austria) で 2 倍希釈した。PBMC を、1 × PBS で 2 回洗浄した。

## 【0490】

20

EL-4B5 培地

10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA)、2 mM グルタミン、1% ペニシリン / ストレプトマイシン溶液 (PAA, Pasching, Austria)、2 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, Germany)、及び 0.05 mM - メルカプトエタノール (Gibco, Paisley, Scotland) を加えた RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) を使用した。

## 【0491】

30

プレートのコーティング

無菌の細胞培養 6 ウェルプレートを、PBGF - BB (2 μg/ml) 又は PDGF - AA と PDGF - CC タンパク質との混合物 (1 μg/ml PDGF - AA 及び PDGF - CC) のいずれかで、炭酸バッファー (0.1 M 炭酸ナトリウム、3.4 mM 炭酸水素二ナトリウム、pH 9.55) 中において、4 °C で一晩コートした。使用前に、プレートを、無菌の PBS で、3 回洗浄した。

## 【0492】

30

マクロファージ / 単球の枯渇

半分の血液サンプルの PBMC を、無菌の 6 ウェルプレート (細胞培養グレード) に播種し、非特異的な付着により、マクロファージ及び単球を枯渇させた。

## 【0493】

40

これらのタンパク質に結合する B 細胞を除去し、1 工程においてマクロファージ及び単球を除去するために、残り 50% PBMC を、PDGF - AA と PDGF - CC タンパク質との混合物で予めコートしたプレートに播種した。

## 【0494】

40

各ウェルに、培地を最大 4 ml 充填し、最大  $6 \times 10^6$  個 免疫化したウサギからの PBMC を充填し、インキュベーター中において、37 °C で 1 時間結合させた。

## 【0495】

50

上清中の細胞 (末梢血リンパ球 (PBL)) を、抗原パニング工程に使用した。

## 【0496】

PDGF BB タンパク質での B 細胞の濃縮

PDGF BB タンパク質でコートした 6 ウェル組織培養プレートに、培地 4 ml 当たりに、最大  $6 \times 10^6$  個 PBL を播種し、インキュベーター中において、37 °C で 1 時間結合させた。付着しなかった細胞を、1 × PBS で 1 ~ 2 回、注意深くウェルを洗浄することにより除去した。残った付着細胞を、トリプシンにより、インキュベーター中にお

いて、37で10分間剥離した。トリプシン処理を、EL-4B5培地で停止させた。免疫蛍光染色まで、細胞を、氷上で維持した。

#### 【0497】

##### 免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー

抗IgG FITC (AbD Serotec, Dusseldorf, Germany) を、単一細胞分取に使用した。表面染色のために、枯渇及び濃縮工程からの細胞を、FITCにコンジュゲートさせた抗IgG抗体と共に、PBS中ににおいてインキュベーションし、4において暗所で45分間インキュベーションした。染色後、PBMCを、氷冷PBSで2回洗浄した。最後に、PBMCを、氷冷PBS中に再懸濁させ、直ちに、FACS分析に供した。FACS分析の前に、死んだ細胞と生きている細胞とを区別するために、濃度5μg/mlヨウ化プロピジウム(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)を加えた。10

#### 【0498】

コンピュータ及びFACSDivaソフトウェアを備えるBecton Dickinson FACSaria (BD Biosciences, USA)を、単一細胞分取に使用した。

#### 【0499】

##### B細胞培養

簡潔に、單一分取されたウサギB細胞を、Pansorbin細胞(1:100,000)(Calbiochem(Merck), Darmstadt, Deutschland)、5%ウサギ胸腺細胞上清(MicroCoat, Bernried, Germany)、及び線照射マウスEL-4B5胸腺細胞(2.5×10<sup>4</sup>細胞/ウェル)を含有する、200μl/ウェルEL-4B5培地により、96ウェルプレートにおいて、インキュベーター中で、37において7日間インキュベーションした。B細胞培養の上清を、スクリーニングのために除去し、残った細胞を、直ちに収集し、RLTバッファー(Qiagen, Hilden, Germany)100μl中において、-80で凍結させた。20

#### 【0500】

##### 実施例25

##### ハイブリドーマ生成

##### 細胞培養

マウス骨髄腫細胞株P3x63-Ag8.653を、マウス-マウスハイブリドーマの生成のための融合パートナーとして使用した。細胞を、融合前約14日で融解させ、8-アザグアニンの存在下において培養した。3~4日毎に、細胞を分割し、濃度1~2×10<sup>5</sup>個/mlに調節した。30

#### 【0501】

##### 細胞融合

##### 材料:

マウスハイブリドーマ培地(RPMI 1640(PAN)、FBS ultra-low-IgG、2mM L-グルタミン、1mM Na-ピルビン酸、NEAA、muIL-6を含むNutridoma-CS、HAZ(SIGMA, #A9666))を、RTで調節した。

RPMI 1640培地(37)

RPMI 1640培地(4)

PEG(37)

#### 【0502】

融合前に、骨髄腫細胞をおおよそ遠心分離する(250rpm、7分)。細胞ペレットを、培養培地中で再懸濁させる。1つの脾臓について、約1~5×10<sup>7</sup>個の細胞が必要である。

#### 【0503】

細胞融合のために、約5:1の骨髄腫細胞に対するリンパ球の比を使用するべきである。P3x63-Ag8.653細胞を、RPMI 1640培地50ml中に再懸濁させ、遠心分離する(250rpm、7分)。上清を除去する。その後、細胞を、脾細胞に加える。

#### 【0504】

融合の間、温度を、水浴中において、37に調節する。

10

20

30

40

50

**【 0 5 0 5 】**

P E G 溶液（ 3 7 ）を、細胞に滴下する。

**【 0 5 0 6 】**

融合混合物を、インキュベーター中において、37で15～120分間インキュベーションする。その後、融合混合物を遠心分離し（250 rpm、7分）、再懸濁させた培地1200 μl中に再懸濁させる。細胞懸濁液100 μlを、半固体ハイブリドーマ培地50 mlに加え、ホモジナイズし、各4 mlを、6ウェルプレートのウェル当たりに加えた。9～13日の培養後、單一クローンを取り出す。

**【 0 5 0 7 】**

実施例 2 6

10

**ハイブリドーマの培養**

約  $5 \times 10^6$  個の細胞を、Hyclone培地50 ml中に懸濁させる。培養混合物を、96時間インキュベーションする。その後、Hyclone培地75 mlを加えた。培養を、7日間継続した。生存率が40%を下回って低下した場合、細胞懸濁液を、0.22 μmフィルタでろ過し、ろ液を、精製に使用した。

**【 0 5 0 8 】**

実施例 2 7

20

**B 細胞のクローニング****V ドメインの P C R 増幅**

トータル RNA を、B 細胞ライゼート（RLTバッファー - Qiagen - Cat. N° 79216 中に再懸濁）から、NucleoSpin 8/96 RNA キット（Macherey&Nagel ;740709.4, 740698）を使用し、製造メーカーのプロトコルに従って調製した。RNA を、RNase-free 水60 μlにより溶出した。RNA 6 μlを使用して、Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix（Invitrogen 18080-400）及びオリゴdT - プライマーを使用するリバーストランスクリプター反応により、製造メーカーの説明に従って、cDNA を生成した。全ての工程を、Hamilton ML Starシステムにおいて行った。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖可変領域（V H 及び V L ）を、AccuPrime SuperMix（Invitrogen 12344-040）により、終容量50 μl中において、野生型ウサギ B 細胞の重鎖用のプライマー rbHC.up 及び rbHC.do ならびに軽鎖用の rbLC.up 及び rbLC.do と、トランスジェニックウサギ B 細胞の軽鎖用の BcPCR\_FHLC\_leader.fw 及び BcPCR\_huCkappa.rev とを使用して増幅するのに、cDNA 4 μlを使用した。全てのフォワードプライマーは、（V H 及び V L それぞれの）シグナルペプチドに特異的であった。一方、リバースプライマーは、（V H 及び V L それぞれの）定常領域に特異的であった。RbVH+RbVLについての P C R 条件を、以下の通りとした。高温での開始、94で5分間、94で20秒、70で20秒、68で45秒を35サイクル、及び最後の伸張、68で7分間。HuVLについての P C R 条件を、以下の通りとした。高温での開始、94で5分間、94で20秒、52で20秒、68で45秒を40サイクル、及び最後の伸張、68で7分間。

30

**【 0 5 0 9 】**

## 【表 7 1】

rbHC.up	AAGCTTGCACCATGGAGACTGGCTGCGC TGGCTTC	
配列番号：1 1 1		
rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG	
配列番号：1 1 2		10
rbLC.up	AAGCTTGCACCATGGACAYGAGGGCCCC ACTC	
配列番号：1 1 3		
rbLC.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC	
配列番号：1 1 4		
BcPCR_FHLC_leader.fw	ATGGACATGAGGGTCCCCGC	
配列番号：1 1 5		20
BcPCR_huCkappa.rev	GATTCAACTGCTCATCAGATGGC	
配列番号：1 1 6		
【0 5 1 0】		
P C R 溶液 5 0 μ l の内の 8 μ l を、48 E-Gel 2 % ( Invitrogen G8008-02 ) にロードした。ポジティブな P C R 反応を、NucleoSpin Extract II キット ( Macherey&Nagel ; 7406 09250 ) を使用し、製造メーカーのプロトコルに従って洗浄し、溶出バッファー 5 0 μ l 中に溶出した。全ての洗浄工程を、Hamilton ML Starlet システムにおいて行った。		
【0 5 1 1】		30
実施例 2 8		
ウサギモノクローナル二価抗体のリコンビナント発現		
ウサギモノクローナル二価抗体のリコンビナント発現のために、V H 又は V L をコードする P C R 産物を、c D N A として、発現ベクター内に、オーバーハングクローニング法 ( RS Haun et al. , BioTechniques 13 ( 1992 ) 515-518 ; MZ Li et al. , Nature Methods 4 ( 2007 ) 251-256 ) によりクローニングした。この発現ベクターには、イントロン A を含む 5' C M V プロモーターと、3' B G H ポリアデニル化配列とからなる発現カセットが含まれる。発現カセットに加えて、プラスミドには、E.coli 中でのプラスミド増幅のための、p U C 由来の複製起点と、アンピシリン抵抗性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子が含まれる。基本的なプラスミドの 3 つの変異体を使用した。1 つのプラスミドは、V H 領域を受容するように設計されたウサギ I g G 定常領域を含有する。2 つのプラスミドは、V L 領域を受容するウサギ又はヒトのカッパ L C 定常領域を含有する。		40
【0 5 1 2】		
カッパ又はガンマ定常領域及び V L / V H インサートをコードする直線化発現プラスミドを、重複プライマーを使用する P C R により増幅した。		
【0 5 1 3】		
精製された P C R 産物を、T 4 D N A ポリメラーゼと共にインキュベーションし、一本鎖オーバーハングを生成した。この反応を、d C T P の添加により停止させた。		
【0 5 1 4】		50
次の工程において、プラスミド及びインサートを組み合わせ、r e c A と共にインキュ		

