

(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 I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/24 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/24 Z N A	4 B O 6 4
<b>C 0 7 K 16/22 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/22	4 C O 8 5
<b>C 0 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
<b>C 0 7 K 16/40 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/40	
<b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 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
(86) (22) 出願日	平成27年11月6日 (2015.11.6)		エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月7日 (2017.7.7)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/075879		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02016/075037		T
(87) 国際公開日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	14192517.2		グレンツアーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成26年11月10日 (2014.11.10)	(74) 代理人	110001508
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		特許業務法人 津国
		(72) 発明者	ベドゥーシャ, マルク
			フランス国、エフー68220 ランシュ
			パッハーラーオー、リュ・デ・スルス 7
		(72) 発明者	ブロイアー, 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
			最終頁に続く

(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 I L - 1 ベータと、ヒト A N G 2、ヒト V E G F、及びヒト P D G F - 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 : 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 0 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 5 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 : 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 9 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、

あるいは、

a ) 配列番号 : 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 4 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 : 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 8 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、

二重特異性抗体。

## 【請求項 2】

ヒト P D G F - B と、ヒト A N G 2、ヒト V E G F、及びヒト I L - 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 : 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 3 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 : 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 7 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 : 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 2 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 : 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 4 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 6 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 : 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 を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号 : 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 5 5 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、

二重特異性抗体。

## 【請求項 3】

ヒト A N G - 2 に更に特異的に結合し、更に、

a ) ( a ) 配列番号 : 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 6 0 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 : 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 :

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。

#### 【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。

#### 【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

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、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する第2の結合部位とを含む、

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。

#### 【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 EUI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

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 EUI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。

#### 【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、

10

20

30

40

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

10

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、

20

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。

30

#### 【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

40

i i i) L251D、L314D、及びL432D、又は

i v) i)～i i i)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。

50

## 【請求項 14】

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】

## 【0001】

## [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。

## 【0002】

## [背景]

10

眼血管疾患、例えば、加齢黄斑変性 (AMD) 及び糖尿病性網膜症 (DR) 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を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 (RP) 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。

## 【0003】

うっ血性網膜症は、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をもたらす。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。うっ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っ血を解決していない。さらに、多数が発症するうっ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 (VEGF) の機能を妨害する戦略が利用されている。短期間では、抗 VEGF 治療により、視野が改善されるが、基礎となるうっ血を解決されず、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、うっ血性の脳、心臓、又は手足に必要となる場合がある。

20

30

## 【0004】

典型的には、眼疾患について、Fab 又は Fab<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、これらのより小型のフラグメントは、典型的には、(例えば、血清内での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

## 【0005】

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 (Cross Mab VH-VL) 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、Bence-Jones 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。

#### 【 0 0 0 6 】

国際公開公報第 2 0 1 1 / 1 1 7 3 2 9 号には、二重特異性で二価の抗 V E G F / 抗 A N G 2 抗体が報告されている。ヒト F c R n 結合改変抗体及び使用方法が、国際公開公報第 2 0 1 4 / 1 7 7 4 6 0 号に報告されている。Kienast, Y., et al. (Clin. Canc. Res. 19 (2013) 6730-6740) には、A n g - 2 - V E G F - A C r o s s M a b が、V E G F - A 及び A n g - 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 I g G 1 抗体として報告されている。

#### 【 発明の概要 】

10

#### 【 0 0 0 7 】

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。

#### 【 0 0 0 8 】

本明細書において、ヒト A N G 2、ヒト V E G F、ヒト I L - 1 ベータ、及び P D G F - 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。

#### 【 0 0 0 9 】

一実施態様において、抗体は、抗 A N G 2 / V E G F 抗体ではない。

#### 【 0 0 1 0 】

一実施態様において、抗体は、ヒト I L - 1 ベータに特異的に結合し、

20

a )

( a ) 配列番号 : 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 0 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3

30

を含む重鎖可変ドメインと、

( a ) 配列番号 : 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 9 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、

あるいは、

a ) 配列番号 : 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 4 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 : 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 8 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。

40

#### 【 0 0 1 1 】

一実施態様において、抗体は、ヒト P D G F - B に特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号 : 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 3 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 : 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 7 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 : 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 2 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 : 4 4 のアミノ酸配列を含む H V

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ANG 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】

好ま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、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、a ) の第 1 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。

#### 【 0 0 1 6 】

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。

#### 【 0 0 1 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

10

20

30

40

50

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り、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。

#### 【0018】

一実施態様において、抗体は、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。

#### 【0019】

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。

#### 【0020】

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。

#### 【0021】

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。

#### 【0022】

一実施態様において、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。

#### 【0023】

[ 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。

#### 【0024】

「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、1  $\mu$ M以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、又は0.1 nM以下（例えば、 $10^{-8}$  M以下、例えば、 $10^{-8}$  M ~  $10^{-10}$  M、例えば、 $10^{-9}$  M ~  $10^{-10}$  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於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、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 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れない妨害し、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、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 、及び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、アドリマイシン、ビンカルカロイド、（ビンクリスチン、ビンブラスチン、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、クロラムブシル、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）のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化を含む。

#### 【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。

20

#### 【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】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」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。宿主細胞は、「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てもよく、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I I Iである。

10

【0042】

「ヒト化」抗体は、非ヒトH V R由来のアミノ酸残基と、ヒトF R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、H V R (例えば、C D R)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、F R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「H V R」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「C D R」)、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H V R; V Hに3つ(H 1、H 2、H 3)及びV Lに3つ(L 1、L 2、L 3)を含む。

30

【0044】

本明細書において、H V Rは、

(a) アミノ酸残基26~32(L 1)、50~52(L 2)、91~96(L 3)、26~32(H 1)、53~55(H 2)、及び96~101(H 3)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(L 1)、50~56(L 2)、89~97(L 3)、31~35b(H 1)、50~65(H 2)、及び95~102(H 3)において生じるC D R(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(L 1)、46~55(L 2)、89~96(L 3)、30~35b(H 1)、47~58(H 2)、及び93~101(H 3)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) H V Rアミノ酸残基46~56(L 2)、47~56(L 2)、48~56(L 2)、49~56(L 2)、26~35(H 1)、26~35b(H 1)、49~65(H 2)、93~102(H 3)、及び94~102(H 3)を含む、(a)、(b)、及び/又は(c)の組み合わせを含む。

【0045】

特に断りない限り、可変ドメイン中のH V R残基及び他の残基(例えば、F R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）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、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。

【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宿主細胞中の1つ以上の位置に存在するこ  
のような核酸分子を含む。

20

【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産生中に生じる可  
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産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  
イン（VL）と3つの定常ドメイン（CL1、CL2、及びCL3）を有する。

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。

【 0 0 5 4 】

「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。

【 0 0 5 5 】

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Megalign（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。

【 0 0 5 6 】

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。

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

【 0 0 5 7 】

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の長さとは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。

【 0 0 5 8 】

「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。

【 0 0 5 9 】

「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。

## 【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ベータ及び細胞中で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入を意味し、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、疾患の進展を遅ら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、それが導入される宿主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】

## II. 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、ウサビ、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。

【 0 0 6 7 】

この抗体は、下記特性を有する。

【 0 0 6 8 】

【表 1】

ヒト I L - 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]
I L - 1 ベータ - m u m A b	1.12	0.75	0.07

【 0 0 6 9 】

10

【表 2】

カニクイザル I L - 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]
I L - 1 ベータ - m u m A b	1.15	0.95	0.08

【 0 0 7 0 】

【表 3】

マウス I L - 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]
I L - 1 ベータ - m u m A b	2.47	12.2	0.49
ゲボキズマブ	2.48	5.35	0.22

20

【 0 0 7 1 】

【表 4】

ラット I L - 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]
I L - 1 ベータ - m u m A b	2.04	6.36	0.31
ゲボキズマブ	2.79	0.20	0.007

30

【 0 0 7 2 】

【表 5】

ウサギ I L - 1 ベータに対する結合性	KD [nM]
m u m A b (配列番号 : 9 及び 1 0)	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

【 0 0 7 3 】

【表 6】

IL-1β の起源	EC <sub>50</sub> [ng/mL]	EC <sub>50</sub> (MWC 150 kDa 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-1β の結合阻害：

	IC <sub>50</sub> [ng/mL]	IC <sub>50</sub> (MWC 150 kDa に基 づく) [10 <sup>-9</sup> M]	実施例
IL-1β レセプター I	230.9	1.54	7
IL-1β 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-1β-μmAb	0.7

【0077】

40

下記表に、HUVEC細胞のIL-1β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-1β-μmAb	16.50

【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-1β

50

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）。

【 0 0 8 0 】

【表 1 0】

抗体	EC <sub>50</sub> [nM]
I L - 1 ベータ - m u m A b	1.09

【 0 0 8 1 】

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）。

【 0 0 8 2 】

【表 1 1】

抗体	相対結合活性	
	3 7 °C、p H 7 . 5 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
I L - 1 ベータ - m u m A b	103 %	102 %

1 0 0 % = - 8 0 °C で保存されたサンプル

【 0 0 8 3 】

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）。

【 0 0 8 4 】

【表 1 2】

抗体	高分子量の割合		
	開始	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
I L - 1 ベータ - m u m A b	0.97 %	1.24 %	1.00 %

【 0 0 8 5 】

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

【 0 0 8 6 】

【表 1 3】

抗体	相対面積%		
	開始	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
I L - 1 ベータ - m u m A b	91.9 %	86.5 %	90.0 %

【 0 0 8 7 】

マウス抗体の熱安定性は、凝集開始温度（T a g g）及び融解温度（T m）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 0 8 8 】

10

20

30

40

【表 1 4】

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

## 【 0 0 8 9 】

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。

## 【 0 0 9 0 】

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。

## 【 0 0 9 1 】

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LEMENT（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LEMENT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。

## 【 0 0 9 2 】

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 ナンバリング）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）。

## 【 0 0 9 3 】

【表 1 5】

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。

## 【 0 0 9 4 】

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。

## 【 0 0 9 5 】

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、VH (IGHJ4 - 01 - 3) 及びVL (IMGT\_hVK\_3\_11) 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。huH34 - 2について記載された逆突然変異は、VH及びVL配列 (配列番号：7及び8) から省略された。

【0096】

【表16】

ヒトIL-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]
H34	1.85	1.27	0.07
H34 + C52aS変異	1.60	6.45	0.40
huH34-1	1.49	15.1	1.02
huH34-2	1.93	1.10	0.06
huH34-2 FAB	1.81	1.11	0.06
huH34-3	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IL-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]
H34	1.99	0.98	0.05
H34 + C52aS変異	1.43	7.28	0.51
huH34-1	1.61	21.2	1.31
huH34-2	2.20	1.18	0.05
huH34-3	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】