ベーションし、部位特異的組換えを誘引した。組換えられたプラスミドを、*E.coli*中にトランسفォーメーションした。翌日、増殖したコロニーを取り出し、プラスミド調製、制限分析、及びDNA配列決定により、正しく組換えられたプラスミドを試験した。

#### 【0515】

抗体発現のために、単離されたHC及びLCプラスミドを、HEK293細胞中で一過性に共トランسفエクションした。上清を、1週間後に収集した。

#### 【0516】

##### 実施例29

##### ウサギモノクローナル一価抗体のリコンビナント発現

モノクローナル一価抗体として選択された候補のリコンビナント発現のために、全てのVH鎖のウサギ定常領域を、CH3セグメント中にノブ突然変異を包含するヒト定常領域に変換した。ウサギの野生型B細胞由来のVL鎖について、ウサギCカッパ定常領域を、ヒトに変換した。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖可変領域を、AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040)により、終容量50μl中において、シグナルペプチドに特異的なフォワードプライマーと、(VH及びVLそれぞれの)ヒト定常領域に相同性を有するオーバーラップ配列(20bp)を(3'端に)有するCDR3-J領域に特異的なリバースプライマーとを使用して増幅するのに、選択された候補のcDNA4μlを使用した。VH及びVL鎖增幅用のPCR条件を、以下の通りとした。高温での開始、94で5分間、94で20秒、68で20秒、68で45秒を35サイクル、及び最後の伸張、68で7分間。

10

20

30

#### 【0517】

VH又はVLをコードするPCR産物を、cDNAとして、発現ベクター内に、オーバーハングクローニング法(RS Haun et al., BioTechniques 13 (1992) 515-518; MZ Li et al., Nature Methods 4 (2007) 251-256)によりクローニングした。この発現ベクターには、イントロンAを含む5'CMVプロモーターと、3'BGHポリアデニル化配列とからなる発現力セットが含まれる。発現力セットに加えて、プラスミドには、*E.coli*中のプラスミド増幅のための、pUC由来の複製起点と、アンピシリン抵抗性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子が含まれる。基本的なプラスミドの2つの変異体を使用した。1つのプラスミドは、新たに増幅されたVH鎖を受容するように設計されたヒトIgG定常領域を含有する。2つ目のプラスミドは、VL鎖を受容するヒトカッパLC定常領域を含有する。

#### 【0518】

カッパ又はガンマ定常領域及びVL/VHインサートをコードする直線化発現プラスミドを、重複プライマーを使用するPCRにより増幅した。

#### 【0519】

精製されたPCR産物を、T4DNAポリメラーゼと共にインキュベーションし、一本鎖オーバーハングを生成した。この反応を、dCTPの添加により停止させた。

#### 【0520】

次の工程において、プラスミド及びインサートを組み合わせ、recAと共にインキュベーションし、部位特異的組換えを誘引した。組換えられたプラスミドを、*E.coli*中にトランسفォーメーションした。翌日、増殖したコロニーを取り出し、プラスミド調製、制限分析、及びDNA配列決定により、正しく組換えられたプラスミドを試験した。

40

#### 【0521】

##### ヒトPDGF-BB結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)系技術を使用して行った。抗原であるヒトPDGF-BB(Cell Signaling, Cat. No. 8921BF)を、384ウェルマイクロタイプレート(Thermo Scientific, Cat. No. 464718)において、濃度125ng/mLでPBS、0.5%BSA及び0.05%Tween 25μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。  
1) プロッキング工程：結合していない表面を飽和させる(1時間、2%BSA)。

50

2) 抗 P D G F - B B 抗体の濃度を 1 時間増大させる。3) 検出抗体、希釈 = 1 : 3 0 0 0 ( E C L 抗ウサギ I g G - P O D , NA9340V + E C L 抗ヒト I g G - P O D , NA933V , あるいは、マウス抗体については、E C L 抗マウス I g G - P O D ; NA9310V )。基質である 3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン ( T M B , Piercenet , Cat. No. 34021 ) を加えた 2 0 ~ 3 0 分後に、光学密度を、3 7 0 nm で決定した。E C 50 を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【 0 5 2 2 】

##### 実施例 3 1

##### カニクイザル P D G F - B B 結合 E L I S A

10

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 ( E L I S A ) 系技術を使用して行った。抗原であるヒト P D G F - B B を、3 8 4 ウェルマイクロタイタープレート ( Thermo Scientific , Cat. No. 464718 ) において、濃度 1 2 5 ng/mL で P B S 、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % Tween 2 5  $\mu$ L 中において固定した。全ての下記工程を、P B S 、0 . 5 % B S A 、0 . 0 5 % Tween 9 0  $\mu$ L の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる ( 1 時間、2 % B S A )。2) 抗 P D G F - B B 抗体の濃度を 1 時間増大させる。3) 検出抗体、希釈 = 1 : 3 0 0 0 ( E C L 抗ウサギ I g G - P O D , NA9340V + E C L 抗ヒト I g G - P O D , NA933V , あるいは、マウス抗体については、E C L 抗マウス I g G - P O D ; NA9310V )。基質である 3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン ( T M B , Piercenet , 34021 ) を加えた 2 0 ~ 3 0 分後に、光学密度を、3 7 0 nm で決定した。E C 50 を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

20

#### 【 0 5 2 3 】

##### 実施例 3 2

##### マウス P D G F - B B 結合 E L I S A

30

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 ( E L I S A ) 系技術を使用して行った。抗原であるマウス P D G F - B B ( Peprotech 315-18 ) を、3 8 4 ウェルマイクロタイタープレート ( Thermo Scientific , Cat. No. 464718 ) において、濃度 1 2 5 ng/mL で P B S 、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % Tween 2 5  $\mu$ L 中において固定した。全ての下記工程を、P B S 、0 . 5 % B S A 、0 . 0 5 % Tween 9 0  $\mu$ L の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる ( 1 時間、2 % B S A )。2) 抗 P D G F - B B 抗体の濃度を 1 時間増大させる。3) 検出抗体、希釈 = 1 : 3 0 0 0 ( E C L 抗ウサギ I g G - P O D , NA9340V + E C L 抗ヒト I g G - P O D , NA933V , あるいは、マウス抗体については、E C L 抗マウス I g G - P O D ; NA9310V )。基質である 3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジジン ( T M B , Piercenet , 34021 ) を加えた 2 0 ~ 3 0 分後に、光学密度を、3 7 0 nm で決定した。E C 50 を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

30

#### 【 0 5 2 4 】

##### 実施例 3 3

##### ラット P D G F - B B 結合 E L I S A

40

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 ( E L I S A ) 系技術を使用して行った。抗原であるラット P D G F - B B ( R&D , 520-BB ) を、3 8 4 ウェルマイクロタイタープレート ( Thermo Scientific , Cat. No. 464718 ) において、濃度 1 2 5 ng/mL で P B S 、0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % Tween 2 5  $\mu$ L 中において固定した。全ての下記工程を、P B S 、0 . 5 % B S A 、0 . 0 5 % Tween 9 0  $\mu$ L の注入及び吸引による 3 回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる ( 1 時間、2 % B S A )。2) 抗 P D G F - B B 抗体の濃度を 1 時間増大させる。3) 検出抗体、希釈 = 1 : 3 0 0 0 ( E C L 抗ウサギ I g G - P O D , NA9340V + E C L 抗ヒト I g G - P O D , NA933V , あるいは、マウス抗体については、E C L 抗マウス I g G - P O D )

50

; NA9310V)。基質である3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた20~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。EC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0525】

##### 実施例34

###### ヒトPDGF-AA結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA) 系技術を使用して行った。抗原であるヒトPDGF-AA (Peprotech, Cat. No. AF-100-13A) を、384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific, Cat. No. 464718) において、濃度125ng/mLでPBS、0.5% BSA及び0.05% Tween 25 μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS、0.5% BSA、0.05% Tween 90 μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる (1時間、2% BSA)。2) 抗PDGF-BB抗体の濃度を1時間増大させる。3) 検出抗体、希釈=1:3000 (ECL抗ウサギIgG-POD、NA9340V+ECL抗ヒトIgG-POD、NA933V、あるいは、マウス抗体については、ECL抗マウスIgG-POD; NA9310V)。基質である3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた20~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。EC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0526】