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

【0098】

ヒトIL-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IL-1bは、IL-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、IL-1RAc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、IL-1レセプターIに対するH34及びmumAbのIL-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、H34、及びmumAb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	@10nM IL-1ベータの存在下におけるIC <sub>50</sub> [nM]
カナキヌマブ	1.6
mumAb	2.5
H34	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、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、種々の抗体について示される。

【 0 1 0 2 】

【表 1 8】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H 3 4	0.18
h u H 3 4 - 1	> 7
h u H 3 4 - 2	0.23
h u H 3 4 - 3	2.23
ゲボキズマブ	0.94
カナキヌマブ	0.31

10

【 0 1 0 3 】

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> が示される。

【表 1 9】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H 3 4	0.24
h u H 3 4 - 2	0.30
カナキヌマブ	9.02

20

【 0 1 0 4 】

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）。

【 0 1 0 5 】

【表 2 0】

抗体	EC <sub>50</sub> [nM]
h u H 3 4 - 1	5.52
h u H 3 4 - 2	0.11
h u H 3 4 - 3	1.09
ゲボキズマブ	0.11
カナキヌマブ	0.12

30

【 0 1 0 6 】

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、D 1 0 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）。

【 0 1 0 7 】

【表 2 1】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
h u H 3 4 - 2	0.83
ゲボキズマブ	3.36
カナキヌマブ	1.99

40

50

## 【 0 1 0 8 】

下記表に、T H P 1 細胞のM S U 刺激に基づくT N F アルファ発現阻害についてのI C<sub>50</sub> 値が、種々の抗体について示される。

## 【 0 1 0 9 】

## 【表 2 2】

抗体	IC <sub>50</sub> [nM]
H 3 4	0.43
h u H 3 4 - 2	2.38
カナキヌマブ	0.41

10

## 【 0 1 1 0 】

加えて、ヒト化抗体は、マウスH 3 4 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）。

## 【 0 1 1 1 】

## 【表 2 3】

抗体	相対結合活性	
	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
H 3 4	70 %	101 %
h u H 3 4 - 1	96 %	99 %
h u H 3 4 - 2	94 %	99 %
h u H 3 4 - 3	96 %	100 %

20

1 0 0 % = - 8 0 °C で保存されたサンプル

## 【 0 1 1 2 】

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

## 【 0 1 1 3 】

## 【表 2 4】

抗体	高分子量の割合		
	開始	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
h u H 3 4 - 1	4.57 %	4.13 %	4.39 %
h u H 3 4 - 2	0.21 %	0.15 %	0.13 %
h u H 3 4 - 3	0.19 %	0.17 %	0.13 %

40

## 【 0 1 1 4 】

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

## 【 0 1 1 5 】

【表 25】

抗体	相対面積%		
	開始	37℃、pH7.4で 2週間	40℃、pH6.0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-R1、及びIL-1アクセサリタンパク質である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-R1及びIL-RACP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-R1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】

IL-1β	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD* [nM]	t1/2 [秒]
huH34-2	2.43E+06	1.15E-04	0.05	101
抗体0031	2.56E+06	3.02E-04	0.12	38
抗体0032	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、SPR分析により示されている。 10

## 【0126】

ANG2特異性pTie2-ELISAにおいて、抗体0031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。

## 【0127】

一実施態様において、ヒト化抗IL-1β抗体は、ヒト及びカニクイザルIL-1βに結合する。

## 【0128】

下記表に、A549細胞のIL-1β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。 20

## 【0129】

【表30】

抗体	IC <sub>50</sub> [ng/mL]
抗体0031	103.9
ゲボキズマブ	204.4

## 【0130】

下記表に、HUVEC細胞のIL-1β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。 30

## 【0131】

【表31】

抗体	IC <sub>50</sub> [ng/mL]
huH34-2	1.2-0.9
huH34-2 Fab	1.1-2.5
抗体0031	2.0-5.5
抗体0032	3.5-6.3

40

## 【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、A549細胞のIL-1β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）。

## 【0133】

【表 3 2】

抗体	EC <sub>50</sub> [ng/mL]
抗体 0 0 3 1	17.0
抗体 0 0 3 2	38.7
ゲボキズマブ	62.0
カナキヌマブ	86.4

## 【 0 1 3 4 】

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）。

## 【 0 1 3 5 】

【表 3 3】

抗体	Tagg [°C]	Tm [°C]
0 0 3 1	61	67.5
0 0 3 2	55	62.5

## 【 0 1 3 6 】

20

配列番号：0 6 ~ 1 0 及び 1 6（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：1 0 2 ~ 1 0 3 及び 1 8 2 ~ 1 8 9 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。

## 【 0 1 3 7 】

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：0 7 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、（b）配列番号：0 8 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び（c）配列番号：1 0 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：1 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、（e）配列番号：1 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（f）配列番号：1 9 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を更に含む。

30

## 【 0 1 3 8 】

好ましい一実施態様では、抗体は、配列番号：0 6 及び配列番号：1 6 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。

## 【 0 1 3 9 】

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：0 7 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、（b）配列番号：0 8 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、（c）配列番号：1 0 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、（d）配列番号：1 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、（e）配列番号：1 8 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（f）配列番号：1 9 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：0 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：1 6 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

## 【 0 1 4 0 】

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。

## 【 0 1 4 1 】

第 1 の抗ヒト PDGF-B 抗体は、配列番号：2 9 の VH と配列番号：3 4 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。

【 0 1 4 2 】

この抗体は、以下の表に列記された下記特性を有する。

【 0 1 4 3 】

【表 3 4 】

	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

【 0 1 4 4 】

【表 3 5 】

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

20

【 0 1 4 5 】

【表 3 6 】

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

30

【 0 1 4 6 】

【表 3 7 】

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

40

【 0 1 4 7 】

【表 3 8】

	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PDGF-β	0.02/0.03/0.03		0.03/0.02/0.019		0.028/0.026/0.031	
	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		0.079/0.69/0.65 100	
PDGF-B-mumAb	0.08	100	0.21	100	0.179	100

10

【0148】

【表 3 9】

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

20

【0149】

【表 4 0】

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

30

【0150】

【表 4 1】

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 4 2】

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

40

【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】

【表 4 3】

	参照と共に、2 w / 4 0℃ pH 6. 0 [%]	参照と共に、2 w / 3 7℃ pH 7. 4 [%]
PDGF-B-mumAb	103	103

【0 1 5 4】

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 5 5】

【表 4 4】

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

【0 1 5 6】

他の抗体は、ヒト Ig ローストランス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。

【0 1 5 7】

抗体 0 0 8 5 は、配列番号：3 8 の V H 及び配列番号：4 3 の V L を含む抗 P D G F - B 抗体である。抗体 0 0 8 6 は、配列番号：4 7 の V H 及び配列番号：5 2 の V L を含む抗 P D G F - B 抗体である。

【0 1 5 8】

【表 4 5】

	ヒト PDGF -BB [EC 5 0] [ng/mL]	マウス PDGF F-BB [EC 5 0] [ng/mL]	ラット PDGF F-BB [EC 5 0] [ng/mL]	カニクイザル PDGF-B [EC 5 0] [ng/mL]	ヒト PDGF -AA [EC 5 0] [ng/mL]	ヒト PDGF -CC [EC 5 0] [ng/mL]
抗体 0 0 8 5	7.55	24.96	15.96	15.33	n.d.	n.d.
抗体 0 0 8 6	12.04	14.08	10.57	16.19	n.d.	n.d.

【0 1 5 9】

【表 4 6】

	SPRに よるヒト PDGF -BB- 結合活性 [M]	SPRに よるヒト PD GF-BB -k o n [M-1s-1]	SPRに よるヒト PD GF-BB -k o f f [s-1]	SPRに よるカニ クイザル PDGF -BB- 結合活性 [M]	SPRに よるカニクイ ザル PDG F-BB- k o n [M-1s-1]	SPRに よるカニクイ ザル PDG F-BB- k o f f [s-1]
抗体 0 0 8 5	4.76E-11	0.93E6	0.44E-4	4.78E-11	0.94E6	4.52E-5
抗体 0 0 8 6	2.18E-11	1.04E6	0.23E-4	1.78E-11	1.04E6	1.84E-5

【0 1 6 0】

【表 4 7】

	P P I I ヒト PDGF - B B : : ヒト PDGF - R β I C 5 0 [ng/ml]
抗体 0 0 8 5	17.76
抗体 0 0 8 6	11.73

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 1 】

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

## 【 0 1 6 2 】

## 【表 4 8】

	収量	スケール	収量	モノマー (分析的 S E C)	主なピーク (C E - S D S / S D S P A G E)
	[m g]	[ l]	[m g / L 上清]	[%]	[%]
抗体 0 0 8 5	22.5	0.25	90	99	96
抗体 0 0 8 6	20.8	0.25	83	99	96
抗体 0 1 0 6	12.0	0.3	40	98	99
抗体 0 1 0 7	10.5	0.3	35	98	99
抗体 0 1 4 4	37.7	1.5	25.1	>98	>95
抗体 0 1 1 7	46.3	1	46.3	>98	>95
抗体 0 1 4 5	21.5	1	21.5	>98	>95
抗体 0 1 4 6	14.6	0.5	29.2	>98	>95

## 【 0 1 6 3 】

## 【表 4 9】

	I C <sub>50</sub> ホスホ阻害		I C <sub>50</sub> 増殖 3 T 3	
抗体 0 0 8 5	n.d.	n.d.	31.8	ng/ml
抗体 0 0 8 6	n.d.	n.d.	56.0	ng/ml

## 【 0 1 6 4 】

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。

## 【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

【表 5 0】

	周皮細胞		Balb-C3T3
	遊走	増殖	増殖
	EC50[nM]	EC50[nM]	EC50[nM]
ヒトPD GF-B B	0.03/0.04	0.02/0.03	0.025/0.023
	IC50(nM) % 中和	IC50(nM) % 中和	IC50(nM) % 中和
R&D ポ 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 0085	0.15 90	0.11 100	0.06 100
抗体 0086	0.09 100	0.09 100	0.11 100

10

20

【0166】

【表 5 1】

	F a b 遊走 阻害 [nM]	F a b 増殖 阻害 [nM]	F a b 増殖 阻害 [nM]
抗体0085	0.41	1.02	1.36
抗体0086	0.14	0.62	1.18

30

【0167】

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）。

【0168】

【表 5 2】

	kd (1/s)	t1/2 [分]
抗体0085	1.02E-04	114
抗体0086	7.93E-05	146

40

【0169】

【表 5 3】

Fab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD* (nM)	t1/2 (秒)
抗体0106	2.02E+05	3.74E-04	2	1853
抗体0107	1.95E+05	3.62E-04	2	1915

【0170】

【表 5 4】

Fab	見掛けの KD* (nM)	T1/2 (秒)	IgG	見掛けのK D** (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】

【表 5 5】

	参照と共に、2 w / 4 0 °C p H 6 . 0 ( % )	参照と共に、2 w / 3 7 °C p H 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】

【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。

【 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	-

【 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

10

20

30

40

50



## 【 0 1 8 1 】

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。

## 【 0 1 8 2 】

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。

## 【 0 1 8 3 】

## 【表 6 0】

	I C <sub>50</sub> 増殖 ヒト周皮細胞	I C <sub>50</sub> 増殖 3 T 3
抗体 0 1 1 7	0.016	nM
抗体 0 1 4 4	0.030	nM
抗体 0 0 8 5 F A B	0.012	nM

10

## 【 0 1 8 4 】

## 【表 6 1】

	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 0 1 1 7	0.055	nM
抗体 0 1 4 4	0.055	nM
抗体 0 0 8 5 F A B	未測定	0.27 nM

20

## 【 0 1 8 5 】

A N G 2 特異性 p T i e 2 - E L I S A において、抗体 0 1 4 4 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 A N G 2 / V E G F 抗体より、6 倍活性である。

## 【 0 1 8 6 】

V E G F 特異性レポーターアッセイ法において、抗体 0 1 1 7 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 A N G 2 / V E G F 抗体と同様の活性を有する。

## 【 0 1 8 7 】

配列番号：3 8 ~ 4 6 ( 結合部位、H V R、V H、V L ) の配列を有する抗体 0 0 8 5 が記載されている。二重特異性フォーマットの抗体 0 0 8 5 が、配列番号：1 2 9 ~ 1 3 0、1 5 0 ~ 1 5 3、1 6 2 ~ 1 6 5、及び 1 7 4 ~ 1 7 7 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。

30

## 【 0 1 8 8 】

配列番号：4 7 ~ 5 5 ( 結合部位、H V R、V H、V L ) の配列を有する抗体 0 0 8 6 が記載されている。二重特異性フォーマットの抗体 0 0 8 6 が、配列番号：1 3 1、1 5 4 ~ 1 5 7、1 6 6 ~ 1 6 9、及び 1 7 8 ~ 1 8 1 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。

## 【 0 1 8 9 】

配列番号：1 6 2 ~ 1 6 5 ( C r o s s M a b 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 0 1 4 4 が記載されている。

40

## 【 0 1 9 0 】

抗体 0 1 4 4 及び 0 1 4 5 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、P D G F - B B 及び A N G 2 それぞれに対するそれらの結合性が決定されている。

## 【 0 1 9 1 】

【表 6 2】

抗体 0 1 4 4	結合性	相対結合性 [%]	SD
開始時の参照値	PDGF-BB	100	
p H 6 でのインキュベーション		101	4
p H 7. 4 でのインキュベーション		94	6
開始時の参照値	ANG2	100	
p H 6 でのインキュベーション		100	1
p H 7. 4 でのインキュベーション		91	4

10

【 0 1 9 2 】

【表 6 3】

抗体 0 1 4 5	結合性	相対結合性 [%]	SD
開始時の参照値	PDGF-BB	100	
p H 6 でのインキュベーション		99	1
p H 7. 4 でのインキュベーション		95	2
開始時の参照値	ANG2	100	
p H 6 でのインキュベーション		99	2
p H 7. 4 でのインキュベーション		94	0

20

【 0 1 9 3 】

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 : 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 3 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 : 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( e ) 配列番号 : 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( f ) 配列番号 : 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を更に含む。

【 0 1 9 4 】

一実施態様において、抗体は、配列番号 : 2 9 及び配列番号 : 3 4 それぞれにおける V H 及び V L 配列のヒト化変異体を含み、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。

30

【 0 1 9 5 】

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 : 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 2 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 : 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( e ) 配列番号 : 4 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( f ) 配列番号 : 4 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を更に含む。

40

【 0 1 9 6 】

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、( a ) 配列番号 : 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、( c ) 配列番号 : 4 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、( d ) 配列番号 : 4 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( e ) 配列番号 : 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( f ) 配列番号 : 4 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 : 3 8 のアミノ酸配列を有する V H と、配列番号 : 4 3 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。

【 0 1 9 7 】

50

一実施態様において、抗体は、配列番号：38及び配列番号：43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。

【0198】

好ましい一実施態様では、抗PDGF-B抗体は、(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。一実施態様において、この抗体は、(d)配列番号：53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む。

【0199】

好ましい一実施態様では、抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号：48のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：50のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号：51のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号：53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号：54のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号：55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：47のアミノ酸配列を有するVHと、配列番号：52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。

【0200】

一実施態様において、抗体は、配列番号：47及び配列番号：52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。

【0201】

A.3 本明細書で報告された二重特異性抗体の抗ANG2結合部位を得ることができる抗ANG2抗体

【表64】

ヒトANG2結合動力学：

分子	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)*	$t_{1/2}$ (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ANG2結合動力学：

分子	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)*	$t_{1/2}$ (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】

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。

【 0 2 0 4 】

【表 6 6 】

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

10

【 0 2 0 5 】

種々の抗体の熱安定性は、凝集開始温度 ( T a g g ) 及び融解温度 ( T m ) 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 2 0 6 】

【表 6 7 】

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

【 0 2 0 7 】

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 ) 。

【 0 2 0 8 】

【表 6 8 】

分子	相対結合活性	
	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 6 . 0 で 2 週間
0009	99 %	91 %
0041	100 %	101 %
0075	101 %	105 %
0090	112 %	100 %

30

1 0 0 % = - 8 0 °C で保存されたサンプル

【 0 2 0 9 】

同じ安定性は、C E - S D S 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

【 0 2 1 0 】

【表 6 9 】

分子	相対面積%		
	開始	3 7 °C、p H 7 . 4 で 2 週間	4 0 °C、p H 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

【 0 2 1 1 】

50

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、Kabatt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、Kabatt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、Kabatt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、Kabatt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】

A5. 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(Kabatt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 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、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 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、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 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、負に荷電したアミノ酸により置換されている。

#### 【 0 2 2 1 】

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 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、a ) の第 1 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。

#### 【 0 2 2 2 】

一実施態様では、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は、K 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 ) 。

#### 【 0 2 2 3 】

一実施態様では、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は、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 ) 。

#### 【 0 2 2 4 】

好ましい一実施態様では、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 C H 1 において、1 4 7 及び 2 1 3 位におけるアミノ酸は、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 ) 。

#### 【 0 2 2 5 】

一実施態様では、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は、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は、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は、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は、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は、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は、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 ) 。

#### 【 0 2 2 6 】

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<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>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<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>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)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。

【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<sub>L</sub>は、前記抗体の可変重鎖ドメインV<sub>H</sub>により置き換えられており、定常軽鎖ドメインC<sub>L</sub>は、前記抗体の定常重鎖ドメインC<sub>H</sub>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<sub>H</sub>は、前記抗体の可変軽鎖ドメインV<sub>L</sub>により置き換えられており、定常重鎖ドメインC<sub>H</sub>1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインC<sub>L</sub>により置き換えられている。

【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<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>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)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。

【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<sub>L</sub>は、前記抗体の定常重鎖ドメインC<sub>H</sub>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<sub>H</sub>1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインC<sub>L</sub>により置き換えられている。

【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inker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、

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、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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinker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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinkerを介して、前記全長抗体の重鎖のC末端に

10

20

30

40

50

に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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinker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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinker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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinker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Fabフラグメントは、前記全長抗体に、ペプチドリinker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)

ba) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)、又は

bb) 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inkerを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の一方のC末端に融合している第1のポリペプチドと、

c)

ca) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、又は

cb) 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inkerを介して、前記全長抗体の2つの重鎖の内の他方の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

ii) 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

iii) 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、Kabatt EUI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、K a b a t の E U 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 F a b フラグメントの可変ドメイン V H と V L 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 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、ペプチドリナーを介して、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、

20

第1及び第2の抗原が、（ヒト）A N G 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抗原である、三重特異性又は四重特異性抗体である

【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。

【0245】

30

一実施態様において、抗原結合ペプチドは、s c F v フラグメント及び s c F a b 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、s c F v 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、s c F a b 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】

40

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。

【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、同じペプチドリナーを介して、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、s c F v フラグメント又は s c F a b 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、s c F v フラグメント又は s c F a b 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 F a b 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 F a b フラグメントであって、前記更なる F a b フラグメントが両方とも、ペプチドリッカーを介して、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 a b フラグメントを含み、

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 フラグメント及び 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おり、

又は

i 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、定常ドメイン C L 及び C H 1 が、互いに置き換えられており、かつ

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、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おり、又は

i i 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、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おり、かつ

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

i v) 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、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おり、又は

v) 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おり、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、

第１及び第２の抗原が、(ヒト) A N G 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、二重特異性の四価抗体である。

#### 【０２５３】

一実施態様において、前記更なる F a b フラグメントは両方とも、ペプチドリッカーを介して、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 F a b フラグメントは両方とも、ペプチドリッカーを介して、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 F a b 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、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 フラグメント又は 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 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。

【 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。

【 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inker 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inker 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、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 ) A N G 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inker 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、

第 1 及び第 2 の抗原が、( ヒト ) A N G 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。

【 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、 $VH^2$ ドメイン及び $VL^2$ 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、

$VH^2$ ドメイン又は $VL^2$ ドメインのいずれかのみが、ペプチドリッカーを介して、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)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、二重特異性抗体である。

【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、 $VH^2$ ドメイン又は $VL^2$ ドメインの他方は、ペプチドリッカーを介して、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、 $VL$ ドメイン及び $CL$ ドメインを含み、第1の重鎖は、 $VH$ ドメイン、 $CH1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $CH2$ ドメイン、及び $CH3$ 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IL-1ベータ及び第2の非ヒトIL-1ベータ抗原に特異的に結合する。