##### 実施例35

###### ヒトPDGF-CC結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA) 系技術を使用して行った。抗原であるヒトPDGF-CC (Peprotech, AF-100-00C) を、384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific, Cat. No. 464718) において、濃度125ng/mLでPBS、0.5% BSA及び0.05% Tween 25 μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS、0.5% BSA、0.05% Tween 90 μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる (1時間、2% BSA)。2) 抗PDGF-BB抗体の濃度を1時間増大させる。3) 検出抗体、希釈=1:3000 (ECL抗ウサギIgG-POD、NA9340V+ECL抗ヒトIgG-POD、NA933V、あるいは、マウス抗体については、ECL抗マウスIgG-POD; NA9310V)。基質である3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた20~30分後に、光学密度を、370nmで決定した。EC<sub>50</sub>を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用する、4パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0527】

##### 実施例36

###### タンパク質-タンパク質相互作用阻害アッセイ法：ヒトPDGF-B:PDGF-BBレセプター

ヒトPDGF-BBのヒトPDGF-BBレセプターに対するタンパク質-タンパク質相互作用阻害分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA) 系技術を使用して行った。ヒトFcタグ付きPDGF-BBレセプタータンパク質 (RnD, Cat.No.385-PR-100) を、384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific, Cat. No. 464718) において、濃度750 μg/mLでPBS、0.5% BSA及び0.05% Tween 25 μL中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90 μLの注入及び吸引による3回の洗浄ルーチンにより行った。1) ブロッキング工程：結合していない表面を飽和させる (1時間、2% BSA)。2) 濃度を増大させる抗PDGF-BB抗体 15 μLを、75nM ビオチン化ヒトPDGF-BB (Cell Signaling, 8921BF) 15 μLと、容量30 μL中で1時間インキュベーションした。3) 検出を、ペルオキシダーゼラベルされたストレプト

10

20

30

40

50

アビジン (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 11089153001) を使用して達成した。基質である 3 , 3' , 5 , 5' - テトラメチルベンジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた 10 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。IC<sub>50</sub> を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用する、4 パラメータロジスティックモデルにより算出した。

#### 【0528】

##### 実施例 37

###### マウスハイブリドーマからの抗体精製

抗体含有ハイブリドーマ上清をろ過し、2 回のクロマトグラフィー工程により精製した。抗体を、PBS (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137 mM NaCl、2.7 mM KCl)、pH 7.4 で平衡化させた、HiTrap プロテイン G (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉する。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去する。抗体を、25 mM クエン酸バッファー、pH 3.0 で回収し、溶出直後に、1 M Tris - 塩基、pH 9.0 で、pH 6.0 に中和する。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを、2 番目の精製工程として使用する。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0 において行う。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンプラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存する。

#### 【0529】

抗体含有ハイブリドーマ上清をろ過し、2 回のクロマトグラフィー工程により精製する。上清を、2 M グリシン、pH 8.6、600 mM NaCl と、50% v/v で混合し、1 M グリシン、pH 8.6、300 mM NaCl で平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉する。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去する。抗体を、100 mM クエン酸バッファー、pH 2.8 で回収し、溶出直後に、1 M Tris - 塩基、pH 8.5 で、pH 6.0 に中和する。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを、2 番目の精製工程として使用する。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0 において行う。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンプラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80°で保存する。

#### 【0530】

##### 実施例 38

###### ヒト P D G F - B B 結合表面プラズモン共鳴分光アッセイ法

結合分析を、BIAcore B4000 システム (GE Healthcare) を適用する表面プラズモン共鳴分光系技術を使用して行った。抗原であるヒト P D G F - B B (Cell Signaling, 8921BF) を、C1 センサチップ (GE Healthcare, BR-1005-35) において、濃度 1 μg/mL で PBS、0.1% BSA、0.05% Tween 中において、アミンカップリング化学を使用して固定した。濃度を増大させる抗 P D G F - B B 抗体を、10 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl 中に加えた。180 秒の会合期及び 600 秒の解離期のリードアウト時間を利用して、見掛けの  $k_a$  及び見掛けの  $k_d$  を算出した。見掛けの  $K_D$  (結合力) を、BIAcore T200 v2.0 フィッティングソフトウェアを使用して算出した。

#### 【0531】

##### 実施例 39

###### カニクイザル P D G F - B B 結合表面プラズモン共鳴分光アッセイ法

結合分析を、BIAcore B4000 システム (GE Healthcare) を適用する表面プラズモン共鳴分光系技術を使用して行った。抗原であるカニクイザル P D G F - B B を、C1 センサチップ (GE Healthcare, BR-1005-35) において、濃度 1 μg/mL で PBS、0.1% BSA 及び 0.05% Tween 中において、アミンカップリング化学を使用して固定した。濃度を増大させる抗 P D G F - B B 抗体を、10 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl

10

20

30

40

50

1中に加えた。180秒の会合期及び600秒の解離期のリードアウト時間を利用して、見掛けの $k_a$ 及び見掛けの $k_d$ を算出した。見掛けの $K_D$ (結合力)を、BIAcore T200 v 2.0フィッティングソフトウェアを使用して算出した。

#### 【0532】

##### 実施例40

##### HEK細胞中のヒト化抗体のトランスフェクション及び一過性発現

トランスフェクション試薬である293-free (Novagen) による懸濁液適合HEK293F (Free Style 293-F細胞; Invitrogen) 細胞における、抗体の一過性発現

#### 【0533】

細胞を、125ml振とうフラスコ中で融解させた後に、希釈により、少なくとも4回(容量30ml)継代した(37、7% CO<sub>2</sub>、85%湿度、135rpmにおいて、インキュベーション/振とう)。

#### 【0534】

細胞を、容量250ml中で、 $3 \times 10^5$ 個/mlに増殖させた。3日後に、細胞を分割し、新たに、1リットル振とうフラスコにおける容量250ml中に、密度 $7 \times 10^5$ 個/mlで播種した。トランスフェクションを、約 $1.4 \sim 2.0 \times 10^6$ 個/mlの細胞密度で、24時間後に行うものとする。

#### 【0535】

トランスフェクション前に、250μg プラスミドDNA (122μg 軽鎖及び128μg 重鎖)を、終容量10mlに、予め温めた(水浴:37)Opti-MEM (Gibco)で希釈する。溶液を穏やかに混合し、室温で5分以内にインキュベーションする。ついで、293-freeトランスフェクション試薬 333.3μlを、DNA-OptiMEM溶液に加える。穏やかに混合し、室温で15~20分間インキュベーションする。混合物の全量を、HEK細胞培養容量250mlを含む1L振とうフラスコに加える。

#### 【0536】

37、7% CO<sub>2</sub>、85%湿度、135rpmにおいて、6又は7日間インキュベーション/振とうする。

#### 【0537】

2,000rpm、4、10分間での1回目の遠心分離工程により、上清を収集する。ついで、4000rpm、4、20分間での2回目の遠心分離のために、この上清を、新たな遠心分離フラスコ中に移す。その後、細胞フリー上清を、0.22μmポトルトップフィルタによりろ過し、フリーザー(-20)において保存する。

#### 【0538】

##### 実施例41

##### 抗体からのFabフラグメントの調製及び分析

5mg 抗体(20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH 6.0中の約1mg/ml)を、L-システイン溶液 90μl (Merck Millipore; 20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH 6.0中の250mM)及びパパイン 12μl (Roche Life Science; 3.2U/mg 抗体)と共に、37で120分間インキュベーションした。開裂後、PBS (1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137mM NaCl、2.7mM KCl)、pH 7.4で平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーを、インタクトなIgG及びFcフラグメントを除去するのに使用した。その後、MabSelectSuReクロマトグラフィーのフロースルーを、2回目の精製工程としてのSuperdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを使用して更に精製した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20mM ヒスチジンバッファー、0.14M NaCl、pH 6.0において行った。Fabフラグメント含有溶液を、Biomat-SKメンブラン (Millipore, Billerica, MA) を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80で保存した。

#### 【0539】

Fabフラグメントのタンパク質濃度を、280nmでの光学密度(OD)を測定し、ア

10

20

30

40

40

50

ミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用することにより決定した。

【0540】

Fabフラグメントの純度及び完全性を、還元剤(5 mM 1,4-ジチオスレイトール)の存在及び不存在下における、SDS-PAGE(NuPAGE 4~12% Bis-Trisゲル、Invitrogen)により、Simply Blue Safe Stain(Invitrogen)で染色して分析した。

【0541】

Fab調製物の凝集含量を、Superdex 200 10/300 GL分析用サイズ排除カラム(GE Healthcare)を使用し、ランニングバッファーとして2×PBS、pH 7.4を使用する高性能SECにより決定した。

10

【0542】

実施例42

3T3細胞増殖ELISA

増殖阻害を決定するために、BradU発色アッセイ法を、製造メーカーのマニュアルに従って使用した(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, # 11 647 229 001)。このアッセイ法において、5 ng/mlヒトPDGF-BB及び抗体を使用した。

【0543】

実施例43

ホスホ-PDGFRベータ(Tyr751)サンドイッチELISA

10,000個3T3細胞/ウェルを、10%ウシ新生仔血清を加えたDMEM培地中において、24時間培養した。その後、細胞を、Hunger培地(0.5%ウシ新生仔血清を含むDMEM培地)中において、24時間インキュベーションした。

20

【0544】

添加前に、抗体(1 µg/ml)を、5 ng/ml PDGF-BBを含有する培地中において、2時間予めインキュベーションした。3T3細胞を、5 ng/ml PDGF-BB及び抗体を含むHunger培地中において、10分間インキュベーションした。