【0269】

ヘテロ二量体化を支援するための $CH3$ 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、欧州特許第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、参照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 $CH3$ ドメイン及び第2の重鎖の $CH3$ 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 $CH3$ 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、 $CH3$ 操作された第1の重鎖は、もはや、別の $CH3$ 操作された第1の重鎖とホモ二量体化できない。 $CH3$ 操作された第2の重鎖は、もはや、別の $CH3$ 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 $CH3$ ドメインを含む重鎖は、相補的な方法で操作されている $CH3$ 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 $CH3$ ドメイン及び第2の重鎖の $CH3$ 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

【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Fab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Fab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。

10

20

30

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 (K a b a t E U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) (K a b a t E U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 (K a b a t E U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 (K a b a t E U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 (K a b a t E U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、欧州特許第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、欧州特許第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(K a b a t E U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

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 C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 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 C H 3 ドメインにおいて、3 5 1 位におけるアミノ酸 L は、D 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)。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 C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位におけるアミノ酸 T は、K により置換されており、3 5 1 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 C H 3 ドメインにおいて、3 5 1 位におけるアミノ酸 L は、D 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)。

#### 【 0 2 8 4 】

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 C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位におけるアミノ酸 T は、K により置換されており、3 5 1 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 C H 3 ドメインにおいて、3 5 1 位におけるアミノ酸 L は、D 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)。加えて、下記置換の内の少なくとも 1 つが、他方の重鎖の C H 3 ドメインに含まれる。3 4 9 位におけるアミノ酸 Y は、E により置換されており、3 4 9 位におけるアミノ酸 Y は、D により置換されており、3 6 8 位におけるアミノ酸 L は、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)。一実施態様において、3 6 8 位におけるアミノ酸 L は、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)。

#### 【 0 2 8 5 】

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 2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8 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 C H 3 ドメインにおいて、3 5 1 位におけるアミノ酸 L は、Y により置換されており、4 0 7 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 C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位におけるアミノ酸 T は、A により置換されており、4 0 9 位におけるアミノ酸 K は、F 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)。別の実施態様では、前述の置換に加えて、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいて、4 1 1 位 (元は T)、3 9 9 位 (元は D)、4 0 0 位 (元は S)、4 0 5 位 (元は F)、3 9 0 位 (元は N)、及び 3 9 2 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)。好ましい置換は、

- 4 1 1 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)、
- 3 9 9 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)、
- 4 0 0 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)、
- 4 0 5 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)、
- 3 9 0 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)、及び
- 3 9 2 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 ( K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング) である。

#### 【 0 2 8 6 】

( 国際公開公報第 2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8 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 C H 3 ドメインにおいて、3 5 1 位におけるアミノ酸 L は、Y により置換されており、4 0 7 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 C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位におけるアミ

10

20

30

40

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 (K a b a t E U 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 C H 3 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 C H 3 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 (K a b a t E U 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 C H 3 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 (K a b a t E U 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 C H 3 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 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)。

**【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 - i n t o - 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 C H 3 (K i H) 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 C H 3 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 C H 3 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 (K a b a t E U 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 C H 3 (K i H) 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 C H 3 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 C H 3 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 (K a b a t E U インデックスに従ってナンバリング)。

20

30

**【0289】**

I g G 2 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 C H 3 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 C H 3 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 (K a b a t E U 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 C H 3 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 (K a b a t E U 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 C H 3 ドメ

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 - リンジンペプチド ( G 4 4 6 及び K 4 4 7、K a b a t E U 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、K a b a t E U 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 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 2 9 9 】

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 F c R n 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 I g G 1 の抗体であり、両重鎖において、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及び H 4 3 4 A ( K a b a t インデックスに従ってナンバリング) を有する。

#### 【 0 3 0 0 】

更なる態様では、上記実施態様のいずれかの抗 I L - 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。

#### 【 0 3 0 1 】

##### 1 . 抗体親和性

K D 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。

#### 【 0 3 0 2 】

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、K D 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 ( E D C ) 及び N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) により、供給元の説明に従って活性化させる。抗原を、流速 5  $\mu$  l / 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、10 mM 酢酸ナトリウム、p H 4 . 8 により、5  $\mu$  g / ml (約 0 . 2  $\mu$  M) に希釈する。抗原の注入後に、1 M 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 F a b ( 0 . 7 8 nM ~ 5 0 0 nM) を、0 . 0 5 % ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤を含む P B S ( P B S T ) 中に、25 において、流速約 2 5  $\mu$  l / 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 ( K D ) 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、P B S、p H 7 . 2 中の 20 nM 抗抗原抗体 ( F a b 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm; 放出 = 340 nm、バンドパス 16 nm) 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。

#### 【 0 3 0 3 】

##### 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 , 8 1 6 , 5 6 7 号; 及び、Morrison, S.L. et al., Proc

10

20

30

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、又は非ヒト霊長類、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。

#### 【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。

#### 【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ライブラ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。

#### 【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。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体フラグメントとして調製することができる。

#### 【0308】

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 - i n t o - 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., Science229 (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 (s F v) 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ADCC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】

【表 7 0】

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

## 【 0 3 1 5 】

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 ) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- ( 6 ) 芳香族性：Trp、Tyr、Phe

30

## 【 0 3 1 6 】

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。

## 【 0 3 1 7 】

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。

40

## 【 0 3 1 8 】

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VH又はVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築及び二次ライブ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、エラーブローンPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌ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、二次ライブラリが調製される。ついで、このライブラリが、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、HVR指定アプローチを含む。そのアプローチにおいて、複数のHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）がランダム化される。抗原結合性に関与するHVR残基は、例えば、アラニン

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HVR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变化（例えば、本明細書で提供された保存的置換）を、HVR中にすることができる。このような変化は、例えば、HVR中の抗原接触残基の外側でもよい。上記で提供された変異VH及びVL配列の特定の実施態様では、各HVR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触点を特定する。このような接触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) グリコシル化変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供された抗体は、抗体がグリコシル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ル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つ以上のグリコシル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。哺乳類細胞により産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 l 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 l 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 % ~ 8 0 %、1 % ~ 6 5 %、5 % ~ 6 5 %、2 0 % ~ 4 0 %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 2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6 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領域におけるおおよそ 2 9 7 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、2 9 7 位の上流又は下流の約 ± 3 個のアミノ酸、すなわち、2 9 4 ~ 3 0 0 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A D C C機能を有する場合がある。20  
例えば、米国特許出願公開公報第 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 号；同第 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1 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 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 号；国際公開公報第 2 0 0 0 / 6 1 7 3 9 号；同第 2 0 0 1 / 2 9 2 4 6 号；米国特許出願公開公報第 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4 号；同第 2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8 号；同第 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1 号；同第 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0 号；同第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4 号；同第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2 号；同第 2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5 号；国際公開公報第 2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9 号；同第 2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0 号；同第 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6 号；同第 2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8 号；同第 2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2 号；同第 2 0 0 2 / 0 3 1 1 4 0 号；Ok  
azaki, 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産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 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 号；及び国際公開公報第 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 号、特に実施例 1 1 ) 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 2 0 0 3 / 0 8 5 1 0 号を参照のこと）を含む。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 l 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A D C 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 2 0 0 3 / 0 1 1 8 7 8 号；米国特許第 6 , 6 0 2 , 6 8 4 号；及び米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 2 3 5 4 6 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C D C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 1 9 9 7 / 3 0 0 8 7 号；同第 1 9 9 8 / 5 8 9 6 4 号；及び同第 1 9 9 9 / 2 2 7 6 4 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領域 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、FcRII、及びFcRIII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ACT1（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。C1q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】

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(CDC)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Fcレセプター(FcRn)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、Fc領域のFcRn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Fc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc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、Fc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)。

【0333】

Fc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MAb」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Fc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。

【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に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(PEG)、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

10

20

30

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。

#### 【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、本明細書に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宿主細胞が提供される。1つのこのような実施態様では、宿主細胞は、(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、宿主細胞は、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宿主細胞を培養することと、場合により、宿主細胞 (又は宿主細胞培養培地) から、抗体を回収することとを含む。

#### 【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、宿主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ケンシングすることができる。

#### 【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宿主細胞は、本明細書に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、グリコシル化及び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。細菌中で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 中で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。

## 【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* 細胞のトランスフェ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。（（トランスジェニック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 によりトランスフ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（HEL A）；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<sup>+</sup> 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。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, Loo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268 を参照のこと。

20

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。

40

## 【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、及び欧州特許第 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

50

及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5,635,483号、同第5,780,588号、及び同第7,498,298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5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、及び同第5,877,296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ピシン(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6,630,579号を参照のこと);メトトレキサート;ビンデシン;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CC1065を含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0347】

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、本明細書に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(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonaria 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

#### 【0348】

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、本明細書に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、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 、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-研究用の放射性原子、例えば、 $Tc^{99m}$ もしくは $I^{123}$ 、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)用のスピンラベル、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

#### 【0349】

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-カルボキシレート(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、ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、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)、ジイソシアナート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアナート)、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 9 4 / 1 1 0 2 6 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, 2 0 8, 0 2 0 号) を使用することができる。

#### 【 0 3 5 0 】

本明細書における免疫コンジュゲート又は A D C 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、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ - E M C S、スルホ - G M B S、スルホ - K M U S、スルホ - M B S、スルホ - S I A B、スルホ - S M C C、及びスルホ - S M P B、ならびに S V S B (スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン) ペンゾアート) 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

#### 【 0 3 5 1 】

##### 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に調製される (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ipient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; シクロヘキサノール; 3 - ペンタノール; 及び m - クレゾール); 低分子量 (約 1 0 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単糖類、二糖類、及び他の炭水化物; キレート剤、例えば、E D T A; 糖、例えば、ショ糖、マンニトール、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、Z n - 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 (P E G) 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 (s H A S E G P)、例えば、ヒト可溶性 P H - 2 0 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、r h u P H 2 0 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) を更に含む。r h u P H 2 0 を含む特定の例示的な s H A S E G P 及び使用方法は、米国特許出願公開公報第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 1 8 6 号及び同第 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8 号に記載されている。一態様において、s H A S E G P 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

30

40

#### 【 0 3 5 2 】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6, 2 6 7, 9 5 8 号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第 6, 1 7 1, 5 8 6 号及び国際公開公報第 2 0 0 6 / 0 4 4 9 0 8 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。

#### 【 0 3 5 3 】

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

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-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルそれぞれに、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

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、以下に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、本明細書に記載された投与経路により使用される。また、約1～99% 本明細書に記載された用量で、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



$\mu\text{g/kg} \sim 15\text{mg/kg}$  (例えば、 $0.5\text{mg/kg} \sim 10\text{mg/kg}$ ) 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 $1\mu\text{g/kg} \sim 100\text{mg/kg}$ 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 $0.05\text{mg/kg} \sim 10\text{mg/kg}$ の範囲であろう。このため、約 $0.5\text{mg/kg}$ 、 $2.0\text{mg/kg}$ 、 $4.0\text{mg/kg}$ 、又は $10\text{mg/kg}$ 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】

##### III. 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、シリンジ、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(BWF)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、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、及びシリンジを含む、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

30

#### 【0370】

上記製品のいずれかが、抗IL-1 $\beta$ 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。

#### 【0371】

40

##### IV. 具体的な実施態様

1. ヒトANG2、ヒトVEGF、ヒトIL-1 $\beta$ 、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。

#### 【0372】

2. i) ヒトANG2と、ii) ヒトIL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 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 I L - 1 ベータとヒト P D G F - 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 I L - 1 ベータに特異的に結合し、

a )

( a ) 配列番号 : 0 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 0 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 0 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は

( a ) 配列番号 : 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 5 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 : 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 9 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、

あるいは、

a ) 配列番号 : 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 4 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 : 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 2 8 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 ~ 4 のいずれか 1 つ記載の抗体。

【0376】

6. 抗体が、ヒト I L - 1 ベータに特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号 : 0 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 0 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 0 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 : 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 1 9 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 ~ 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

【0377】

7. 抗体が、ヒト P D G F - B に特異的に結合し、

a ) ( a ) 配列番号 : 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 3 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 : 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 3 7 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 : 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( b ) 配列番号 : 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 2 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 : 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 4 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 4 6 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 : 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 を含む重鎖可変ドメインと、( a ) 配列番号 : 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、( b ) 配列番号 : 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び ( c ) 配列番号 : 5 5 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 ~ 6 のいずれか 1 つ記載の抗体。

## 【0378】

8．抗体が、ヒトPDGFR-βに特異的に結合し、

(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、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PDGFR-βに特異的に結合し、

(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、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PDGFR-βに特異的に結合し、

(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1～7のいずれか1つ記載の抗体。

## 【0381】

11．抗体が、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-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、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ANG2に特異的に結合し、

(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

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 EUI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。

【0392】

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

【0393】

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。

【0394】

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

【0395】

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

【0396】

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。

【0397】

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。

40

【0398】

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、

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 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inker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 (V H)、又は

b b) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) 及び抗体定常ドメイン 1 (C H 1) 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 V H ドメインの N 末端により、ペプチドリinkerを介して、前記全長抗体の 2 つの重鎖の内の一方の 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 (V L)、又は

c b) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) 及び抗体軽鎖定常ドメイン (C L) 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、V L ドメインの N 末端により、ペプチドリinkerを介して、前記全長抗体の 2 つの重鎖の内の他方の 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 (V H) と第 2 のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン (V L) 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 (V H) と、c) のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン (V L) 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

30

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、K a b a t E U 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 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inker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 F a b 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 a bフラグメントであって、前記更なるF a b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 a bフラグメントを含み、

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フラグメント及び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おり、

又は

i 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、定常ドメインC L及びC H 1が、互いに置き換えられており、かつ

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、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おり、

i i 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、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おり、かつ

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、定常ドメインC L及びC H 1が、互いに置き換えられており、

又は

i v) 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、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おり、

又は

v) 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おり、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、

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、 $VH^2$ ドメイン及び $VL^2$ 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、

$VH^2$ ドメイン又は $VL^2$ ドメインのいずれかのみが、ペプチドリッカーを介して、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。

【0406】

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IgG1 Fc領域ポリペプチド、

- ヒトIgG2 Fc領域ポリペプチド、

- ヒトIgG3 Fc領域ポリペプチド、

- ヒトIgG4 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異L234A、L235Aを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1

Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1

Fc領域ポリペプチド、

- 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、

- 突然変異L234A、L235A、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329Gを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異L234A、L235A、P329Gを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 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、

- 突然変異L234A、L235A、P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG1 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異S228P、L235Eを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異S228P、L235E、P329Gを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4

Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4

Fc領域ポリペプチド、

- 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、

- 突然変異S228P、L235E、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4

Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329Gを有するヒトIgG4 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vを有するヒトIgG4

Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有する

ヒトIgG4 Fc領域ポリペプチド、

- 突然変異P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vを有する

10

20

30

40

50



ヒト I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 K 3 9 2 D を有するヒト I g G 1、I g G 2、又は I g G 4、及び

- 突然変異 N 3 9 2 D を有するヒト I g G 3 を含む群より選択され、

i i) 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、

- ヒト I g G 2 F c 領域ポリペプチド、

- ヒト I g G 3 F c 領域ポリペプチド、

- ヒト I g G 4 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 1 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F 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 W を有するヒト I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g G 4 F c 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 I g 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 I g G 2、I g G 3、又は I g 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。

【 0 4 0 7 】

3 7 . 抗体が、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、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

【 0 4 0 8 】

3 8 . 抗体が、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、

抗体が、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、実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つ記載の抗体。

## 【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るか、又は、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、

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、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Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び

Y 4 0 7 V ( ホール鎖 ) を含み、第 2 の F c 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 F c 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 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 C H 3 ドメイン及び第 2 のポリペプチドの C H 3 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 ( 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 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つ記載の抗体。

10

#### 【 0 4 1 2 】

4 2 . 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 4 1 記載の抗体。

#### 【 0 4 1 3 】

4 3 . 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

20

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 4 1 又は 4 2 記載の抗体。

#### 【 0 4 1 4 】

4 4 . 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

30

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、

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 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 4 1 5 】

4 5 . 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

40

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 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 4 1 6 】

4 6 . 医薬として使用するための、実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 4 1 7 】

4 7 . 眼血管疾患の処置に使用するための、実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つ記載の抗体。

#### 【 0 4 1 8 】

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．眼血管疾患を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。

10

【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。

20

【0425】

55．眼血管疾患を患う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、眼血管疾患を患う患者を処置する、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】

30

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、

40

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ことが理解される。

【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

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 (P B S) 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 - アミノプテリン - チミジン (H A T) 及びヒポキサンチン - チミジン (H T) 補助剤ならびに 5 0 % ポリエチレングリコール (P E G) 1 4 5 0 を、Bethesda Research Labs (Gaithersburg, MD) から得た。ウサギ抗マウス I g G + 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 I g G 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 (O P D) 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>1 2 5</sup> I 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

40

50

#### 【0433】

ハイブリドーマ生成 - I L - 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、C F A 中の 5 µg I L - 1 ベータ (精製された M W 17, 500 型) を注入した。不完全なフロイントアジュバント (I F A) 中の 5 回の追加免疫注入を、3 ~ 4 週間間隔で与えた。血清抗体力価を、E L I S A により、定期的に決定した。5 回の注入後に、力価を検出可能であった。融合用に選択された動物に、無菌 P B S 中の 10 µg I L - 1 ベータの静脈内 (I V) 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 % P E G 1 4 5 0 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、H A T 培地中で培養した。ハイブリドーマ上清を、固相抗原 E L I S A、<sup>1 2 5</sup> I I L - 1 ベータによる固相抗体 R I A、及び I L - 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 I L - 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 H A T 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。

#### 【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 I L B 1 - H 3 4 を、上記された対応する細胞株から調製した。

#### 【0436】

I L - 1 ベータ抗体の E L I S A - ビニルアッセイプレート (Costar) を、P B S 中の 5 µg/ml 希釈抗原溶液により、50 µL / 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 % チオメルサル / P B S 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 (B S A) / 0.05 % チオメルサル / P B S で洗浄し、50 µL / ウェル 抗 I L - 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 I g G + A + M ペルオキシダーゼコンジュゲート及び O P D 基質溶液を使用する間接 E L I S A 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 O P D 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 I g アイソタイプ特定キットを使用する間接 E L I S A 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  $\mu$ g/ml ) を、M E M / 5 % 牛胎児血清 ( F B S ) / 1 0 0  $\mu$ g/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 m M 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  $^{\circ}$  C において 4 8 時間後、0 . 5  $\mu$ Ci / ウェル  $^3$  H - チミジンを加え、培養物を、一晚インキュベーションした。細胞を、ガラス繊維フィルタ上で、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  $^{125}$  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  $\mu$ L 中の 1  $\mu$ g I L - 1 ベータを、1 mCi 試薬と、4  $^{\circ}$  C で 4 時間反応させた。P B S / 0 . 2 % ゼラチン 5 0 0  $\mu$ 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。 $^{125}$  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 繊維芽細胞のコンフルエントな単層に加えた。3 7  $^{\circ}$  C における 1 時間後、単層を、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。単層を、ガンマカウンタのために、0 . 1 N N a O H を使用して取り出した。 $^{125}$  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  $^{125}$  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 % チオメルサル / P B S 0 . 3 ml 中において、4  $^{\circ}$  C で一晚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  $\mu$ 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  $^{\circ}$  C 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  $^{125}$  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  $^9$  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

NMRI 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  $\mu$ g / ml、1 0 0  $\mu$ l / 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  $\mu$ l / 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  $\mu$ l / 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  $\mu$ l / 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、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。力価を、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 500 ng/mL で PBS 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) 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。

#### 【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 Biologicals, 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 0.25 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 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。

#### 【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 Biologicals, 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 0.5 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 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

10

20

30

40

50

メチルベンジジン ( T M B、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 118 35033001 ) 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 <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。

#### 【 0 4 4 6 】

##### 実施例 6

###### マウス I L - 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 I L - 1 ベータ ( Sino Biologics, Cat. No. 50101-MNAE ) 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 0 . 5 μg/mLで P B S 2 5 μL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 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 % B S A )。2) 抗 I L - 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 : 2 0 0 0 ( ロバ F ( a b )<sub>2</sub> 抗ウサギ I g G P O D、Amersham, NA9340V又はヒツジ I g G 抗マウス I g G P O D、Amersham RPN4201 )。基質である 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B、Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No 11835033001 ) 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 <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。

#### 【 0 4 4 7 】

##### 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 I L - 1 ベータ：ヒト I L - 1 レセプター 1 型

ヒト I L - 1 ベータのヒト I L - 1 レセプター I 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 H i s タグ付き I L - 1 ベータタンパク質 ( Sino Biologics, Cat.No.10139-H07E ) 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 μg/mLで P B S、0 . 5 % B S A及び0 . 0 5 % Tween 2 5 μL中において固定した。全ての下記工程を、P B S 9 0 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 % B S A )。2) 濃度を増大させる抗 I L - 1 ベータ抗体 1 2 . 5 μLを、3 0 0 n g/mL F c タグ付きヒト I L - 1 ベータレセプター ( Sino Biologics, Ca.No10126-H02H )