【0545】

溶解前に、細胞を、PBSで4回洗浄した。細胞の溶解を、溶解バッファー 100 µl中において行った。

30

【0546】

溶解溶液を、ウサギ抗PDGFRベータ抗体でコートした96ウェルプレートのウェルにおいて、4℃で一晩インキュベーションした。その後、ウェルを、PBSで4回洗浄した。マウス抗ホスホ-PDGFレセプターベータ抗体との1時間のインキュベーション後、ウェルを、洗浄バッファーで4回洗浄した。検出のために、ウェルを、TMB基質溶液100 µlで、30分間インキュベーションした。反応を、停止溶液100 µlの添加により停止させた。吸光を、450 nmで決定した。

【0547】

実施例44

細胞遊走アッセイ法

CIM-プレート 16(ACEA Biosciences Inc., n°05665817001、メンブラン孔径8 µm)を使用。

40

【0548】

プロトコル

使用前に、初代ヒト網膜周皮細胞(hTERTにより不死化されたACBRI 183 CellSystems)を、(成長因子を含まないCellSystems CSC血清フリー培地(b<sup>0</sup>SF-4ZR-500-S中において)一晩飢餓状態にする(50~70%コンフルエント)。

【0549】

プレート準備

上側チャンバ:(50 µl 培地 + 100 µl 細胞懸濁液)

【0550】

50

PBS中の $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  フィブロネクチン (Sigma n°F0895-2mg) で、両面をコーティング。

#### 【0551】

各ウェルのセンサ側（底面側）に、フィブロネクチン溶液 $40\text{ }\mu\text{l}$ を加え、上側チャンバを、フード中において、30分間インキュベーションする。フィブロネクチン溶液を、センサ側から注意深く吸引し、電極との接触を避ける。ウェル側が上に、センサ側が下になるように、UCをひっくり返す。フィブロネクチン溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ をウェルに加え、フード下において、RTで30分間インキュベーションする。溶液を、ウェル内から注意深く吸引する。成長因子を含まないCSC血清フリー培地 $50\text{ }\mu\text{l}$ を、ウェルに加える。

#### 【0552】

下側チャンバ： $160\text{ }\mu\text{l}/\text{ウェル}$  試験サンプル ( $1\times$ 濃度)

#### 【0553】

成長因子を含まないCellSystems CSC血清フリー培地 (n°SF-4ZR-500-S) 中で全てを希釈する。サンプル／抗体の混合物を、フード中において2時間インキュベーションする。 $160\text{ }\mu\text{l}/\text{ウェル}$  サンプルを加える。UCとLCとを、CIM-プレート16アッセンブリツールを使用してアッセイブリする。このCIM-プレート16を、インキュベーター中ににおいて、37℃で1時間置いて、平衡化させる。CIM-プレート16を、RTCA DP分析器に入れる。RTCAソフトウェアのステップ1を開始することにより、バックグラウンド測定を開始する。

#### 【0554】

##### 細胞調製

細胞を、細胞剥離バッファーで剥離し、この細胞を、成長因子を含まないCellSystems CSC血清フリー培地 (n°SF-4ZR-500-S) 中に、 $1.5\times10^5$  個/mlで再懸濁させる。CIM-プレート16を、RTCA分析器から取り出し、UCに、基礎培地（成長因子を含まないCellSystems CSC血清フリー培地 n°SF-4ZR-500-S） $100\text{ }\mu\text{l}$ 当たりに、 $15,000$  個初代ヒト網膜周皮細胞（hTERTにより不死化された（ACBRI 183 CellSystems））/ウェルを加える。このプレートを、RTCA分析器に戻し、 $10\sim20$ 時間の間、測定を直ちに開始する。

#### 【0555】

##### 実施例45

##### 細胞増殖アッセイ法

CellTiter 96 Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ法 (Promega, G3580)。

#### 【0556】

$100\text{ }\mu\text{l}$ 当たりに、 $2500$ 個/ウェル 初代ヒト網膜周皮細胞（hTERTにより不死化された（ACBRI 183 CellSystems））。

#### 【0557】

##### 培地

増殖培地 = CSC完全培地、培養追加免疫 (ACBRI n°4Z--500)

アッセイ培地 = 成長因子を含まないCSC血清フリー培地 (ACBRI n°SF-4ZR-500-S)

#### 【0558】

Balbc3T3、 $100\text{ }\mu\text{l}$ 当たりに、 $5000$ 個/ウェル

#### 【0559】

##### 培地

増殖培地 = DMEM (Gibco n°41966)、 $10\%$  NBCS

アッセイ培地 = DMEM (Gibco n°41966)、 $0.4\%$  NBCS

#### 【0560】

##### 増殖アッセイ法

アッセイ前に、細胞を、増殖培地中に、 $24\sim48$ 時間播種する。細胞が $80\sim90\%$ コンフルエントとなった時点で、細胞を、トリプシン溶液で収集する。細胞を、増殖培地中において、 $0.25\times10^5$  個/ml (又は $0.5\times10^5$  個/ml) で再懸濁させる。細

10

20

30

40

50

胞懸濁液 100 µlを、96 ウェルプレートの各ウェルに加える。増殖培地を除去し、アッセイ培地 100 µlを、各ウェルに加える。24 時間インキュベーションする。標準又はサンプル 100 µlを、各ウェルに加える(2×濃縮、アッセイバッファー中で希釈)。37、5% CO<sub>2</sub>で、72 時間インキュベーションする。染料溶液 40 µlを細胞に加え、37 でインキュベーションする。種々の時点(1時間~8時間)において、490 nmで読み取る。

#### 【0561】

##### 実施例 4 6

###### 抗 P D G F - B B 抗体の動力学スクリーニング

ヒト P D G F - B B に対する抗 P D G F - B B 抗体の結合性を、BIACORE T200 機器(GE Healthcare)を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。約 20 共鳴単位(RU)のリコンビナントヒト P D G F - B B (5 µg/ml; オーダーコード 220-BB; R&D Systems)を、シリーズ S C 1 チップ(GE Healthcare BR-1005-35)に、pH 4.0において、GE Healthcareにより提供されているアミンカップリングキットを使用することによりカップリングさせた。固定用のランニングバッファーを、H B S - N pH 7.4 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)とした。下記動力学特徴決定について、ランニング及び希釈バッファーを、H B S - P pH 7.4 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% 界面活性剤 P 20、pH 7.4、GE Healthcare)とした。フローセルを、25 に設定し、サンプルブロックを、12 に設定し、ランニングバッファーで 2 回下塗りした。

10

20

30

#### 【0562】

会合を、溶液中の濃度 30 nM 及び 3 nM 抗 P D G F - B B 抗体の注入により、流速 100 µl/分において、30 分間測定した。解離期を、最大 600 秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。表面を、流速 5 µl/分での、60 秒間の 0.85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(リン酸)溶液の 2 回の連続的な注入で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、プランク表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。プランク注入も差し引いた(=二重参照)。K<sub>D</sub> 及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア 1:1 モデルを使用した。

#### 【0563】

##### 実施例 4 7

###### 抗 P D G F - B B F a b の動力学特徴決定

ヒト P D G F - B B に対する抗 P D G F - B B F a b サンプルの結合性を、BIACORE T200 機器(GE Healthcare)を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。約 50 共鳴単位(RU)のリコンビナントヒト P D G F - B B (0.5 µg/ml; オーダーコード 220-BB; R&D Systems)を、シリーズ S C M 3 チップ(GE Healthcare BR-1005-36)に、pH 4.0において、GE Healthcareにより提供されているアミンカップリングキットを使用することによりカップリングさせた。固定用のランニングバッファーを、H B S - N pH 7.4 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)とした。下記動力学特徴決定について、ランニング及び希釈バッファーを、H B S - P pH 7.4 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05% 界面活性剤 P 20、pH 7.4、GE Healthcare)とした。フローセルを、25 に設定し、サンプルブロックを、12 に設定し、ランニングバッファーで 2 回下塗りした。

40

50

#### 【0564】

会合を、種々の濃度の溶液における抗 P D G F - B B F a b の注入により、流速 30 µl/分で、1:3 系列希釈において 300 nM で開始して、180 秒間測定した。解離期を、最大 900 秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。表面を、流速 5 µl/分での、60 秒間の 0.85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(リン酸)溶液で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、プランク表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。プランク注入も差し引いた(=二重参照)。K<sub>D</sub> 及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア 1:1 モデルを使用した。

## 【0565】

## 実施例48

## 抗体からのF a b フラグメントの調製及び分析

12 mg 抗体 (20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 中の 1 mg/ml) を、L - システイン溶液 240 μl (Merck Millipore; 20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 中の 250 mM) 及びパパイン 327 μl (Roche Life Science; 0.001 U/mg 抗体) と共に、37 ℃ で 120 分間インキュベーションした。開裂後、PBS (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137 mM NaCl、2.7 mM KCl) 、pH 7.4 で平衡化させた、HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用する親和性クロマトグラフィーを、インタクトな IgG 及び Fc フラグメントを除去するのに使用した。その後、MabSelectSuRe クロマトグラフィーのフロースルーを、2 回目の精製工程としての Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) におけるサイズ排除クロマトグラフィーを使用して更に精製した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジンバッファー、0.14 M NaCl、pH 6.0 において行った。F a b フラグメント含有溶液を、Biomax-SKメンプラン (Millipore, Billerica, MA) を備える Ultrafree-CL 遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80 ℃ で保存した。

## 【0566】

F a b フラグメントのタンパク質濃度を、280 nm での光学密度 (OD) を測定し、アミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用することにより決定した。

## 【0567】

F a b フラグメントの純度及び完全性を、還元剤 (5 mM 1,4-ジチオスレイトール) の存在及び不存在下における、SDS-PAGE (NuPAGE 4~12% Bis-Tris ゲル、Invitrogen) により、Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) で染色して分析した。

## 【0568】

F a b 調製物の凝集含量を、BioSuite 高解像 SEC、250 、5 μm 分析用 サイズ排除カラム (Waters GmbH) を使用し、ランニングバッファーとして 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、250 mM KCl、pH 7.0 を使用する高性能 SEC により決定した。