1 2 . 5 μLと、容量 2 5 0 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 h u F c 抗体 ( ヤギ F ( a b )<sub>2</sub> 抗ヒト F C P O D、Jack son, 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 ( T M B、Roche Diagnostics GmbH, Cat. No. 11835033001 ) を加えた 1 0 ~ 3 0 分後に、光学密度を、3 7 0 nmで決定した。I C <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。

#### 【 0 4 4 8 】

##### 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 I L - 1 ベータ：ヒト I L - 1 レセプター 2 型

ヒト I L - 1 ベータのヒト I L - 1 レセプター I I 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 H i s タグ付き I L - 1 ベータタンパク質 ( Sino Biologics, Cat.No.10139-H07E ) 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 μg/mLで P B S、0 . 5 % B S A及び0 . 0 5 % Tween 2 5 μL中において固定した。全ての下記工程を、P B S 9 0 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IL-1β抗体 12.5 μLを、30 ng/mL Fcタグ付きヒトIL-1βレセプター (RnD, Ca.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hIFC抗体(ヤギFcγ2)抗ヒトFCγPOD、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, Mannheim, Germany, 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。

#### 【0449】

##### 実施例 9

マウスハイブリドーマH34マウス抗IL-1β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、2 mM 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 8 mLを予め含有する10 mLフラスコ(CellStar)に移す。フラスコを、1000 rpm (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 10 mL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、2 mM 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-Scientific)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、20 ml (T75 フラスコ)に増やす。抗体生成のために、細胞 15 mlを、密度2×10<sup>6</sup>個/mlで、Celline 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、50 mlのfalcon中に充填し、4000 rpmで4回遠心分離する(各サイクル後、上清を、新たな50 ml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 (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、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、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、2M グリシン、pH 8.6、600mM NaClと、50% v/vで混合し、1M グリシン、pH 8.6、300mM 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、100mM クエン酸バッファー、pH 2.8で回収し、溶出直後に、1M 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、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。

#### 【0455】

#### 実施例 11

HEK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

#### 【0456】

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)。

#### 【0457】

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。

#### 【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 333.3 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 250mlを含む1L振とうフラスコに加える。

#### 【0459】

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。

#### 【0460】

2000rpm、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、0.22 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 12

HEK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 (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 x 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 KCl、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; 0.001 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。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】

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

/  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、250mM  $\text{KCl}$ 、 $\text{pH} 7.0$ を使用する高性能SECにより決定した。

#### 【0469】

##### 実施例 15

A549細胞のIL-1ベータ刺激後のICAM-1発現

A549細胞(10,000個/ウェル)を、10% FCSを加えたRPMI 1640中で、一晚増殖させた。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IL-1ベータ抗体を、250pg/ml IL-1ベータ及び種々の濃度の抗体(1000、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、A549細胞を、IL-1ベータ/抗体混合物と共に、クアドルブリケートで一晩インキュベーションした。

10

#### 【0471】

細胞を、氷冷したPBSで4回洗浄し、その後、PFAで20分間固定した。その後、細胞を、非透過性のGSD Bでブロックした。抗ICAM-1抗体(R&D Systems、5µg/ml)との2時間のインキュベーション後、サンプルを、PBS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-HRPコンジュゲート(Amersham)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、PBSで4回洗浄し、ABTS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405nmで測定した。

20

#### 【0472】

##### 実施例 16

A549細胞のIL-1ベータ刺激後のIL-6決定(Quantikine ELISA, R&D Systems)

A549細胞(10,000個/ウェル)を、10% FCSを加えたRPMI 1640中で、一晚増殖させた。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IL-1ベータ抗体(1µg/ml)を、250pg/ml IL-1ベータと共に、2時間インキュベーションした。その後、A549細胞を、IL-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。

30

#### 【0474】

培養上清のサンプル 100µlを、更なる分析用に採取した。

#### 【0475】

モノクローナル抗ヒトIL-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、RT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 200µlで4回洗浄した。その後、ウェルを、HRPにコンジュゲートさせたポリクローナル抗ヒトIL-6抗体により、RT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 200µl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 $\text{H}_2\text{O}_2$ 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。

40

#### 【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(Th-2)D10.G4.1株が、IL-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、IL-1又はフィーダー細胞の不存在下において、con 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 $ED_{50}$ は、典型的には、12 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 ConA/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。

#### 【0479】

#### 実施例18

IL-1ベータにより誘引されたHUVEC細胞でのICAM-1アップレギュレーション

対応する培地EBM/EGM(Cat# CC-4176)中のHUVEC細胞(Lonza, Cat#00191027)を、96ウェル培養プレート(Costar, Cat#3596)に、40,000個/ウェルで、EBM+2% BSA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で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。EBM+2% BSA中に、一方は、抗IL-1β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で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で行った。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% BSA 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% BSA+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ICAM-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で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% BSA 110 µl中に再懸濁させ、LSRIIにおいて測定した。

#### 【0480】

#### 実施例19

THP1細胞におけるMSU誘引TNFアルファ生成

THP1細胞(Invitrogen, Cat. No. thp-null)を、10% FBS(熱不活性化)を加えた増殖培地RPMI 1640(Gibco, Cat#A10491)中で、密度 $1 \times 10^6$ 個/mlまで増殖させ、Falconチューブに移した。PMA(ホルボールミリスチン酸酢酸、Invitrogen, Cat# tlr1-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で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% FBS(熱不活性化)を加えたHunger RPMI(Gibco, Cat#31870-025)中に、密度 $1.33 \times 10^6$ 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、 $2 \times 10^5$ 個/ウェルで播種した。一晚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。4倍濃縮したM

10

20

30

40

50

S U 懸濁液（尿酸－ナトリウム結晶、Invitrogen, Cat# t1rl-msu） 50  $\mu$ l を、Hunger 培地中に終濃度 250  $\mu$ g/ml で加え、5 %  $\text{CO}_2$  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  $\beta$  抗体の希釈系列を、増殖培地で行った。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-1  $\beta$  抗体の希釈系列を、このウェルに加えた。一晚のインキュベーションを、5 %  $\text{CO}_2$  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アルファシグナ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

サンプルを、3つのアリコートに分割し、20mM His / His \* 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

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  $\mu$ m 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  $\mu$ L 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266nm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。

【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ローカストランスジェニックウサギ）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。

【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  $\mu$ g/ml（マウス）又は1.0  $\mu$ g/ml（ウサギ）で、PBS中に100  $\mu$ l / ウェルで免疫化し、続けて、PBS中の2 % CroteinCにより、200  $\mu$ l / 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  $\mu$ l / 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,

10

20

30

40

50



0 0 0 希釈したビオチン化ヤギ抗ヒトカップパ抗体 (Southern Biotech) 及び 1 : 8 , 0 0 0 希釈した H R P - コンジュゲートストレプトアビジンにより、1 0 0  $\mu$ L / ウェルで検出した。全ての工程について、プレートを、3 7 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、P B S 中の 0 . 0 5 % Tween 20 で 3 回洗浄した。シグナルを、1 0 0  $\mu$ L / 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、1 0 0  $\mu$ L / ウェルで、1 M H C l を加えることにより停止させた。吸光度を、参照としての 6 9 0 nm に対して、4 5 0 nm において読み取った。力価を、最大半値シグナルをもたらず抗血清の希釈として定義した。

【 0 4 8 9 】

10

#### 実施例 2 4

ウサギからの B 細胞クローニング

ウサギ末梢血単核球 ( P B M C ) 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。E D T A 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  $\times$  P B S (PAA, Pasching, Austria) で 2 倍希釈した。P B M C を、1  $\times$  P B S で 2 回洗浄した。

【 0 4 9 0 】

EL-4B5 培地

1 0 % F C S (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 ビルビン酸ナトリウム、1 0 mM H E P E S (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) 、及び 0 . 0 5 mM -メルカプトエタノール (Gibco, Paisley, Scotland) を加えた R P M I 1 6 4 0 (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) を使用した。

20

【 0 4 9 1 】

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、P B G F - B B ( 2  $\mu$ g/ml ) 又は P D G F - A A と P D G F - C C タンパク質との混合物 ( 1  $\mu$ g/ml P D G F - A A 及び P D G F - C C ) 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、p H 9 . 5 5 ) 中において、4 で一晩コートした。使用前に、プレートを、無菌の P B S で、3 回洗浄した。

30

【 0 4 9 2 】

マクロファージ / 単球の枯渇

半分の血液サンプルの P B M C 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。

【 0 4 9 3 】

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 5 0 % P B M C を、P D G F - A A と P D G F - C C 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。

【 0 4 9 4 】

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 P B M C を充填し、インキュベーター中において、3 7 で 1 時間結合させた。

【 0 4 9 5 】

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

【 0 4 9 6 】

P D G F B B タンパク質での B 細胞の濃縮

P D G F B B 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 当りに、最大  $6 \times 10^6$  個 P B L を播種し、インキュベーター中において、3 7 で 1 時間結合させた。付着しなかった細胞を、1  $\times$  P B S 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

50

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、PBM Cを、氷冷PBSで2回洗浄した。最後に、PBM C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5 µg/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、単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 ( $2.5 \times 10^4$  細胞/ウェル) を含有する、200 µl/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) 100 µl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  $1 \sim 2 \times 10^5$  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、mLL-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 )

40

#### 【0502】

融合前に、骨髄腫細胞をおおよそ遠心分離する (250 rpm、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  $1 \sim 5 \times 10^7$  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 (250 rpm、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。

50

## 【0505】

P E G 溶液 ( 3 7 ) を、細胞に滴下する。

## 【0506】

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あたりに加えた。9～13日の培養後、単一クローンを取り出す。

## 【0507】

## 実施例 26

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。

## 【0508】

## 実施例 27

## B細胞のクローニング

## VドメインのPCR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フリー水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ゼ反応により、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(VH及びVL)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、(VH及びVL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、(VH及びVLそれぞれの)定常領域に特異的であった。RbVH+RbVLについての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、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、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。

## 【0509】

20

30

## 【表 7 1】

rbHC.up AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGC  
TGGCTTC

配列番号：1 1 1

rbHCf.do CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG

配列番号：1 1 2

rbLC.up AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCC  
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

BcPCR\_huCkappa.rev GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

配列番号：1 1 6

## 【0 5 1 0】

PCR 溶液 50 μl の内の 8 μl を、48 E-Gel 2 % (Invitrogen G8008-02) にロードした。ポジティブな PCR 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 50 μl 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】

## 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、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、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 3 つの変異体を使用した。1 つのプラスミドは、VH 領域を受容するように設計されたウサギ IgG 定常領域を含有する。2 つのプラスミドは、VL 領域を受容するウサギ又はヒトのカッパ LC 定常領域を含有する。

## 【0 5 1 2】

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。

## 【0 5 1 3】

精製された PCR 産物を、T4 DNA 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。

## 【0 5 1 4】

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

10

20

30

40

50

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中にトランスフ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スフェクションした。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50 µl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(20 bp)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cDNA 4 µlを使用した。VH及びVL鎖増幅用の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。

#### 【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、T4 DNA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中にトランスフ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。

#### 【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タープレート(Thermo Scientific, Cat. No. 464718)において、濃度125 ng/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) 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ジン (TMB、Piercenet, Cat. No. 34021) を加えた20 ~ 30分後に、光学密度を、370nmで決定した。E C<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。

#### 【0522】

##### 実施例31

##### カニクイザル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。E C<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。

#### 【0523】

##### 実施例32

##### マウス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。抗原であるマウスPDGF-BB (Peprotech 315-18) 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。E C<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。

#### 【0524】

##### 実施例33

##### ラット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。抗原であるラットPDGF-BB (R&D, 520-BB) 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ジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた 20 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。E C<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 125 ng/mL で PBS、0.5% BSA 及び 0.05% Tween 25  $\mu$ L 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  $\mu$ 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% 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ジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた 20 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。E C<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 125 ng/mL で PBS、0.5% BSA 及び 0.05% Tween 25  $\mu$ L 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  $\mu$ 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% 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ジン (TMB、Piercenet, 34021) を加えた 20 ~ 30 分後に、光学密度を、370 nm で決定した。E C<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  $\mu$ g/mL で PBS、0.5% BSA 及び 0.05% Tween 25  $\mu$ L 中において固定した。全ての下記工程を、PBS 90  $\mu$ 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% BSA)。2) 濃度を増大させる抗 PDGF - BB 抗体 15  $\mu$ L を、75 nM ビオチン化ヒト PDGF - BB (Cell Signaling, 8921BF) 15  $\mu$ L と、容量 30  $\mu$ L 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

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。I C<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 で保存する。

10

#### 【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 MabSelect SuRe (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 で保存する。

20

30

#### 【0530】

##### 実施例 38

ヒト PDGF - BB 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 PDGF - BB (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 PDGF - BB 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。

40

#### 【0531】

##### 実施例 39

カニクイザル PDGF - BB 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 PDGF - BB 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 PDGF - BB 抗体を、10 mM HEPES pH 7.2、150 mM NaCl

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細胞中で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、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 °C、7 %  $CO_2$ 、85 % 湿度、135 rpmにおいて、インキュベーション/振とう)。

#### 【0534】

細胞を、容量250 ml 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250 ml 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、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 °C) 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細胞培養容量250 ml を含む1 L 振とうフラスコに加える。

#### 【0536】

37 °C、7 %  $CO_2$ 、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。

#### 【0537】

2,000 rpm、4 °C、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 °C、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 °C) 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

5 mg 抗体 (20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 中の約1 mg/ml) を、L-システイン溶液 90 µl (Merck Millipore; 20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 中の250 mM) 及びパバイン 12 µl (Roche Life Science; 3.2 U/mg 抗体) と共に、37 °C で120 分間インキュベーションした。開裂後、PBS (1 mM  $KH_2PO_4$ 、10 mM  $Na_2HPO_4$ 、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。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 °C で保存した。

#### 【0539】

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

10

20

30

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】

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、S D S - P A G E ( NuPAGE 4 ~ 12 % B i s - T r i s ゲル、Invitrogen ) により、Simply Blue Safe Stain ( Invitrogen ) で染色して分析した。

【0541】

F a b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 × P B S、p H 7 . 4 を使用する高性能S E Cにより決定した。

10

【0542】

実施例 4 2

3 T 3 細胞増殖 E L I S A

増殖阻害を決定するために、B r d U 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 P D G F - B B 及び抗体を使用した。

【0543】

実施例 4 3

ホスホ - P D G F - R ベータ ( T y r 7 5 1 ) サンドイッチ E L I S A

1 0 , 0 0 0 個 3 T 3 細胞 / ウェルを、1 0 % ウシ新生仔血清を加えた D M E M 培地中において、2 4 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 D M E M 培地 ) 中において、2 4 時間インキュベーションした。

20

【0544】

添加前に、抗体 ( 1 μ g/ml ) を、5 ng/ml P D G F - B B 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。3 T 3 細胞を、5 ng/ml P D G F - B B 及び抗体を含む Hunger 培地中において、1 0 分間インキュベーションした。

【0545】

溶解前に、細胞を、P B S で 4 回洗浄した。細胞の溶解を、溶解バッファー 1 0 0 μ l 中において行った。

【0546】

30

溶解溶液を、ウサギ抗 P D G F - R ベータ抗体でコートした 9 6 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、P B S で 4 回洗浄した。マウス抗ホスホ - P D G F 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、T M B 基質溶液 1 0 0 μ l で、3 0 分間インキュベーションした。反応を、停止溶液 1 0 0 μ l の添加により停止させた。吸光を、4 5 0 nm で決定した。

【0547】

実施例 4 4

細胞遊走アッセイ法

C I M - プレート 1 6 ( ACEA Biosciences Inc., n°05665817001、メンブラン孔径 8 μ m ) を使用。

40

【0548】

プロトコル

使用前に、初代ヒト網膜周皮細胞 ( h T E R T により不死化された ( ACBRI 183 Cell Systems ) ) を、( 成長因子を含まない Cell Systems CSC 血清フリー培地 ( b°SF-4ZR-500-S 中において ) 一晩飢餓状態にする ( 5 0 ~ 7 0 % コンフルエント ) ) 。

【0549】

プレート準備

上側チャンバ : ( 5 0 μ l 培地 + 1 0 0 μ l 細胞懸濁液 )

【0550】

50

PBS中の20 µg/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 µl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 µl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 µlを、ウェルに加える。

#### 【0552】

10

下側チャンバ: 160 µl/ウェル 試験サンプル (1×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 µl/ウェル サンプルを加える。UCとLCとを、CIM-プレート16アッセイ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】

20

##### 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、 $1.5 \times 10^5$  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 µlあたりに、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、10~20時間の間、測定を直ちに開始する。

#### 【0555】

##### 実施例45

30

##### 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 µlあたりに、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】

40

Balbc 3 T 3、100 µlあたりに、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、24~48時間播種する。細胞が80~90%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、 $0.25 \times 10^5$  個/ml (又は  $0.5 \times 10^5$  個/ml) で再懸濁させる。細胞

50

胞懸濁液 100  $\mu$ l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  $\mu$ l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  $\mu$ lを、各ウェルに加える(2 $\times$ 濃縮、アッセイバッファー中で希釈)。37、5%  $\text{CO}_2$ で、72時間インキュベーションする。染料溶液 40  $\mu$ l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、490nmで読み取る。

#### 【0561】

##### 実施例46

##### 抗PDGF-BB抗体の動力学スクリーニング

ヒトPDGF-BBに対する抗PDGF-BB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PDGF-BB(5  $\mu$ g/ml; オーダーコード220-BB; R&D Systems)を、シリーズS C1チップ(GE Healthcare BR-1005-35)に、pH4.0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、HBS-N pH7.4(10mM HEPES、150mM NaCl、pH7.4、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、HBS-P pH7.4(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% 界面活性剤P20、pH7.4、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。

#### 【0562】

会合を、溶液中の濃度30nM及び3nM抗PDGF-BB抗体の注入により、流速100  $\mu$ l/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  $\mu$ l/分での、60秒間の0.85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (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、ブ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。ブ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47

##### 抗PDGF-BB Fabの動力学特徴決定

ヒトPDGF-BBに対する抗PDGF-BB Fab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PDGF-BB(0.5  $\mu$ g/ml; オーダーコード220-BB; R&D Systems)を、シリーズS CM3チップ(GE Healthcare BR-1005-36)に、pH4.0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、HBS-N pH7.4(10mM HEPES、150mM NaCl、pH7.4、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、HBS-P pH7.4(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% 界面活性剤P20、pH7.4、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。

#### 【0564】

会合を、種々の濃度の溶液における抗PDGF-BB Fabの注入により、流速30  $\mu$ l/分で、1:3系列希釈において300nM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  $\mu$ l/分での、60秒間の0.85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (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、ブ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。ブ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。

## 【 0 5 6 5 】

## 実施例 4 8

## 抗体からの F a b フラグメントの調製及び分析

1 2 mg 抗体 ( 2 0 mM ヒスチジン、1 4 0 mM N a C l、p H 6 . 0 中の 1 mg/ml ) を、L - システイン溶液 2 4 0  $\mu$  l ( Merck Millipore ; 2 0 mM ヒスチジン、1 4 0 mM N a C l、p H 6 . 0 中の 2 5 0 mM ) 及びパパイン 3 2 7  $\mu$  l ( Roche Life Science ; 0 . 0 0 1 U/mg 抗体 ) と共に、3 7 で 1 2 0 分間インキュベーションした。開裂後、P B S ( 1 mM K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、1 0 mM N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub>、1 3 7 mM N a C l、2 . 7 mM K C l )、p H 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 I g G 及び F c 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、2 0 mM ヒスチジンバッファー、0 . 1 4 M N a C l、p H 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、- 8 0 で保存した。

10

## 【 0 5 6 6 】

F a b フラグメントのタンパク質濃度を、2 8 0 nmでの光学密度 ( O D ) 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。

20

## 【 0 5 6 7 】

F a b フラグメントの純度及び完全性を、還元剤 ( 5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール ) の存在及び不存在下における、S D S - P A G E ( NuPAGE 4 ~ 1 2 % B i s - T r i s ゲル、Invitrogen ) により、Simply Blue Safe Stain ( Invitrogen ) で染色して分析した。

## 【 0 5 6 8 】

F a b 調製物の凝集含量を、BioSuite高解像 S E C、2 5 0 、5  $\mu$  m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 2 0 0 mM K <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> / K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、2 5 0 mM K C l、p H 7 . 0 を使用する高性能 S E C により決定した。

30

## 【 0 5 6 9 】

## 実施例 4 9

## 成熟 X F a b の A N G 2 結合動力学及び交叉反応性

ヒト A N G 2 - R B D - F c 領域融合物に対する成熟 X F a b の結合性を、BIAcore T2 00 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 4 0 0 0 RU 抗ヒト抗体 ( 1 0  $\mu$  g/ml 抗ヒト I g G ( F c ) 抗体 ; オーダーコード BR-1008-39 ; GE Healthcare ) を、シリーズ S C M 5 チップ ( GE Healthcare BR-1005-30 ) に、p H 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 ( 1 0 mM H E P E S、1 5 0 mM N a C l、p H 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 ( 1 0 mM H E P E S、1 5 0 mM N a C l、p H 7 . 4、0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0 ; GE Healthcare ) とした。フローセルを、2 5 に設定し、サンプルブロックを、1 2 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。

40

## 【 0 5 7 0 】

ヒト又はカニクイザルの A N G 2 - R B D - F c 領域融合物を、1  $\mu$  g/ml 溶液を流速 5  $\mu$  l/分 で 3 0 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 9 0  $\mu$  l/分 で、1 : 3 系列希釈において 3 0 0 nM で開始して、9 0 秒間測定した。解離期を、最大 6 0 0 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  $\mu$  l/分 での、6 0 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、

50

抗ヒトIgG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照基準に対して、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(100 µl、10 µg/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250 µlで3回洗浄した後、ブロッキング200 µl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(40 µl; 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(80 µl)に加えた。10分後、細胞を溶解させた(溶解バッファー60 µl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100 µl; 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(100 µl; 0.3 µg/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(100 µl; 100 mU/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(100 µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat# 11835033001)を加えた。光学密度を、450 nmで5~10分後に測定した。

30

#### 【0576】

40

#### 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、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)、3又は4日毎に継代した(37 °C、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)。細胞を、細胞密度3 × 10<sup>5</sup> 個/mlで、培地250 ml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

50

500 ml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、110 rpm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  $1.4 \sim 2.0 \times 10^6$  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、1000 µg プラスミドDNA (2 × 250 µg 軽鎖コードプラスミドDNA及び2 × 250 µg 重鎖コードプラスミドDNA)を、終容量40 ml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 1333 µl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、110 rpm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。

10

#### 【0579】

2000 rpm、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、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した。細胞フリー上清を、0.22 µm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。

20

#### 【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 (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、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、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に中和した。

30

#### 【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、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℃で保存する。

40

#### 【0582】

抗PDGF-B / ANG 2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1 Mになるように加えた。この溶液を、1 M 硫酸アンモニウム、35 mM 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、35 mM 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。

50

#### 【0583】

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。

#### 【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、250 Å、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

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、250mM KCl、pH 7.0を使用する高性能SEC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PDGF-B/ANG2抗体	0144	1.5	37.7	25.1	>98	>95	CH1 select, HIC, SEC
抗PDGF-B/VEGF抗体	0117	1	46.3	46.3	>98	>95	CH1 select, SEC
抗PDGF-B/ANG2抗体	0145	1	21.5	21.5	>98	>95	CH1 select/SEC
抗PDGF-B/ANG2抗体	0146	0.5	14.6	29.2	>98	>95	CH1 select/SEC
抗IL-1ベータ/ANG2抗体	0031	1	29.2	29.2	>98	>95	CH1 select, SEC
抗IL-1ベータ/VEGF抗体	0032	1.5	23.6	15.7	>98	>95	CH1 select, IEX, SEC

10

20

【0587】

抗体0144は、配列番号：117（VH）及び配列番号：118（VL）のANG2結合部位と、配列番号：92（VH）及び配列番号：97（VL）のPDGF-B結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

【0588】

抗体0117は、配列番号：119（VH）及び配列番号：120（VL）のVEGF結合部位と、配列番号：92（VH）及び配列番号：97（VL）のPDGF-B結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

30

【0589】

抗体0145は、配列番号：119（VH）及び配列番号：120（VL）のANG2結合部位と、配列番号：101（VH）及び配列番号：106（VL）のPDGF-B結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

【0590】

抗体0146は、配列番号：117（VH）及び配列番号：118（VL）のANG2結合部位と、配列番号：121（VH）及び配列番号：122（VL）のPDGF-B結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

40

【0591】

抗体0031は、配列番号：06（VH）及び配列番号：16（VL）のIL-1ベータ結合部位と、配列番号：140（VH）及び配列番号：141（VL）のANG2結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

【0592】

抗体0032は、配列番号：142（VH）及び配列番号：143（VL）のVEGF結合部位と、配列番号：06（VH）及び配列番号：16（VL）のIL-1ベータ結合部位とを含む、CrossMab抗体である。

【0593】

実施例52

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、サンプルブロックを、12 に設定し、ランニングバッファで2回下塗りした。

10

20

30

40

50

## 【0594】

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、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%  $H_3PO_4$  (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、ブ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。ブ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。

## 【0595】

## 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で2回下塗りした。

## 【0596】

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。ブ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。

## 【0597】

## 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

りカップリングさせた。HBS - N ( 10mM HEPES、150mM 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 ( 10mM HEPES、150mM 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ntagを含むヒトVEGFアイソフォーム121を、溶液を流速5  $\mu$ l/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  $\mu$ l/分で、1:3系列希釈において300nM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  $\mu$ l/分での、60秒間の3M 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 ( 10mM His、140mM 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 ~ 200RUをもたらすように、表面に捕捉させた。ヒトIL - 1 ベータを、0.74 ~ 最大60nM ( 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、3M MgCl<sub>2</sub> (抗ヒトFc抗体用) 又は10mM グリシン pH 1.5 (抗マウスFc抗体用) を、流速5  $\mu$ l/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32mg/mlで行った。結晶化滴を、タンパク質溶液 0.1  $\mu$ lを貯留液 0.1  $\mu$ lと混合することにより、蒸気拡散シット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、0.1M HEPES pH 7.0、20% PEG 4000、及び0.1M カコジル酸ナトリウム、15% PEG 4000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100K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2つのFabを生成した (以下の表を参照のこと)。

## 【 0 6 0 2 】

構造を、検索モデルとして、Roche-internal PDB-ID 1htfrからのFab 577を使用する分子置換により決定した。Fab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 アポ結晶についてのデータ収集及び構造精密化統計

<b>データ収集</b>		
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)	10
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 / σ (I)	5.95 (0.59)	
Wilson B 因子	28.27	
R - m e r g e <sup>2</sup>	0.1151 (1.612)	
R - m e a s	0.1352 (1.908)	
CC1/2	0.991 (0.332)	
CC*	0.998 (0.706)	20
<b>精密化</b>		
精密化に使用される反射数	123149 (12068)	
R - f r e e に使用される反射数	6101 (592)	
R - w o r k <sup>3</sup>	0.2005 (0.3964)	
R - f r e e <sup>4</sup>	0.2350 (0.4117)	
CC (w o r k)	0.959 (0.593)	
CC (f r e e)	0.943 (0.586)	
非水素原子数	7574	
巨大分子	6622	
タンパク質残基	859	30
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	
クラッシュスコア	1.30	
平均 B 因子 (Å <sup>2</sup> )	32.58	
巨大分子	31.78	40
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>  $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$  (式中、I は強度である)

<sup>3</sup>  $R_{work} = \sum |F_o - \langle F_c \rangle| / \sum F_o$  (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>  $R_{free}$  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。

**F a bフラグメントH 3 4 とヒトI L - 1 ベータとの複合体**

結晶化スクリーニング前に、F a bフラグメントH 3 4 を、I L - 1 ベータ (Peptotec h) と、モル比 1 . 2 : 1 で混合した。タンパク質混合物を、2 1 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、3 2 mg/mlとした。結晶化滴を、タンパク質 0 . 1  $\mu$ l を貯留液 0 . 1  $\mu$ l 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、2 1 でセットアップした。結晶は、0 . 1 M T r i s p H 8 . 0、2 0 % P E G 4 0 0 0 において、2 日以内に現れ、4 日以内に、最終サイズ 0 . 1 5 mm  $\times$  0 . 0 6 mm  $\times$  0 . 0 1 mm に成長した。

**【 0 6 0 5 】**

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 1 0 0 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、H 3 4 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、H 3 4 F a b 構造及びインターロイキン - 1 ベータ (PDB-ID 112 h) 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。

**【 0 6 0 6 】**

## 【表 7 4】

表：H 3 4 F a b I L - 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	10
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 / σ (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)	20
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	30
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	40
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、HBS - P ( 10 mM His、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 ) を使用して、25℃で行った。抗ヒト又は抗マウス 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。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 α 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 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。

10

20

【 0608】

## 実施例 5 5

## 抗 I L - 1 ベータ Fab と比較した抗 I L - 1 ベータ IgG 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 IgG 及び Fab 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、HBS - P ( 10 mM His、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 ) を使用して、25℃で行った。抗ヒト Fc 又は抗ヒト Fab 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。抗 I L - 1 ベータ IgG 及び Fab を、約 100 及び 50 RU の捕捉応答それぞれをもたらし、表面に捕捉させた。ヒト I L - 1 ベータを、0.74 ~ 最大 60 nM ( 1 : 3 系列希釈 ) 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 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。

30

【 0609】

## 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 RI 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、HBS - P ( 10 mM His、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 ) を使用して、25℃で行った。ヒト I L - 1 RI 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。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 NaOH 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

40

50

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	1-14
Y	----- 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 ----- -/-	6,8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier 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

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2015

Date of mailing of the international search report

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	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	6,8
Y	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	1-14
A	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	1-14
Y	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	1-14
Y	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	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>LEONARDZEHR: "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> <p>-----</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
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
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
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
WO 2005087812 A1	22-09-2005	US 2005282233 A1	22-12-2005
		WO 2005087812 A1	22-09-2005
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)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 27/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/02	
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (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・シュトラッセ 4 4 アー
- (72) 発明者 ガスナー, クリティアン  
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・ベルクグラベン 1 1
- (72) 発明者 グリュナー, 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ッセ 1 0
- (72) 発明者 ハルトマン, ガイド  
ドイツ国、7 9 5 3 9 レラハ、ハングシュトラッセ 3 4
- (72) 発明者 ヒュールスマン, ペーター・ミヒャエル  
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・シュトラッセ 3 0
- (72) 発明者 モルケン, イェルク  
ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、オシエツキーシュトラッセ 2
- (72) 発明者 モルホイ, ミヒャエル  
ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、ファヒナーシュトラッセ 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, イェルク・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ッセ 1 7 ・ペー
- (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ッセ 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、ケーニヒベルクシュトラッセ 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