## 【0569】

## 実施例49

## 成熟 X F a b の ANG2 結合動力学及び交叉反応性

ヒト ANG2 - RBD - Fc 領域融合物に対する成熟 X F a b の結合性を、BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。約 4000 RU 抗ヒト抗体 (10 μg/ml 抗ヒト IgG (Fc) 抗体；オーダーコード BR-1008-39 ; GE Healthcare) を、シリーズ S CM5 チップ (GE Healthcare BR-1005-30) に、pH 5.0 において、GE Healthcare により提供されているアミンカップリングキットを使用することによりカップリングさせた。HBS-N (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare) を、固定手順の間のランニングバッファーとして使用した。下記動力学特徴決定について、サンプル及びランニングバッファーを、HBS-P (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、0.05% 界面活性剤 P20 ; GE Healthcare) とした。フローセルを、25 ℃ に設定し、サンプルブロックを、12 ℃ に設定し、動力学特徴決定前に、ランニングバッファーで 2 回下塗りした。

## 【0570】

ヒト又はカニクイザルの ANG2 - RBD - Fc 領域融合物を、1 μg/ml 溶液を流速 5 μl/分で 30 秒間注入することにより捕捉した。会合を、溶液中の種々の濃度における X F a b の注入により、流速 90 μl/分で、1 : 3 系列希釈において 300 nM で開始して、90 秒間測定した。解離期を、最大 600 秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。全ての表面を、流速 5 μl/分での、60 秒間の 3 M MgCl<sub>2</sub> 溶液で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、

10

20

30

40

50

抗ヒトTie2抗体(Fc)表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア1:1モデルを使用した。

#### 【0571】

##### 実施例50

###### 生物学的活性

この方法により、ANG2のそのレセプターであるTie2への結合を阻害する、抗体の能力を決定される。細胞表面上でのTie2レセプターチロシンキナーゼの発現のために、ヒト胚腎細胞株であるHEK293細胞株を、ヒトTie2についての発現ベクターで安定的にトランスフェクションして、細胞株HEK293\_Tie2を得た。

10

#### 【0572】

この細胞を、Tie2レセプターに結合し、このレセプターの自己リン酸化を誘引するANG2で刺激した。Tie2に対する結合は、本明細書で報告された抗ANG2抗体の添加により阻害することができる。リン酸化のグレードを、ELISAにより分析する。OD値は、リン酸化されたTie2の量と関連し、抗体濃度に対してプロットされる。EC<sub>50</sub>値を、同じプレートにおける参考基準に対して、相対生物学的活性(RBA)として決定し、報告する。

#### 【0573】

マルチウェルプレートを、ヒトTie2レセプターに対する抗体でコートし(100μl、10μg/ml; R&D Systems, Cat# MAB3132; 96ウェルMaxisorb immunoプレート)、室温で一晩インキュベーションした。コートしたプレートを、容量250μlで3回洗浄した後、ブロッキング200μlと共に、室温で1~2時間インキュベーションした。

20

#### 【0574】

別に、HEK293\_Tie2細胞(40μl; 5×10<sup>6</sup>個/ml; DMEM/F12)を、対象となる抗体の希釈系列とANG2(R&D Systems, Cat# 623-CF)との、予めインキュベーションした混合物(80μl)に加えた。10分後、細胞を溶解させた(溶解バッファー60μlを加え、15分間インキュベーション)。細胞ライゼートを、ELISAのために、コートしたプレートに移した。

#### 【0575】

ライゼートのTie2レセプターは、抗Tie2捕捉抗体に結合する(ライゼート100μl; RTで90分間インキュベーション)。Tie2レセプター上のリン酸化チロシンを、ビオチンにコンジュゲートさせた抗ホスホチロシン抗体(100μl; 0.3μg/ml 抗ホスホチロシン抗体、クローン4G10(登録商標)、ビオチンコンジュゲート、Upstate, Cat# 16-103; RTで60分間インキュベーション)により検出した。ビオチン残基を、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(100μl; 100mU/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat# 11089153001; RTで30分間インキュベーション)に結合させた。ペルオキシダーゼ基質であるTMB(100μl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat# 11835033001)を加えた。光学密度を、450nmで5~10分後に測定した。

30

#### 【0576】

##### 実施例51

###### 二重特異性抗体の生成及び精製

トランスフェクション試薬である293-free(Novagen)による、DNAのトランスフェクション後の懸濁液適合HEK293F(FreeStyle 293-F細胞; Invitrogen)細胞における、二重特異性抗体の一過性発現

#### 【0577】

細胞を、125ml振とうフラスコ中で融解させた後に、希釈により、少なくとも4回(容量30ml)、3又は4日毎に継代した(37°C、7%CO<sub>2</sub>、85%湿度、135rpmにおいて、インキュベーション/振とう)。細胞を、細胞密度3×10<sup>5</sup>個/mlで、培地250ml中に播種することにより増殖させた。3日後に、細胞を分割し、新たに、培地

40

50

500ml中に、密度 $2 \times 10^5$ 個/mlで播種した。4日後、細胞を分割し、新たに、培地1リットル中に、密度 $7 \times 10^5$ 個/mlで播種した(37℃、7%CO<sub>2</sub>、85%湿度、110rpmにおいて、インキュベーション/振とう)。トランスフェクションを、約1.4~2.0×10<sup>6</sup>個/mlの細胞密度で、24時間後に行った。

#### 【0578】

トランスフェクション前に、1000μg プラスミドDNA(2×250μg 軽鎖コードプラスミドDNA及び2×250μg 重鎖コードプラスミドDNA)を、終容量40mlに、予め温めた(水浴:37℃)Opti-MEM(Gibco)で希釈した。溶液を穏やかに混合し、室温で5分以内にインキュベーションした。ついで、293-freeトランスフェクション試薬1333μlを、DNA-OptiMEM溶液に加えた。混合物を、穏やかに混合し、室温で15~20分間インキュベーションした。混合物の全量を、HEK細胞培養物1リットルに注意深く加えた。細胞を、110rpmで振とうしながら、37℃、7%CO<sub>2</sub>、85%湿度で、7日間更にインキュベーションした。

#### 【0579】

2000rpm、4℃、10分間での1回目の遠心分離工程により、上清を、7日後に収集した。ついで、4000rpm、4℃、20分間での2回目の遠心分離のために、この上清を、新たな遠心分離フラスコ中に移した。細胞フリー上清を、0.22μmフィルタ(Millipore)によりろ過し、精製手順を開始するまで、フリーザー(-20℃)において保存する。

#### 【0580】

抗体含有培養上清をろ過し、少なくとも2回のクロマトグラフィー工程により精製した。PBS(1mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137mM NaCl、2.7mM KCl)、pH 7.4で平衡化させた、CaptureSelect Pre-packedカラム IgG - CH1(life technologies, #494320005)を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。結合しなかったタンパク質を、平衡化バッファーで洗浄することにより除去した。抗体を、25mM クエン酸バッファー、pH 3.0で回収し、溶出直後に、1M Tris-塩基、pH 9.0で、pH 6.0に中和した。

#### 【0581】

Superdex 200(商標)(GE Healthcare)におけるサイズ排除クロマトグラフィーを、2番目の精製工程として使用した。このサイズ排除クロマトグラフィーを、20mM ヒスチジンバッファー、0.14M NaCl、pH 6.0において行った。抗体含有溶液を、Biomax-SKメンプラン(Millipore, Billerica, MA)を備えるUltrafree-CL遠心分離フィルタユニットにより濃縮し、-80℃で保存する。

#### 【0582】

抗PDGF-B/ANG2抗体(クローン0144-0004)を、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)を使用して更に精製した。硫酸アンモニウムを、抗体含有溶液に対して、終濃度1Mになるように加えた。この溶液を、1M 硫酸アンモニウム、35mM 酢酸、pH 5.6中で平衡化させた、Butyl Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)カラムにアプライした。抗体を、35mM 酢酸、pH 5.6により直線勾配(0~100%)において溶出した。抗体含有画分をプールし、サイズ排除クロマトグラフィーにアプライした。

#### 【0583】

抗体調製物のタンパク質濃度を、280nmでの光学密度(OD)を測定し、アミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光係数を使用することにより決定した。

#### 【0584】

抗体の純度及び完全性を、Protein Expressチップ及びHT Protein Express試薬キットを備えるLabChip GX II(PerkinElmer)を使用するCE-SDSにより分析した。

#### 【0585】

抗体調製物の凝集含量を、BioSuite高解像SEC、250Å、5μm分析用サイズ排除カラム(Waters GmbH)を使用し、ランニングバッファーとして200mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/

10

20

30

40

50

K H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、250mM K C l、pH 7.0 を使用する高性能S E Cにより決定した。

【0586】

【表72】

	抗体	スケール [1]	収量 [mg]	収量 [mg/1 上 清]	単量体 (SE-HPLC) [%]	単量体 (CE-SDS) [%]	カラム
抗P D G F - B / A N G 2 抗体	0144	1.5	37.7	25.1	>98	>95	CH1 select, HIC, SEC
抗P D G F - B / V E G F 抗体	0117	1	46.3	46.3	>98	>95	CH1 select, SEC
抗P D G F - B / A N G 2 抗体	0145	1	21.5	21.5	>98	>95	CH1 select/SEC
抗P D G F - B / A N G 2 抗体	0146	0.5	14.6	29.2	>98	>95	CH1 select/SEC
抗I L - 1 ベータ / A N G 2 抗体	0031	1	29.2	29.2	>98	>95	CH1 select, SEC
抗I L - 1 ベータ / V E G F 抗体	0032	1.5	23.6	15.7	>98	>95	CH1 select, IEX, SEC

【0587】

抗体0144は、配列番号：117（V H）及び配列番号：118（V L）のA N G 2 結合部位と、配列番号：92（V H）及び配列番号：97（V L）のP D G F - B 結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0588】

抗体0117は、配列番号：119（V H）及び配列番号：120（V L）のV E G F 結合部位と、配列番号：92（V H）及び配列番号：97（V L）のP D G F - B 結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0589】

抗体0145は、配列番号：119（V H）及び配列番号：120（V L）のA N G 2 結合部位と、配列番号：101（V H）及び配列番号：106（V L）のP D G F - B 結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0590】

抗体0146は、配列番号：117（V H）及び配列番号：118（V L）のA N G 2 結合部位と、配列番号：121（V H）及び配列番号：122（V L）のP D G F - B 結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0591】

抗体0031は、配列番号：06（V H）及び配列番号：16（V L）のI L - 1 ベータ結合部位と、配列番号：140（V H）及び配列番号：141（V L）のA N G 2 結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0592】

抗体0032は、配列番号：142（V H）及び配列番号：143（V L）のV E G F 結合部位と、配列番号：06（V H）及び配列番号：16（V L）のI L - 1 ベータ結合部位とを含む、Cross Mab抗体である。

【0593】

実施例52

10

20

30

40

50

## 二重特異性抗体の動力学特徴決定

### P D G F - B B

ヒト P D G F - B B に対する二重特異性抗 P D G F - B B / A N G 2 抗体の結合性を、 BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。約 50 共鳴単位 (RU) のリコンビナントヒト P D G F - B B (0.5 μg/ml; オーダーコード 220-BB; R&D Systems) を、シリーズ S C M 3 チップ (GE Healthcare BR-1005-36) に、 pH 4.0 において、 GE Healthcare により提供されているアミンカップリングキットを使用することによりカップリングさせた。固定用のランニングバッファーを、 H B S - N pH 7.4 (10 mM H E P E S, 150 mM N a C l, pH 7.4, GE Healthcare) とした。下記動力学特徴決定について、ランニング及び希釈バッファーを、 H B S - P pH 7.4 (10 mM H E P E S, 150 mM N a C l, 0.05% 界面活性剤 P 20, pH 7.4, GE Healthcare) とした。フローセルを、 25 に設定し、サンプルロックを、 12 に設定し、ランニングバッファーで 2 回下塗りした。

#### 【 0 5 9 4 】

会合を、種々の濃度の溶液における二重特異性抗体の注入により、流速 30 μl/ 分で、 1 : 3 系列希釈において 300 nM で開始して、 180 秒間測定した。解離期を、最大 900 秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。表面を、流速 5 μl/ 分での、 60 秒間の 0.85% H<sub>3</sub> P O<sub>4</sub> (リン酸) 溶液で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、プランク表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。プランク注入も差し引いた (= 二重参照)。K D 及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア 1 : 1 モデルを使用した。

#### 【 0 5 9 5 】

### A N G 2 :

ヒト A N G 2 - R B D - マウス F c 領域融合物に対する二重特異性抗体の結合性を、 BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。約 4000 RU 抗マウス F c 領域抗体 (10 μg/ml 抗マウス (F c ) 抗体) を、シリーズ S C M 5 チップ (GE Healthcare BR-1005-30) に、 pH 5.0 において、 GE Healthcare により提供されているアミンカップリングキットを使用することによりカップリングさせた。H B S - N (10 mM H E P E S, 150 mM N a C l, pH 7.4, GE Healthcare) を、固定手順の間のランニングバッファーとして使用した。下記動力学特徴決定について、サンプル及びランニングバッファーを、 H B S - P (10 mM H E P E S, 150 mM N a C l, pH 7.4, 0.05% 界面活性剤 P 20; GE Healthcare) とした。フローセルを、 25 に設定し、サンプルロックを、 12 に設定し、動力学特徴決定前に、ランニングバッファーで 2 回下塗りした。

#### 【 0 5 9 6 】

ヒト A N G 2 - R B D - マウス F c 領域融合物を、 1 μg/ml 溶液を流速 5 μl/ 分で 30 秒間注入することにより捕捉した。会合を、溶液中の種々の濃度における二重特異性抗体の注入により、流速 90 μl/ 分で、 1 : 3 系列希釈において 300 nM で開始して、 90 秒間測定した。解離期を、最大 600 秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。全ての表面を、流速 5 μl/ 分での、 60 秒間の 3 M M g C l<sub>2</sub> 溶液で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、抗マウス I g G 抗体 (F c) 表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。プランク注入も差し引いた (= 二重参照)。K D 及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア 1 : 1 モデルを使用した。

#### 【 0 5 9 7 】

### V E G F :

ヒト V E G F アイソフォーム 121 に対する二重特異性抗体の結合性を、 BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。抗ヘキサヒスチジン抗体を、 C M 5 チップ (GE Healthcare BR-1005-30) に、製造メーカーの説明に従って、 GE Healthcare により提供されているアミンカップリングキットを使用することによ

10

20

30

30

40

50

リカップリングさせた。HBS-N (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)を、固定手順の間のランニングバッファーとして使用した。下記動力学特徴決定について、サンプル及びランニングバッファーを、HBS-P (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、0.05% 界面活性剤P20; GE Healthcare)とした。フローセルを、25に設定し、サンプルブロックを、12に設定し、動力学特徴決定前に、ランニングバッファーで2回下塗りした。

#### 【0598】

ヒスチジンタグを含むヒトVEGFアイソフォーム121を、溶液を流速5 μl/分で30秒間注入することにより捕捉した。会合を、溶液中の種々の濃度における二重特異性抗体の注入により、流速90 μl/分で、1:3系列希釈において300 nMで開始して、90秒間測定した。解離期を、最大600秒間モニターし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによりトリガーした。全ての表面を、流速5 μl/分での、60秒間の3 M MgCl<sub>2</sub>溶液で洗浄することにより再生させた。バルク屈折率差を、抗ヘキサヒスチジン抗体表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動力学パラメータの算出のために、ラングミュア1:1モデルを使用した。

#### 【0599】

##### IL-1ベータ:

ヒトIL-1ベータに対する抗IL-1ベータ抗体の結合動力学を、BIACORE T200機器(GE Healthcare)を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。全ての実験を、ランニング及び希釈バッファーとして、HBS-P (10 mM His、140 mM NaCl、0.05% Tween20、pH 7.4)を使用して、25で行った。抗ヒトFc抗体を、シリーズS CM5センサチップ(GE Healthcare)に、標準的なアミンカップリング化学を使用して固定した。二重特異性抗体を、捕捉応答100~200 RUをもたらすように、表面上に捕捉させた。ヒトIL-1ベータを、0.74~最大60 nM (1:3系列希釈)の濃度で、表面上に90秒間注入した(会合期)。解離期を、ランニングバッファーで洗浄することにより、600秒間モニターした。表面を、3 M MgCl<sub>2</sub>(抗ヒトFc抗体用)又は10 mM グリシン pH 1.5(抗マウスFc抗体用)を、流速5 μl/分で60秒間注入することにより再生させた。バルク屈折率差を、モック表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注入を差し引いた(=二重参照)。得られた曲線を、ラングミュア1:1結合モデルに、BIAevaluationソフトウェアを使用して当て嵌めた。

#### 【0600】

##### 実施例53

###### X-線構造決定

###### Apo FabフラグメントH34

FabフラグメントH34についての結晶化スクリーニングを、濃度32 mg/mlで行った。結晶化滴を、タンパク質溶液0.1 μlを貯留液0.1 μlと混合することにより、蒸気拡散シッティングドロップ実験において、21でセットアップした。結晶が、沈殿剤としてPEGを含有する種々の条件で現れた。H34の構造を決定するのに使用された結晶は、0.1 M HEPES pH 7.0、20% PEG4000、及び0.1 M ルコジル酸ナトリウム、15% PEG4000において、2日以内に現れた。

#### 【0601】

結晶を、抗凍結剤としての無水パラフィンオイルにより収集し、ついで、液体N<sub>2</sub>中で瞬間冷却した。回折像を、温度100 Kにおいて、Swiss Light SourceのビームラインX10SAで、Pilatus 6M検出器により収集し、XDSパッケージ(Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800)により処理した。2つの結晶からのデータをマージして、空間群P1における1.64 解像データセット及び結晶学的非対称ユニット当たりに2つのFabを生成した(以下の表を参照のこと)。

10

20

30

40

50

## 【 0 6 0 2 】

構造を、検索モデルとして、Roche-internal PDB-ID 1htfrからのF a b 5 7 7を使用する分子置換により決定した。F a bを、定常ドメインと可変ドメインとに分割し、両方を、CCP4プログラムであるPHASER CCP4 ( CCP4 ( Collaborative Computational Project , N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D, (1994) 760-763 )において、エルボ角における可能性のある変化を考慮するために、別々の検索に使用した。モデルを、COOT ( Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, WG. & Cowtan, K. Features and development of COOT. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60 ( 2010) 486-501 )において再構築し、CCP4プログラムで精密化した。

## 【 0 6 0 3 】

【表 7 3】

表 : H 3 4 F a b アボ結晶についてのデータ収集及び構造精密化統計

データ収集	
波長 (Å)	1.0
解像能 <sup>1</sup> (Å)	48.27 - 1.64 (1.699 - 1.64)
空間群	P1
単位格子 (Å、°)	50.03 69.72 80.58 93.389 95.059 110.195
総反射数	424699 (40316)
独立な反射数	123149 (12254)
多重性	3.4 (3.3)
完全性 (%)	0.99 (0.99)
平均 $I/\sigma(I)$	5.95 (0.59)
Wilson B因子	28.27
R-merge <sup>2</sup>	0.1151 (1.612)
R-meas	0.1352 (1.908)
CC1/2	0.991 (0.332)
CC*	0.998 (0.706)
精密化	
精密化に使用される反射数	123149 (12068)
R-freeに使用される反射数	6101 (592)
R-work <sup>3</sup>	0.2005 (0.3964)
R-free <sup>4</sup>	0.2350 (0.4117)
CC (work)	0.959 (0.593)
CC (free)	0.943 (0.586)
非水素原子数	7574
巨大分子	6622
タンパク質残基	859
RMS結合 (Å)	0.007
RMS角 (°)	1.09
マチャンドラン 是認値 (%)	97
ラマチャンドラン 許容値 (%)	2.7
ラマチャンドラン はずれ値 (%)	0.23
回転異性体はずれ値 (%)	1.1
クラッショスコア	1.30
平均B因子 (Å <sup>2</sup> )	32.58
巨大分子	31.78
溶媒	38.12

全てのデータを、Phenix で計算した。

<sup>1</sup>丸括弧内の値は、最高解像能ビンを意味する。

<sup>2</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$  (式中、I は強度である)

<sup>3</sup>  $R_{\text{work}} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$  (式中、F<sub>o</sub> は、観察された構造因子振幅であり、F<sub>c</sub> は、計算された構造因子振幅である)

<sup>4</sup> R<sub>free</sub> を、精密化中に省略された総データの 5 %に基づいて算出した。

### Fab フラグメント H34 とヒト IL-1 ベータとの複合体

結晶化スクリーニング前に、Fab フラグメント H34 を、IL-1 ベータ (Peprotech) と、モル比 1.2 : 1 で混合した。タンパク質混合物を、21℃ で 2 時間インキュベーションした。結晶化実験に使用されたタンパク質濃度を、32 mg/ml とした。結晶化滴を、タンパク質 0.1 μl を貯留液 0.1 μl と混合することにより、蒸気拡散シッティングドロップ実験において、21℃ でセットアップした。結晶は、0.1 M Tris pH 8.0、20% PEG 4000 において、2 日以内に現れ、4 日以内に、最終サイズ 0.15 mm × 0.06 mm × 0.01 mm に成長した。

#### 【0605】

結晶を、抗凍結剤を加えずに収集し、ついで、液体 N<sub>2</sub> 中で瞬間冷却した。回折像を、温度 100 K において、Swiss Light Source のビームライン X10SA で、Pilatus 6M 検出器により収集し、XDS パッケージ (Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800 (1993)) により処理した。データ収集及び処理は、H34 アポ結晶についてと同じルートで行った (上記を参照のこと)。統計は、上記表において収集されている。2 つの結晶からのデータをマージして、より完全なデータセットを得た。検索モデルとして、H34 Fab 構造及びインターロイキン-1 ベータ (PDB-ID 1I2h) を使用して、分子置換に成功した。モデル構築及び精密化を、上記のように行った。

#### 【0606】

【表74】

表:H34 Fab IL-1ベータ複合体結晶についてのデータ収集及び構造精密化統計

データ収集	
波長	1
解像能範囲 <sup>1</sup>	48.22 - 1.36 (1.409 - 1.36)
空間群	P 1
単位格子	41.1 48.92 70.36 96.162 101.938 96.035
総反射数	564817 (55575)
独立な反射数	113220 (11310)
多重性	5.0 (4.9)
完全性 (%)	0.99 (1.00)
平均 $I/\sigma(I)$	9.82 (0.78)
Wilson B因子	17.64
R-merge <sup>2</sup>	0.09016 (2.448)
R-meas	0.1007 (2.744)
CC1/2	0.999 (0.277)
CC*	1 (0.659)
精密化	
精密化に使用される反射数	113220 (10997)
R-freeに使用される反射数	5663 (564)
R-work	0.1559 (0.3786)
R-free	0.2063 (0.4137)
CC (work)	0.979 (0.659)
CC (free)	0.971 (0.626)
非水素原子数	5318
巨大分子	4570
タンパク質残基	576
RMS (結合)	0.005
RMS (角)	1.09
マチャンドラン 是認値 (%)	98
ラマチャンドラン 許容値 (%)	1.9
ラマチャンドラン はずれ値 (%)	0
回転異性体はずれ値 (%)	1.3
クラッシュスコア	1.86
平均B因子	28.68
巨大分子	26.52
溶媒	41.85

全てのデータを、Phenixで計算した。

<sup>1</sup>丸括弧内の値は、最高解像能ビンを意味する。

<sup>2</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$  (式中、Iは強度である)

<sup>3</sup>  $R_{\text{work}} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$  (式中、 $F_o$ は、観察された構造因子振幅であり、 $F_c$ は、計算された構造因子振幅である)

<sup>4</sup>  $R_{\text{free}}$ を、精密化中に省略された総データの5%に基づいて算出した。

### 実施例 5 4

#### 抗 I L - 1 ベータ抗体の結合動力学及び交叉反応性

ヒト、カニクイザル、ラット、及びマウス I L - 1 ベータに対する抗 I L - 1 ベータ抗体の結合動力学と、ヒト I L - 1 ベータ及びヒト I L - 1 アルファに対する交叉反応性を、BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。全ての実験を、ランニング及び希釈バッファーとして、H B S - P (10 mM H i s、140 mM N a C l、0.05% Tween 20、p H 7.4) を使用して、25<sup>10</sup> で行った。抗ヒト又は抗マウス F c 抗体を、シリーズ S C M 5 センサチップ (GE Healthcare) に、標準的なアミンカップリング化学を使用して固定した。抗 I L - 1 ベータ抗体を、捕捉応答 100 ~ 200 RU をもたらすように、表面上に捕捉させた。I L - 1 ベータ分子を、0.74 ~ 最大 60 nM (1 : 3 系列希釈) の濃度で、表面上に 90 秒間注入した (会合期)。解離期を、ランニングバッファーで洗浄することにより、600 秒間モニターした。ヒト I L - 1 ベータ及びヒト I L - 1<sup>20</sup> に対する交叉反応性を、上記された条件に従って、100 nM 抗原の 1 回の注入により決定した。表面を、3 M M g C l<sub>2</sub> (抗ヒト F c 抗体用) 又は 10 mM グリシン p H 1.5 (抗マウス F c 抗体用) を、流速 5 μl / 分で 60 秒間注入することにより再生させた。バルク屈折率差を、モック表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注入を差し引いた (二重参照)。得られた曲線を、ラグミュア 1 : 1 結合モデルに、BIAevaluation ソフトウェアを使用して当て嵌めた。

#### 【 0 6 0 8 】

### 実施例 5 5

#### 抗 I L - 1 ベータ F a b と比較した抗 I L - 1 ベータ I g G の結合動力学

ヒト I L - 1 ベータに対する抗 I L - 1 ベータ I g G 及び F a b の結合性を、BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。全ての実験を、ランニング及び希釈バッファーとして、H B S - P (10 mM H i s、140 mM N a C l、0.05% Tween 20、p H 7.4) を使用して、25<sup>30</sup> で行った。抗ヒト F c 又は抗ヒト F a b 抗体を、シリーズ S C M 5 センサチップ (GE Healthcare) に、標準的なアミンカップリング化学を使用して固定した。抗 I L - 1 ベータ I g G 及び F a b を、約 100 及び 50 RU の捕捉応答それぞれをもたらすように、表面上に捕捉させた。ヒト I L - 1 ベータを、0.74 ~ 最大 60 nM (1 : 3 系列希釈)<sup>30</sup> の濃度で、流速 30 μl / 分において表面上に 90 秒間注入した (会合期)。解離期を、ランニングバッファーで洗浄することにより、600 秒間モニターした。表面を、3 M M g C l<sub>2</sub> (抗ヒト F c 抗体用) 又は 10 mM グリシン p H 1.5 (抗マウス F c 抗体用) を、流速 5 μl / 分で 60 秒間注入することにより再生させた。バルク屈折率差を、モック表面から得られた応答を差し引くことにより補正した。ブランク注入を差し引いた (二重参照)。得られた曲線を、ラグミュア 1 : 1 結合モデルに、BIAevaluation ソフトウェアを使用して当て嵌めた。

#### 【 0 6 0 9 】

### 実施例 5 6

#### 抗 I L - 1 ベータ抗体の作用分析方式

ヒト I L - 1 R I<sup>40</sup> に対する抗体 I L - 1 ベータの結合阻害を、BIACORE T200 機器 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により調査した。全ての実験を、ランニング及び希釈バッファーとして、H B S - P (10 mM H i s、140 mM N a C l、0.05% Tween 20、p H 7.4) を使用して、25<sup>50</sup> で行った。ヒト I L - 1 R I を、シリーズ S C M 5 センサチップ (GE Healthcare) に、標準的なアミンカップリング化学を使用して固定した。10 nM ヒト I L - 1 ベータを、100 nM ~ 0.098 nM に低下させる濃度 (1 : 2 系列希釈) での、抗 I L - 1 ベータ抗体と共に予めインキュベーションした。I L - 1 ベータ / 抗 I L - 1 ベータ抗体混合物を、フローセル上に 5 μl / 分で注入した。60 秒後の結合応答 (RU) を使用して、阻害をモニターした。表面を、10 mM N a O H を流速 5 μl / 分で 60 秒間注入することにより再生させた。バルク屈折率差を、モック表

面から得られた応答を差し引くことにより補正した。

【 0 6 1 0 】

前述の発明は、理解を明確にする目的で、例示及び実施例として、一部を詳細に説明されているが、この説明及び実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用された全ての特許及び科学文献の開示は、その全体が参照により明確に組み入れられる。

【配列表】

2017537896000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2015/075879

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075879
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 ADD.
---

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
---

B. FIELDS SEARCHED
--------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K
---

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/117329 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BAEHNER MONIKA [DE]; IMHOF-JUNG SABINE [DE]; K) 29 September 2011 (2011-09-29) page 37, paragraph 1 - paragraph 2; examples 1-11 ----- W. SCHAEFER ET AL: "Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 27, 5 July 2011 (2011-07-05), pages 11187-11192, XP055003817, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1019002108 abstract; table 1 ----- -/--	1-14
Y		6,8

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--	--

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

21 December 2015	14/01/2016
------------------	------------

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer
--	--------------------

Domingues, Helena
-------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075879
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Y. KIENAST ET AL: "Ang-2-VEGF-A CrossMab, a Novel Bispecific Human IgG1 Antibody Blocking VEGF-A and Ang-2 Functions Simultaneously, Mediates Potent Antitumor, Antiangiogenic, and Antimetastatic Efficacy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 24, 4 October 2013 (2013-10-04), pages 6730-6740, XP055106066, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0081 abstract page 6731, right-hand column</p> <p>-----</p> <p>WO 2014/177460 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 6 November 2014 (2014-11-06) page 9, line 10 - line 27 page 43, line 3 - line 7 page 61, line 11 - line 29 page 1; examples 1-8</p> <p>-----</p> <p>ROLAND KONTERMANN: "Dual targeting strategies with bispecific antibodies", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 4, no. 2, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 182-197, XP009160769, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/MABS.4.2.19000 the whole document</p> <p>-----</p> <p>WU CHENGBIN ET AL: "Molecular construction and optimization of anti-human IL-1 alpha/beta dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig (TM)) molecules", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 1, no. 4, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 339-347, XP002657321, ISSN: 1942-0862 abstract, table 3, pg. 346, lhc, 1</p> <p>-----</p> <p>WO 2008/024188 A2 (ABBOTT LAB [US]; WU CHENGBIN [US]; GHAYUR TARIQ [US]; DIXON RICHARD W) 28 February 2008 (2008-02-28) examples 1.3-1.8</p> <p>-----</p>	6,8
Y		1-14
A		1-14
Y		1-14
Y		1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075879
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QINGCUI LI ET AL: "Therapeutic efficacy of three bispecific antibodies on collagen-induced arthritis mouse model", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 21, no. 1, 1 July 2014 (2014-07-01), pages 119-127, XP055195879, ISSN: 1567-5769, DOI: 10.1016/j.intimp.2014.04.018 abstract and pgs. 122-123 -----	1-14
Y	WO 2014/072876 A1 (PFIZER [US]) 15 May 2014 (2014-05-15) page 1 page 82, line 26 - page 85 -----	1-14
Y	MABRY ROBERT ET AL: "A dual-targeting PDGFRbeta/VEGF-A molecule assembled from stable antibody fragments demonstrates anti-angiogenic activity in vitro and in vivo.", MABS 2010 JAN-FEB, vol. 2, no. 1, January 2010 (2010-01), pages 20-34, XP055196572, ISSN: 1942-0870 page 26, paragraph bridging - page 27; table 1 examples 1-12 page 20, left-hand column, paragraph final -----	1-14
Y	JO NOBUO ET AL: "Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY; [10640], ELSEVIER INC, US, vol. 168, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 2036-2053, XP002500820, ISSN: 0002-9440, DOI: 10.2353/AJPATH.2006.050588 abstract -----	1-14
Y	WO 2005/087812 A1 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; LICENTIA LTD [FI]; ERIKSSON ULF [SE]; ALI) 22 September 2005 (2005-09-22) pg. 46, line 28 to pg. 48, line 1; claim 1 -----	1-14
Y	WO 2014/001442 A1 (MOLECULAR PARTNERS AG [CH]) 3 January 2014 (2014-01-03) page 27, paragraph final; claim 26 -----	1-14
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075879
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LEONARDZEHRS: "Molecular Partners Continues to validate DARPin platform", INTERNET CITATION, 11 September 2012 (2012-09-11), pages 1-8, XP002711999,            Retrieved from the Internet:            URL:<a href="http://biotuesdays.com/2012/09/11/molecular-partners-continues-to-validate-darpin-platform/">http://biotuesdays.com/2012/09/11/molecular-partners-continues-to-validate-darpin-platform/</a>            [retrieved on 2013-08-29]            the whole document            -----</p>	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/075879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011117329 A1 29-09-2011		AR 080794 A1		09-05-2012
		AU 2011231580 A1		27-09-2012
		CA 2793402 A1		29-09-2011
		CL 2012002662 A1		25-01-2013
		CN 102906114 A		30-01-2013
		CO 6630087 A2		01-03-2013
		CR 20120464 A		05-10-2012
		EC SP12012177 A		30-10-2012
		EP 2552960 A1		06-02-2013
		JP 5707482 B2		30-04-2015
		JP 2013526848 A		27-06-2013
		KR 20130001291 A		03-01-2013
		MA 34172 B1		03-04-2013
		NZ 602320 A		28-06-2013
		PE 05602013 A1		05-05-2013
		RU 2012143793 A		10-05-2014
		SG 184295 A1		29-11-2012
		TW 201138820 A		16-11-2011
		US 2011236388 A1		29-09-2011
		US 2015191535 A1		09-07-2015
		WO 2011117329 A1		29-09-2011
<hr/>				
WO 2014177460 A1 06-11-2014		AU 2014261630 A1		17-09-2015
		CA 2904806 A1		06-11-2014
		CN 105143262 A		09-12-2015
		TW 201446799 A		16-12-2014
		WO 2014177460 A1		06-11-2014
<hr/>				
WO 2008024188 A2 28-02-2008		EP 2056869 A2		13-05-2009
		US 2007071675 A1		29-03-2007
		US 2010047239 A1		25-02-2010
		US 2013004416 A1		03-01-2013
		US 2014100359 A1		10-04-2014
		US 2014154256 A1		05-06-2014
		US 2014213768 A1		31-07-2014
		US 2014377805 A1		25-12-2014
		US 2014377858 A1		25-12-2014
		US 2015004167 A1		01-01-2015
		US 2015056202 A1		26-02-2015
		US 2015086554 A1		26-03-2015
		US 2015147327 A1		28-05-2015
		WO 2008024188 A2		28-02-2008
<hr/>				
WO 2014072876 A1 15-05-2014		AU 2013343099 A1		14-05-2015
		CA 2890483 A1		15-05-2014
		CN 105026426 A		04-11-2015
		EP 2917237 A1		16-09-2015
		IL 238568 A		30-06-2015
		KR 20150082503 A		15-07-2015
		TW 201431878 A		16-08-2014
		WO 2014072876 A1		15-05-2014
<hr/>				
WO 2005087812 A1 22-09-2005		US 2005282233 A1		22-12-2005
		WO 2005087812 A1		22-09-2005
<hr/>				
WO 2014001442 A1 03-01-2014		AU 2013283296 A1		05-02-2015
		CA 2877584 A1		03-01-2014
		CN 104508129 A		08-04-2015

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2015/075879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2867360 A1	06-05-2015
		IL 236428 A	26-02-2015
		JP 2015522576 A	06-08-2015
		KR 20150023957 A	05-03-2015
		US 2014005125 A1	02-01-2014
		WO 2014001442 A1	03-01-2014

International Application No. PCT/ EP2015/ 075879

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

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

1. claims: 1-14

Concerns aspects related to a bispecific antibody that specifically binds to hIL-1 beta and to a second antigen selected from hANG2, hVEGF and hPDGF-B.

1.1. claims: 1, 3-14

Concerns aspects related to a bispecific antibody that specifically binds to hIL-1 beta and to a second antigen selected from hANG2, hVEGF and hPDGF-B.

1.2. claims: 2-4, 6-14

Concerns aspects related to a bispecific antibody that specifically binds to hPDGF-B and to hANG2.

1.3. claims: 2-4, 6-14

Concerns aspects related to a bispecific antibody that specifically binds to hPDGF-B and to hVEGF.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

- (72) 発明者 デングル, シュテファン  
ドイツ国、8 0 3 3 3 ミュンヘン、シュライスハイマー・シュトラーセ 4 4 アー
- (72) 発明者 ガスナー, クリストイアン  
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ハビヒトヴェーク 4
- (72) 発明者 ジョルジュ, ギー  
ドイツ国、8 2 3 9 2 ハーバッハ、アム・ベルクグラーベン 1 1
- (72) 発明者 グリューナー, ザビーネ  
ドイツ国、7 9 6 3 9 グレンツァッハ - ヴィレン、ソルヴァイシュトラーセ 1 0
- (72) 発明者 ハルトマン, グイド  
ドイツ国、7 9 5 3 9 レラハ、ハングシュトラーセ 3 4
- (72) 発明者 ヒュールスマン, ペーター・ミヒヤエル  
ドイツ国、8 2 3 9 2 ハーバッハ、イム・ゾンネンタール 2 0
- (72) 発明者 ケッテンベルガー, フーベルト  
ドイツ国、8 1 3 6 9 ミュンヘン、パッサウアー・シュトラーセ 3 0
- (72) 発明者 モルケン, イエルク  
ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、オシエツキーシュトラーセ 2
- (72) 発明者 モルホイ, ミヒヤエル  
ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、ファヒナーシュトラーセ 7 アー
- (72) 発明者 ムンディグル, オラフ  
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、タッシーロリング 1 6
- (72) 発明者 レグラ, イエルク・トーマス  
ドイツ国、8 1 3 7 7 ミュンヘン、インナーコフラーシュトラーセ 1 7 ・ベー
- (72) 発明者 シューマッハー, ラルフ  
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ホーホフェルトシュトラーセ 3 7
- (72) 発明者 ヴァイザー, パルバラ  
ドイツ国、8 2 4 0 4 ジンデルスドルフ、ケニヒベルクシュトラーセ 5 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01  
4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA72