

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5368570号
(P5368570)

(45) 発行日 平成25年12月18日 (2013.12.18)

(24) 登録日 平成25年9月20日 (2013.9.20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 13 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-530411 (P2011-530411)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月7日 (2009.10.7)
 (65) 公表番号 特表2012-504943 (P2012-504943A)
 (43) 公表日 平成24年3月1日 (2012.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/007182
 (87) 国際公開番号 W02010/040508
 (87) 国際公開日 平成22年4月15日 (2010.4.15)
 審査請求日 平成23年6月3日 (2011.6.3)
 (31) 優先権主張番号 08017607.6
 (32) 優先日 平成20年10月8日 (2008.10.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 08021834.0
 (32) 優先日 平成20年12月16日 (2008.12.16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異的抗-VEGF/抗-ANG-2抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト血管内皮成長因子 (VEGF) 及びヒトアンギオポエチン2 (ANG-2) に対して特異的に結合する、ヒトVEGFに対して特異的に結合する第1抗原結合部位及びヒトアンギオポエチン2 (ANG-2) に対して特異的に結合する第2抗原結合部位を含んで成る二重特異的抗体において、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインの対であり；

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1のCDR3領域、配列番号：2のCDR2領域、及び配列番号：3のCDR1領域を、そしてL鎖可変ドメインに、配列番号：4のCDR3領域、配列番号：5のCDR2領域、及び配列番号：6のCDR1領域を含んで成り；

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：46のCDR3領域、配列番号：47のCDR2領域、及び配列番号：48のCDR1領域を、そしてL鎖可変ドメインに、配列番号：49のCDR3領域、配列番号：50のCDR2領域、及び配列番号：51のCDR1領域を含んで成る、

ことを特徴とする二重特異的抗体。

【請求項 2】

ヒトANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、ヒトアンギオポエチン1 (ANG-1) に対して特異的に結合しないことを特徴とする、請求項1に記載の二重特異

的抗体。

【請求項 3】

KD (VEGF に対して特異的な抗原結合部位) / KD (ANG-2 に対して特異的な抗原結合部位) の結合親和性比が 1.0 ~ 10.0 であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の二重特異的抗体。

【請求項 4】

前記抗体が二価であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体を含んで成る医薬組成物。

10

【請求項 6】

癌の処理のための請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

血管疾患の処理のための請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

癌の処理 において使用する ための請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体。

【請求項 9】

血管疾患の処理において使用する ための請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体。

20

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体をコードする核酸。

【請求項 11】

原核又は真核宿主細胞において前記核酸を発現できる請求項 10 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のベクターを含んで成る原核又は真核宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体の生成方法であって、原核又は真核宿主細胞において請求項 10 に記載の核酸を発現し、そして前記細胞又は細胞培養上清液から前記二重特異的抗体を回収することを特徴とする方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト血管内皮成長因子 (VEGF / VEGF-A) 及びヒトアンジオポエチン - 2 (ANG - 2) に対する二重特異的抗体類、それらの製造方法、前記抗体類を含む医薬組成物、及びそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

脈管形成は、固形腫瘍、眼内新生血管症候群、例えば増殖性網膜症又は加齢性網膜黄斑部変性 (AMD)、リュウマチ様関節炎、及び乾癬を包含する種々の疾患の病因論に係る (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及び Garner, A., Vascular diseases, in: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625- 1710) 。固形腫瘍の場合、新生血管形成は、正常細胞に比較して、腫瘍細胞による成長利点及び増殖自立性の獲得を可能にする。従って、腫瘍断片における微小血管の密度と、乳癌及びいくつかの他の腫瘍における患者生存性との間に相互関係が観察された (Weidner, N., et al, N Engl J Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R., et al., Lancet 340 (1992) 1 120-1 124; and Macchiarini, P., et al., Lancet 340 (1992) 145-146) 。

40

50

【 0 0 0 3 】

VEGF及び抗 - VEGF抗体 :

ヒト血管内皮成長因子 (VEGF/VEGF-A) (配列番号 : 105) は、例えばLeung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P. J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 及び Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24に記載されている。VEGFは、腫瘍及び眼内疾患に関係する正常及び異常脈管形成及び新生血管形成の調節に関与する (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; 及びDvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039)。VEGFは、いくつかの源から単離されたホモダイマー糖タンパク質である。

10

【 0 0 0 4 】

VEGFは、内皮細胞に対して高い特異性の有糸分裂活性を示す。VEGFは、胚脈管形成の間の新規血管の形成、及び成人期の脈管形成において重要な調節機能を有する (Carmeliet, P., et al., Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., Nature, 380 (1996) 439-442; Ferrara and Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18 (1997) 4-25に再考される)。VEGFにより演じられる役割の有意性は、単一のVEGF対立遺伝子の不活性化が脈管構造の誤った成長のために胚致死性をもたらすことを示す研究において示されている (Carmeliet, P., et al., Nature, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., Nature, 380 (1996) 439-442)。

20

【 0 0 0 5 】

さらに、VEGFは、単核細胞に対して強い化学誘引活性を有し、プラスミノーゲン活性化因子、及び内皮細胞におけるプラスミノーゲン活性因子インヒビターを誘発でき、そしてまた、微小血管浸透性も誘発できる。後者の活性のためには、それは血管透過性因子 (VPF) として時々言及される。VEGFの単離及び性質は再考されている : Ferrara, N., et al., J. Cellular Biochem., 47 (1991) 211-218 及び Connolly, J. Cellular Biochem., 47 (1991) 219-223を参照のこと。単一のVEGF遺伝子の他のmRNAスプライシングは、VEGFの5種のイソフォームをもたらす。

【 0 0 0 6 】

30

抗 - VEGF中和抗体は、マウスにおいて種々のヒト腫瘍細胞系の成長を抑制する (Kim, I., et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, S.R., et al., J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; 及び Melnyk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924)。WO 94/10202号、WO 98/45332号、WO 2005/00900号、及び WO 00/35956号、は、VEGFに対する抗体を言及する。ヒトモノクローナル抗体bevacizumab (商品名Avastin (商標) として市販されている) は、腫瘍治療に使用される抗 - VEGF抗体である (WO98/45331号)。

【 0 0 0 7 】

Ranibizumab (商品名Lucentis (商標)) は、bevacizumab (Avastin) と同じ親ネズミ抗体に由来するモノクローナル抗体フラグメントである。それは親分子よりもより小さく、そして親和性成熟され、VEGF-Aに対する強い結合を提供する (WO98/45331号)。それは、“湿潤” タイプの加齢性網膜黄斑部変性 (ARMD)、すなわち通常形の加齢性視力喪失の処理を許可されている抗 - 血管由来性である。もう1つの抗 - VEGF抗体は、例えばUS2007/0141065号に記載されるHuMab G6-31である。

40

【 0 0 0 8 】

ANG-2及び抗 - ANG-2抗体 :

ヒトアンギオポエチン - 2 (ANG-2) (他方では、ANGPT2又はANG2により略される) (配列番号 : 106) は、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 及び Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91に記載される。アンギオポエチン - 1 及び - 2 (ANG-1 (配列番号 : 107) 及びANG-2 (配列番号 : 106)) は、Ties, すなわち血管内

50

皮内に選択的に発現されるチロシンキナーゼのファミリーのためのリガンドとして発見された (Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48)。現在、アンギオポエチンファミリーの4種の決定的メンバーが存在する。アンギオポエチン-3及び-4 (Ang-3及びAng-4)は、マウス及びヒトにおける同じ遺伝子座の広く分岐されたカウンターパートを提供することができる (Kim, I., et al., FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28)。

【0009】

ANG-1及びANG-2は、それぞれアゴニスト及びアンタゴニストとして組織培養実験において元々同定されている (ANG-1については、Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 161-69; 及びANG-2については、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60を参照のこと)。既知アンギオポエチンのすべては主としてTie2に結合し、そしてAng-1及び-2の両者は3nMの親和性 (Kd) を伴ってTie2に結合する (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。Ang-1は、EC生存性を支持し、そして内皮統合性を促進することが示されており (Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 161-69; Kwak, H.J., et al., FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C, et al., Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G., et al., Science 286 (1999) 251 1-14; Thurston, G., et al., Nat. Med. 6 (2000) 460-63)、ところがANG-2は反対の効果を有し、そして生存因子VEGF又は塩基性線維芽細胞成長因子の不在下で血管不安定化及び後退を促進した (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。

【0010】

しかしながら、ANG-2機能の多くの研究は、より複雑な状況を提案して来た。ANG-2は、脈管発芽及び後退の両者において役割を演じる血管再構築の複雑なレギュレーターである。ANG-2についてのそのような役割を支持する場合、発現分析は、ANG-2が血管由来の発芽の成人設定において、VEGFと一緒に急速に誘発され、ところがANG-2は血管後退の設定においてVEGFの不在下で誘発されることを示す (Holash, J., et al., Science 284 (1999) 1994-98; Holash, J., et al., Oncogene 18 (1999) 5356-62)。環境-依存性役割と一致するANG-2は、同じ内皮-特異的受容体、すなわちAng-1により活性化されるが、しかしその活性化に対して環境-依存性効果を有するTie-2に対して特異的に結合する (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。

【0011】

角膜脈管形成アッセイは、ANG-1及びANG-2の両者が新規血管の成長を促進するためにVEGFと共に相乗的に作用する類似する効果を有したことを示している (Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40)。用量-依存性内皮応答が存在する可能性は、インビトロで、高濃度で、ANG-2がまた前-脈管由来性であり得る観察により高められた (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52)。高濃度で、ANG-2は、PI-3キナーゼ及びAkt経路を通してのTie2の活性化を通して血清損失アポトーシスの間、内皮細胞のためのアポトーシス生存因子として作用する (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52)。

【0012】

他のインビトロ実験は、持続された暴露の間、ANG-2の効果が、アンタゴニストの効果からTie2のアンタゴニストに累進的に変化し、そして後の時点で、それが血管形成及び新生血管安定化に直接的に寄与できることを示唆している (Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70)。さらに、ECがフィブリンゲル上で培養される場合、ANG-2によるTie2の活性化がまた観察され、このことはたぶん、ANG-2の作用がEC分化状態に依存することを示唆する (Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70)。立体コラーゲンゲルにおいて培養される微小血管ECにおいて、ANG-2はまた、Tie2活性化を誘発し、そして毛管様構造の形成を促進することができる (Mochizuki, Y., et al., J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83)。

【0013】

血管成熟のインビトロモデルとしての3-D球状コカルチャーの使用は、ECと間葉細胞

10

20

30

40

50

との直接的接触がVEGFに対する応答性を取り消し、ところがVEGF及びANG-2の存在が発芽を誘発したことを示した (Korff, T., et al., *Faseb J.* 15 (2001) 447-57)。Etoh, T. H.などは、Tie2を構成的に発現するEC、すなわちMMP-1, -9及びu-PAの発現がVEGFの存在下でANG-2により強くアップレギュレートされたことを示した (Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53)。インビボ瞳孔膜モデルにより、Lobov, I.B.などは、内皮VEGFの存在下でのANG-2が毛管直径の急速な上昇、基板のリモデリング、内皮細胞の増殖及び移動を促進し、そして新規血管の発芽を刺激することを示した (Lobov, I.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 1 1205-10)。

【 0 0 1 4 】

対照的に、ANG-2は内皮細胞死及び血管退化を内皮VEGFを伴わないで促進する (Lobov, I.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 1 1205-10)。同様に、インビボ腫瘍モデルによれば、Vajkoczy, P.,などは、多細胞凝集物が宿主及び腫瘍内皮によるVEGF-R2及びANG-2の同時発現を通して血管由来の発芽により脈管成長を開始することを示した (Vajkoczy, P., et al., *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85)。このモデルは、増殖性腫瘍の確立された微小血管がVEGF及びANG-2の発現によりたぶん介在される連続リモデリングにより特徴づけられることを示した (Vajkoczy, P., et al., *J Clin. Invest.* 109 (2002) 777-85)。

【 0 0 1 5 】

Tie-2及びアンギオポエチン - 1 のノックアウトマウス研究は、類似する表現型を示し、そしてアンギオポエチン - 1 刺激されたTie-2リン酸化が成長血管のリモデリング及び安定化、脈管形成の間の血管成熟の促進、及び内皮細胞 - 支持細胞付着の維持を介在することを示唆する (Dumont, J., et al., *Genes & Development*, 8 (1994) 1897-1909; Sato, T.N., *Nature*, 376 (1995) 70-74; (Thurston, G., et al., *Nature Medicine*: 6 (2000) 460-463))。アンギオポエチン - 1 の役割は、それが広く及び構成的に発現される、成人に保存されると思われる (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., *Exp Neurology*, 159:391-400 (1999))。対照的に、アンギオポエチン - 2 の発現は、血管リモデリングの部位に主に制限され、ここでそれはアンギオポエチン - 1 の構成的に安定化又は成熟機能を阻止すると思われ、発芽シグナルに対して、より応答性であり得る塑性状態への血管の復帰及び存続を可能にする (Hanahan, D., 1997; Holash, J., et al., *Orzcogerze* 18 (199) 5356-62; Maisonpierre, P.C., 1997)。

【 0 0 1 6 】

病理学的脈管形成におけるアンギオポエチン - 2 発現の研究は、脈管アンギオポエチン - 2 発現を示すための多くの腫瘍型を見出した (Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60)。機能的な研究は、アンギオポエチン - 2 が腫瘍脈管形成に包含されることを示唆し、そしてマウス異種移植片モデルにおいて高められた腫瘍増殖とアンギオポエチン - 2 過剰発現とを関連づける (Ahmad, S.A., et al., *Cancer Res.*, 61 (2001) 12 55-1259)。他の研究は、腫瘍血管過剰とアンギオポエチン - 2 過剰発現とを関連づけた (Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 124-29)。

【 0 0 1 7 】

最近、アンギオポエチン - 1、アンギオポエチン - 2 及び/又はTie-2が、可能性ある抗癌治療標的物として提案されている。例えば、US 6,166,185号、US 5,650,490号及びUS 5,814,464号はそれぞれ、抗 - Tie-2リガンド及び受容体抗体を開示する。可溶性Tie-2を用いての研究は、齧歯類における腫瘍の数及びサイズを低めることを報告している (Lin, 1979; Lin 1998)。Siemeister, G., et al., *Cancer Res.* 59 (1999) 3185-91は、Tie-2の細胞外ドメインを発現するヒトメラノーマ細胞系を生成し、それらをヌードマウス中に注入し、そして腫瘍増殖及び腫瘍脈管形成の有意な阻害をもたらす可溶性Tie-2を報告している。

【 0 0 1 8 】

アンギオポエチン - 1 及びアンギオポエチン - 2 の両者がTie-2に結合する場合、アン

10

20

30

40

50

ギオボエチン - 1、アンギオボエチン又はTie-2が抗 - 癌治療のための魅力的な標的物であり得るかどうか、それらの研究から明確ではない。しかしながら、効果的な抗 - アンギオボエチン - 2 治療は、疾病、例えば癌の処理において有益であると思われ、この癌においては、その進行は、その工程の阻止が疾病の進行の阻止を導くことができる異常脈管形成に依存する (Follunan, J., Nature Medicine. 1 (1995) 27-31)。

【 0 0 1 9 】

さらに、いくつかのグループは、アンギオボエチン - 2 に対して結合する抗体及びペプチドの使用を報告している。例えば、US 6 166,185号及びUS 2003/10124129号、WO 03/03 0833号、WO 2006/068953号、WO 03/057134号又はUS 2006/0122370号を参照のこと。

【 0 0 2 0 】

アンギオボエチン - 2 の局限性発現の研究は、アンギオボエチン - 1 /Tie-2シグナルのアンタゴニズが堅い血管構造を弱め、それにより、脈管形成インデューサー、例えばVEGFからの活性化シグナルにECを暴露することを示している (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50)。アンギオボエチン - 1 の阻害に起因するこの前 - 血管由来の効果は、抗 - アンギオボエチン - 1 療法が効果的な抗癌処理でないことを示唆する。

【 0 0 2 1 】

ANG-2は、血管リモデリングが生じる部位で進行の間、発現される (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。成人においては、ANG-2発現は、脈管リモデリングの部位に、及び高く脈管形成された腫瘍、例えばグリオーマ (Osada, H., et al., Int. J. Oncol. 18 (2001) 305-09); Koga, K., et al., Cancer Res. 61 (2001) 6248-54)。肝細胞癌 (Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45)、胃癌 (Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H., et al. (商標) Int. J. Oncol. 18 (2001) 355-61)、甲状腺腫瘍 (Bunone, G., et al., Am J Pathol 155 (1999) 1967-76)、非小細胞肺癌 (Wong, M.P., et al., Lung Cancer 29 (2000) 11-22)、結腸癌 (Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43)、及び前立腺癌 (Wurmbach, J.H., et al., Anticancer Res. 20 (2000) 5217-20) に制限される。

【 0 0 2 2 】

いくつかの腫瘍細胞がANG-2を発現することが見出されている。例えば、Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45は、ヒト肝細胞癌 (HCC) の12の検体のうち10にANG-2 mRNAを検出した。Ellisのグループは、ANG-2が腫瘍上皮において偏在して発現されることを報告する (Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43)。他の研究者は類似する発現を報告している (Chen, L., et al., J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-35)。保存されたヒト乳癌検体におけるANG-2 mRNAを発現することにより、Sfiligoi, C., et al., Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74は、ANG-2 mRNAが補助リンパ節侵襲、短い疾病のない時間、及び、良好でない全体の生存性に有意に関連されることを報告している。Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29は、それぞれ、病理学的段階 - I ~ III Aにより非小細胞肺癌 (NSCLC) の合計236人の患者を再考した。

【 0 0 2 3 】

免疫組織化学法を用いて、彼らは、NSCLC患者の16.9%がANG-2陽性であったことを見出した。ANG-2陽性腫瘍についての微小血管密度は、ANG-2陰性のその密度よりも有意に高い。そのようなANG-2の血管由来の効果が、VEGF発現が高い場合のみ見出された。さらに、ANG-2の陽性発現は、不良な術後生存性を予測するための有意な要因であった (Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29)。しかしながら、彼らは、Ang-1発現と微小血管密度との間の有意な相互関係を見出さなかった (Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29)。それらの結果は、ANG-2がいくつかのタイプの癌を有する不良な予後患者のインジケーターであることを示唆する。

【 0 0 2 4 】

最近、ANG-2ノックアウトマウスモデルを用いて、Yancopoulosのグループは、ANG-2が生後脈管形成のために必要とされることを報告した (Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。彼らは、眼におけるガラス状脈管構造の発生的にプログラムされた後

10

20

30

40

50

退がANG-2ノックアウトマウスにおいて生じず、そしてそれらの網膜血管が網膜中心動脈から発芽するのに失敗したことを示した (Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。彼らはまた、ANG-2の欠失がリンパ脈管構造のパターン及び機能に深い欠陥をもたらすことを見出した (Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (200) 411-23)。Ang-1による遺伝子救済は、リンパ性欠陥を修正するが、しかし脈管形成欠陥を修正しない (Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23)。

【0025】

Peters及び彼の同僚は、可溶性Tie2が、組換えタンパク質として又はウィルス発現ベクターにおいて供給される場合、マウスモデルにおいてネズミ乳癌及びメラノーマのインビボ増殖を阻害したことを報告している (Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34; Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78)。そのような処理された腫瘍組織における血管密度が非常に低められた。さらに、可溶性Tie2は、腫瘍細胞ならし培地により刺激されたラット角膜における脈管形成を阻止した (Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78)。さらに、Isner及び彼のチームは、VEGFへのANG-2の付加がVEGF単独よりも有意に長く且つより周辺の新生血管形成化を促進したことを示した (Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40)。

【0026】

過剰の可溶性Tie2受容体は、ANG-2による、VEGF - 誘発された新生血管形成の調節を妨げた (Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40)。Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59 (1999) 3185-91は、異種移植片におけるFlt-1又はTie2のいずれかの細胞外リガンド結合ドメインの過剰発現が経路の有意な阻害をもたらすヌードマウス異種移植片が他のものによっては補正され得ず、このことは、VEGF受容体経路及びTie2経路がインビボ脈管形成の工程のために必須な2種の独立したメディエーターとして見なされるべきであることを示唆することを示した (Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91)。これは、White, R., R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33による、より最近の出版物により証明されている。それらの研究においては、ANG-2を特異的に結合し、そして阻害するヌクレアーゼ - 耐性RNAアプタマーが、ラット角膜マイクロポケット脈管形成モデルにおいてbFGFにより誘発された新生血管形成を有意に阻害したことが示された。

【0027】

二重特異的抗体：

広範囲の種類の組換え抗体形、例えばIgG抗体形及び単鎖ドメインの融合による四価の二重特異的抗体が最近、開発されて来た (例えば、Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; 及び Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234を参照のこと)。

【0028】

抗体コアー構造体 (IgA, IgD, IgE, IgG又はIgM)、例えば2又はそれ以上の抗原を結合することができる、ジア - 、トリア - 又はテトラポディー、ミニボディー、いくつかの単鎖形 (scF, Bis-scFv) がもはや保持されないいくつかの他の新規形が開発されている (Holliger, P., et al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

【0029】

すべてのそのような形は、追加の結合タンパク質 (例えば、scFv) に抗体コアー (IgA, IgD, IgE, IgG又はIgM) を融合するか、又は例えば2種のFabフラグメント又はscFvsを融合するためにリンカーを用いる (Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。天然に存在する抗体に対する高い程度の類似性を維持することにより、Fc受容体結合を通して介在される、エフェクター機能、例えば補体 - 依存性細胞毒性 (CDC) 又は抗体依存性細胞毒性 (ADCC) の保持が所望されることを心に留めるべきである。

【0030】

WO2007/024715号においては、構築された多価及び多特異的結合タンパク質として二重可変ドメイン免疫グロブリンが報告されている。生物学的活性抗体ダイマーの調製方法が、US6,897,044号に報告されている。ペプチドリinkerを通してお互い結合される少なくとも4種の変ドメインを有する多価Fv抗体構造体がUS7,129,330号に報告されている。二量体又は多量体の抗原結合構造体がUS2005/00079170号に報告される。そのタンパク質が天然の免疫グロブリンではない、結合構造体によりお互い共有結合される3又は4種のFabフラグメントを含んで成る三又は四価の単一特異的抗原結合タンパク質がUS6,511,663号に報告されている。

【0031】

WO2006/020258号においては、原核及び真核細胞において効果的に発現され得、そして治療及び診断方法において有用である四価の二重特異的抗体が報告されている。2種のタイプのポリペプチドダイマーを含んで成る混合物からの少なくとも1つの鎖間シスルフィド結合を通して結合されない少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合を通して結合されるダイマーの分離又は選択的合成方法がUS2005/0163782号に報告されている。二重特異的四価受容体がUS5,959,083号に報告されている。3又はそれ以上の機能的抗原結合部位を有する構築された抗体がWO2001/077342号に報告されている。

【0032】

多重特異的及び多価の抗原結合ポリペプチドがWO0997/001580号に報告されている。WO1992/004053号は、合成架橋により共有結合される同じ抗原決定基に結合するIgGクラスのものクローナル抗体から典型的には調製されるホモ接合体を報告する。抗原に対して高い結合活性を有するオリゴマー性モノクローナル抗体がWO1991/06305号に報告されており、それによれば、四価又は五価のIgG分子を形成するために一緒に結合される2又はそれ以上の免疫グロブリンモノマーを有する、典型的にはIgGクラスのオリゴマーが分泌される。

【0033】

インターフェロン 病原性である疾病を処理するために使用され得る、羊由来の抗体及び構築された抗体構造体がUS6,350,860号に報告されている。US2005/0100543号においては、二重特異的抗体の多価キャリアーである、すなわち標的可能な構造体の個々の分子が2又はそれ以上の特異的抗体のキャリアーとして作用することができる、標的可能な構造体が報告されている。遺伝子的に構築された二重特異的四価抗体がWO1995/009917号に報告されている。WO2007/109254号においては、安定化されたscFvから成るか又はそれを含んで成る安定化された結合分子が報告されている。

【0034】

VEGF及びANG-2インヒビターの組合せ：

WO2007/068895号は、ANG-2アンタゴニスト及びVEGF、KDR及び/又はFLT1アンタゴニストの組合せを言及する。WO2007/089445号は、ANG-2及びVEGFインヒビター組合せを言及する。

【0035】

WO2003/106501号は、アンギオポエチンに結合し、そして多量体化ドメインを含む融合タンパク質を言及する。WO2008/132568号は、アンギオポエチン及びVEGFに結合する融合タンパク質を言及する。

【発明の概要】

【0036】

本発明の第1の観点は、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びヒトアンギオポエチン2(ANG-2)に対して特異的に結合する、ヒトVEGFに対して特異的に結合する第1抗原結合部位及びヒトアンギオポエチン2(ANG-2)に対して特異的に結合する第2抗原結合部位を含んで成る二重特異的抗体である。

【0037】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ1対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメイン

10

20

30

40

50

であり；

【0038】

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1、配列番号：9、配列番号：17、又は配列番号：94のCDR3領域、配列番号：2、配列番号：10、配列番号：18、又は配列番号：95のCDR2領域、及び配列番号：3、配列番号：11、配列番号：19、又は配列番号：96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4、配列番号：12、配列番号：20、又は配列番号：97のCDR3領域、配列番号：5、配列番号：13、配列番号：21、又は配列番号：98のCDR2領域、及び配列番号：6、配列番号：14、配列番号：22、又は配列番号：99のCDR1領域を含んで成り；

【0039】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：25、配列番号：38、配列番号：46、配列番号：54、配列番号：62、配列番号：70、配列番号：78、又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：26、配列番号：39、配列番号：47、配列番号：55、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：79、又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：27、配列番号：40、配列番号：48、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：80、又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：28、配列番号：28 (T92L、H93Q及びW94Tの突然変異を有する)、配列番号：41、配列番号：49、配列番号：57、配列番号：65、配列番号：73、配列番号：81、又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：29、配列番号：42、配列番号：50、配列番号：58、配列番号：66、配列番号：74、配列番号：82又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：30、配列番号：43、配列番号：51、配列番号：59、配列番号：67、配列番号：75、配列番号：83、又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0040】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ1対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインであり；

【0041】

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1のCDR3領域、配列番号：2のCDR2領域、及び配列番号：3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4のCDR3領域、配列番号：5のCDR2領域、及び配列番号：6のCDR1領域を含んで成り；又は

【0042】

VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：9のCDR3領域、配列番号：10のCDR2領域、及び配列番号：11のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：12のCDR3領域、配列番号：13のCDR2領域、及び配列番号：14のCDR1領域を含んで成り；又は

【0043】

VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：17のCDR3領域、配列番号：18のCDR2領域、及び配列番号：19のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：20のCDR3領域、配列番号：21のCDR2領域、及び配列番号：22のCDR1領域を含んで成り；そして

【0044】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：25のCDR3領域、配列番号：26のCDR2領域、及び配列番号：27のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：28のCDR3領域、又は突然変異T92L、H93Q及びW94Tを有する配列番号：28、配列番号：29のCDR2領域、及び配列番号：30のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0045】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ1対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインであり；

【0046】

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:7、配列番号:15、配列番号:23、又は配列番号:100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:8、配列番号:16、配列番号:24、又は配列番号:101を含んで成り；そして

【0047】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:31、配列番号:44、配列番号:52、配列番号:60、配列番号:68、配列番号:76、配列番号:84、又は配列番号:92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:32、突然変異T92L、H93Q及びW94Tを有する配列番号:32、配列番号:45、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:69、配列番号:77、配列番号:85、又は配列番号:93を含んで成ることにより特徴づけられる。

10

【0048】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:1又は配列番号:94のCDR3領域、配列番号:2又は配列番号:95のCDR2領域、及び配列番号:3又は配列番号:96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:4又は配列番号:97のCDR3領域、配列番号:5又は配列番号:98のCDR2領域、及び配列番号:6又は配列番号:99のCDR1領域を含んで成り；

20

【0049】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:38、配列番号:46、配列番号:54、配列番号:62、配列番号:70、配列番号:78、又は配列番号:86のCDR3領域、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:55、配列番号:63、配列番号:71、配列番号:79、又は配列番号:87のCDR2領域、及び配列番号:40、配列番号:48、配列番号:56、配列番号:64、配列番号:72、配列番号:80、又は配列番号:88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:41、配列番号:49、配列番号:57、配列番号:65、配列番号:73、配列番号:81、又は配列番号:89のCDR3領域、配列番号:42、配列番号:50、配列番号:58、配列番号:66、配列番号:74、配列番号:82又は配列番号:90のCDR2領域、及び配列番号:43、配列番号:51、配列番号:59、配列番号:67、配列番号:75、配列番号:83、又は配列番号:91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

30

【0050】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:7又は配列番号:100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:8又は配列番号:101を含んで成り；そして

【0051】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:44、配列番号:52、配列番号:60、配列番号:68、配列番号:76、配列番号:84、又は配列番号:92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:45、配列番号:53、配列番号:61、配列番号:69、配列番号:77、配列番号:85、又は配列番号:93を含んで成ることにより特徴づけられる。

40

【0052】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:38、配列番号:46、配列番号:54、配列番号:62、配列番号:70、配列番号:78、又は配列番号:86のCDR3領域、配列番号:39、配列番号:47、配列番号:55、配列番号:63、配列番号:71、配列番号:79、又は配列番号:87のCDR2領域、及

50

び配列番号：40、配列番号：48、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：80、又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：41、配列番号：49、配列番号：57、配列番号：65、配列番号：73、配列番号：81、又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：42、配列番号：50、配列番号：58、配列番号：66、配列番号：74、配列番号：82又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：43、配列番号：51、配列番号：59、配列番号：67、配列番号：75、配列番号：83、又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0053】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

iii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：44、配列番号：52、配列番号：60、配列番号：68、配列番号：76、配列番号：84、又は配列番号：92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：45、配列番号：53、配列番号：61、配列番号：69、配列番号：77、配列番号：85、又は配列番号：93を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0054】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1のCDR3領域、配列番号：2のCDR2領域、及び配列番号：3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4のCDR3領域、配列番号：5のCDR2領域、及び配列番号：6のCDR1領域を含んで成り；そして

【0055】

iii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：46のCDR3領域、配列番号：47のCDR2領域、及び配列番号：48のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：49のCDR3領域、配列番号：50のCDR2領域、及び配列番号：51のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0056】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8を含んで成り；

iii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：52、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：53を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0057】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1又は配列番号：94のCDR3領域、配列番号：2又は配列番号：95のCDR2領域、及び配列番号：3又は配列番号：96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4又は配列番号：97のCDR3領域、配列番号：5又は配列番号：98のCDR2領域、及び配列番号：6又は配列番号：99のCDR1領域を含んで成り；

【0058】

iii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：62又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：63又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：64又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：65又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：66又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：67又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0059】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7又は配列番号：100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8又は配列番号：101を含んで成り；そして

【 0 0 6 0 】

iii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:68又は配列番号:92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:69又は配列番号:93を含んで成ることにより特徴づけられる。

【 0 0 6 1 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号: 1のCDR3領域、配列番号: 2のCDR2領域、及び配列番号:3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号: 4のCDR3領域、配列番号:5のCDR2領域、及び配列番号:6のCDR1領域を含んで成り；

10

【 0 0 6 2 】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:62のCDR3領域、配列番号:63のCDR2領域、及び配列番号:64のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:65の CDR3領域、配列番号:66の CDR2領域、及び配列番号:67の CDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【 0 0 6 3 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:7、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号: 8を含んで成り；

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:68、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号: 69を含んで成ることにより特徴づけられる。

20

【 0 0 6 4 】

前記二重特異的抗体は少なくとも二価であり、そして三価、四価又は多価であり得る。好ましくは、本発明の二重特異的抗体は、二価、三価又は四価である。

【 0 0 6 5 】

本発明のさらなる観点とは、前記二重特異的抗体の鎖をコードする核酸分子である。

本発明はさらに、原核又は真核宿主細胞において前記核酸を発現できる本発明の核酸を含む発現ベクター、及び本発明の抗体の組換え生成のためのそのようなベクターを含む宿主細胞を供給する。

30

本発明はさらに、本発明のベクターを含んで成る原核又は真核宿主細胞を含んで成る。

【 0 0 6 6 】

本発明はさらに、原核又は真核宿主細胞において本発明の核酸を発現し、そして前記細胞又は細胞培養上清液から前記二重特異的抗体を回収することを特徴とする、本発明の二重特異的抗体の生成方法を含んで成る。本発明はさらに、そのような組換え方法により得られた抗体を含んで成る。

【 0 0 6 7 】

本発明のさらなる観点とは、前記二重特異的抗体を含んで成る医薬組成物、癌の処理のための前記組成物、癌の処理のための薬物の製造のためへの前記二重特異的抗体の使用、及び癌処理の必要な患者に前記二重特異的抗体を投与することによるそのような患者の処理方法である。

40

【 0 0 6 8 】

本発明の二重特異的抗体は、VEGF及びANG-2標的化療法の必要なヒト患者のための有益性を示す。本発明の抗体は、そのような疾病、特に癌を有する患者のための有益性を引き起す新規及び進歩的性質を有する。驚くべきことには、本発明の二重特異的抗体が、それぞれの単一特異的抗体の組合せに比較して、腫瘍増殖及び/又は腫瘍脈管形成の阻害においてより効果的であることが見出された。

【 0 0 6 9 】

発明の特定の記載：

発明の 1 つの態様は、ヒトVEGF、及びヒトVEGFに対して特異的に結合する第 1 抗原結合

50

部位及びヒトANG-2に対して特異的に結合する第2抗原結合部位を含んで成るヒトANG-2に対して特異的に結合する二重特異的抗体であり、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ1対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインであり；

【0070】

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1、配列番号：9、配列番号：17、又は配列番号：94のCDR3領域、配列番号：2、配列番号：10、配列番号：18、又は配列番号：95のCDR2領域、及び配列番号：3、配列番号：11、配列番号：19、又は配列番号：96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4、配列番号：12、配列番号：20、又は配列番号：97のCDR3領域、配列番号：5、配列番号：13、配列番号：21、又は配列番号：98のCDR2領域、及び配列番号：6、配列番号：14、配列番号：22、又は配列番号：99のCDR1領域を含んで成り；

【0071】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：25、配列番号：38、配列番号：46、配列番号：54、配列番号：62、配列番号：70、配列番号：78、又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：26、配列番号：39、配列番号：47、配列番号：55、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：79、又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：27、配列番号：40、配列番号：48、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：80、又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：28、配列番号：28 (T92L、H93Q及びW94Tの突然変異を有する)、配列番号：41、配列番号：49、配列番号：57、配列番号：65、配列番号：73、配列番号：81、又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：29、配列番号：42、配列番号：50、配列番号：58、配列番号：66、配列番号：74、配列番号：82又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：30、配列番号：43、配列番号：51、配列番号：59、配列番号：67、配列番号：75、配列番号：83、又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0072】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ1対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインであり；

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1のCDR3領域、配列番号：2のCDR2領域、及び配列番号：3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4のCDR3領域、配列番号：5のCDR2領域、及び配列番号：6のCDR1領域を含んで成り；又は

【0073】

VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：9のCDR3領域、配列番号：10のCDR2領域、及び配列番号：11のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：12のCDR3領域、配列番号：13のCDR2領域、及び配列番号：14のCDR1領域を含んで成り；又は

【0074】

VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：17のCDR3領域、配列番号：18のCDR2領域、及び配列番号：19のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：20のCDR3領域、配列番号：21のCDR2領域、及び配列番号：22のCDR1領域を含んで成り；そして

【0075】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：25のCDR3領域、配列番号：26のCDR2領域、及び配列番号：27のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：28のCDR3領域、又は突然変異T92L、H93Q及びW94Tを有する配列番号：28、配列番号：29のCDR2領域、及び配列番号：30のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【 0 0 7 6 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

i) 前記抗原結合部位がそれぞれ 1 対の抗体H鎖可変ドメイン及び抗体L鎖可変ドメインであり；

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7、配列番号：15、配列番号：23、又は配列番号：100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8、配列番号：16、配列番号：24、又は配列番号：101を含んで成り；そして

【 0 0 7 7 】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：31、配列番号：44、配列番号：52、配列番号：60、配列番号：68、配列番号：76、配列番号：84、又は配列番号：92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：32、突然変異T92L、H93Q及びW94Tを有する配列番号：32、配列番号：45、配列番号：53、配列番号：61、配列番号：69、配列番号：77、配列番号：85、又は配列番号：93を含んで成ることにより特徴づけられる。

10

【 0 0 7 8 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1又は配列番号：94のCDR3領域、配列番号：2又は配列番号：95のCDR2領域、及び配列番号：3又は配列番号：96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4又は配列番号：97のCDR3領域、配列番号：5又は配列番号：98のCDR2領域、及び配列番号：6又は配列番号：99のCDR1領域を含んで成り；

20

【 0 0 7 9 】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：38、配列番号：46、配列番号：54、配列番号：62、配列番号：70、配列番号：78、又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：39、配列番号：47、配列番号：55、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：79、又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：40、配列番号：48、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：80、又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：41、配列番号：49、配列番号：57、配列番号：65、配列番号：73、配列番号：81、又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：42、配列番号：50、配列番号：58、配列番号：66、配列番号：74、配列番号：82又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：43、配列番号：51、配列番号：59、配列番号：67、配列番号：75、配列番号：83、又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

30

【 0 0 8 0 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第 1 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7又は配列番号：100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8又は配列番号：101を含んで成り；そして

【 0 0 8 1 】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：44、配列番号：52、配列番号：60、配列番号：68、配列番号：76、配列番号：84、又は配列番号：92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：45、配列番号：53、配列番号：61、配列番号：69、配列番号：77、配列番号：85、又は配列番号：93を含んで成ることにより特徴づけられる。

40

【 0 0 8 2 】

本発明の 1 つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第 2 抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：38、配列番号：46、配列番号：54、配列番号：62、配列番号：70、配列番号：78、又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：39、配列番号：47、配列番号：55

50

、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：79、又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：40、配列番号：48、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：80、又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：41、配列番号：49、配列番号：57、配列番号：65、配列番号：73、配列番号：81、又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：42、配列番号：50、配列番号：58、配列番号：66、配列番号：74、配列番号：82又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：43、配列番号：51、配列番号：59、配列番号：67、配列番号：75、配列番号：83、又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0083】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：44、配列番号：52、配列番号：60、配列番号：68、配列番号：76、配列番号：84、又は配列番号：92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：45、配列番号：53、配列番号：61、配列番号：69、配列番号：77、配列番号：85、又は配列番号：93を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0084】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1のCDR3領域、配列番号：2のCDR2領域、及び配列番号：3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4のCDR3領域、配列番号：5のCDR2領域、及び配列番号：6のCDR1領域を含んで成り；そして

【0085】

iii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：46のCDR3領域、配列番号：47のCDR2領域、及び配列番号：48のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：49のCDR3領域、配列番号：50のCDR2領域、及び配列番号：51のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0086】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8を含んで成り；

iii)ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：52、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：53を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0087】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：1又は配列番号：94のCDR3領域、配列番号：2又は配列番号：95のCDR2領域、及び配列番号：3又は配列番号：96のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：4又は配列番号：97のCDR3領域、配列番号：5又は配列番号：98のCDR2領域、及び配列番号：6又は配列番号：99のCDR1領域を含んで成り；

【0088】

iii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号：62又は配列番号：86のCDR3領域、配列番号：63又は配列番号：87のCDR2領域、及び配列番号：64又は配列番号：88のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号：65又は配列番号：89のCDR3領域、配列番号：66又は配列番号：90のCDR2領域、及び配列番号：67又は配列番号：91のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0089】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii)VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号：7又は配列番号：100、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号：8又は配列番号：1

10

20

30

40

50

01を含んで成り；そして

【0090】

iii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:68又は配列番号:92、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:69又は配列番号:93を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0091】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:1のCDR3領域、配列番号:2のCDR2領域、及び配列番号:3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:4のCDR3領域、配列番号:5のCDR2領域、及び配列番号:6のCDR1領域を含んで成り；

10

【0092】

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:62のCDR3領域、配列番号:63のCDR2領域、及び配列番号:64のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:65のCDR3領域、配列番号:66のCDR2領域、及び配列番号:67のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0093】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:7、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:8を含んで成り；

20

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:68、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:69を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0094】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:1のCDR3領域、配列番号:2のCDR2領域、及び配列番号:3のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:4のCDR3領域、配列番号:5のCDR2領域、及び配列番号:6のCDR1領域を含んで成り；

【0095】

30

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインに、配列番号:78のCDR3領域、配列番号:79のCDR2領域、及び配列番号:80のCDR1領域、及びL鎖可変ドメインに、配列番号:81のCDR3領域、配列番号:82のCDR2領域、及び配列番号:83のCDR1領域を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0096】

本発明の1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、

ii) VEGFに対して特異的に結合する前記第1抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:7、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:8を含んで成り；

iii) ANG-2に対して特異的に結合する前記第2抗原結合部位が、H鎖可変ドメインとして、配列番号:84、及びL鎖可変ドメインとして、配列番号:85を含んで成ることにより特徴づけられる。

40

【0097】

本発明のもう1つの態様は、親抗-ANG-2抗体がヒトアンギオポエチン1(ANG-1)に対して特異的に結合しないことを特徴とする、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びヒトアンギオポエチン-2(ANG-2)に対して特異的に結合する二重特異的抗体である。ヒトANG-2に対しては特異的に結合するが、しかしヒトANG-1に対しては結合しない典型的な親抗体は例えば、Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、及び好ましくはAng2i_LC10又はAng2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10と同じエピトープに結合する抗体、好ましくはAng2i_LC06又はAng2i_LC10と同じエピトープに結合する抗体である。

50

【0098】

従って、本発明の1つの態様においては、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びヒトアンギオポエチン-2(ANG-2)に対しては特異的に結合するが、しかしヒトANG-1に対しては結合しない(又は親抗-ANG-2抗体はヒトアンギオポエチン1(ANG-1)に対して特異的に結合しない)二重特異的抗体は、Ang2s_R3_LC03、Ang2s_LC09、Ang2i_LC06、Ang2i_LC07、Ang2i_LC10と同じエピトープ、好ましくはAng2i_LC06又はAng2i_LC10と同じエピトープに結合する。

【0099】

そのような二重特異的抗体は、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びヒトアンギオポエチン-2(ANG-2)に対しては特異的に結合するが、しかしヒトANG-1に対して結合しない(又は親抗-ANG2抗体はヒトアンギオポエチン1(ANG-1)に対して特異的に結合しない)そのような二重特異的抗体は、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びアンギオポエチン-2(ANG-2)並びにヒトANG-1に対して特異的に結合する二重特異的抗体と比較して、改良された性質、例えば生物学的又は薬理学的活性、低い毒性又は薬物力学的プロファイルを有することができる。

【0100】

従って、好ましい態様は、VEGF、及びヒトVEGFに対して特異的に結合する第1抗原結合部位及びヒトANG-2に対して特異的に結合する第2抗原結合部位を含んで成るヒトANG-2に対して特異的に結合する二重特異的抗体であり、ここで前記第2抗原-結合部位はヒトアンギオポエチン1(ANG-1)に対して特異的に結合しないことを特徴とする。

【0101】

本発明の1つの態様は、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)、及びヒトVEGFに対して特異的に結合する第1抗原結合部位及びヒトアンギオポエチン2(ANG-2)に対して特異的に結合する第2抗原結合部位を含んで成るヒトANG-2に対して特異的に結合する二重特異的抗体であり、ここでKD(VEGFに対して特異的な抗原結合部位)/KD(ANG-2に対して特異的な抗原結合部位)の結合親和性比が1.0~10.0、好ましくは1.5~8.0(1つの態様においては、5.0~8.0)であり、そして好ましくは、絶対KD値は 10^{-8} ~ 10^{-13} モル/lの範囲にあることを特徴とする。KD値は、ANG-2/VEGF結合BIACOREにおいて決定される(例2及び図15Aを参照のこと)。

【0102】

タンパク質ヒトVEGF及びヒトANG-2の両者はほぼ同じ濃度でヒト血清に可溶性受容体リガンドとして存在するので、KD(VEGFに対して特異的な抗原結合部位)/KD(ANG-2に対して特異的な抗原結合部位)の結合親和性比が1.0~10.0、好ましくは1.5~8.0、及び1つの態様においては、5.0~8.0であることを特徴とする二重特異的抗体による前記両受容体リガンドの阻止は、そのような二重特異的抗体による癌又は血管疾患の処理の間、抗-血管由来の効果、腫瘍増殖阻害又は耐性機構に関する改良された性質を導くことができる。

【0103】

好ましくは、前記二重特異的抗体は、KD(VEGFに対して特異的な抗原結合部位)/KD(ANG-2に対して特異的な抗原結合部位)の結合親和性比が1.0~10.0、好ましくは1.5~8.0(1つの態様においては、5.0~8.0)であることにより特徴づけられ、そして前記二重特異的抗体は、VEGFに対して特異的に結合する第1抗原結合部位として、配列番号:7のH鎖可変ドメイン及び配列番号:8のL鎖可変ドメインを、ANG-2に対して特異的に結合する第2抗原結合部位として、a)配列番号:52のH鎖可変ドメイン及び配列番号:53のL鎖可変ドメイン、又はb)配列番号:84のH鎖可変ドメイン、及び配列番号85のL鎖可変ドメインを含んで成ることにより特徴づけられる。

【0104】

本明細書において使用される場合、“抗体”とは、抗原結合部位を含んで成る結合タンパク質を言及する。用語“結合部位”又は“抗原結合部位”とは、本明細書において使用される場合、リガンドが実際結合する抗体分子の領域を示す。用語“抗原結合部位”とは、抗体H鎖可変ドメイン(VH)及び/又は抗体L鎖可変ドメイン(VL)、又はVH/VL対を含み

10

20

30

40

50

、そして完全な抗体、又は抗体フラグメント、例えば単鎖Fv、VHドメイン及び/又はVLドメイン、Fab又は(Fab)₂から誘導され得る。本発明の1つの態様においては、抗原結合部位の個々の抗体H鎖可変ドメイン(VH)及び/又は抗体L鎖可変ドメイン(VL)を含んで成り、そして好ましくは、抗体L鎖可変ドメイン(VL)及び抗体H鎖可変ドメイン(VH)から成る対により形成される。

【0105】

ヒト血管内皮成長因子(VEGF)に対して特異的に結合する、抗原結合部位、及び特にH鎖可変ドメイン(VH)及び/又は抗体L鎖可変ドメイン(VL)は、a)既知の抗-VEGF抗体(例えば、Kim et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, R.S., et al., J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; Melnyk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924)、WO 94/10202号、WO 98/45332号、WO 2005/00900号、WO 00/35956号及びUS 2007/0141065号)から、又はb)中でも、ヒトVEGFタンパク質又は核酸、又はそのフラグメントを用いるデノボ免疫化方法により、又はファージ表示により得られる新規抗-VEGF抗体から誘導され得る。

【0106】

抗原結合部位、及びヒトアンギオポエチン-2(ANG-2)に対して特異的に結合する、特にH鎖可変ドメイン(VH)及び/又は抗体鎖可変ドメイン(VL)は、a)既知抗体-ANG-2抗体(例えば、WO 03/030833号、WO 2006/068953号、WO 2006/045049号、又はUS 6,166,185号);又はb)中でも、ヒトVEGFタンパク質又は核酸、又はそのフラグメントを用いるデノボ免疫化方法により、又はファージ表示により得られる新規抗-VEGF抗体から誘導され得る。

【0107】

抗体特異性は、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を言及する。例えば、天然の抗体は、単一特異的である。

【0108】

本発明の“二重特異的抗体”は、2種の異なった抗原結合特異性を有する抗体である。抗体が1つよりも多くの特異性を有する場合、その認識されるエピトープは、単一の抗原又は1つよりも多くの抗原により結合され得る。本発明の抗体は、2種の異なった抗原、すなわち第1の抗原としてのVEGF及び第2の抗原としてのANG-2に対して特異的である。

【0109】

用語“単一特異的”抗体とは、本明細書において使用される場合、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する、1又は複数の結合部位を有する抗体を示す。

【0110】

用語“価”とは、本出願内で使用される場合、抗体分子における特定数の結合部位の存在を示す。用語、“二価”、“四価”及び“六価”は、抗体分子において、それぞれ2個の結合部位、4個の結合部位及び6個の結合部位の存在を示す。本発明の二重特異的抗体は、少なくとも“二価”であり、そして“三価”又は“多価”(例えば、“四価”又は“六価”)であり得る。好ましくは、本発明の二重特異的抗体は、二価、三価又は四価である。1つの態様においては、前記二重特異的抗体は二価である。1つの態様においては、前記二重特異的抗体は三価である。1つの態様においては、前記二重特異的抗体は四価である。

【0111】

本発明の抗体は、2又はそれ以上の結合部位を有し、そして二重特異性である。すなわち、この抗体は、2つ以上の結合部位(すなわち、抗体は三価又は多価である)が存在する場合でさえ、二重特異的であり得る。本発明の二重特異的抗体は例えば、多価の単鎖抗体、ジアボディー及びトリアボディー、並びにさらなる抗原結合部位(例えば、単鎖Fv、VHドメイン及び/又はVLドメイン、Fab、又は(Fab)₂)が1又は複数のペプチド-リンカーを通して結合されている、十分な長さの抗体の不変ドメインを有する抗体を包含する。抗体は、単一の種からの十分な長さであり得、又はキメラ化が又はヒト適合され得る。2つ以上の抗原結合部位を有する抗体に関して、いくつかの結合部位は、タンパク質が2つの

異なった抗原のための結合部位を有する限り、同一であり得る。すなわち、第1の結合部位はVEGFに対して特異的であり、第2の結合部位はANG-2に対して特異的であり、そして逆もまた同様である。

【0112】

ヒト血管内皮成長因子 (VEGF/VEGF-A) (配列番号: 105) は、例えば Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 及び Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24 に記載されている。VEGF は、腫瘍及び眼内疾患に関連する、正常及び異常脈管形成及び新生脈管形成の調節に関与される (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; 及び Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039)。VEGF は、いくつかの源から単離されたホモダイマー糖タンパク質である。VEGF は、内皮細胞についての特定のミトジェン活性を示す。

【0113】

ヒトアンギオポエチン - 2 (ANG-2) (他方では、ANGPT2 又は ANG2 により簡略される) (配列番号: 106) は、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 及び Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91 に記載される。アンギオポエチン - 1 及び - 2 (ANG-1 (配列番号: 107) 及び ANG-2 (配列番号: 106)) は、Ties, すなわち血管内皮内で選択的に発現されるチロシンキナーゼのファミリーについてのリガンドとして発現された (Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48)。現在、アンギオポエチンファミリーの4種の決定的なメンバーが存在する。アンギオポエチン - 3 及び - 4 (Ang-3 及び Ang-4) は、マウス及びヒトにおいて同じ遺伝子座の広く分岐されたカウンターパートを表すことができる (Kim, I., et al., FEBS Lett. 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28)。

【0114】

ANG-1 及び ANG-2 はそれぞれ、アゴニスト及びアンタゴニストとして組織培養実験において元々同定された (ANG-1 については、Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 161-69; 及び ANG-2 については、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 を参照のこと)。既知アンギオポエチンのすべては主に、Tie2 に結合し、そして Ang-1 及び - 2 の両者は 3nM の親和性 (Kd) を伴って Tie2 に結合する (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。

【0115】

本発明の抗体の抗原結合部位は、抗原のための結合部位の親和性に種々の程度、寄与する6個の相補性決定領域 (CDR) を含むことができる。3種のH鎖可変ドメイン CDR (CDRH1, CDRH2 及び CDRH3) 及び3種のL鎖可変ドメイン CDR (CDRL1, CDRL2 及び CDRL3) が存在する。CDR 及び骨格領域 (FR) の程度は、それらの領域が配列間の変動性に従って定義されたアミノ酸配列の編集されたデータベースへの比較により決定される。少数の CDR から成る機能的抗原結合部位 (すなわち、ここで結合特異性が3, 4 又は5個の CDR により決定される) は、本発明の範囲内にまた包含される。例えば、完全な組以下の6個の CDR が結合のために十分であり得る。ある場合、VH 又は VL ドメインが十分であろう。

【0116】

一定の態様において、本発明の抗体はさらに、1 又は複数の免疫グロブリンクラスの免疫グロブリン不変領域を含んで成る。免疫グロブリンクラスは、IgG, IgM, IgA, IgD 及び IgE イソタイプ、及び IgG 及び IgA の場合、それらのサブタイプを包含する。好ましい態様においては、本発明の抗体は、IgG タイプ抗体の不変ドメイン構造体を有し、そして4種の抗原結合部位を有する。これは、例えば ANG-2 に対して特異的に結合する完全な抗体の N - 又は C - 末端 H 又は L 鎖のいずれかに、VEGF に対して特異的に結合する2種の完全な抗原結合部位 (例えば、単鎖 Fv) を結合することにより達成される。他方では、これは、VEGF に対して特異的に結合する完全な抗体の C - 末端 H 鎖に、ANG-2 に対して特異的に結合する

2種の完全な結合ペプチドを融合することにより達成される。それらの4個の抗原結合部位は好ましくは、2種の異なった結合特異性の個々のために2つの抗原結合を含んで成る。

【0117】

用語“モノクローナル抗体”又は“モノクローナル抗体組成物”とは、本明細書において使用される場合、単一のアミノ酸組成の抗体分子の調製物を意味する。

【0118】

用語“キメラ抗体”とは、通常組換えDNA技法により調製される、可変領域、すなわち1つの源又は種からの結合領域、及び異なった源又は種に由来する不変領域の少なくとも一部を含んで成る抗体を言及する。ネズミ可変領域及びヒト不変領域を含んで成るキメラ抗体が好ましい。本発明により包含される他の形の“キメラ抗体”は、不変領域が、特にC1q結合及び/又はFc受容体(FcR)結合に関して、本発明の性質を生成するために、修飾されているか、又は元の抗体のその領域から変更されているそれらの抗体である。

【0119】

そのようなキメラ抗体はまた、“クラス-スイッチ抗体”としても言及される。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメント、及び免疫グロブリン不変領域をコードするDNAセグメントを含んで成る、発現された免疫グロブリン遺伝子の生成物である。キメラ抗体を生成するための方法は、当業界において現在良く知られている、従来の組換えDNA及び遺伝子トランスフェクション技法を包含する。例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; アメリカ特許第5,202,238号 及びアメリカ特許第5,204,244号を参照のこと。

【0120】

用語“ヒト適合された抗体”とは、その骨格又は“相補性決定領域”(CDR)が、親イムノグロブリンのCDRに比較して、異なった特異性の免疫グロブリンのCDRを含んで成るよう修飾されている抗体を言及する。好ましい態様においては、ネズミCDRは、“ヒト適合された抗体”を調製するために、ヒト抗体の骨格領域中に移植される。例えば、Riechman, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270を参照のこと。特に好ましいCDRは、キメラ抗体に関して上記に示される抗原を認識する配列を表すそれらに対応する。本発明により包含される他の形の“ヒト適合された抗体”とは、不変領域が、特にC1q結合及び/又はFc受容体(FcR)結合に関して、本発明の性質を生成するために、さらに修飾されているか、又は元の抗体のその領域から変更されているそれらの抗体である。

【0121】

用語“ヒト抗体”とは、本明細書において使用される場合、ヒト生殖系免疫グロブリン配列に由来する可変及び不変領域を有する抗体を包含することを意図する。ヒト抗体は技術的に良く知られている(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374)。ヒト抗体はまた、免疫化に基づいて、内因性免疫グロブリン生成の不在下で十分なレパートリー又は選択のヒト抗体を生成できるトランスジェニック動物(例えば、マウス)においても生成され得る。そのような生殖系変異体マウスにおけるヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイのトランスファーは、抗原攻撃に基づくヒト抗体の生成をもたらすであろう(例えば、Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照のこと)。

【0122】

ヒト抗体はまた、ファージ表示ライブラリーにおいても生成され得る(Hoogenboom, H. R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。Cole, など., 及びBoerner, など.の技法はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のためにも利用できる(Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); 及び Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991)86-95)。本発明のキメラ及びヒト適合された抗体についてすでに

言及されたように、用語“ヒト抗体”とは、本明細書において使用される場合、また、特にC1q結合及び/又はFcR結合に関して、例えばFc部分の“クラススイッチ”、すなわち変更又は突然変異誘発（IgG1からIgG4への及び/又はIgG1/IgG4突然変異）により、本発明の性質を生成するために不変領域において修飾されているそのような抗体も含んで成る。

【0123】

用語“組換えヒト抗体”とは、本明細書において使用される場合、組換え手段により調製され、発現され、創造され、又は単離されるすべてのヒト抗体、例えば宿主細胞、例えばNSO又はCHO細胞から又はヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスゲニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、又は宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現された抗体を意味する。そのような組換えヒト抗体は、転位された形で、可変及び不変領域を有する。本発明の組換えヒト抗体は、インビボ体細胞超突然変異にゆだねられている。従って、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系VH及びVL領域に由来し、そしてその配列に関連しているが、天然においては、ヒト抗体生殖系レパートリー内にインビボで存在することができない配列である。

【0124】

“可変ドメイン”（L鎖の可変領域（VL）、H鎖の可変領域（VH））は、本明細書において使用される場合、抗原への抗体の結合において直接関与するL鎖及びH鎖の対の個々を示す。ヒト可変L及びH鎖のドメインは、同じ一般構造を有し、そして個々のドメインは4個の骨格（FR）領域を含んで成り、それらの配列は広く保存され、3個の“超可変領域”（又は相補性決定領域、CDR）により結合される。骨格領域は、 β -シートコンホメーションを採用し、そしてCDRは β -シート構造体を結合するループを形成することができる。個々の鎖におけるCDRは、骨格領域によりそれらの立体構造を保持され、そして他の鎖からのCDRと共に抗原結合部位を形成する。抗体H及びL鎖CDR3領域は、本発明の抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を演じ、そして従って、本発明のさらなる目的を提供する。

【0125】

用語“超可変領域”又は“抗体の抗原-結合部分”とは、本明細書において使用される場合、抗原結合を担当できる抗体のアミノ酸残基を言及する。超可変領域は“相補性決定領域”又は“CDR”からのアミノ酸残基を含んで成る。“骨格”又は“FR”領域は、本明細書において定義されるように超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン領域である。従って、抗体のL鎖及びH鎖は、N-末端からC-末端の方に、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含んで成る。個々の鎖上のCDRはそのような骨格アミノ酸により分離される。特に、H鎖のCDR3は、ほとんど抗原結合に寄与する領域である。CDR及びFR領域は、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の標準の定義に従って決定される。

【0126】

本発明の二重特異的抗体はさらに、“保存性配列修飾”（二重特異的抗体の“変異体”を意味する）を有するそのような抗体を包含する。これは、本発明の抗体の上記に記載された特徴に影響を及ぼさないか又は変更しないヌクレオチド及びアミノ酸配列修飾を意味する。修飾は、当業界において知られている標準技法、例えば部位特異的突然変異及びPCR-介在性突然変異誘発により導入され得る。保存性アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似する側鎖を有するアミノ酸残基により置換されるそのような置換を包含する。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当業界において定義されている。

【0127】

それらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、荷電されていない極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 β -枝分れ側鎖（例えば、トレオニン、バリ

10

20

30

40

50

ン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を包含する。従って、二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体における予測される非必須アミノ酸残基は好ましくは、同じ側鎖ファミリーからのもう1つのアミノ酸残基により置換される。

【0128】

従って、“変異”二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体は、親抗体の1又は複数の可変領域又は不変領域において、10個までの、好ましくは約2～約5個の付加、欠失及び/又は置換により、“親”二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体アミノ酸配列とは、アミノ酸配列において異なる分子を言及する。アミノ酸置換は、Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 and Queen, C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033により記載されるように、分子モデリングに基づく突然変異誘発により実施され得る。本発明の“変異”二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体はまた、リンカー（存在するなら）が変性されるか、又はもう1つのリンカーにより置換された二重特異的抗体形式も包含する。

【0129】

本明細書において使用される場合、用語“結合する”又は“特異的に結合する”とは、精製された野生型抗原を用いて、インビトロアッセイ、好ましくはプラスモン共鳴アッセイ（BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden）（例2）において、抗原のエピトープ（ヒトVEGF又はヒトANG-2）への抗体の結合を言及する。結合の親和性は、用語 k_a （抗体/抗原複合体からの抗体の結合についての速度定数）、 k_D （解離定数）及び K_D （ k_D/k_a ）により定義される。結合又は特異的結合とは、 10^{-8} モル/l又はそれ以下、好ましくは 10^{-9} M～ 10^{-13} モル/lの結合親和性（ K_D ）を意味する。

【0130】

Fc RIII への抗体の結合が、BIAcore アッセイ（GE-Healthcare Uppsala, Sweden）により調べられ得る。結合の親和性は、用語 k_a （抗体/抗原複合体からの抗体の結合についての速度定数）、 k_D （解離定数）及び K_D （ k_D/k_a ）により定義される。

本明細書において使用される場合、用語“ANG-1に結合しない”又は“ANA-1に対して特異的に結合しない”とは、抗体がインビトロANG-1結合ELISAアッセイにおいて8000ng/ml以上のEC50値を有することを示す（例9によれば）。

【0131】

用語“エピトープ”は、抗体に対して特異的に結合できるいずれかのポリペプチド決定因子を包含する。ある態様においては、エピトープ決定因子は、分子の化学的活性表面基、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリン又はスルホニルを包含し、そしてある態様においては、特定の立体構造特徴及び/又は特定の電荷特徴を有することができる。エピトープは抗体により結合される抗原の領域である。

【0132】

ある態様においては、抗体は、それがタンパク質及び/又は高分子の複雑な混合物においてその標的抗原を選択的に認識する場合、抗原を特異的に結合するといわれる。

本発明の1つの態様においては、二重特異的抗体は、足場として十分な長さの親抗体を含んで成る。

【0133】

用語“十分な長さの抗体”とは、2つの“十分な長さの抗体H鎖”及び2つの“十分な長さの抗体L鎖”から成る抗体を示す。“十分な長さの抗体H鎖”は、N末端からC末端方向に、抗体H鎖可変ドメイン（VH）、抗体不変H鎖ドメイン1（CH1）、抗体ヒンジ領域（HR）、抗体H鎖不変ドメイン2（CH2）、及び抗体H鎖不変ドメイン3（CH3）（VH-CH1-HR-CH2-CH3）；及び任意には、サブクラスIgEの抗体の場合、抗体H鎖不変ドメイン4（CH4）から成るポリペプチドである。好ましくは、“十分な長さの抗体H鎖”は、N末端からのC末端方向に、VH、CH1、HR、CH2及びCH3から成るポリペプチドである。“十分な長さの抗体L鎖”は、N末端からC末端方向に、抗体L鎖可変ドメイン（VL）及び抗体L鎖不変ドメイン（CL）（VL-CLと略される）から成るポリペプチドである。抗体L鎖不変ドメイン（CL）は、（カッパ）又は（ラムダ）であり得る。

【 0 1 3 4 】

それらの 2 種の十分な長さの抗体鎖は、CLドメインとCH1ドメインとの間及び十分な長さの抗体H鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を通して一緒に結合される。典型的な十分な長さの抗体の例は、天然の抗体、例えばIgG（例えばIgG 1 及び IgG2）、IgM、IgA、IgD及びIgEである。本発明の十分な長さの抗体は、単一の種、例えばヒトからであり得、又はそれらはキメラ化された又はヒト適合された抗体であり得る。本発明の十分な長さの抗体は、同じ抗体に対して特異的に結合する、VH及びVL対により個々に形成される 2 種の抗原結合部位を含んで成る。従って、第 1 の抗原結合部位を含んで成り、そして 2 種の抗体L鎖及び 2 種の抗体H鎖から成る単一特異的二価（＝十分な長さ）抗体は、十分な長さの抗体である。前記十分な長さの抗体のH鎖又はL鎖のC - 末端は、前記H鎖又はL鎖のC - 末端での最後のアミノ酸を示す。前記十分な長さの抗体のH鎖又はL鎖のN - 末端は、前記H鎖又はL鎖のN - 末端での最後のアミノ酸を示す。

10

【 0 1 3 5 】

本発明のヒト血管内皮成長因子（VEGF）及びヒトアンギオポエチン - 2（ANG - 2）に対して特異的に結合する二重特異的抗体についての二重特異的抗体形式についての好ましい態様は、例えば、a）WO 2009/080251号、WO 2009/080252号又はWO 2009/080253号（ドメイン交換された抗体、例13を参照のこと）に記載されるように、又はb）1つの単鎖Fabフラグメント（結果的には、ジスルフィド安定化された）がVEGFに対して特異的であり、そして他の単鎖Fabフラグメント（結果的には、ジスルフィド安定化された）がANG-2に対して特異的である、scFab-Fc融合抗体に基づいて（例14を参照のこと）、又はc）Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621 ; WO 96/027011 号; Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681 ; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35 及びEP 1 870 459A1号に記載されるように、2種の異なった特異性を有する二価の抗体である。

20

【 0 1 3 6 】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:121、配列番号:122、配列番号:123 及び配列番号:124のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

【 0 1 3 7 】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:125、配列番号:126、配列番号:127 及び配列番号:128のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

30

【 0 1 3 8 】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:129、配列番号:130、配列番号:131及び配列番号:132のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

【 0 1 3 9 】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:133及び配列番号:134のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:135及び配列番号:136のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

40

【 0 1 4 0 】

それらのアミノ酸配列は、VEGFに対して結合する第 1 の抗原結合部位として、配列番号: 7 のH鎖可変ドメイン及び配列番号: 8 のL鎖可変ドメイン（bevacizumab（Avastin）に由来する）に基づき、そしてANG-2に結合する第 2 の抗原結合部位として、配列番号: 52 のH鎖可変ドメイン及び配列番号: 53のL鎖可変ドメイン（Ang2i_LC06に由来する）に基づかれる。

【 0 1 4 1 】

1つの態様においては、前記二重特異的抗体は、例えば、EP出願番号09004909.9号に記載されるように、1つのH鎖の1つのC末端でのみ、2種の抗原VEGF又はANG-2の片方に対

50

して特異的に結合するscFabフラグメントが融合される、2種の抗原VEGF又はANG-2の1つに対して特異的に結合する十分な長さの抗体に基づかれる形式、例えばノブ-イントゥホール(knobs-into holes)技法(例11を参照のこと)、又は例えば、EP出願番号09005108.7号に記載されるように、1つのH鎖の1つのC-末端で、CH1フラグメント及び第2H鎖の他のC-末端で、VL又はVL-CLフラグメント(2種の抗原VEGF又はANG-2の片方に対して特異的に結合する)が融合される、2種の抗原VEGF又はANG-2の1つに対して特異的に結合する十分な長さの抗体に基づかれる形式、例えばノブ-イントゥホール技法(例12を参照のこと)を用いれば、三価である。

【0142】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:115、配列番号:116及び配列番号:117のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

10

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:118、配列番号:119及び配列番号:120のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

【0143】

それらのアミノ酸配列は、VEGFに対して結合する第1の抗原結合部位として、配列番号:7のH鎖可変ドメイン及び配列番号:8のL鎖可変ドメイン(bevacizumab(Avastin)に由来する)に基づき、そしてANG-2に結合する第2の抗原結合部位として、配列番号:52のH鎖可変ドメイン及び配列番号:53のL鎖可変ドメイン(Ang2i_LC06に由来する)に基づかれる。

【0144】

20

本発明のヒト血管内皮成長因子(VEGF)及びヒトアンギオポエチン-2(ANG-2)に対して特異的に結合する二重特異的抗体のための好ましい二重特異的抗体形式は、例えばWO 2007/024715号、WO 2007/109254号、又はヨーロッパ特許出願09004909.9号に記載されるように、2種の異なった特異性を有する四価の抗体(TvAb)である。従って、1つの態様においては、前記二重特異的抗体は、WO 2007/024715号、WO 2007/109254号、又はヨーロッパ特許出願09004909.9号に記載されるような形式を用いれば、四価である(例1又は10を参照のこと)。

【0145】

本発明の1つの態様においては、二重特異的四価抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC06は、配列番号:102のペプチド及び配列番号:62のL鎖、又はそれらの変異体を含んで成ることにより特徴づけられる。

30

【0146】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:109及び配列番号:110のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:111及び配列番号:112のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

【0147】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は、配列番号:113及び配列番号:114のアミノ酸配列又はそれらの変異体として含んで成ることを特徴とする。

【0148】

40

それらのアミノ酸配列は、VEGFに対して結合する第1の抗原結合部位として、配列番号:7のH鎖可変ドメイン及び配列番号:8のL鎖可変ドメイン(bevacizumab(Avastin)に由来する)に基づき、そしてANG-2に結合する第2の抗原結合部位として、配列番号:52のH鎖可変ドメイン及び配列番号:53のL鎖可変ドメイン(Ang2i_LC06に由来する)に基づかれる。

【0149】

本発明の1つの態様においては、二重特異的四価抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC08は、配列番号:103のペプチド及び配列番号:62のL鎖、又はそれらの変異体を含んで成ることにより特徴づけられる。

【0150】

50

本発明の抗体における結合部位は、1対の2種の可変ドメイン、すなわち1対の1つのH鎖可変ドメイン及び1つのL鎖可変ドメインによりそれぞれ形成され得る。抗体における最小結合部位決定因子は、H鎖CDR3領域である。

【0151】

1つの態様においては、本発明の二重特異的抗体は四価である。さらなる態様においては、前記四価の二重特異的抗体は、次の特徴を有する：

それは、

a) 2種の十分な長さの抗体H鎖及び2種の十分な長さの抗体L鎖（個々の鎖はわずか1つの可変ドメインを含んで成る）から成る単一特異的二価親抗体、

b) 2種のペプチド-リンカー、及び

c) 抗体H鎖可変ドメイン、抗体L鎖可変ドメイン、及び前記抗体H鎖可変ドメインと前記抗体L鎖可変ドメインとの間の単鎖リンカーから個々に成る2種の単一特異的単価抗体から成り；そして

【0152】

好ましくは、前記単鎖抗体は、単一特異的二価抗体H鎖の同じ末端（C-及びN-末端）、又は他方では、単一特異的二価抗体L鎖の同じ末端（好ましくは、C-末端）、及びより好ましくは、単一特異的二価抗体H鎖の同じ末端（C-及びN-末端）に結合される。

もう1つの態様においては、前記二重特異的抗体は、四価であり、そして

a) 前記抗原結合部位を含んで成り、そして2種の抗体H鎖及び2種の抗体L鎖から成る十分な長さの抗体；及び

b) 前記第2抗原結合部位を含んで成る2種の同一の単鎖Fabフラグメントから成り、ここでb)下の前記単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体のH鎖又はL鎖のC-又はN-末端でペプチドコネクターを通して、a)下の前記十分な長さの抗体に融合される。

【0153】

もう1つの態様においては、前記二重特異的抗体は、四価であり、そして

a) 前記第2抗原結合部位を含んで成り、そして2種の抗体H鎖及び2種の抗体L鎖から成る十分な長さの抗体；及び

b) 前記第1抗原結合部位を含んで成る2種の同一の単鎖Fabフラグメントから成り、ここでb)下の前記単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体のH鎖又はL鎖のC-又はN-末端でペプチドコネクターを通して、a)下の前記十分な長さの抗体に融合される。

【0154】

好ましくは、b)下の前記単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体のH鎖又はL鎖のC-末端でペプチドコネクターを通して、a)下の前記十分な長さの抗体に融合される。

1つの態様においては、第2抗原に対して結合する2種の同一の単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体の個々のH鎖又はL鎖のC-末端でペプチドコネクターを通して前記十分な長さの抗体に融合される。

【0155】

1つの態様においては、第2抗原に対して結合する2種の同一の単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体の個々のH鎖のC-末端でペプチドコネクターを通して前記十分な長さの抗体に融合される。

【0156】

1つの態様においては、第2抗原に対して結合する2種の同一の単鎖Fabフラグメントは、前記十分な長さの抗体の個々のL鎖のC-末端でペプチドコネクターを通して前記十分な長さの抗体に融合される。

単鎖Fabフラグメントを包含するそのような態様は、引用により本明細書に組込まれるヨーロッパ特許出願番号09004909.9号に、より詳細に記載される。

【0157】

用語“ペプチド-リンカー”とは、本発明内で使用される場合、好ましくは合成起源のものである、アミノ酸配列を有するペプチドを示す。本発明のそれらのペプチド-リンカーは、本発明の二重特異的抗体を形成するために、異なった抗原-結合部位、及び/又は結果的に、前記異なった抗原-結合部位を含んで成る抗原フラグメント（例えば、単鎖Fv、十分な長さの抗体、VHドメイン及び/又はVLドメイン、Fab、(Fab)₂、Fc部分）を連結するために使用され得る。ペプチド-リンカーは、表1に列挙される1又は複数の次のアミノ酸配列及びさらに任意に選択されたアミノ酸を含んで成る。

【0158】

前記ペプチド-リンカーは、少なくとも5個のアミノ酸、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸、より好ましくは10~50個のアミノ酸を有するアミノ酸配列のペプチドである。好ましくは、b)下の前記ペプチド-リンカーは、少なくとも10個のアミノ酸を有するアミノ酸配列のペプチドである。1つの態様においては、前記ペプチド-リンカーは、(GxS)_n（ここで、G=グリシン、S=セリン、(x=3、及びn=3, 4, 5又は6)、又は(x=4及びn=2, 3, 4又は5)、好ましくはx=4及びn=2又は3、より好ましくはx=4、n=2((G₄S)₂)）である。前記(GxS)_nペプチド-リンカーはまた、追加のG=グリシン、例えばGG又はGGGが付加され得る。

【0159】

用語“単鎖リンカー”とは、本発明内で使用される場合、好ましくは合成起源のものである、アミノ酸配列を有するペプチドを示す。本発明のそれらの単鎖リンカーは、単鎖Fvを形成するために、VH及びVLドメインを連結するのに使用される。好ましくは、c)下の前記単鎖リンカーは、少なくとも15個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも20個のアミノ酸を有するアミノ酸配列のペプチドである。1つの態様においては、前記単鎖リンカーは、(GxS)_n（ここで、G=グリシン、S=セリン、(x=3、及びn=4, 5又は6)、又は(x=4及びn=3, 4又は5)、好ましくはx=4、n=4又は5、より好ましくはx=4、n=4）である。前記(GxS)_nペプチド-リンカーはまた、追加のG=グリシン、例えばGG又はGGGが付加され得る。

【0160】

さらに、前記単鎖（単鎖Fv）抗体は好ましくは、ジスルフィド安定化される。そのような単鎖抗体の追加のジスルフィド安定化は、単鎖抗体の可変ドメイン間へのジスルフィド結合の導入により達成され、そして例えばWO 94/029350号、Rajagopal, V., et al., Protein Engin. 10 (12) (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393; 又はSchmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 171 1-1721に記載される。

【0161】

ジスルフィド安定化された単鎖抗体の1つの態様においては、本発明の抗体に含まれる単鎖抗体の可変ドメイン間のジスルフィド結合は、下記から選択された個々の単鎖抗体に関しては無関係である：

- i) H鎖可変ドメイン位置44~L鎖可変ドメイン位置100、
- ii) H鎖可変ドメイン位置105~L鎖可変ドメイン位置43、又は
- iii) H鎖可変ドメイン位置101~L鎖可変ドメイン位置100。

【0162】

1つの態様において、本発明の抗体に含まれる単鎖抗体の可変ドメイン間のジスルフィド結合は、H鎖可変ドメイン位置44とL鎖可変ドメイン位置100との間に存在する。

1つの態様において、本発明の抗体に含まれる単鎖抗体の可変ドメイン間のジスルフィド結合は、H鎖可変ドメイン位置105とL鎖可変ドメイン位置43との間に存在する。

【0163】

本発明の二重特異的抗体のこの四価の態様の構造体は、VEGF及びANG-2に対して特異的に結合し、ここで抗原A又はBの1つはVEGFであり、そして他はANG-2である。前記構造体は、抗原Aに対して特異的に結合する十分な長さの抗体に基づかれ、これに対して抗原Bに対して特異的に結合する2つの（任意には、ジスルフィド-安定化された）単鎖Fvが、図

10

20

30

40

50

1 及び 2 のスキームに例示されるように、ペプチド - リンカーを通して連結される。

【 0 1 6 4 】

1 つの態様においては、単鎖抗体（単鎖Fv）の可変ドメインVHとVLとの間に前記任意のジスルフィド安定化を有さない前記単鎖（単鎖Fv）抗体が好ましい。

さらなる態様においては、前記四価の二重特異的抗体は、a) 下の前記単一特異的二価抗体部分がVEGFに対して特異的に結合し、そしてc) 下の前記 2 つの単価の単一特異的単鎖抗体がANG - 2 に対して結合することを特徴とする。

【 0 1 6 5 】

さらなる態様においては、前記四価の二重特異的抗体は、a) 下の前記単一特異的二価抗体部分がANG - 2 に対して特異的に結合し、そしてc) 下の前記 2 つの単価の単一特異的単鎖抗体がVEGFに対して結合することを特徴とする。

【 0 1 6 6 】

“ 単鎖Fabフラグメント ”（図11を参照のこと）は、抗体H鎖可変ドメイン（VH）、抗体不変ドメイン 1（CH1）、抗体L鎖可変ドメイン（VL）、抗体L鎖不変ドメイン（CL）及びリンカーから成るポリペプチドであり、ここで前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、N - 末端からC - 末端方向に、次のオーダーの 1 つを有する：a) VH - CH1 - リンカー - VL - CL、b) VL - CL - リンカー - VH - CH1、c) VH - CL - リンカー - VL - CH1、又はd) VL - CH1 - リンカー - VH - CL；そしてここで前記リンカーは、少なくとも30個のアミノ酸、好ましくは32～50個のアミノ酸のポリペプチドである。前記単鎖Fabフラグメントa) VH - CH1 - リンカー - VL - CL、b) VL - CL - リンカー - VH - CH1、c) VH - CL - リンカー - VL - CH1、及びd) VL - CH1 - リンカー - VH - CLは、CLドメインとCH1ドメインとの間の天然のジスルフィド結合を通して安定化される。用語“N - 末端”とは、N - 末端の最後のアミノ酸を示す。用語“C - 末端”とは、C - 末端の最後のアミノ酸を示す。

【 0 1 6 7 】

好ましい態様においては、前記単鎖Fabフラグメントにおける前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、N - 末端からC - 末端方向に、次のオーダーの 1 つを有する：a) VH - CH1 - リンカー - VL - CL、又はb) VL - CL - リンカー - VH - CH1、より好ましくはVL - CL - リンカー - VH - CH1。

【 0 1 6 8 】

もう 1 つの好ましい態様においては、前記単鎖Fabフラグメントにおける前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、N - 末端からC - 末端方向に、次のオーダーの 1 つを有する：a) VH - CH - リンカー - VL - CH1又はb) VL - CH1 - リンカー - VH - CL。

【 0 1 6 9 】

用語“ペプチドコネクター”とは、本発明内で使用される場合、好ましくは合成起源のものである、アミノ酸配列を有するペプチドを示す。本発明のそれらのペプチドコネクターは、本発明の多重特異的抗体を形成するために十分な長さの抗体のC - 又はN - 末端に単鎖Fabフラグメントを融合するために使用される。好ましくは、b) 下の前記ペプチドコネクターは、少なくとも 5 個のアミノ酸、好ましくは 5 ～ 100 個、より好ましくは 10 ～ 50 個のアミノ酸を有するアミノ酸配列のペプチドである。1 つの態様においては、前記ペプチドコネクターは、(GxS)_n又は(GxS)_nGmであり、ここでG = グリシン、S = セリン、及び (x = 3、n = 3、4、5 又は 6、及び m = 0、1、2 又は 3)、又は (x = 4、n = 2、3、4 又は 5、及び m = 0、1、2 又は 3)、好ましくは、x = 4 及び n = 2 又は 3、より好ましくは、x = 4、n = 2。1 つの態様においては、前記ペプチドコネクターは (G₄S)₂ である。

【 0 1 7 0 】

用語“リンカー”とは、本発明内で使用される場合、好ましくは合成起源のものである、アミノ酸配列を有するペプチドを示す。本発明のそれらのペプチドは、本発明の次の単鎖Fabフラグメントを形成するために、a) VH - CH1 ~ VL - CL、b) VL - CL ~ VH - CH1、c) VH - CL ~ VL - CH1 又はd) VL - CH1 ~ VH - CLを連結するために使用される：a) VH - CH1 - リンカー - VL - CL、b) VL - CL - リンカー - VH - CH1、c) VH - CL - リンカー - VL - CH1 又は d) VL - CH1 - リンカ

ー - VH-CL。単鎖Fabフラグメント内の前記リンカーは、少なくとも30個のアミノ酸、好ましくは32～50個のアミノ酸を有するアミノ酸配列を有するペプチドである。1つの態様においては、前記リンカーは、 $(GxS)_n$ であり、ここでG=グリシン、S=セリン、 $(x=3, n=8, 9 \text{ 又は } 10, \text{ 及び } m=0, 1, 2 \text{ 又は } 3)$ 又は $(x=4 \text{ 及び } n=6, 7 \text{ 又は } 8, \text{ 及び } m=0, 1, 2 \text{ 又は } 3)$ 、好ましくは、 $x=4, n=6 \text{ 又は } 7, \text{ 及び } m=0, 1, 2 \text{ 又は } 3$ 、より好ましくは、 $x=4, n=6 \text{ 及び } m=2$ 。1つの態様においては、前記リンカーは $(G_4S)_6G_2$ である。

【0171】

任意には、前記単鎖Fabフラグメントにおいては、CL - ドメインとCH1ドメインとの間の天然のジスルフィド結合の他に、また抗体H鎖可変ドメイン (VH) 及び抗体L鎖可変ドメイン (VL) が、次の位置間へのジスルフィド結合の導入によりジスルフィド安定化される：

- i) H鎖可変ドメイン位置44～L鎖可変ドメイン位置100、
- ii) H鎖可変ドメイン位置105～L鎖可変ドメイン位置43、又は
- iii) H鎖可変ドメイン位置101～L鎖可変ドメイン位置100 (番号付けは、KabatのEUインデックスに常に従う)。

【0172】

単鎖Fabフラグメントのそのようなさらなるジスルフィド安定化が、単鎖Fabフラグメントの可変ドメインVH及びVL間へのジスルフィド結合の導入により達成される。単鎖Fvについての安定化のために不自然なジスルフィド橋を導入するための技法は、例えばWO 94/02 9350号, Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, 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。1つの態様においては、本発明の抗体に含まれる単鎖Fabフラグメントの可変ドメイン間の任意なジスルフィド結合は、H鎖可変ドメイン位置44とL鎖可変ドメイン位置100との間に存在する。1つの態様においては、本発明の抗体に含まれる単鎖Fabフラグメントの可変ドメイン間の任意なジスルフィド結合は、H鎖可変ドメイン位置105とL鎖可変ドメイン位置43との間に存在する (番号付けは、KabatのEUインデックスに常に従う)。

【0173】

1つの態様においては、単鎖Fabフラグメントの可変ドメインVH及びVL間の前記ジスルフィド安定化を伴わない単鎖Fabフラグメントが好ましい。

好ましくは、本発明の四価の二重特異的抗体の前記第2態様は、a) 下の前記十分な長さの抗体の2つのH鎖の2つのC - 末端、又は2つのL鎖の2つのC - 末端に両者とも融合される2つの同一の単鎖Fabフラグメント (好ましくは、VL-CL - リンカー - VH-CH) を含んで成る。そのような融合は、本発明の二重特異的抗体を得るために、十分な長さの抗体のL鎖又はH鎖のいずれかと共に同時発現される2種の同一の融合ペプチド (i) H鎖及び単鎖Fabフラグメント、又はii) L鎖及び単鎖Fabフラグメントのいずれか) をもたらす。

【0174】

さらなる態様においては、前記二重特異的抗体は、その不変領域がヒト起源から誘導されること特徴とする。

さらなる態様においては、前記二重特異的抗体は、本発明の二重特異的抗体の不変領域がヒトIgG1サブクラス、又は突然変異L234A及びL235Aを有するヒトIgG1サブクラスのものであることを特徴とする。

【0175】

さらなる態様においては、前記二重特異的抗体の不変領域がヒトIgG2サブクラスのものであることを特徴とする。

さらなる態様においては、前記二重特異的抗体の不変領域がヒトIgG3サブクラスのものであることを特徴とする。

【0176】

さらなる態様においては、前記二重特異的抗体は、本発明の二重特異的抗体の不変領域がヒトIgG4サブクラス、又は追加の突然変異S228Pを有するヒトIgG4サブクラスのものである

10

20

30

40

50

あることを特徴とする。

【0177】

本発明のヒトVEGF及びヒトANG-2に対する二重特異的抗体が改良された特性、例えば生物学的又は薬理学的活性、薬力学的性質又は毒性を有することが現在見出されている。それらは、VEGF及びANG-2に対する単一特異的親抗体に比較して、高められたインビボ腫瘍増殖阻害及び/又は腫瘍脈管形成の阻害を示す（例16、17、及び18、すなわち単一特異的抗体Avastin（bevacicimab）のみ、ANG2i-LC06のみ、又は組合しての両者と異なった二重特異性＜VEGF-ANG-2＞抗体bevacizumab-ANG2i-LC06との比較を参照のこと）。

【0178】

さらに、組合してのVEGF及びANG-2に対する2種の対応する個々の単一特異的抗体の適用に比較して、低い毒性の副作用（インビボ適用の間、試験動物の改善された体重及び試験動物の低い副作用（インビボ適用の間、試験動物の改善された体重及び試験動物の低い死亡率において影響される）がまた、本発明の二重特異的抗体の利点を提供すること）。

【0179】

さらに、本発明の二重特異的抗体は、有益性、例えば低められた用量及び/又は投与の頻度及び付随的費用節減性を提供することができる。

【0180】

用語“不変領域”とは、本出願内で使用される場合、可変領域以外の抗体のドメインの合計を示す。不変領域は、抗原の結合に直接的には関与しないが、しかし種々のエフェクター機能を示す。それらのH鎖の不変領域のアミノ酸配列に依存して、抗体は次のクラスに分割され：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、そしてそれらのいくつかはさらに、サブクラス、例えばIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4、IgA1及びIgA2に分割され得る。異なったクラスの抗体に対応する鎖不変領域は、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。すべての5種の抗体クラスにおいて見出され得るL鎖不変領域は、 κ （カップ）及び λ （ラムダ）と呼ばれる。

【0181】

用語“ヒト起源由来の不変領域”とは、本出現において使用される場合、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のヒト抗体の不変H鎖領域及び/又は不変L鎖領域を示す。そのような不変領域は、当業界においては良く知られており、そして例えば、Kabat, E.A., (例えば、Johnson, G., and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788を参照のこと)により記載される。

【0182】

IgG4サブクラスの抗体は低められたFc受容体（FcR1II a）結合を示すが、他のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。しかしながら、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297（loss of Fc 炭水化物の欠失）、Pro329、Leu234、Leu235、Gly236、Gly237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及びHis435は、変更される場合、低められたFc受容体結合を提供する残基である（Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 15-19; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434号）。

【0183】

1つの態様においては、本発明の抗体は、IgG1抗体に比較して、低められたFcR結合性を有し、そして単一特異的二価（十分な長さの）親抗体は、IgG4サブクラス、又はS228、L234、L235及び/又はD265に突然変異を有するIgG1又はIgG2サブクラスのFcR結合に関して存在し、そして/又はPVA236突然変異を含む。1つの態様においては、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体における突然変異は、S228P、L234A、L235A、L235E及び/又はPVA236である。もう1つの態様においては、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体における特前変異は、IgG1 L234A 及び L235Aに存在する。不変H鎖領域は配列番号：35及び36で示される。

【0184】

10

20

30

40

50

1つの態様においては、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体の不変H鎖領域は、とく前変異L234A及びL235Aを有する配列番号：35のものである。もう1つの態様においては、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体の不変H鎖領域は、突然変異S228Pを有する配列番号：36のものである。もう1つの態様においては、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体の不変L鎖領域は、配列番号：37のL鎖領域又は配列番号：34のL鎖領域である。好ましくは、単一特異的二価（十分な長さの）親抗体の不変H鎖領域は、配列番号：35又は突然変異S228Pを有する配列番号：36のものである。

【0185】

抗体の不変領域は、直接的に、ADCC（抗体 - 依存性細胞 - 介在細胞毒性）及びCDC（補体 - 依存性細胞毒性）に包含される。補体活性化（CDC）は、ほとんどのIgG抗体サブクラスの不変領域への補体因子C1qの結合により開始される。抗体へのC1qの結合は、いわゆる結合部位での定義されたタンパク質 - タンパク質相互作用により引起される。そのような不変領域結合部位は、当業界において知られており、そして例えばLukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; 及びEP 0 307 434号により記載される。そのような不変領域結合部位は、アミノ酸L234、L235、D270、N297、E318、320、K322、P331及びP329（番号付けは、KabatのEUインデックスに常に従う）により特徴づけられる。

【0186】

用語“抗体 - 依存性細胞毒性（ADCC）”とは、エフェクター細胞の存在下で本発明の抗体による標的細胞の溶菌を言及する。ADCCは好ましくは、エフェクター細胞、例えば新しく単離されたPBMC又は白血球層からの精製されたエフェクター細胞、例えば単球又はナチュラルキラー（NK）細胞又は永久的に増殖するNK細胞系の存在下での本発明の抗体によるCCR5発現細胞の調製物の処理により測定される。

【0187】

用語“補体 - 依存性細胞毒性（CDC）”とは、ほとんどのIgG抗体サブクラスのFc部分への補体因子C1qの結合により開始される工程を示す。抗体へのC1qの結合は、いわゆる結合部位での定義されるタンパク質 - タンパク質相互作用により引起される。そのようなFc部分結合部位は、当業界において知られている（上記参照のこと）。そのようなFc部分結合部位は例えば、アミノ酸（L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及びP329（番号付けは、KabatのEUインデックスに常に従う））により特徴づけられる。サブクラスIgG1、IgG2及びIgG3の抗体は通常、C1q及びC3結合を包含する補体活性化を示し、ところがIgG4はその補体システムを活性化せず、そしてC1q及びC3を結合しない。

【0188】

本発明の抗体は、組換え手段により生成される。従って、本発明の1つの観点は、本発明の抗体をコードする核酸であり、そしてさらなる観点は、本発明の抗体をコードする前記核酸を含んで成る細胞である。組換え生成方法は当業界において広く知られており、そして原核及び真核細胞におけるタンパク質発現、抗体の続く単離及び通常、医薬的に許容できる純度への精製を包含する。宿主細胞における前述のような抗体の発現のためには、それぞれの修飾されたL鎖及びコードする核酸が標準方法により発現ベクター中に挿入される。

【0189】

発現は、適切な原核宿主細胞、例えばCHO細胞、NSO細胞、SP210細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母又はE.コリ細胞において実施され、そして抗体は細胞（溶菌後の上清液又は細胞）から回収される。抗体の組換え生成のための一般方法は、当業界において良く知られており、そして例えばMakrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271 -282; Kaufman, R.J.

., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161 ; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880の再考文献に記載されている。

【 0 1 9 0 】

二重特異的抗体は、従来の免疫グロブリン精製方法、例えばプロテインA - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又は親和性クロマトグラフィーにより、培養培地から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNA及びRNAは、従来の方法を用いて、容易に単離され、そして配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNA及びRNAの源として作用することができる。単離されると、DNAは発現ベクター中に挿入され、次に宿主細胞、例えば免疫グロブリンタンパク質を生成しない、HEK293細胞、CHO細胞又は骨髓腫細胞中にトランスフェクトされ、宿主細胞において組換えモノクローナル抗体の合成が得られる。

10

【 0 1 9 1 】

二価の二重特異的抗体のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド配列変化を抗体DNA中に導入することにより、又はヌクレオチド合成により調製される。しかしながら、そのような修飾は、例えば上記のように、非常に制限された範囲でのみ、実施され得、例えば、修飾は、上記抗体特性、例えばIgGイソタイプ及び抗原結合を変更しないが、しかし組換え生成の収率、タンパク質安定性を改良するか、又は精製を促進する。

【 0 1 9 2 】

用語“ 宿主細胞 ”とは、本出願において使用される場合、本発明の抗体を生成するように構築され得るいずれかの種類の細胞システムを示す。1つの態様においては、HEK293細胞及びCHO細胞が宿主細胞として使用される。本明細書において使用される場合、用語“ 細胞 ”、“ 細胞系 ”及び“ 細胞培養物 ”とは、交換可能的に使用され、そしてすべてのそのような名称は子孫を包含する。従って、用語“ 形質転換体 ”及び“ 形質転換された細胞 ”とは、主要な対象細胞、及びトランスファーの数に関係なく、それに由来する培養物を包含する。すべての子孫は、故意の又は偶然な突然変異のために、DNA含有率において正確には同一でないことがまた理解される。元の形質転換された細胞についてスクリーンされる場合、同じ機能又は生物学的活性を有する変異体子孫が包含される。

20

【 0 1 9 3 】

NSO細胞における発現が、例えばBarnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261 -270により記載される。過渡的発現が、例えばDurocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9により記載される。可変ドメインのクローニングが、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289;及びNorderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87により記載される。好ましい過渡的発現システム(HEK293)が、Schlaeger, E.-J., and Christensen, ., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83、及びSchlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199により記載される。

30

【 0 1 9 4 】

原核生物のために適切である制御配列は、プロモーター、任意にはオペレーター配列及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー及びポリアデニル化シグナルを使用することが知られている。

40

【 0 1 9 5 】

核酸は、それがもう1つの核酸配列と機能的関係下に配置される場合、“ 操作可能的に結合される ”。例えば、プレ - 配列又は分泌リーダーのためのDNA、それがポリペプチドの分泌において関与するプレ - タンパク質として発現される場合、ポリペプチドのためのDNAに操作可能的に結合され；プロモーター又はエンハンサーは、それがその配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に操作可能的に結合され；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するために配置される場合、コード配列に操作可能的に結合される。一般的に、“ 操作可能的に結合される ”とは、結合されているDNA配列が隣接し、そして分泌リーダーの場合、隣接し、そして読み取り枠下に存在する。しかしながら、エンハンサ

50

ーは、隣接すべきではない。結合は、従来の制限部位での連結により達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーは、従来の実施に従って使用される。

【0196】

抗体の精製は、細胞成分又は他の汚染物、例えば他の細胞核酸又はタンパク質を排除するために、標準技法、例えばアルカリ/SDS処理、CsCl結合、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動及び当業界において良く知られている他の技法により実施される。Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照のこと。

【0197】

次の異なった方法がタンパク質精製のために十分に確立され、そして広く使用されている：微生物タンパク質を用いての親和性クロマトグラフィー（例えば、プロテインA又はプロテインG親和性クロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、カチオン交換（カルボキシメチル樹脂）、アニオン交換（アミノエチル樹脂）及び混合されたモードの交換）、チオフィリック（thiophilic）吸着（例えば、 γ -メルカプトエタノール及び他のSHリガンドによる）、疎水性相互作用又は芳香族吸着クロマトグラフィー（例えば、フェニル-セファロース、アザ-アレノフィリック樹脂又はm-アミノフェニル硼素酸による）、金属キレート親和性クロマトグラフィー（例えば、Ni(II)-及びCu(II)親和性材料による）、サイズ排除クロマトグラフィー及び電気泳動方法（例えば、電気泳動、毛細管電気泳動）（Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102）。

【0198】

本発明の1つの観点は、本発明の抗体を含んで成る医薬組成物である。本発明のもう1つの観点は、医薬組成物の製造のためへの本発明の抗体の使用である。本発明のさらなる観点は、本発明の抗体を含んで成る医薬組成物の製造方法である。もう1つの観点においては、本発明は、医薬キャリアーと一緒に配合される、本発明の抗体を含む、組成物、例えば医薬組成物を供給する。

【0199】

本発明の1つの態様は、癌の処理のための本発明の二重特異的抗体である。

本発明のもう1つの観点は、癌の処理のための前記医薬組成物である。

本発明のもう1つの観点は、癌の処理のための薬剤の製造のためへの本発明の抗体の使用である。

本発明のもう1つの観点は、癌を有する患者に、本発明の抗体と投与することによる、そのような処理の必要な患者の処理方法である。

【0200】

本明細書において使用される場合、“医薬キャリアー”とは、いずれかの及びすべての溶媒、分散媒体、被膜、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤、及び生理学的に適合できる同様のものを包含する。好ましくは、キャリアーは、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与（例えば、注射又は注入による）のために適切である。

【0201】

本発明の組成物は、当業界において知られている種々の方法により投与され得る。当業者により理解されるように、投与の経路及び/又はモードは、所望する結果に依存して、変化するのであろう。一定の投与路により本発明の化合物を投与するためには、化合物の不活性化を妨げるための材料により化合物を被覆するか、又は同時投与する必要がある。例えば、化合物は、適切なキャリアー、例えばリボソーム又は希釈剤において対象に投与され得る。医薬的に許容できる希釈剤は、塩溶液及び緩衝水溶液を包含する。医薬キャリアーは、無菌の注射用溶液又は分散液の即興的調製のために無菌の水溶液又は分散液及び無菌の粉末を含む。医薬的活性物質のためへのそのような媒体及び剤の使用は、当業界において知られている。

【0202】

用語“非経口投与”及び“非経口投与される”とは、本明細書において使用される場合、腸及び局部投与以外の投与モード、通常注射による投与のモードを意味し、そして筋肉内、動脈内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、気管内、皮下、表皮下、関節内、皮膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外注射及び注入を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0203】

用語“癌”とは、本明細書において使用される場合、増殖性疾患、例えばリンパ腫、リンパ球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)の癌腫、細気管支肺胞上皮癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭部又は首の癌、皮膚又は眼内の黒色腫、子宮癌、卵巣癌、肛門癌、肛門部の癌、胃潰瘍、胃癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜の腫瘍、頸部の腫瘍、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌腫、甲状腺癌、副甲状腺線の癌、副腎の癌、軟組織の肉腫、尿道の癌腫、陰茎の癌腫、前立腺癌、膀胱癌、腎臓か輸尿管の癌、腎細胞腫、腎盂の腫瘍、中皮腫、肝細胞癌、胆管癌、中枢神経系の腫瘍(CNS)、脊髄軸腫瘍、脳幹膠腫、多形膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、ependymomas、髄芽腫、髄腹腫、扁平上皮癌、脳下垂体腺腫及びEwings肉腫、例えば上記癌の治りにくい癌、又は1又は複数の上記癌の組合せを意味する。

10

【0204】

本発明のもう1つの観点は、抗-脈管形成剤としての本発明の二重特異的抗体又は前記医薬組成物である。そのような抗-脈管形成剤は、癌、特に固形腫瘍及び他の血管疾患の処理のために使用され得る。

20

本発明の1つの態様は、血管疾患の処理のための本発明の二重特異的抗体である。

本発明のもう1つの観点は、血管疾患の処理のための前記医薬組成物である。

【0205】

本発明のもう1つの観点は、血管疾患の処理のための薬剤の製造のためへの本発明の抗体の使用である。

本発明のもう1つの観点は、血管疾患を有する患者への本発明の抗体の投与による、そのような処理の必要な患者の処理方法である。

【0206】

用語“血管疾患”とは、癌、炎症性疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血症、外傷、敗血症、COPD、喘息、糖尿病、AMD、網膜障害、脳卒中、肥満症、急性肺障害、出血、脈管漏出、例えば誘発されたサイトカイン、アレルギー、Graves'病、Hashimoto's自己免疫性甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、側頭動脈炎、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、狼瘡腎炎、クローン病、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、特に固形腫瘍、眼内新生血管症候群、例えば増殖性網膜症又は加齢性網膜黄斑部変性(AMD)、慢性関節リウマチ、及び乾癬を包含する(Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及び Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710)。

30

【0207】

それらの組成物はまた、アジュベント、例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤を含むことができる。微生物の存在の阻止は、前記殺菌方法により、及び種々の殺菌及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸及び同様のものの注入により確保され得る。組成物中に等張剤、例えば糖、塩化ナトリウム及び同様のものを含むことがまた所望される。さらに、注射できる医薬形の延長された吸収が、吸収を遅延する剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの包含によりもたらされ得る。

40

【0208】

選択される投与路に関係なく、適切な水和化された形で使用され得る本発明の化合物及び/又は本発明の医薬組成物は、当業者に知られている従来の方法により、医薬的に許容

50

できる投与形に配合される。

【0209】

本発明の医薬組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、特定の患者のための所望する治療応答を達成するために効果的である活性成分の量、組成及び投与路を、患者に対しての毒性を伴わないで得るために変更され得る。選択される投与量レベルは、種々の薬力学的因子、例えば使用される本発明の特定の組成物の活性、投与路、投与時間、使用される特定化合物の排泄速度、処理の持続期間、他の薬物、使用される特定組成物と組合して使用される化合物及び/又は材料、処理される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康及び従来の病歴、及び当業界において良く知られている同様の因子に依存するであろう。

10

【0210】

組成物は、それが注射により供給される程度まで、無菌であり、且つ流体であるべきである。水の他に、キャリアーは好ましくは、等張緩衝溶液である。

【0211】

適切な流動性が、被膜、例えばレシチンの使用により、分散液の場合、必要とされる粒度の維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール又はソルビトール、及び塩化ナトリウムを組成物に含むことが好ましい。

【0212】

本明細書において使用される場合、用語“細胞”、“細胞系”、及び“細胞培地”とは、交換可能的に使用され、そしてすべてのそのような名称は子孫も包含する。従って、用語“形質転換体”及び“形質転換された細胞”とは、トランスファーの数に関係なく、それらに由来する一次対象細胞及び培養物を包含する。すべての子孫は、故意の又は偶然な突然変異のために、DNA含有において正確には同一でないこともまた理解されている。元の形質転換された細胞についてスクリーンされる場合、同じ機能的又は生物学的活性を有する変異体子孫が包含される。異なった命名法が意図される場合、その内容から明白であろう。

20

【0213】

用語“形質転換”とは、本明細書において使用される場合、宿主細胞中へのベクター/核酸のトランスファー工程を言及する。強い細胞壁バリアーを有さない細胞が宿主細胞として使用される場合、トランスフェクションが、例えばGraham and Van der Eh, Virology 52 (1978) 546ffにより記載されるようなリン酸カルシウム沈殿方法により実施される。しかしながら、核注入又はプロトプラスト融合による細胞中へのDNAの導入のための他の方法がまた使用され得る。原核細胞、又は実質的な細胞壁構成を含む細胞が使用される場合、1つのトランスフェクション方法は、Cohen, F. N, et al, PNAS. 69 (1972)2110-2114により記載されるような、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理法である。

30

【0214】

本明細書において使用される場合、“発現”とは、核酸がmRNAに転換される方法、及び/又は転写されたmRNA（また、転写体としても言及される）がペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に連続的に翻訳される方法を言及する。転写体及びコードされるポリペプチドは、集合的には、遺伝子生成物として言及される。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、真核細胞における発現は、mRNAのスプライシングを包含する。

40

【0215】

“ベクター”とは、挿入される核酸分子を、宿主細胞中に及び/又は宿主細胞間にトランスファーする、核酸分子、特に自己複製する核酸分子である。この用語は、DNAの細胞中への挿入（例えば、染色体組込み）のために主に機能するベクター、DNA又はRNAの複製のために主に機能するベクターの複製、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターを包含する。1つよりも多くの記載されるような機能を提供するベクターもまた包含される。

【0216】

50

“発現ベクター”とは、適切な宿主細胞中に導入される場合、転写され、そしてポリペプチドに翻訳され得るポリヌクレオチドである。“発現システム”とは、所望する発現生成物を生成するために機能することができる発現ベクターから構成される適切な宿主細胞を通常言及する。

【0217】

アミノ酸配列の説明：

【表1】

表1

配列番号：	1	H鎖CDR3, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	2	H鎖CDR2, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	3	H鎖CDR1, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	4	L鎖CDR3, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	5	L鎖CDR2, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	6	L鎖CDR1, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	7	H鎖可変ドメイン, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	8	L鎖可変ドメイン, <VEGF>bevacizumab
配列番号：	9	H鎖CDR3, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	10	H鎖CDR2, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	11	H鎖CDR1, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	12	L鎖CDR3, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	13	L鎖CDR2, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	14	L鎖CDR1, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	15	H鎖可変ドメイン, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	16	L鎖可変ドメイン, <VEGF>ranibizumab
配列番号：	17	H鎖CDR3, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	18	H鎖CDR2, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	19	H鎖CDR1, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	20	L鎖CDR3, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	21	L鎖CDR2, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	22	L鎖CDR1, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	23	H鎖可変ドメイン, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	24	L鎖可変ドメイン, <VEGF>HuMab G6-31
配列番号：	25	H鎖CDR3, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	26	H鎖CDR2, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	27	H鎖CDR1, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	28	L鎖CDR3, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	29	L鎖CDR2, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	30	L鎖CDR1, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	31	H鎖可変ドメイン, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	32	L鎖可変ドメイン, <ANG-2> Mab 536
配列番号：	33	(G4S) 4 リンカー
配列番号：	34	λ L鎖不変領域
配列番号：	35	IgG1由来のヒトH鎖不変領域
配列番号：	36	IgG4由来のヒトH鎖不変領域
配列番号：	37	κ L鎖不変領域
配列番号：	38	H鎖CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
配列番号：	39	H鎖CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
配列番号：	40	H鎖CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
配列番号：	41	L鎖CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
配列番号：	42	L鎖CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

10

20

30

40

【表 2】

表 2

配列番号:	43	L鎖CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
配列番号:	44	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2s_R3_LC03
配列番号:	45	L鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2s_R3_LC03
配列番号:	46	H鎖CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	47	H鎖CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
配列番号:	48	H鎖CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	49	L鎖CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	50	L鎖CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	51	L鎖CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	52	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	53	L鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2i_LC06
配列番号:	54	H鎖CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	55	H鎖CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	56	H鎖CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	57	L鎖CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	58	L鎖CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	59	L鎖CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	60	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	61	L鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2i_LC07
配列番号:	62	H鎖CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08
配列番号:	63	H鎖CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08
配列番号:	64	H鎖CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08
配列番号:	65	L鎖CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
配列番号:	66	L鎖CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
配列番号:	67	L鎖CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
配列番号:	68	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2k_LC08
配列番号:	69	L鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2k_LC08
配列番号:	70	H鎖CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	71	H鎖CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	72	H鎖CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	73	L鎖CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	74	L鎖CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	75	L鎖CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
配列番号:	76	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2s_LC09
配列番号:	77	L鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2s_LC09
配列番号:	78	H鎖CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	79	H鎖CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	80	H鎖CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	81	L鎖CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	82	L鎖CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	83	L鎖CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号:	84	H鎖可変ドメイン, <ANG-2>Ang2i_LC10

【表 3】

表 3

配列番号：	85	L鎖可変ドメイン, <ANG-2> Ang2i_LC10
配列番号：	86	H鎖CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	87	H鎖CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	88	H鎖CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	89	L鎖CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	90	L鎖CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	91	L鎖CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	92	H鎖可変ドメイン, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	93	L鎖可変ドメイン, <ANG-2> Ang2k_LC11
配列番号：	94	H鎖CDR3, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	95	H鎖CDR2, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	96	H鎖CDR1, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	97	L鎖CDR3, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	98	L鎖CDR2, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	99	L鎖CDR1, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	100	H鎖可変ドメイン, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	101	L鎖可変ドメイン, <VEGF>B20-4.1
配列番号：	102	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab-LC06のBevacizumab H鎖Ang2i LC06 scFv融合ペプチド
配列番号：	103	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab-LC08のbevacizumab H鎖Ang2i LC08 scFv融合ペプチド
配列番号：	104	bevacizumabのL鎖
配列番号：	105	ヒト血管内皮成長因子 (VEGF)
配列番号：	106	ヒトアンギオポエチン-2 (ANG-2)
配列番号：	107	ヒトアンギオポエチン-1 (ANG-1)
配列番号：	108	ヒト Tie-2受容体
配列番号：	109	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-LC06-2620のH鎖1
配列番号：	110	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-LC06-2620のL鎖
配列番号：	111	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-Ang2i-LC06-2640のH鎖1
配列番号：	112	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-Ang2i-LC06-2640のL鎖
配列番号：	113	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-Ang2i-LC06-2641 のH鎖1
配列番号：	114	二重特異的, 四価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab- Avastin-Ang2i-LC06-2641 のL鎖
配列番号：	115	二重特異的, 三価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06-KiH-C- scFabのH鎖1
配列番号：	116	二重特異的, 三価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06-KiH-C- scFabのH鎖2

10

20

30

40

【表 4】

表 4

配列番号：	117	二重特異的，三価の単鎖 Fab <VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06-KiH-C- scFabのL鎖
配列番号：	118	二重特異的，三価<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- C-Fab-6CSSのH鎖1
配列番号：	119	二重特異的，三価<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- C-Fab-6CSSのH鎖2
配列番号：	120	二重特異的，三価<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- C-Fab-6CSSのL鎖
配列番号：	121	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- CH1-CLのH鎖1
配列番号：	122	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- CH1-CLのH鎖2
配列番号：	123	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- CH1-CLのL鎖1
配列番号：	124	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- CH1-CLのL鎖2
配列番号：	125	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VLのH鎖1
配列番号：	126	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VLのH鎖2
配列番号：	127	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VLのL鎖1
配列番号：	128	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VLのL鎖2
配列番号：	129	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VL-SSのH鎖1
配列番号：	130	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VL-SSのH鎖2
配列番号：	131	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VL-SSのL鎖1
配列番号：	132	二重特異的，二価ドメイン交換された<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- VH-VL-SSのL鎖2
配列番号：	133	二重特異的，二価ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- N-scFabのH鎖1
配列番号：	134	二重特異的，二価ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- N-scFabのH鎖2
配列番号：	135	二重特異的，二価ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- N-scFabSSのH鎖1
配列番号：	136	二重特異的，二価ScFab-Fc融合<VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06- N-scFabSSのH鎖2

【 0 2 1 8 】

次の例、配列の列挙及び図は、本発明、すなわち付随する請求項に示される真の範囲の理解を助けるために供給される。修飾が本発明の範囲内で、示される方法に行われ得るこ

【図面の簡単な説明】

【 0 2 1 9 】

【図 1 A】図1Aは、VEGF及びANG-2に結合する本発明の二重特異的抗体の1つの四価の態様の図解構造を示し、ここで抗原A又はBの1つはVEGFであり、そして他はANG-2である。前記構造は、抗原Aに結合する十分な長さの抗体に基づかれ、ここで抗原Bに結合する2つの（任意には、ジスルフィド - 安定化された）単鎖Fvがペプチド - リンカーを通して連結される。

【 0 2 2 0 】

【図 1 B】図1Bは、scFvのジスルフィド安定化を伴わないで又は伴って、TvAb命名法を用

いての生成される二重特異的四価抗体の略図（例を参照のこと）を示す。

【図 2 A】図2Aは、ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > 二重特異的四価抗体（ = < VEGF - ANG-2 > TvAb6 ; No. 2331, 表 3 を参照のこと）の略図を示す。

【図 2 B - 1】図2B-1は、ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6 の発現のために使用される、修飾されたH鎖及びL鎖ペクターのプラスミド地図を示す。

【図 2 B - 2】図2B-2は、ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6 の発現のために使用される、修飾されたH鎖及びL鎖ペクターのプラスミド地図を示す。

【 0 2 2 1】

【図 3】図3は、還元及び非還元条件下で、“標準”ヒトIgG1抗体G6-31（ < VEGF > HuMab G6-31）に比較しての、精製された、ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6 のSDS-PAGEを示す。

10

【図 4 A】図4Aは、“標準”ヒトIgG1抗体G6-31に比較しての精製された、ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6 のサイズ排除クロマトグラフィーは、ジスルフィド - 安定化されたTvAb6が精製に基づいて再び凝集体を形成しないことを示す。

【図 4 B】図4Bは、“標準”ヒトIgG1抗体G6-31に比較しての精製された、ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6 のサイズ排除クロマトグラフィーは、ジスルフィド - 安定化されたTvAb6が精製に基づいて再び凝集体を形成しないことを示す。

【図 4 C】図4Cは、“標準”ヒトIgG1抗体G6-31に比較しての精製された、ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6 のサイズ排除クロマトグラフィーは、ジスルフィド - 安定化されたTvAb6が精製に基づいて再び凝集体を形成しないことを示す。

20

【 0 2 2 2】

【図 5 - 1】図 5 -1は、VEGF結合ELISAからの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6は、 < VEGF > G6-31に相当するVEGFに結合する。 < ANG-2 > Mab536はVEGFに結合しない。

【図 5 - 2】図 5 -2は、VEGF結合ELISAからの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6は、 < VEGF > G6-31に相当するVEGFに結合する。 < ANG-2 > Mab536はVEGFに結合しない。

【図 6 A】図 6 Aは、ANG-2結合ELISAからの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6は、 < ANG-2 > Mab536に相当するANG-2に結合する。 < VEGF > G6-31はANG-2に結合しない。

30

【 0 2 2 3】

【図 6 B】図6Bは、表面プラスモン共鳴（Biacore）によるANG-2結合分析からの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6は < ANG-2 > Mab536に相当する親和性を伴って、ANG-2に結合する。

【図 7 - 1】図 7 -1は、VEGF-ANG-2架橋ELISAからの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6はVEGF及びANG-2に同時に結合し、ところが < VEGF > G6-31及び < ANG-2 > Mab536はVEGF及びANG-2に同時に結合できない。

【図 7 - 2】図 7 -2は、VEGF-ANG-2架橋ELISAからの図解及び結果を示す。ジスルフィド - 安定化された < VEGF-ANG-2 > TvAb6はVEGF及びANG-2に同時に結合し、ところが < VEGF > G6-31及び < ANG-2 > Mab536はVEGF及びANG-2に同時に結合できない。

40

【 0 2 2 4】

【図 8 a】図 8 aは、Scidページマウスにおける段階式皮下Calo205異種移植片モデルにおける、 < ANG-2 > Mab536、 < VEGF > G6-31及びMab536及びG6-31の組合せに比較してのジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6の効力（研究ANG2_Pz_Colo205_003）を示す。

【図 8 b】図 8 bは、Scidページマウスにおける段階式皮下Calo205異種移植片モデルにおける、 < ANG-2 > Mab536、 < VEGF > G6-31及びMab536及びG6-31の組合せに比較してのジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6の効力（研究ANG2_Pz_Colo205_005）を示す。

【 0 2 2 5】

50

【図 9】図 9 は、二重特異的四価抗体 < VEGF-ANG-2 > TvAb6 による VEGF - 誘発された管形成の阻止の結果を示す。

【図 10 A】図10Aは、bジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6 による VEGF - 誘発された管形成の阻止（定量的分析）を示す。

【図 10 B】図10Bは、bジスルフィド - 安定化された < VEGF - ANG-2 > TvAb6 による VEGF - 誘発された管形成の阻止（定量的分析）を示す。

【 0 2 2 6 】

【図 1 1】図11は、表面プラスモン共鳴（Biacore）による VEGF 結合分析の図解を示す。

【図 1 2】図12は、Ka-Kdプロットにおける 2 種の < VEGF > 抗体 < VEGF-Ang-2 > TvAb6 及び < VEGF > G6-31 の運動特性を示す。

10

【図 1 3】図13は、二重特異的抗体への ANGPT2 及び VEGF の同時結合を検出するための表面プラスモン共鳴（Biacore）の図解を示す。

【図 1 4】図14は、TvAb6 が ANGPT2 及び VEGF に同時に結合することを示す表面プラスモン共鳴（Biacore）実験からの結果を示す。

【 0 2 2 7 】

【図 1 5 A】図15Aは、< VEGF-ANG-2 > 二重特異的抗体の二重特異的及び同時Biacore結合アッセイの略図を示す。

【図 1 5 B】図15Bは、TvAb-2441 -bevacicumab_LC06 への ANG-2 及び VEGF の同時結合を示すBiacoreデータを示す。

【 0 2 2 8 】

20

【図 1 6 A】図16Aは、抗 - Ang2 抗体 < ANG- 2 > Ang2i_LC06 及び < ANG-2 > Ang2k_LC08 に比較しての、二重特異的抗体 < VEGF-ANG-2 > TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び < VEGF-ANG-2 > TvAb-2441 の Tie2 リン酸化を示す。

【図 1 6 B】図16Bは、抗 - Ang2 抗体 < ANG- 2 > Ang2i_LC06 及び < ANG-2 > Ang2k_LC08 に比較しての、二重特異的抗体 < VEGF-ANG-2 > TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び < VEGF-ANG-2 > TvAb-2441 の Tie2 リン酸化を示す。

【 0 2 2 9 】

【図 1 7】図17は、ヒトアンギオポエチン相互作用 ELISA の略図を示す。

【図 1 8】図18は、< VEGF-ANG-2 > TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び < VEGF-ANG-2 > TvAb-2441-bevacizumab-LC08 及び bevacizumab の VEGF-誘発された HUVEC 増殖を示す。

30

【 0 2 3 0 】

【図 1 9】図19は、治療の間、ラベルされた抗 - CD31 抗体及び CD31 シグナルの相対的变化を通してモニターされる Calu3 異種移植片モデルにおける、< ANG-2 > ANG2i-LC06、及び < ANG-2 > ANG2i-LC06 及び Avastin (bevacizumab) の組合せに比較しての二重特異的抗体 < VEGF-ANG-2 > bevacizumab-LC06 抗体のインビボ抗 - 脈管形成効力を示す。

【実施例】

【 0 2 3 1 】

材料及び一般方法：

ヒト免疫グロブリン L 及び H 鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に与えられている。抗体鎖のアミノ酸は EU 番号付けに従って、番号付けされ、そして言及される (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))。

40

【 0 2 3 2 】

組換え DNA 技法：

標準方法が、Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 に記載されるように、DNA を操作するために使用された。分子生物学的試薬が、その製造業者の指示に従

50

って使用された。

【 0 2 3 3 】

遺伝子合成：

所望する遺伝子セグメントを、化学合成により製造されたオリゴヌクレオチドから調製した。単一の制限エンドヌクレオアーゼ切断部位を両端に有する、遺伝子セグメントを、PCR増幅を包含するオリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結によりアセンブリーし、そして続いて、示される制限部位、例えばKpnI/SacI又はAsxI/PacIを通して、pPCRScrip (Stratagene)に基づくpGA4クローニングベクター中にクローン化した。サブクローン化された遺伝子フラグメントのDNA配列を、DNA配列決定により確かめた。

【 0 2 3 4 】

遺伝子合成フラグメントを、Geneart (Regensburg, Germany)での得られる規格に従って意図した。Ang-2/VEGF二重特異的抗体のL及びH鎖kをコードするすべての遺伝子セグメントを、真核細胞における分泌のためのタンパク質、及び5' - BamHI及び3' - XbaI制限部位を標的化する、リーダーペプチド (MGWSCIIILFLVATATGVHS) をコードする5' - 末端DNA配列により合成した。ジスルフィド安定化された “ ノブ - イントゥー - ホール (knobs-into-hole) ” 修飾されたH鎖を担持するDNA配列を、“ ノブ ” H鎖におけるS354C及びT366W突然変異及び “ ホール ” H鎖におけるY349C、T366S、L368A及びY407V突然変異により企画した。

【 0 2 3 5 】

DNA配列決定：

DNA配列を、MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) 又はSequiserive GmbH (Vaters tetten, Germany)で実施される二本鎖配列決定により決定した。

DNA及びタンパク質配列分析及び配列データ管理：

GCG's (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)ソフトウェアパッケージバージョン10.2及びInfomax's Vector NTI Advance suiteバージョン8.0を、配列創造、マッピング、分析注釈及び例解のために使用した。

【 0 2 3 6 】

発現ベクター (例 1 に関する)：

記載される抗体の発現のために、CMV-イントロンAプロモーターによるcDNA構成又はCMVプロモーターによるゲノム構成のいずれかに基づいての一過性発現 (例えば、HEK293 EBN A 又はHEK293-Fにおける) 細胞、又は安定発現 (例えば、CHO 細胞における) のための発現プラスミドの変異体 (例えば、図 2 B) を適用した。

抗体発現カセットの他に、ベクターは、次のものを含んだ：

- E. コリにおいてこのプラスミドの複製を可能にする複製の起点、及び
- E. コリにおいてアンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼ遺伝子。

【 0 2 3 7 】

抗体遺伝子の転写ユニットは、次の要素から構成される：

- 5' 末端でのユニーク制限部位、
- ヒトサイトメガロウィルスからの即時初期エンハンサー及びプロモーター、
- cDNA構成の場合、続くイントロンA配列、
- ヒト抗体遺伝子の5' - 末端翻訳領域、
- 免疫グロブリンH鎖シグナル配列、
- cDNAとしての又は免疫グロブリンエキソン-イントロン構成を伴ってのゲノム構成としてのヒト抗体鎖 (H鎖、修飾されたH鎖又はL鎖)、
- ポリアデニル化シグナル配列を有する3' 末翻訳領域、及び
- 3' 末端でのユニーク制限部位。

【 0 2 3 8 】

下記に記載されるような選択された抗体及びC-末端scFv融合のH鎖配列を含む融合遺伝子を、PCR及び/又は遺伝子合成により生成し、そして、例えばゲノムH鎖ベクターにおけるユニークNsiI 及び EcoRI部位を用いて、核酸セグメントの結合により、既知組換え

10

20

30

40

50

方法及び技法によりアセンブリーした。サブクローン化された核酸配列を、DNA配列決定により確認した。一過性及び安定したトランスフェクションのために、多量のプラスミドを、形質転換されたE. コリ培養物 (Nucleobond AX, Macherey-Nagel) からのプラスミド調製物により調製した。

【 0 2 3 9 】

発現ベクター (例10 - 14に関する) :

次の要素から構成される発現ベクターを用いた :

- 選択マーカーとしてのヒグロマイシン耐性遺伝子、
- Epstein-Barrウイルス (EBV) の複製の起点、oriP、
- E. コリにおけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からの複製の起点
- E. コリにおいてアンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼ遺伝子、
- ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) からの即時初期エンハンサー及びプロモーター、
- ヒト1 - 免疫グロブリンポリアデニル化 (“ポリA”) シグナル配列、及び
- ユニークBamHI及びXbaI制限部位。

10

【 0 2 4 0 】

H又はL鎖構造体及びC末端VH及びVLドメインを有する“ノブ - イントウ - ホール”構造体を含んで成る免疫グロブリン融合遺伝子を、遺伝子合成により調製し、そして記載のようにして、pGA18(ampR)プラスミド中にクローン化した。合成されたDNAセグメント及びRoche発現ベクターを担持するpG18 (ampR) プラスミドを、BamHI及びXbaI制限酵素 (Roche Molecular Biochemicals) により消化し、そしてアガロースゲル電気泳動にゆだねた。次に、精製されたH及びL鎖コードのDNAセグメントを、単離されたRoche発現ベクターBamHI/XbaIフラグメントに連結し、最終発現ベクターをもたらしした。その最終発現ベクターを用いて、E. コリ細胞を形質転換し、発現プラスミドDNAを単離し (Miniprep)、そして制限酵素分析及びDNA配列決定にゆだねた。正しいクローンを、150mlのLB - Amp培地において増殖し、再びプラスミドDNAを単離し (Maxiprep)、そして配列完全性をDNA配列決定により確かめた。

20

【 0 2 4 1 】

細胞培養技法 :

標準の細胞培養技法を、Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Incに記載されるようにして使用した。

30

【 0 2 4 2 】

HEK293 - Fシステムにおける一過性トランスフェクション (例1について) :

抗体を、HEK293-Fシステム (Invitrogen) を用いて、その製造業者の説明書に従って、それぞれH鎖又は修飾されたH鎖、及びその対応するL鎖をコードする2種のプラスミドの一過性トランスフェクションにより生成した。手短かに言及すると、血清を有さないFreeStyle293発現培地 (Invitrogen) における振盪フラスコ又は攪拌された発酵器において浮遊状態で増殖するHEK293-F細胞 (Invitrogen) を、2種のそれぞれの発現プラスミド及び293フェクチン又はフェクチン (Invitrogen) の混合物によりトランスフェクトした。例えば2Lの振盪フラスコ (Corning) に関しては、HEK293-F細胞を、600mlにおいて 1.0×10^6 個の細胞/mlの密度で接種し、そして120rpm, 8%CO₂下でインキュベートした。

40

【 0 2 4 3 】

この後、細胞を、A) それぞれ、H鎖又は修飾されたH鎖、及びその対応するL鎖を当モル比でコードする全プラスミドDNA ($1 \mu\text{g/ml}$) $600 \mu\text{g}$ を含むOpti-MEM (Invitrogen) 20ml、及びB) 20mlのOpti-MEM及び1.2mlの293フェクチン又はフェクチン ($2 \mu\text{l/ml}$) の混合物 (約42ml) により、約 1.5×10^6 個の細胞/mlの細胞密度でトランスフェクトした。グルコース消費に従って、グルコース溶液を、発酵の間、添加した。分泌された抗体を含む上清液を、5 - 10日後、収穫し、そして抗体を上清液から直接的に精製するか、又は上清液を凍結し、そして貯蔵した。

50

【 0 2 4 4 】

HEK293-Fシステムにおける一過性トランスフェクション（例10 - 14について）：

組換え免疫グロブリン変異体を、FreeStyle™ 293 Expression Systemを用いて、その製造業者の説明書（Invitrogen, USA）に従って、ヒト胚腎臓293 - F細胞の一過性トランスフェクションにより発現した。手短には、懸濁FreeStyle™ 293-F細胞を、FreeStyle™ 293発現培地において37 / 8 %CO₂下で培養し、そして細胞を、トランスフェクションの日、1 ~ 2 × 10⁶生存細胞/mlの密度で、新鮮培地に接種した。DNA-293 fectin™複合体を、325mlの293fectin™（Invitrogen, Germany）、及び250mlの最終トランスフェクション、体積のために1 : 1のモル比での250 µgのH鎖及びL鎖プラスミドDNAを用いて、Opti-ME M（商標）I 培地（Invitrogen, USA）において調製した。

10

【 0 2 4 5 】

2つのH鎖及び1つのL鎖を有する“ノブ - イントゥー - ホール”DNA - 293fectin複合体を、325 µlの293fectin™（Invitrogen, Germany）、及び250mlの最終トランスフェクション体積のために1 : 1 : 2のモル比での250 µgの“ノブ - イントゥー - ホール”H鎖1及び2及びL鎖プラスミドDNAを用いて、Opti-MEM（商標）I培地（Invitrogen, USA）において調製した。2つのH鎖を有する“ノブ - イントゥー - ホール”DNA - 293fectin複合体を、325 µlの293fectin™（Invitrogen, Germany）、及び250mlの最終トランスフェクション体積のために1 : 1のモル比の250 µgの“ノブ - イントゥー - ホール”H鎖及び2 DNAを用いて、Opti-MEM（商標）I 培地（Invitrogen, USA）において調製した。

20

【 0 2 4 6 】

CrossMab DNA- 293fectin複合体を、325 µlの293fectin™（Invitrogen, Germany）、及び250mlの最終トランスフェクション体積のために1 : 1 : 1 : 1のモル比での250 µgの“ノブ - イントゥー - ホール”H鎖1及び2及びL鎖プラスミドDNAを用いて、Opti-MEM（商標）I 培地（Invitrogen, USA）において調製した。抗体含有細胞培養上清液を、14000gでの30分間の遠心分離により、トランスフェクションの7日後、収穫し、そして無菌フィルター（0.22 µm）を通して濾過した。上清液を、精製まで、-20 で貯蔵した。

【 0 2 4 7 】

タンパク質決定：

精製された抗体及び誘導体のタンパク質濃度を、Pace, et. al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423に従ってのアミノ酸配列に基づいて計算されたモル消衰係数を用いて、280nmでの光学密度（OD）を決定することにより決定した。

30

【 0 2 4 8 】

上清液において抗体濃度決定：

細胞培養上清液における抗体及び誘導体の濃度を、プロテインAアガロースビーズ（Roche）による免疫沈澱法により推定した。60 µlのプロテインAアガロースビーズを、TBS-NP40（50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40）により3度、洗浄した。続いて、1 ~ 15mlの細胞培養上清液を、TBS-NP40において予備-平衡化されたプロテインAアガロースビーズに適用した。室温での1時間のインキュベーションの後、ビーズを、Ultrafree-MC-filter カラム（Amicon）上で、0.5mlのTBS-NP40により1度、0.5mlの2 × リン酸緩衝溶液（2 × PBS, Roche）により、2度、及び0.5mlの100mMのクエン酸ナトリウム（pH5.0）により、すばやく4度、洗浄した。供給された抗体を、35 µlのNuPAGE（商標）LDS サンプル緩衝液（Invitrogen）の添加により溶出した。

40

【 0 2 4 9 】

サンプルの半分を、それぞれNuPAGE（商標）サンプル還元剤と共に組合すか、又は未還元のままにし、そして70 で10分間、加熱した。続いて、20 µlを、4-12% NuPAGE（商標）Bis-Tris SDS- PAGE（Invitrogen）（還元されていないSDS-PAGEのためにはMOPS緩衝液、及び還元されたSDS-PAGEのためには、NuPAGE（商標）抗酸化ランニング緩衝液添加剤（Invitrogen）と共にMES緩衝液を用いる）に適用し、そしてクーマシーブルーにより染色した。

【 0 2 5 0 】

50

細胞培養上清液における抗体及び誘導体の濃度を、Protein A-HPLCクロマトグラフィーにより測定した。手短に言及すると、プロテインAに結合する抗体及び誘導体を含む細胞培養上清液を、50mMの KH_2PO_4 、300mMのNaCl (pH7.3) 中、HiTrap Protein Aカラム (GE Healthcare) に適用し、そしてDionex HPLC-System上で、550mMの酢酸 (pH2.5) によりマトリックスから溶出した。溶出されたタンパク質を、UV吸光度及びピーク領域の積分により定量化した。精製された標準のIgG1抗体が、標準として作用した。

【0251】

他方では、細胞培養上清液における抗体及び誘導体の濃度を、Sandwich-IgG-ELISAにより測定した。手短に言及すれば、StreptaWell High Bind Streptavidin A-96 ウェルマイクロタイタープレート (Roche) を、100 μl /ウェルのビオチニル化された抗 - ヒトIgG捕獲分子F(ab')₂<h-Fcgamma>BI (Dianova) により、0.1 $\mu\text{g/ml}$ で室温で1時間、又は他方では、4℃で一晩、被覆し、そして続いて、200 μl /ウェルのPBS、0.05% Tween (PBST, Sigma) により3度、洗浄した。それぞれの抗体含有細胞培養上清液のPBS (Sigma) 中、希釈溶液シリーズ100 μl を、ウェル当たり添加し、そして室温でマイクロタイタープレートシェーカー上で1~2時間インキュベートした。

【0252】

ウェルを、200 μl /ウェルのPBSTにより3度、洗浄し、そして結合された抗体を、室温でマイクロタイタープレートシェーカー上で1~2時間、検出抗体として、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の100 μl のF(ab')₂<hFcgamma>POD (Dianova) により検出した。結合されなかった検出抗体を、200 μl /ウェルのPBSTにより3度、洗浄し、そして結合された検出抗体を、100 μl のABTS/ウェルの添加により検出した。吸光度の決定を、405nmの測定波長 (492nmの参照波長) でTecan Fluor分光計上で実施した。

【0253】

タンパク質精製：

タンパク質を、標準プロトコールに従って、濾過された細胞培養上清液から精製した。手短に言及すると、抗体を、プロテインAセファロースカラム (GE Healthcare) に適用し、そしてPBSにより洗浄した。抗体の溶出を、酸性pHで達成し、続いてすぐに、サンプルを中和した。凝集されたタンパク質を、20mMのヒスチジン、140mMのNaCl (pH6.0) 中、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200, GE Healthcare) により、モノマー抗体から分離した。モノマー抗体画分をプールし、必要なら、例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 遠心分離濃縮機を用いて濃縮し、そして-80℃で貯蔵した。サンプルの一部を、例えばSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分光法、及び内毒素決定による、続くタンパク質の分析及び分析特徴化のために供給する (図3及び4を参照のこと)。

【0254】

SDS-PAGE：

NuPAGE (商標) Pre-Cast ゲルシステム (Invitrogen) を、その製造業者の説明書に従って使用した。特に、4~20% NuPAGE (商標) Novex (商標) TRIS- Glycine Pre-Castゲル及びNovex (商標) TRIS-Glycine SDSランニング緩衝液を使用した (例えば、図3を参照のこと)。サンプルの還元を、ゲルの走行の前、NuPAGE (商標) サンプル還元剤を添加することにより、達成した。

【0255】

分析用サイズ排除クロマトグラフィー：

抗体の凝集及びオリゴマー状態の決定のためのサイズ排除クロマトグラフィー処理を、HPLCクロマトグラフィーにより実施した。手短に言及すると、プロテインA精製された抗体を、Agilent HPLC 1100システム上、300mMのNaCl、50mMの $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.5) 中、Tosoh TSKgel G3000SWカラムに、又はDionex HPLC-システム上、2 x PBS中、Superdex 200 カラム (GE Healthcare) に適用した。溶出されたタンパク質を、UV吸光度及びピーク領域の積分により定量化した。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901が、標準として作用した (図4を参照のこと)。

【0256】

質量分光法：

クロスオーバー抗体の全体の脱グリコシル化された質量を、電子噴霧イオン化質量分析 (ESI-MS) により、決定し、そして確かめた。手短に言及すると、100 μ g の精製された抗体を、100mMの $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH7) 中、50mUのN-Glycosidase F (PNGaseF, ProZyme) により、37 °Cで12~24時間、2mg/mlまでのタンパク質濃度で脱グリコシル化し、そして続いてSephadex G25カラム (GE Healthcare) 上、HPLCにより脱塩した。それぞれのH及びL鎖の質量を、脱グリコシル化及び還元の後、ESI-MSにより決定した。手短に言及すると、115 μ l中、50 μ gの抗体を、60 μ lの1MのTCEP及び50 μ lの8Mのクアニジン塩酸塩と共にインキュベートし、続いて脱塩した。還元されたH及びL鎖の合計質量及び質量を、NanoMate源を備えたQ-Star Elite MSシステム上でESI-MSにより決定した。

10

【 0 2 5 7 】VEGF結合ELISA：

四価抗体 (TvAb) の結合性質を、十分な長さのVEGF165-His タンパク質 (R&D Systems) を有するELISAアッセイにより評価した (図5)。このために、Falconポリスチレン性の透明な増強されたマイクロタイタープレートを、PBS中、100 μ lの2 μ g/mlの組換えヒトVEGF 165 (R&D Systems) により、室温で2時間、又は4 °Cで一晩、被覆した。ウェルを、300 μ lのPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして200 μ lの2% BSA、0.1% Tween20により室温で30分間ブロックし、そして続いて、300 μ lのPBSTにより3度、洗浄した。PBST (Sigma) 中、精製された<VEGF-ANG-2> TvAb及び対照としてのヒト抗-ANG-2抗体 <ANG-2> 抗体 Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370号)、及び抗VEGF抗体<VEGF> 抗体G6-31 (Liang et al., J Biol Chem. 2006 Jan 13; 281(2):951-61; US 2007/0141065号)の希釈シリーズ (40pM - 0.01pM) 100 μ lをウェルに添加し、そしてマイクロタイタープレートシェーカー上で1時間、室温でインキュベートした。

20

【 0 2 5 8 】

ウェルを、300 μ lのPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして結合された抗体を、マイクロタイタープレートシェーカー上で室温で1時間、検出抗体としての2% BSA 0.1% Tween20中、0.1 μ g/mlのF(ab')₂ <hFcgamma>POD (Immuno research) 100 μ l/ウェルにより検出した。未結合検出抗体を、300 μ l/ウェルのPBSTにより3度、洗浄し、そして結合された検出抗体を100 μ lのABTS/ウェルの添加により検出した。吸光度の決定を、Tecan Fluor Spectrometer上で、405nmの測定波長 (492nmの参照波長) で実施した。

30

【 0 2 5 9 】VEGF結合：表面プラスモン共鳴 (Biacore) による37 °CでのVEGF結合の動力学的特徴化：

ELISA発見をさらに確認するために、VEGFへの<VEGF> 抗体 G6-31 又は Avastin 及び<VEGF-Ang-2> TvAb6又はTvAb-2441-bevacizumab-LC06 又は TvAb-2441-bevacizumab-LC08の結合を、次のプロトコルに従って、Biacore T100装置上で表面プラスモン共鳴技法を用いて定量的に分析し、そしてT100ソフトウェアパッケージを用いて分析した：手短には、<VEGF> 抗体をやぎ抗ヒトIgG (JIR 109-005-098)への結合を通してCM5-Chip上に捕獲した。捕獲抗体を、次の通りに標準アミノカップリングを用いてアミノカップリングにより固定した：HBS-N緩衝液がランニング緩衝液として作用し、活性化を700RUのリガンド密度のためにEDC/NHSの混合物により行った。

40

【 0 2 6 0 】

捕獲 - 抗体を、カップリング緩衝液NaAc, pH5.0、c = 2 μ g/mlに希釈し、最終的に、さらに活性化されたカルボキシル基を1Mのエタノールアミンの注入によりブロックした。Mabs <VEGF> 抗体の捕獲を、5 μ l/分の流速及びc(Mabs <VEGF>) = 10nMで行い、ランニング緩衝液 + 1mg/mlのBSAにより希釈し；約30RUの捕獲レベルに達すべきである。rhVEGF (rhVEGF, R&D-Systems カタログ番号, 293-VE) を、分析物として使用した。<VEGF> 抗体に結合するVEGFの動力学的特徴化を、ランニング緩衝液としてのPBS + 0.005% (v/v) Tween 20において37 °Cで実施した。サンプルを、50 μ l/分の流速で注入し、そして300~0.29nM

50

のrhVEGFの一連の濃度を伴っての80秒の結合時間及び1200秒の解離時間を伴う。

【 0 2 6 1 】

遊離捕獲抗体表面の再生を、10mMのグリシン (pH1.5) により、及び個々の分析物サイクルの後、60秒の接触時間を伴って実施した。動力学定数を、通常の二重参照方法を用いて計算した (制御参照: 捕獲分子ヤギ抗ヒトIgGへのrhVEGFの結合、測定流動細胞に基づくブランク、rhVEGF濃度“0”、モデル: Langmuir結合 1 : 1、捕獲分子結合のためにローカル設定されたRmax)。図11は、Biocoreアッセイの略図を示す。

【 0 2 6 2 】

ANG-2結合ELISA:

四価抗体 (TvAb) の結合性質を、十分な長さのアングリオポエチン - 2 - His タンパク質 (R&D Systems) を有するELISAアッセイにより評価した (図 6 a)。このために、Falconポリスチレン性の透明な増強されたマイクロタイタープレート (Falcon) を、PBS中、100 µl の 1 µg/ml の組換えヒトアングリオポエチン - 2 (R&D Systems、キャリアフリー) により、室温で2時間、又は4で一晩、被覆した。ウェルを、300 µl のPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして200 µl の2% BSA、0.1% Tween20により室温で30分間ブロックし、そして続いて、300 µl のPBSTにより3度、洗浄した。

【 0 2 6 3 】

PBS (Sigma) 中、精製された<VEGF-ANG- 2> TvAb及び対照としての<ANG-2> 抗体 Mab53 6及び<VEGF> 抗体G6-31の希釈シリーズ (40pM - 0.01pM) 100 µl /ウェルをウェルに添加し、そしてマイクロタイタープレートシェーカー上で1時間、室温でインキュベートした。ウェルを、300 µl のPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして結合された抗体を、マイクロタイタープレートシェーカー上で室温で1時間、検出抗体としての2% BSA 0.1% Tween20中、0.1 µg/ml のF(ab') <hk>POD (Biozol カタログ番号 206005) 100 µl /ウェルにより検出した。末結合検出抗体を、300 µl /ウェルのPBSTにより3度、洗浄し、そして結合された検出抗体を100 µl のABTS/ウェルの添加により検出した。吸光度の決定を、Tecan Fluor Spectrometer上で、405nmの測定波長 (492nmの参照波長) で実施した。

【 0 2 6 4 】

ANG-1及びANG-2への比較結合 (ANG-1及びANG-2結合ELISA):

抗体の結合性質を、十分な長さのアングリオポエチン - 2 - Hisタンパク質 (R&D Systems #623-AN/CF、又は内部で生成された材料)、又はアングリオポエチン - 1 - His (R&D systems #923-AN) を用いて、ELISAアッセイにより評価した。従って、96ウェルプレート (Falcon) を、PBS (Sigma) 中、100 µl の 1 µg/ml の組換えヒトアングリオポエチン - 1 又はアングリオポエチン - 2 (キャリアフリー) により、室温で2時間、又は4で一晩、被覆した。ウェルを、300 µl のPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして200 µl の2% BSA、0.1% Tween20により室温で30分間、ブロックし、そして続けて、300 µl のPBSTにより3度、洗浄した。

【 0 2 6 5 】

PBS中、精製された試験抗体の希釈シリーズ (40pM - 0.01pM) 100 µl をウェルに添加し、そしてマイクロタイタープレートシェーカー上で1時間、室温でインキュベートした。ウェルを、300 µl のPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして結合された抗体を、マイクロタイタープレートシェーカー上で室温で1時間、検出抗体としての2% BSA 0.1% Tween20中、0.1 µg/ml のF(ab') <hk>POD (Biozol カタログ番号 206005) 100 µl /ウェルにより検出した。末結合検出抗体を、300 µl /ウェルのPBSTにより3度、洗浄し、そして結合された検出抗体を100 µl のABTS/ウェルの添加により検出した。吸光度の決定を、Tecan Fluor Spectrometer上で、405nmの測定波長 (492nmの参照波長) で実施した。

【 0 2 6 6 】

ANG-2結合BIACORE:

抗原、例えばヒトANG-2への抗体の結合を、BIACORE T100 装置 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) を用いて、表面プラズモン共鳴により調べた。手短には、親

10

20

30

40

50

和性測定のために、ヤギ<hIgG-Fcγ>ポリクローナル抗体を、ヒトANG-2に対する抗体の提供のためにアミンカップリングを通してCM5チップ上に固定した(図6B)。結合を、HBS緩衝液(HBS-P(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20, pH 7.4))において5で測定した。精製されたANG-2-His(R&D systems 又は内部精製された)を、溶液での6.25nM~200nMの種々の濃度で添加した。会合を、3分のANG-2-注入により測定し; 解離を、HBS緩衝液によりチップ表面を3分間、洗浄することにより測定し、そしてKD値を、1:1 Langmuir結合モデルを用いて評価した。

【0267】

ANG-2調製物の異種性のために、1:1結合は観察されず; 従って、KD値は単なる相対的な評価である。負の対照データ(例えば、緩衝液曲線)を、システム固有の基線変動の補正のために及びノイズシグナルの低減のためにサンプル曲線から引き算した。Biacore T100評価ソフトウェアバージョン1.1.1をセンサーグラムの分析、及び親和性データの計算のために使用した。他方では、Ang-2は、アミンカップリング(BSAフリー)を通してCM5チップ上に固定されたPentaHisAntibody(PentaHis-Abs BSA-フリー, Qiagen No. 34660)を通して、2000-1700RUの捕獲レベルで捕獲され得た(下記参照のこと)。

【0268】

Tie-2へのhuANG-2結合の阻害(ELISA):

相互作用ELISAを、384ウェルのマイクロタイタープレート(MicroCoat, DE, カタログ番号464718)上でRTで実施した。個々のインキュベーション段階の後、プレートをPBSTにより3度、洗浄した。ELISAプレートを、0.5 µg/mlのTie-2タンパク質(R&D Systems, UK, カタログ番号313-TI)により、少なくとも2時間、被覆した。その後、ウェルを、0.2% Tween-20及び2% BSA(Roche Diagnostics GmbH, DE)により補充されたPBSにより1時間、ブロックした。PBS中、精製された抗体の希釈溶液を、0.2 µg/mlのhuアンジオポエチン-2(R&D Systems, UK, カタログ番号623-AN)とともに、RTで、1時間インキュベートした。洗浄後、0.5 µg/mlのビオチニル化された抗-アンジオポエチン-2クローンBAM0981(R&D Systems, UK)及び1:3000で希釈されたストレプトアビジンHRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, カタログ番号11089153001)の混合物を1時間、添加した。その後、プレートをPBSTにより6度、洗浄した。プレートを、新しく調製されたABTS試薬(Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 表#11 112 422 001)によりRTで30分間、進行せしめた。吸光度を405nmで測定した。

【0269】

ANG-2-VEGF架橋ELISA:

四価抗体(TvAb)の結合性質を、固定された十分な長さのVEGF165-Hisタンパク質(R&D Systems)及びヒトANG-2-Hisタンパク質(R&D Systems)により、結合された二重特異的抗体の検出のためにELISAアッセイにより評価した(図7)。二重特異的<VEGF-ANG-2>TvAbのみが、VEGF及びANG-2に同時に結合することができ、そして従って、2種の抗原を架橋し、ところが単一特異的“標準”IgG1抗原は、VEGF及びANG-2に同時に結合することはできない(図7)。

【0270】

このために、Falconポリスチレン性の透明な増強されたマイクロタイタープレートを、PBS中、100 µlの2 µg/mlの組換えヒトVEGF 165(R&D Systems)により、室温で2時間、又は4で一晩、被覆した。ウェルを、300 µlのPBST(0.2% Tween20)により3度、洗浄し、そして200 µlの2% BSA、0.1% Tween20により室温で30分間ブロックし、そして続いて、300 µlのPBSTにより3度、洗浄した。PBS(Sigma)中、精製された<VEGF-ANG-2>TvAb及び対照としての<ANG-2>抗体 Mab536及び<VEGF>抗体G6-31の希釈シリーズ(40pM - 0.01pM)100 µl/ウェルをウェルに添加し、そしてマイクロタイタープレートシェーカー上で1時間、室温でインキュベートした。ウェルを、300 µlのPBST(0.2% Tween20)により3度、洗浄し、そして結合された抗体を、PBS中、0.5 µg/mlのヒトANG-2-His(R&D Systems)100 µlの添加により検出した。

【0271】

ウェルを、300 μ lのPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして結合されたANG-2を、100 μ lの0.5 μ g/mlの<ANG-2>mIgG1-ビオチン抗体 (BAM0981, R&D Systems)により室温で1時間、検出した。末結合の検出抗体を、300 μ lのPBST (0.2% Tween20) により3度、洗浄し、そして結合された抗体を、ブロッキング緩衝液により1:4に希釈された、1:2000ストレプタビジン-POD接合体 (Roche Diagnostics GmbH, カタログ番号11089153) の室温での1時間の添加により検出した。末結合ストレプタビジン-POD接合体を、300 μ lのPBST (0.2% Tween20) により6度、洗浄し、そして結合されたストレプタビジン-POD接合体を、100 μ lのABTSをウェル当たり添加することにより検出した。吸光度の決定を、405nmの測定波長 (対照波長492nm) でTecan Fluor分光計上で行った。

【0272】

BiacoreによるVEGF-A及びAng-2への二重特異的四価抗体<VEGF-Ang-2>TvAb6の同時結合の実証:

架橋ELISAからのデータをさらに確証するために、追加のアッセイを、Biacore T100装置上で、次のプロトコールに従って、表面プラスモン共鳴技法を用いて、VEGF及びAng-2への同時結合を確保するために確立し、そしてT100ソフトウェアパッケージ (T100 Control, Version 2.01, T100 Evaluation, Version 2.01, T100 Kinetics Summary, Version 1.01) を用いて分析した: Ang-2を、アミンカップリング (BSAフリー) を通してCM5チップ上の同定されたPentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-free, Qiagen No. 34660) を通して、0.005% (v/v) のTween20ランニング緩衝液を通して、PBS中、2000-1700RUの捕獲レベルで捕獲した。

【0273】

HBS-N緩衝液は、カップリングの間、ランニング緩衝液として作用し、活性化はEDC/NHSの混合物により行われた。PentaHis-Ab BSAフリー捕獲-抗体を、カップリング緩衝液NaAc, pH4.5, c=30 μ g/mlにより希釈し、最終的に、活性化されたカルボキシル基を1Mのエタノールアミンの注入によりブロックし; 5000及び17000RUのリガンド密度を試験した。500nMの濃度を有するAng-2を、ランニング緩衝液+1mg/mlのBSAにより希釈された、5 μ l/分の流速でのPentaHis-Abにより捕獲した。続けて、Ang-2及びVEGFに結合する<Ang-2, VEGF>二重特異的抗体を、rhVEGFとのインキュベーション及びサンドイッチ複合体の形成により実証した。

【0274】

このために、二重特異的<VEGF-Ang-2>TvAb6を、50 μ l/分の流速及び100nMの濃度でAng-2に結合し、ランニング緩衝液+1mg/mlのBSAにより希釈し、そして同時結合を、50 μ l/分の流速及び150nMのVEGF濃度で、PBS+0.005% (v/v) Tween20ランニング緩衝液中、VEGF (rhVEGF, R&D-Systems カタログ番号293-VE) とのインキュベーションにより検出した。会合時間120秒、解離時間1200秒。再生を、2 \times 10mMのグリシン (pH2.0) による50 μ l/分の流速及び60秒の接触時間で個々のサイクルの後、実施した。センサーグラムを、通常の二重参照 (制御参照: 捕獲分子PentaHisAbへの二重特異的抗体及びrhVEGFの結合) を用いて補正した。個々のAbのブランクを、rhVEGF濃度“0”により測定した。Biacoreアッセイのスキームを、図13に示す。他のBiacoreアッセイ形式を図15に示す。

【0275】

HEK293-Tie2細胞系の生成:

ANGPT2刺激されたTie2リン酸化及び細胞上のTie2へのANGPT2の結合によるアンジオポエチン-2抗体の妨害を決定するために、組換えHEK293-Tie細胞系を生成した。手短には、CMVプロモーター及びネオマイシン耐性マーカーの制御下で、十分な長さのヒトTie2 (配列番号: 108) をコードするpcDNA3に基づくプラスミド (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) を、HEK293細胞 (ATCC) 中に、トランスフェクション試薬としてFugene (Roche Applied Science) を用いてトランスフェクトし、そして耐性細胞を、DMEM10%FCS、500 μ g/mlのG418において選択した。個々のクローンを、クローニングシリンドラーを通して単離し、そして続いて、FACSによるTie2発現について分析した。クローン22を、G418 (HEK293-Tie2 クローン22) の不在下でさえ、高く且つ安定したTie2発現を有するクローンとして同定した。

続いて、HEK293-Tie2 クローン22を、次の細胞アッセイのために使用した：ANGPT2はTie2リン酸化及びANGPT2細胞リガンド結合アッセイを誘発した。

【0276】

ANGPT2誘発されたTie2リン酸化アッセイ：

ANGPT2抗体によるANGPT2誘発されたTie2リン酸化の阻害を、次のアッセイ原理に従って測定した。HEK293-Tie2 クローン22を、ANGPT2抗体の不在又は存在下で5分間、ANGPT2により刺激し、そしてP-Tie2をサンドイッチELISAにより定量化した。手短には、ウェル当たり 2×10^5 個のHEK293-Tie2 クローン22細胞を、100 μ lのDMEM、10% FCS、500 μ g/ml Geneticinにおいて、ポリ-D-リシン被覆された96ウェル-マイクロタイタープレート上で一晩、増殖した。次の日、ANGPT2抗体の力価測定例を、マイクロタイタープレートにおいて調製し（4倍濃度された、75 μ lの最終体積/ウェル、二重反復）、そして75 μ lのANGPT2（R&D Systems #623-AN）希釈溶液（4倍濃縮された溶液として3.2 μ g/ml）と共に混合した。

10

【0277】

抗体及びANGPT2を、室温で15分間、プレインキュベートした。100 μ lの混合物を、HEK293-Tie2 クローン22細胞（1mMのNaV304と共に5分間、プレインキュベートされた、Sigma #S6508）に添加し、そして37℃で5分間インキュベートした。続いて、細胞をウェル当たり200 μ lの氷冷却されたPBS + 1mMのNaV304により洗浄し、そして氷上でのウェル当たり120 μ lの溶菌緩衝液（20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% グリセロール, 2mM EDTA, 1 mM NaV304, 1 mM PMSF及び10 μ g/ml Aprotinin）の添加により溶菌した。

20

【0278】

細胞を、マイクロタイタープレートシェーカー上で4℃で30分間、溶菌し、そして100 μ lの溶菌物を、前もっての遠心分離を伴わないで、及び全タンパク質決定を伴わないで、p-Tie2 ELISAマイクロタイタープレート（R&D Systems, R&D #DY990）中に直接移した。P-Tie2の量を、製造業者の説明書に従って定量化し、そして阻害についてのIC50値を、エクセルについてのXLfit 4 分析プラグ-イン（Plug-In）（用量-応答ワンサイト、モデル205）を用いて決定した。IC50値を、実験に基づかないで比較したが、しかし実験ごとに変化する。

【0279】

VEGF誘発されたHUVEC増殖アッセイ：

VEGF誘発されたHUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞, Promocell #C-12200）増殖を、VEGF抗体の細胞機能を測定するために選択した。手短には、96ウェル当たり5000HUVEC細胞（低継代数 5 継代）を、コラーゲンI-被覆されたBD Biocoat Collagen I 96-ウェルマイクロタイタープレート（BD #354407 / 35640）における100 μ lの飢餓培地（EBM-2内皮基本培地2, Promocell # C-22211, 0.5% FCS, ペニシリン/ストレプトマイシン）において一晩インキュベートした。種々の濃度の抗体を、rhVEGF（30ng/mlの最終濃度、BD#354107）と共に混合し、そして室温で15分間プレインキュベートした。続いて、その混合物をHUVEC細胞に添加し、そしてそれらを、37℃、5%CO₂下で72時間インキュベートした。分析の日、プレートを、室温で30分間、平衡化し、そして細胞生存性/増殖を、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay キットを用いて、そのマニュアル（Promega, # G7571 /2/3）に従って決定した。発光を分光光度計で決定した。

30

40

【0280】

四価の二重特異的及び四価の単一特異的抗体の企画：

本発明のVEGF（VEGF-A）及びANG-2（アンジオポエチン-2）に結合する二重特異的抗体は、VEGFに結合する第1抗原結合部位及びANG-2に結合する第2抗原結合部位を含んで成る。VEGFに結合する第1抗原結合部位として、例えばLiang, W.C., et al., J Biol Chem. 281 (2) (2006) 951-61 及びUS 2007/0141065号に詳細に記載されるヒトファージ表示由来の抗-VEGF抗体G6-31に両者とも由来する、配列番号：23のH鎖可変ドメイン及び配列番号：24のL鎖可変ドメインが使用され得る。他方では、例えばVEGFに対して特異的に結合する第2抗原結合部位は、配列番号：7又は100のH鎖可変ドメイン、及び抗-VEGF抗

50

体 < VEGF > bevacizumab 及び < VEGF > B20-4.1、好ましくは < VEGF > bevacizumab からの L 鎖可変ドメインを含んで成る。

【 0 2 8 1 】

第 2 抗原結合部位として、Oliner, J., et al., Cancer Cell. 6(5) (2004) 507-16、及び US 2006/0122370 号に詳細に記載されるヒト抗 - ANG-2 抗体 < ANG-2 > Mab536 に両者とも由来する、配列番号 : 31 の H 鎖可変ドメイン、及び配列番号 : 32、又は突然変異 T92L, H93Q 及び W94T (Kabat 番号付け) を有する配列番号 : 32 の L 鎖可変ドメインが使用され得る。他方では、例えば ANG-2 に対して特異的に結合する第 2 抗原結合部位は、配列番号 : 44、配列番号 : 52、配列番号 : 60、配列番号 : 68、配列番号 : 76、配列番号 : 84 又は配列番号 : 92 の H 鎖可変ドメイン、及び抗 - ANG-2 抗体 < ANG-2 > Ang2s_R3_LC03、< ANG-2 > Ang2i_LC06、< ANG-2 > Ang2i_LC07、< ANG-2 > Ang2k_LC08、< ANG-2 > Ang2s_LC09、< ANG-2 > Ang2i_LC10、又は < ANG-2 > Ang2k_LC11、好ましくは < ANG-2 > Ang2i_LC06、又は < ANG-2 > Ang2k_LC08 からの配列番号 : 45、配列番号 : 53、配列番号 : 61、配列番号 : 69、配列番号 : 77、配列番号 : 85、配列番号 : 93 の L 鎖可変ドメインを含んで成る。

【 0 2 8 2 】

両抗体の特徴を兼ね備える剤を生成するために、新規の四価の二重特異的抗体 - 由来のタンパク質体を構成した。それらの分子においては、1 つの抗体の組換え単鎖結合分子が、組換えタンパク質融合技法により、十分な長さの IgG1 形式で保持された他の抗体に連結される。この第 2 抗体は、所望する第 2 結合特異性を担持する。

遺伝子合成及び組換え分子生物学技法により、それぞれの抗体の H 鎖可変ドメイン (VH) 及び L 鎖可変ドメイン (VL) を、グリシンセリン (G4S)3 又は (G4S)-4 単鎖リンカーにより連結し、単鎖 Fv (scFv) を得、これを、(G)6- 又は (G4S)3 - リンカーを用いて他の抗体 H 鎖の C 末端に結合した。

【 0 2 8 3 】

さらに、システイン残基を、前に記載されたように (例えば、WO 94/029350 号; Reiter, Y., et al., Nature biotechnology (1996) 1239-1245; Young, N.M., et al, FEBS Letters (1995) 135- 139; 又は Rajagopal, V., et al., Protein Engineering (1997) 1453-59)、ANG-2 又は VEGF に結合する scFv の VH (Kabat 位置 44 を包含する) 及び VL (Kabat 位置 100 を包含する) ドメインに導入した。

【 0 2 8 4 】

すべてのそれらの分子を、組換え的に生成し、精製し、そして特徴づけ、そしてタンパク質発現、安定性及び生物学的活性を評価した。

四価の二重特異的 < VEGF-ANG-2 >、< ANG-2-VEGF > 抗体及び四価の単一特異的 < ANG-2 > 抗体を生成するために適用された二重特異的抗体企画の要約が表 5 及び表 6 に与えられる。この研究に関しては、我々は、種々の四価のタンパク質体を説明するために用語 “TvAb” を用いる。

【 0 2 8 5 】

二重特異的四価抗体 < VEGF-ANG-2 > TvAb5 及び TvAb6 を得るために、配列番号 : 31 の H 鎖可変ドメイン (VH)、及びヒト抗 - ANG-2 抗体 < ANG-2 > Mab536 に由来する突然変異 T92L、H93Q 及び W94T を有する配列番号 : 32 の L 鎖可変ドメイン (VL) に由来するアンギオポエチン - 2 に結合する単鎖 Fv (ScFv) を、配列番号 : 23 のヒト抗 - VEGF 抗体 < VEGF > G6-31 の H 鎖ペクターの C 末端に対応する配列に融合せしめ、そして配列番号 : 24 に基づくそれぞれの L 鎖発現ペクターと共に同時発現した。企画された形式の代表が図 1 B に示され、そして表 5 及び表 6 に列挙される。

【 0 2 8 6 】

二重特異的四価抗体 TvAb9 及び TvAb15 を得るために、配列番号 : 23 の H 鎖可変ドメイン (VH)、及びヒト抗 - VEGF 抗体 < VEGF > G6-31 に由来する配列番号 : 24 の L 鎖可変ドメイン (VL) に由来する VEGF に結合する単鎖 Fv (ScFv) を、配列番号 : 31 のヒト抗 - ANG 抗体 < ANG-2 > Mab536 の H 鎖ペクターの C 末端に対応する配列に融合せしめ、そして配列番号 : 32 に基づくそれぞれの L 鎖発現ペクターと共に同時発現した。企画された形式の代表が図 1 B に示

され、そして表 5 及び表 6 に列挙される。

【 0 2 8 7 】

【 表 5 】

表 5 : C-末端scFv結合を有する異なった二重特異的四価抗体形式及びその対応する TvAb-命名法。表中の“-”は“存在しない”ことを意味する。

分子名 (二重 特異的 抗体に ついての TvAb- 命名法)	下記 由来の 抗体主鎖	下記 由来の scFv	可変 ドメイン VH及び VL : 配列番号	抗体に 結合される scFvの位置	単鎖 リンカー	ペプチド- リンカー	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
G6-31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23+24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31+32	-	-	-	-
bevacizu mab	<VEGF> bevacizum ab	-	23+24	-	-	-	-
Ang2i_LC 06 (LC06)	<ANG-2> Ang2i_ LC06	-	52+53	-	-	-	-
Ang2k_LC 06 (LC08)	<ANG-2> Ang2k_ LC08	-	68+69	-	-	-	-
TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31 + 32 突然 変異 T92L 、 H93Q 及び W94T を有する	C-末端HC	(G4S) 3	(G) 6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23+24, 31 + 32 突然 変異 T92L 、 H93Q 及び W94T を有する	C-末端HC	(G4S) 3	(G4S) 3	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32 及び 23+24	C-末端HC	(G4S) 3	(G4S) 3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31+32 及び 23+24	C-末端HC	(G4S) 4	(G4S) 3	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された

10

20

30

40

【表 6】

表 6 : C-末端scFv結合を有する異なった二重特異的四価抗体形式及びその対応する TvAb-命名法。表中の“-”は“存在しない”ことを意味する。

分子名 (二重 特異的 抗体に ついての TvAb- 命名法)	下記 由来の 抗体主鎖	下記 由来の scFv	可変 ドメイン VH及び VL: 配列番号	抗体に 結合される scFvの位置	単鎖 リンカー	ペプチド- リンカー	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb- 2441- bevacizu mab-LC06	bevacizum ab	LC06	7+8及び 52+53	C-末端HC	(G4S) 4	(G4S) 4	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb-244 1-bevac izumab-LC 08	bevacizum ab	LC08	7+8及び 68+69	C-末端HC	(G4S) 4	(G4S) 4	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb-342 1_ bevac izumab_L C06	bevacizum ab	LC06	7+8及び 52+53	N-末端HC	(G4S) 4	(G4S) 2	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb-442 1_ bevac izumab_L C06	bevacizum ab	LC06	7+8及び 52+53	C-末端LC	(G4S) 4	(G4S) 2	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された
TvAb-446 1_ bevac izumab_L C06	bevacizum ab	LC06	7+8及び 52+53	C-末端LC	(G4S) 4	(G4S) 6	scFv ジスルフィド VH44/VL100 安定化された

【 0 2 8 8 】

TvAb形成は、例えば下記に基づく：

a) aa) ヒト抗 - VEGF抗体 <VEGF> G6-31、及びab) 抗 - VEGF抗体 <VEGF> G6-31 (配列番号：23) のH鎖のC末端に結合される、配列番号：31のH鎖可変ドメイン (VH)、及び突然変異T92L、H93Q及びW94Tを有する配列番号：32のL鎖可変ドメイン (VL) に由来するアングリオポエチン - 2 に結合する 2 つの単鎖Fv (scFv)；又は

b) ba) ヒト抗 - ANG-2抗体 <ANG-2> Mab536、及びbb) 抗 - ANG-2抗体 <ANG-2> Mab536 (配列番号：31) のH鎖のC末端に結合される、配列番号：23のH鎖可変ドメイン (VH)、及び配列番号：24のL鎖可変ドメイン (VL) に由来するVEGFに結合する 2 つの単鎖Fv(scFv)；

【 0 2 8 9 】

c) ca) ヒト抗 - VEGF 抗体 <VEGF> bevacizumab (Avastin)、及びcb) 抗 - VEGF 抗体 <VEGF> bevacizumab (Avastin) のH鎖のC末端に結合される、配列番号：52又は68のH鎖可変ドメイン (VH)、及び配列番号：53又は69のL鎖可変ドメインに由来するアングリオポエチン - 2 に結合する 2 つの単鎖Fv(scFv)。得られる融合ペプチドの配列は、bevacizumab配列番号：106のL鎖と共に同時発現される配列番号：102又は103である。(他方では、アングリオポエチン - 2 に結合する 2 つの単鎖Fv(scFv) はまた、L鎖のC末端又はH鎖のN末端にも結合され得る。)

【 0 2 9 0 】

10

20

30

40

50

他方では、2つの単鎖Fv(scFv)の他に、また単鎖Fabフラグメントは、上記に記載されるように(C又はN末端への融合のためのペプチドコネクターを用いる)、ヨーロッパ出願番号09004909.9号及び例10におけるよう使用され得る。

【0291】

例1：二重特異的四価抗体の発現及び精製：

<VEGF-ANG-2> TvAb5、TvAb6、TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08：

対応する四価の二重特異的抗体TvAb5及びTvAb6のL鎖及びH鎖を、上記のようにして、ゲノム発現ベクターにおいて構成した。プラスミドを、E.コリにおいて増殖し、精製し、そして続いて、HEK293-F細胞における組換えタンパク質の一過性発現のためにトランスフェクトした(Invitrogen's FreeStyle 293 システムを用いる)。7日後、HEK293-F細胞上清液を収穫し、濾過し、そして二重特異的抗体をプロテインA及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

10

【0292】

すべての二重特異的抗体構成物の均質性を、非還元及び還元条件下でSDS-PAGEにより、及び分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより確かめた。還元条件(図3)下で、C末端scFv融合体を担持する<VEGF-ANG-2> TvAb6のポリペプチドH鎖は、SDS-PAGEに基づいて、計算された分子量に類似する約75kDaの見掛け分子サイズを示した。質量分光法は、精製された抗体構成体の識別を確認した。すべての構成体の発現レベルは、プロテインA HPLCにより分析され、そして“標準”のIgGの発現収量に類似した。タンパク質収量は、プロテインA HPLCにより決定される場合、1Lの細胞-培養上清液当たり150mgのTvAb6 <VEGF-ANG-2>を達成した。

20

【0293】

H鎖でC-末端融合されたscFvを有する精製された、非ジスルフィド安定化された構造体TvAb5のサイズ排除クロマトグラフィー分析は、“標準”のIgGと比較して、サイズ排除のクロマトグラフィーを通してのモノマー抗体の精製の後、再び凝集する高められた傾向を示した(いわゆる、“デージャー鎖”現象)。この発現は、VHとVLとの間の鎖間ジスルフィドにより安定化されなかったscFvを含む分子が、凝集する高められた傾向及び低められた収量を示したことを示す他の例(Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al, Nucl Med Biol. (1998) 387-393 or Schmidt, M., et al, Oncogene (1999) 18, 1711 - 1721)により支持されて来た。

30

【0294】

そのような二重特異的抗体の凝集に関する問題を解決するために、scFv成分のジスルフィド-安定化を適用した。このために、我々は、定義される位置(Kabat番号付けスキームに関して、位置VH44/VL100)でのscFvのVH及びVL内に単一のシステイン置換を導入した。それらの突然変異は、VHとVLとの間での安定した鎖間ジスルフィドの形成を可能にし、これがその得られるジスルフィド安定化されたscFvモジュールを安定化する。TvAb6 <VEGF-ANG-2>のFvのC末端でのscFvへのVH44/VL100ジスルフィドの導入が、精製の後すぐ、凝集傾向を示さず、そしてモノマー状態で存続した安定した四価抗体を導く(図4)。さらに、TvAb6 <VEGF-ANG-2>は、3mg/kgのインビトロ及びインビボで適用される濃度で、反復された凍結-溶融サイクルに基づいて、凝集傾向の上昇を示さなかった。

40

【0295】

表5及び表6に記載されるすべての他のTvAb分子(例えば、TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び TvAb-2441-bevacizumab-LC08)を調製し、そして記載される方法に類似して分析的に特徴づけた。

【0296】

例2：VEGF-A及びANG-2への二重特異的四価抗体<VEGF-ANG-2> TvAb6、TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08の同時結合：

scFvモジュール、及び異なった二重特異的抗体形式のIgG-モジュールに保持されるFvsの結合を、結合モジュール及び二重特異的抗体が由来する“野生型”IgGの結合に比較し

50

た。それらの分析を、生化学的結合ELISAの実施により、及び表面プラスモン共鳴 (Biacore) の適用により、等モル濃度で実施した。

【 0 2 9 7 】

<VEGF-ANG-2> TvAb6に関しては、それが0.625pMの等モル濃度で、その親抗体G6-31に匹敵できるVEGFに結合することが、上記のようなVEGF結合ELISAにより示された (図5)。この発現は、TvAbのFv領域がG6-31のその領域と同一であることを予測する。<VEGF-ANG-2> TvAb6と<VEGF> G6-31との間わずかな差異は、タンパク質濃度の小さな差異、及び<hFc> POD検出抗体の結合によるC-末端scFvのわずかな立体障害性妨害のためであり、そしてANG-2結合ELISAのために使用されるような<hk> POD (Biozol カタログ番号 206005号) 検出抗体の適用により克服され得る。

10

【 0 2 9 8 】

Biacoreを用いてのそれらの発見は、37 °での従来の濃度シリーズを用いて確認された (図11)。それらのデータは、 $4.7\text{--}4.8 \times 10^6 \text{ l}/(\text{Ms})$ の早いKon - 速度 $k(a)$ を示し、飽和がVEGFの最高濃度で達成された。Koff-速度は、ダイマー分析物rhVEGFの結果として、たぶんこの条件下での二価結合 (結合効果) のために、技術的規格の限界 (すなわち、 $5 \times 10^{-6} \text{ s/s}$) に達するが、但し、非常に低リガンド密度が使用され、10 - 15RUの最終VEGF - 応答をもたらすからであった。それにもかかわらず、異なった<VEGF> 抗体の動力学定数を、この方法により比較し、そしてその方法の誤差内に、四価の二重特異的抗体<VEGF-Ang-2> TvAb6及び検出できる元来の抗体<VEGF> G6-31の動力学定数に有意な差異は存在しなかった。それらの条件下での<VEGF-Ang-2>TvAb6及び <VEGF> G6-31についての動力学定数は、この方法によれば実質的に同一であった。従って、TvAb6がそのVEGF結合性質を完全に保持することが結論づけられ得る。表7は、それぞれの動力学定数を示し、そして図12はKa-Kdプロットにおける2種の<VEGF> 抗体 <VEGF-Ang-2> TvAb6及び<VEGF> G6-31の動力学的特性を示す。

20

【 0 2 9 9 】

【表7】

表7 : <VEGF-Ang-2> TvAb6 及び<VEGF> G6-31の動力学的性質 :

37°Cで測定された	Ka	kd	T1/2	KD
抗体	[1/ (Ms)]	[1/s]	[分]	[M]
<VEGF> G6-31	4.83×10^6	9.33×10^{-6}	1237.8	1.93×10^{-12}
<VEGF-Ang-2> TvAb6	4.72×10^6	7.24×10^{-6}	1596.7	1.53×10^{-12}

30

【 0 3 0 0 】

さらなる実験において、<VEGF-ANG-2> TvAb6が0.039pMの等モル濃度でMab536の態様に匹敵する態様でANG-2に結合することが、上記に記載されるように、<hk> POD検出抗体 (Biozolカタログ番号206005) を用いて、ANG-2結合ELISAにより示された (図6A)。これは、TvAb6のScFvモジュールがTvAb構造体においてその結合性質を保持したことを示した。

【 0 3 0 1 】

40

この発見をさらに検証するために、<ANG-2> Mab536及び<VEGF-ANG-2> TvAb6を、Biacore CM5チップ上に第2抗体として固定し、そしてヒトANG-2に対する結合動力学を決定した。ANG-2調製物の異種性のために、1 : 1結合は観察され得ず ; 従って、KD値は単なる相対的評価である。Biacore分析は、<VEGF-ANG-2> TvAb6がANG-2について4.4nMの推定KD値を有することを示した。比較すれば、Mab536は、1.6nMの推定KD値を有する。前記方法の誤差内で、<ANG-2> Mab536と<VEGF-ANG-2> TvAb6との間の結合モード及び親和性の差異は観察されなかった (図6B)。従って、TvAb6のscFvモジュールがTvAb構造体においてその結合性質を完全に保持したことが結論づけられ得る。

【 0 3 0 2 】

<VEGF-ANG-2> TvAb6が、VEGFと同時に結合でき、そして上記に記載されるようなANG-2

50

架橋ELISAアッセイ及びBiacoreアッセイが適用された。

【 0 3 0 3 】

上記に記載されるVEGF-ANG-2 - 架橋ELISAを適用することにより、< VEGF-ANG-2 > TvAb6のみが、0.625pMの等モル濃度でVEGF及びANG-2に同時に結合でき、ところが、単一特異的“標準”IgG1抗体<ANG-2> Mab536 及び<VEGF> G6-31がVEGF及びANG-2に対して同時に結合できなかったことが示された（図7）。

【 0 3 0 4 】

図14は、Biacoreアッセイからのそれぞれのデータを示す。両抗原Ang-2及びVEGFの同時結合が四価の二重特異的抗体<VEGF-Ang-2> TvAb6について示された。負の対照は予測される通りであった：単一特異的抗体<Ang-2> Mab536はAng-2への結合のみを示したが、しかしVEGF-結合は示さなかった。単一特異的抗体<VEGF> G6-31は、VEGFへの結合を示したが、しかしAng-2への結合はまったく示さなかった（データは示されていない）。Ang-2被覆された表面に結合し、そして続いてダイマー-VEGF結合に結合する四価の二重特異的抗体<VEGF-Ang-2> TvAb6の相対的応答単位から、その化学量論が1：1～1：1.4の範囲で計算され得た。一緒に考慮すると、記載されるELISA及びBiacoreアッセイを適用することにより、<VEGF-Ang-2> TvAb6のみがVEGF及びAng-2に同時に結合することができ、ところが単一特異的“標準”IgG1抗体<Ang-2> Mab536 及び<VEGF>G6-31はVEGF及びAng-2に同時に結合することはできなかったことが示された（図15）。

【 0 3 0 5 】

類似する結果が、図15Aに示される類似するBiacoreアッセイにおいて構造体TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び TvAb-2441-bevacizumab-LC08により得られた。抗原、例えばヒトANG-2及びVEGFへの抗体の結合を、BIACORE T100 装置(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)を用いて、表面プラスモン共鳴法により調べた。手短には、親和性測定に関しては、ヤギ<hIgG-FcD> ポリクローナル抗体を、ヒトANG-2及びVEGFに対する二重特異的抗体の提供のためにアミンカップリングを通してCM4チップ上に固定した。

【 0 3 0 6 】

結合を、25℃でHBS緩衝液（HBS-P（10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20, pH 7.4））において測定した。精製されたANG-2-His（R&Dシステム、又は内部精製された）を、溶液中、6.25nM～200nMの種々の濃度で、添加した。会合を3分のANG-2-流入により測定し；解離をHBS緩衝液により3分間、チップ表面を洗浄することにより測定し、そしてKD値を1：1 Langmuir結合モデルを用いて評価した。ANG-2調製の異種性のために、1:1結合は観察されず；従って、KD値は単なる相対的評価である。

【 0 3 0 7 】

VEGF（R&Dシステム）を、溶液中、6.25nM～200nMの種々の濃度で添加した。会合を、3分のVEGF - 注入により測定し；解離を、HBS緩衝液によりチップ表面を3分間、洗浄することにより測定し、そしてKD値を1：1 Langmuir結合モデルを用いて評価した。

結合パートナーの注入の順序を変え、すなわち最初にVEGF及び次にAng2であり、又は逆もまた同様である。

【 0 3 0 8 】

負の対照データ（例えば、緩衝液曲線）を、システム固有の基線変動の補正及びノイズシグナルの低減のためにサンプル曲線から引き算した。Biacore T100 Evaluation Software バージョン1.1.1を、センサーグラム分析及び親和性データの計算のために使用した。

【 0 3 0 9 】

【表 8】

表 8

抗体	親和性hAng-2	親和性hVEGF
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	2.3 nM	0.35 nM
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	0.7 nM	0.34 nM
G6-31	--	<0.1 nM
Mab536	3 nM	--
bevacizumab	--	0.59 nM

10

【0310】

最終的に、TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び TvAb-2441-bevacizumab-LC08の同時結合を、ANGPT2及びVEGFと共に連続態様でインキュベートすることにより示した。図15Bに示されるように、ANGPT2及びVEGFは、二重特異的抗体に同時に結合できる。

【0311】

例3：Scidページマウスにおける段階的皮下Colo205異種移植片モデルにおける<ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31、及びMab536及びG6-31の組み合わせと比較してのジスルフィド - 安定化された二重特異的四価抗体 <VEGF-ANG-2> TvAb6のインビボ効能：

20

精製された、ジスルフィド - 安定化された<VEGF-ANG-2> TvAb6 (n00.2331、表5及び6参照)を、雌のScidページマウスにおいて異なった用量で、2段階皮下Colo205異種移植片モデル研究 (Ang2_PZ_Colo205_003 及びAng2_PZ_Colo205_005) において抗体<ANG-2> Mab536、<VEGF> G6-31、及び<ANG-2> Mab536 及び <VEGF> G6-31の組合せに比較した。

【0312】

抗体：<ANG-2> Mab536を凍結された原液 (c=4.5mg/ml) として供給し、<VEGF> G6-31を凍結溶液 (c=0.6mg/ml) として供給し、そして20mMのヒスチジン、140mMのNaCl、pH6.0中、<VEGF-ANG-2> TvAb6を凍結された原液 (c=0.5 mg/ml) として、供給した。抗体溶液を、必要とされる注射の前、原液からPBSに適切に希釈し、そしてPBSをピークルとして適用した。

30

【0313】

細胞系及び培養条件：Colo205ヒト結腸直腸癌細胞は本来、ATCCから得られ、そして拡張の後、Roche Penzberg内部細胞バンクに寄託された。腫瘍細胞系は通常、水 - 飽和雰囲気、5%CO₂下で37℃で、10%ウシ胎児血清 (PAA Laboratories, Austria) 及び2mM-Lグルタミンにより補充されたRPMI 1640培地 (PAA, Laboratories, Austria)において培養された。継代2～5を移植のために使用した。

【0314】

動物：雌のSCIDページマウス (到着で生後4～5週) (Charles River Germanyから購入された)を、特異的 - 病原体フリー条件下で、ガイドライン (GV-Solas; Felasa; TierschG) に従って、12時間の明/12時間の暗の毎日のサイクルを伴って維持した。実験研究プロトコルが再考され、そして他方自治体により許可された。到着後、動物を動物施設の検疫部で1週間、維持し、新しい環境及び観察のために慣らされた。連続した健康モニターリングを、規則的に実施した。ダイエット食品 (Provimi Kliba 3337) 及び水 (酸性化された、pH2.5-3) を任意に供給した。研究の開始でのマウスの年齢は、生後約10週であった。

40

【0315】

モニターリング：動物を、臨床学的症状及び副作用の検出のために毎日、制御した。実験を通してのモニターリングのために、動物の実験体重を記録し、そして腫瘍の体積を、病期分類の後、キャリパにより測定した。

【0316】

50

腫瘍細胞注入：注入の日、Colo205細胞を遠心分離し、1度洗浄し、そしてPBSに再懸濁した。PBSによる追加の洗浄の後、細胞濃度及び細胞サイズを、細胞カウンター及び分析器システム（Vi-CELL, Beckman Coulter）を用いて決定した。Colo205細胞の注入のために、最終力価を、 5.0×10^7 細胞/ml、生存率約90%に調製した。続いて、動物当たり 2.5×10^6 個の細胞に対応するこの懸濁液100 μ lを、マウスの右脇腹にs.c.注入した。

【0317】

動物の処理は、細胞移植の16日後（研究Ang2_PZ_Colo205_003）及び細胞移植の14日後（研究Ang2_PZ_Colo205_005）、それぞれ100mm³又は150mm³の平均腫瘍体積で、ランダムの日で開始した。

【0318】

【表9】

表9

研究Ang2_PZ_Colo205_003の74日目までの用量スケジュール（図8Aを参照のこと）：

グループ	動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与の経路/ モード	処理の数	累積用量 mg/kg
1	10	ビークル		i. p. 毎週1度	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	i. p. 毎週1度	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	i. p. 毎週1度	8	48
4	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	5 mg/kg	i. p. 毎週1度	8	40
			+6 mg/kg	i. p. 毎週1度	8	48
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	7 mg/kg	i. p. 毎週1度	8	56

【0319】

研究Ang2_PZ_Colo205_003においては、<VEGF-ANG-2> TvAb6は、等モル比に関して、誤って過少投与された。<VEGF-ANG-2> TvAb6の用量が研究Ang2_PZ_Colo205_005において調節され、その結果、動物は<VEGF-ANG-2> TvAb6及び<VEGF> G6-31 及び<ANG-2> Mab536の組合せにより、等モル比のANG-2及びVEGF結合部位を受けた。

【0320】

74日目までの腫瘍増殖阻害（図8aを参照のこと）Ang2_PZ_Colo205_003研究：

7mg/kgの用量での<VEGF-ANG-2> TvAb6は、5mg/kgでの<VEGF> G6-31及び6mg/kgでの<ANG-2> Mab536の組合せ、及び6mg/kgの用量での単一剤としての<VEGF> G6-31に匹敵する効力を示し（図8A）、そして6mg/kgの用量での単一剤<ANG-2> Mab536よりも卓越した。皮下Colo205モデルは、ほとんど完全に腫瘍増殖阻害をもたらす、ヒト及びネズミVEGFを阻止する<VEGF> G6-31抗体に対して非常に応答するので、<VEGF-ANG-2> TvAb6は、選択された実験条件下で単一剤としてG6-31（6mg/kg）から分化されず、ところが<VEGF-ANG-2> TvAb6は、明白に低い累積量で<ANG-2> Mab536及び<VEGF> G6-31の組合せのような匹敵できる阻害性を示した（<VEGF-ANG-2> TvAb6 = 56mg/kg抗体は、<ANG-2> Mab536及び<VEGF> G6-31 = 40 + 48 = 88mg/kg抗体の組合せに相当した）。

【0321】

10

20

30

40

【表 10】

表10

63日目までの研究の用量スケジュールAng2_PZ_Colo205_005 :

グループ	動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与の経路/ モード	処理の数	累積用量
6	10	ビークル		i. p. 毎週1度	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	i. p. 毎週1度	7	21mg/kg
8	10	<VEGF> G6-31 + <ANG-2> Mab536	3	i. p. 毎週1度	7	21mg/kg
			3	i. p. 毎週1度	7	21mg/kg
9	10	<ANG-2> Mab536	3	i. p. 毎週1度	7	21mg/kg
10	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	i. p. 毎週1度	7	28mg/kg

【 0 3 2 2 】

63日目までの研究の用量スケジュールAng2_PZ_Colo205_005 :

4mg/kgの用量での<VEGF-ANG-2> TvAb6は、それぞれ3mg/kgでの<VEGF> G6-31及び<Ang-2> Mab536の組合せの効力に匹敵できる効力を示し、そして3mg/kgの用量での単一剤<VEGF> G6-31及び<ANG-2> Mab536のいずれかよりも卓越した(図8B)。これは、低用量(要約された抗体の濃度に関して - その組合せの累積用量は、21 + 21 = 42mg/kg - 対 - 28mg/kgの二重特異的抗体TvAb6である)で、VEGF及びANG-2を標的化する二重特異的抗体が、VEGF及びANG-2を阻止するそれぞれの単一剤の組合せに匹敵できる、及びいずれかの単一剤よりも卓越した強い抗 - 腫瘍効力をもたらすことができたことを示す最初の例である。

【 0 3 2 3 】

例 4 : VEGF - 誘発された管形成の阻止 :

抗 - VEGF関連の活性が二重特異的の<VEGF-ANG-2> TvAb6に保持されることを確かめるために、<VEGF-ANG-2> TvAb6が単一特異的抗体<VEGF> G6-31に匹敵できる管形成の用量依存性阻害に介在する、VEGF誘発された管形成アッセイAngioKit TCS CellWorks (Cell Systems)が示された。AngioKit TCS CellWorksアッセイを、次の手順に従って実施した : 細胞を、1, 4, 7及び9日目、抗体による処理の前、2ng/mgのVEGFにより個々の時点で刺激した。

【 0 3 2 4 】

血管を11日目、CD31-PE抗体(BD Pharmingen #555446)を用いて、内皮細胞の染色により可視化した。写真を4倍の倍率で取り、そして管の長さ及び分枝点の数についての値を、Angiogenesis Tube Formation Application Module in MetaMorph (Molecular Devices)を用いて、定量的に分析した。値及び標準偏差を、検体当たり4枚の写真の二重反復及び分析により計算した。図9は、それぞれの結果を示し、そして図10A及びBは定量分析を示す。アングリオポエチン - 2は、管形成に対して影響を有さず、そして従って、ANG-2の阻害はこのアッセイにおいては研究されなかった。そのデータは、二重特異的<VEGF-ANG-2> TvAb6及び単一特異的<VEGF> G6-31抗体がVEGF刺激された管形成の阻害において同等に効果的であることを示す。

【 0 3 2 5 】

例 5 : Tie2リン酸化 :

抗 - ANGPT2関連活性が二重特異的の<VEGF-ANGPT2> 抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC06及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08に保持されているかを確かめるために、TvAb-2441-bevacizumab-LC06及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08が、上記のようなANGPT2刺激されたTie2リン酸化アッセイにおけるそれらの母クローンLC06及びLC08のような匹敵できる態様で、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げたことが示された。

【 0 3 2 6 】

最初の実験においては、両二重特異的抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC06及びTvAb-2441

-bevacizumab-LC08は、図16Aに示されるように、母クローンLC06及びLC08のそれらの値に匹敵できるIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化の用量 - 依存性妨害を示した。TvAb-2441 -bevacizumab-LC06は、約721ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げるが、ところがLC06は、約508ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げた。TvAb- 2441-bevacizumab-LC08は約364ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げ、ところがLC08は、約499ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2酸化を妨げた。

【 0 3 2 7 】

第2の実験においては、両二重特異的抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC06及び TvAb-2441-bevacizumab-LC08は、図16Bに示されるように、母クローンLC06及びLC08のそれらの値に匹敵できるIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化の用量 - 依存性妨害を示した。TvAb-2441 -bevacizumab-LC06は、約488ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げるが、ところがLC06は、約424ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げた。TvAb- 2441-bevacizumab-LC08は約490ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げ、ところがLC08は、約399ng/mlのIC50値を伴って、ANGPT2刺激されたTie2酸化を妨げた。

【 0 3 2 8 】

一緒に考慮すると、それらのデータは、二重特異的四価の<VEGF-ANGPT2> 抗体TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08が、この細胞アッセイの誤差内で、それらの母クローンLC06及びLC08に匹敵する態様で、ANGPT2刺激されたTie2リン酸化を妨げたことを示す。

【 0 3 2 9 】

例6：Tie-2 (ELISA) に結合するhuANG-2の阻害：

相互作用ELISAを、384ウェルのマイクロタイタープレート (MicroCoat, DE, カタログ番号 464718) 上でRTで実施した。個々のインキュベーション段階の後、プレートをPBSTにより3度、洗浄した。ELISAプレートを、0.5 µg/mlのTie-2タンパク質 (R&D Systems, UK, カタログ番号313-TI) により、少なくとも2時間、被覆した。その後、ウェルを、0.2%Tween-20及び2%BSAにより補充されたPBS (Roche Diagnostics GmbH, DE) により1時間、ブロックした。PBS中、精製された抗体の希釈溶液を、RTで1時間、0.2 µg/mlのヒトアンギオポエチン - 2 (R&D Systems, UK, カタログ番号623 -AN) と共にインキュベートした。洗浄の後、0.5 µg/mlのビオチニル化された抗 - アンギオポエチン - 2 クローンBAM0981 (R&D Systems, UK) 及び1：3000に希釈されたストレプトタビジンHRP (Roche Diagnostics GmbH, DE, カタログ番号11089153001) の混合物を、1時間、添加した。その後、プレートを、PBSTにより6度洗浄した。プレートを、新しく調製されたABTS試薬 (Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠剤#11 112 422 001) によりRTで30分間、進行せしめた。吸光度を405nmで測定した。

【 0 3 3 0 】

10

20

30

【表 1 1】

表11

Ang2相互作用ELISAについての要約データ：

＜VEGF-ANG-2＞二重特異的抗体 (又は単一特異的親抗体)	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	hANG2	
＜VEGF-ANG-2＞G6_31	>20000	
TvAb-2441_ G6_31-Ang2i_LC06	75	39
TvAb-2441_ G6_31-Ang2k_LC08	66	31
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	44	8
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	42	11
＜ANG-2＞Mab536	15	8
＜VEGF＞ Bevacizumab	>20000	
TvAb-3421-bevacizumab-LC06	31	1
TvAb-4421-bevacizumab-LC06	35	17
TvAb-4461-bevacizumab-LC06	46	10

10

【 0 3 3 1】

20

例 7：hVEGF受容体（ELISA）に結合するhVEGFの阻害：

試験を、384ウェルのマイクロタイタープレート（MicroCoat, DE, カタログ番号464718）上でRTで実施した。個々のインキュベーション段階の後、プレートをPBSTにより3度、洗浄した。開始で、プレートを0.5 µg/mlのhVEGF-Rタンパク質（R&D Systems, UK, カタログ番号321-FL）により少なくとも2時間、被覆した。その後、ウェルを、0.2%Tween-20及び2%BSAにより補充されたPBS（Roche Diagnostics GmbH, DE）により1時間、ブロックした。

【 0 3 3 2】

PBS中、精製された抗体の希釈溶液を、RTで1時間、0.15 µg/mlのhuVEGF121（R&D Systems, UK, カタログ番号298-VS）と共にインキュベートした。洗浄の後、0.5 µg/mlの抗VEGFクローンMab923（R&D Systems, UK）及び1：2000に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）-接合されたF(ab')₂抗マウスIgG（GE Healthcare, UK, カタログ番号NA9310V）の混合物を1時間、添加した。その後、プレートを、PBSTにより6度洗浄した。プレートを、新しく調製されたABTS試薬（Roche Diagnostics GmbH, DE, 緩衝液#204 530 001, 錠剤#11 112 422 001）によりRTで30分間、進行せしめた。吸光度を405nmで測定した。

30

【 0 3 3 3】

【表 1 2】

表12

VEGF相互作用ELISAについての要約データ：

＜VEGF-ANG-2＞二重特異的抗体	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	VEGF	
＜VEGF-ANG-2＞G6_31	1431	130
TvAb-2441_ G6_31-Ang2i_LC06	1654	213
TvAb-2441_ G6_31-Ang2k_LC08	1392	184
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	2831	503
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	2305	972
TvAb-＜ANG-2＞Mab536	>20000	
TvAb-＜VEGF＞ Bevacizumab	1584	357
TvAb-3421-bevacizumab-LC06	2660	284
TvAb-4421-bevacizumab-LC06	1980	1319
TvAb-4461-bevacizumab-LC06	1677	394

10

【 0 3 3 4】

例 8：HUVEC増殖：

20

抗 - VEGF関連活性が二重特異的四価＜VEGF-ANG2＞抗体TvAb-2441-bevacizumab- LC06 及びTvAb-2441-bevacizumab-LC08に保持されているかを確認するために、TvAb-2441- bevacizumab-LC06 及び TvAb-2441-bevacizumab-LC08が、上記のようなVEGF誘発されたHUVEC増殖アッセイにおけるそれらの母クローンLC06及びLC08のような匹敵できる態様で、VEGF誘発されたHUVEC増殖を妨げたことが示された。

図18は、実際、TvAb-2441-bevacizumab-LC06 及び TvAb-2441 - bevacizumab-LC08が、親抗体bevacizumabに匹敵するVEGF - 誘発されたHUVEC増殖を、濃度依存性態様で妨げることを示す。

【 0 3 3 5】

例 9：ヒトANG-1及びヒトANG-2へのELISA結合アッセイ：

30

ヒトANG-1及びヒトANG-2への親＜ANG-2＞抗体Ang2i-LC06、Ang2i-LC07 及びAng2k- LC08の結合を、上記のようにANG-1又はANG-2結合ELISAにおいて決定した（ANG-1及びANG-2（ANG-1及びANG-2結合ELISA）への比較結合を参照のこと）。手短には、ELISA型アッセイは、マイクロタイタープレートにおけるヒト野生型アングリオポエチン-1又は-2の固定化に基づく。固定されたANG-1又はANG-2に向けられる抗体の結合を、POD接合体と共に＜ヒトFc＞（抗-IgG）抗体を通して測定した。＜ANG-2＞抗体の希釈系列はEC₅₀濃度を決定することを可能にする。参照として、ヒト抗-ANG-2抗体＜ANG-2＞抗体Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370号)を用いた。決定されたEC50濃度を下記表に要約する。

【 0 3 3 6】

40

【表 1 3】

表13

抗体	hANG-1結合 EC50	hANG-2結合 EC50
<ANG-2>Mab536	2538 ng/ml	133 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC06	>8000 ng/ml	84 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC07	>8000 ng/ml	3006 ng/ml
<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 ng/ml	105 ng/ml

10

すべての抗体は、ANG-2に対して特異的に結合する。Mab536及びAng2k-LC08はまた、ANG-1に対する特異的結合を示すが、ところがAng2i-LC06 及びAng2i-LC07は、ANG-1に対して特異的に結合されなかった。なぜならば、それらは8000ng/ml（検出限界）以上のEC50値を有するからであった。

【 0 3 3 7】

例10：二重特異的四価の単鎖Fab <VEGF- ANG-2> 抗体分子scFab-Avastin-LC06-2620、scFab-Avastin- Ang2i-LC06-2640及び scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641の発現及び精製：

例 1、及び上記材料及び方法に記載される方法に類似して、二重特異的四価の単鎖Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子 scFab-Avastin- LC06-2620、scFab-Avastin- LC06-2640及びscFab-Avastin- LC06-2641（すべて3種は、<VEGF> bevacizumab 及び<ANG- 2> Ang2i-LC06に基づく）を、発現し、そして精製した。結合親和性及び他の性質を、上記例に記載のようにして決定した。それらの二重特異的抗体の適切な（結果的に修飾された）L鎖及びH鎖アミノ酸配列は、配列番号：109 -110（scFab-Avastin-LC06- 2620）、配列番号：111 -112（scFab-Avastin-LC06-2640）及び配列番号：113-114（scFab-Avastin-LC06-2641）で与えられる。

20

【 0 3 3 8】

【表 1 4】

表14

キーデータ	scFab-Avastin- LC06- 2620	scFab-Avastin- Ang2i-LC06-2640	scFab-Avastin-Ang2i- LC06-2641
発現（収率）	29 μ g/ml	27 μ g/ml	18 μ g/ml
精製（収率、プロテインA 相溶性）	21mg、57%	19mg、86%	12mg、90%
分離用SEC後の相溶性	98%	98%	99%
機能			
hANG-2親和性 (Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
hVEGF親和性 (Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

30

40

【 0 3 3 9】

例11：二重特異的三価の単鎖Fab <VEGF-ANG-2>抗体分枝 Avastin-LC06-KiH-C-scFabの発現及び精製：

例 1 及び上記材料及び方法に記載される方法に類似して、<VEGF> bevacizumab及び<ANG-2> Ang2i-LC06に基づく、二重特異的三価の単鎖Fab <VEGF-ANG-2>抗体分子Avastin-LC06-KiH-C-scFabを発現し、そして精製した。結合親和性及び他の性質を、上記例に記載のようにして決定した。この二重特異的抗体の適切な（結果的に修飾された）L鎖及びH鎖アミノ酸配列は、配列番号：115-117（Avastin-LC06-KiH-C- scFab）で与えられる。

【 0 3 4 0】

50

【表 15】

表15

キーデータ	Avastin-LC06-KiH-C-scFab
発現 (収率)	15 μ g/ml
精製 (収率、プロテインA 相同性)	4.8mg、91%
分離用SEC後の相同性	97%
機能	
hANG-2親和性 (Biacore)	4.4 E-9 M
hVEGF親和性 (Biacore)	1 E-10 M

10

【0341】

例12：二重特異的三価<VEGF-ANG-2>抗体分子Avastin-LC06-C-Fab-6CSSの発現及び精製

例1及び上記材料及び方法に記載される方法に類似して、<VEGF> bevacizumab及び<ANG-2> Ang2i-LC06に基づく、二重特異的三価<VEGF-ANG-2>抗体分子Avastin-LC06-C-Fab-6CSSを発現し、そして精製した。結合親和性及び他の性質を、上記例に記載のようにして決定した。一般にこの形式の二重特異的三価抗体分子は、ヨーロッパ出願番号09005108.7号に記載されている。この二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体の適切な（結果的に修飾された）L鎖及びH鎖アミノ酸配列は、配列番号：118-120 (Avastin-LC06-C-Fab-6CSS)で与えられる。

20

【0342】

【表 16】

表16

キーデータ	scFab-Avastin-LC06-2620	scFab-Avastin-LC06-2640	scFab-Avastin-LC06-2641
発現 (収率)	29 μ g/ml	27 μ g/ml	18 μ g/ml
精製 (収率、プロテインA 相同性)	21mg、57%	19mg、86%	12mg、90%
分離用SEC後の相同性	98%	98%	99%
機能			
hANG-2親和性 (Biacore)	1.9 E-9 M	1.8 E-9 M	1.9 E-9 M
hVEGF親和性 (Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

30

【0343】

例13：二重特異的二価のドメイン交換された<VEGF-ANG-2>抗体分子Avastin-LC06-CHI-CL、Avastin-LC06-VH-VL及びAvastin-LC06-VH-VL-SSの発現及び精製：

例1及び上記材料及び方法に記載される方法に類似して、<VEGF> bevacizumab及び<ANG-2> Ang2i-LC06に基づく、二重特異的二価のドメイン交換された<VEGF-ANG-2>抗体分子Avastin-LC06-CHI-CL (WO 2009/080253号に記載されるようなCH-CL交換)、Avastin-LC06-VH-VL (WO 2009/080252号に記載されるようなVH-VL交換)及びAvastin-LC06-VH-VL-SS (WO 2009/080252号に記載されるようなVH-VL交換及び追加の導入されたVH44 VL100ジスルフィド架橋)を発現し、そして精製した。結合親和性及び他の性質を、上記例に記載のようにして決定した。それらの二重特異的抗体の適切な（結果的に修飾された）L鎖及びH鎖アミノ酸配列は、配列番号：121-124 (Avastin-LC06-CHI-CL)、配列番号：125 -

40

50

128 (Avastin-LC06-VH-VL) 及び配列番号: 129 -132 (Avastin-LC06-VH-VL-SS) で与えられる。

【 0 3 4 4 】

【 表 1 7 】

表17

キーデータ	Avastin-LC06-CM-CH1-CL	Avastin-LC06-CM-VH-VL	Avastin-LC06-VH-VL-SS
発現 (収率)	87 μ g/ml	44 μ g/ml	65 μ g/ml
精製 (収率、プロテインA 相溶性)	50mg、62%	22mg、95%	91mg、74%
分離用SEC後の相溶性	84%	>99%	95%
機能			
hANG-2親和性 (Biacore)	1.3 E-9 M	2.1 E-9 M	1.46 E-9 M
hVEGF親和性 (Biacore)	1 E-10 M	1 E-10 M	1 E-10 M

【 0 3 4 5 】

例14: 二重特異的二価のScFab-Fc融合 <VEGF-ANG- 2>抗体分子 Avastin-LC06-N-scFab 及びAvastin-LC06-N-scFabSSの発現及び精製:

例 1 及び上記材料及び方法に記載される方法に類似して、<VEGF> bevacizumab及び<ANG-2> Ang2i-LC06に基づく、二重特異的二価のScFab-Fc 融合 <VEGF-ANG-2> 抗体分子Avastin-LC06-N-scFab及びAvastin-LC06-N-scFabSSを発現し、そして精製した。結合親和性及び他の性質を、上記例に記載のようにして決定した。それらの二重特異的抗体の適切な (結果的に修飾された) H鎖アミノ酸配列は、配列番号: 133-134 (Avastin-LC06- N-sc Fab) 及び配列番号:135 -136 (Avastin-LC06-N-scFabSS) で与えられる。

【 0 3 4 6 】

【 表 1 8 】

表18

キーデータ	Avastin-LC06-N-scFab	Avastin-LC06-N-scFabSS
発現 (収率)		62 μ g/ml
精製 (収率、プロテインA 相溶性)		43%
機能		
hANG-2親和性 (Biacore)		1nM
hVEGF親和性 (Biacore)		1nM

【 0 3 4 7 】

例15: hVEGF受容体 (ELISA) に結合するhVEGFの阻害、VEGF - 誘発された管形成のブロッキング、Tie-2 (ELISA) に結合するhuANG-2の阻害、Tie2リン酸化、及び例10~14の二重特異的 <VEGF-ANG-2> 抗体分子のHUVEC増殖:

hVEGF受容体 (ELISA) に結合するhVEGFの阻害、VEGF - 誘発された管形成のブロッキング、Tie-2 (ELISA) に結合するhuANG-2の阻害、Tie2リン酸化、及び例10~14の二重特異的 <VEGF-ANG-2> 抗体分子のHUVEC増殖を、上記材料及び方法、及び例 4 ~ 9 に記載される方法に類似して決定することができる。

【 0 3 4 8 】

例16: Scidページマウス (bevacizumab(Avastin)処理に対して耐性にした後) におけ

る難治性Colo 205異種移植片における <ANG-2> ANG2i-LC06、及び<ANG-2> ANG2i-LC06及び Avastinの組合せに比較しての二重特異的抗体 <VEGF-ANG-2> 抗体のインビボ効力：細胞系及び培養条件：

Colo205ヒト結腸直腸癌細胞は本来、ATCCから得られ、そして拡張の後、Roche Penzberg内部細胞バンクに寄託された。腫瘍細胞系は通常、水 - 飽和雰囲気、5%CO₂下で37℃で、10%ウシ胎児血清（PAA Laboratories, Austria）及び2mMのL-グルタミンにより補充されたRPMI 1640 培地（PAA, Laboratories, Austria）において培養された。継代2～5を移植のために使用した。

【0349】

動物：

雌のSCIDページマウス（到着で生後4～5週）（Charles River Germanyから購入された）を、特異的 - 病原体フリー条件下で、ガイドライン（GV-Solas; Felasa; TierschG）に従って、12時間の明/12時間の暗の毎日のサイクルを伴って維持した。実験研究プロトコルが再考され、そして地方自治体により許可された。到着後、動物を動物施設の検疫部で1週間、維持し、新しい環境及び観察のために慣らされた。連続した健康モニタリングを、定期的に実施した。ダイエツト食品（Provimi Kliba 3337）及び水（酸性化された、pH2.5-3）を任意に供給した。研究の開始でのマウスの年齢は、生後約10週であった。

【0350】

腫瘍細胞注入：

注入の日で、腫瘍細胞を、培養フラスコ（Greiner）から収穫し（トリプシン - EDTA）、そして50mlの培養培地中に移し、PBSにより1度洗浄し、そしてPBSに再懸濁した。PBSによる追加の洗浄段階及び濾過（細胞濾過器；Falcon 100µm）の後、最終細胞力価を、 2.5×10^7 /mlに調節した。腫瘍細胞懸濁液を、トランスファーピペットにより注意して混合し、細胞凝集を回避した。この後、細胞懸濁液を、広い針（1.10×40mm）を用いて、1.0mlのツベルクリン注射器（Braun Melsungen）中に満たし；注射針に関しては、交換し（0.45×25mm）、そしてあらゆる注入に関して、新しい針が使用された。

【0351】

麻酔を、密封された循環システムに、ブレインキュベーションチャンバー（ブラキシガラス）、個々のマウス用鼻マスク（シリコーン）を有し、そして燃焼性又は爆発性麻酔化合物イソフルラン（cp-pharma）を有さない、小動物のためのStephens注入ユニットを用いて実施した。注入の2日前、動物の被膜を削り、そして細胞注入のために、麻酔された動物の皮膚を解剖ばさみにより注意して持ち上げ、そして100µlの細胞懸濁液（ $= 2.5 \times 10^6$ 個の細胞）を、動物の右側面に皮下注入した。

【0352】

動物の処理：

前処理：

動物処理を、それぞれ100mm³～150mm³の平均腫瘍体積で、細胞移植の14日後（研究Ang2_PZ_Colo205_008）、開始した。マウスを、5週間、Avastin（10mg/kg）により、週1度、処理した。

二次処理：

その後、マウスを、二次処理のためにランダム化し、そしてそれぞれのグループに10匹のマウスを含む4つのグループに分けた。51日目で二次処理の開始での腫瘍体積は、336～341mm³の範囲であった。マウスを、次の表に示されるように、異なった化合物により週1度、i.p.処理した。

【0353】

10

20

30

40

【表 19】

表19

グループ	動物の数	化合物	用量 (mg/kg) (nモル/kg)	投与の経路/ モード	処理数	累積用量 (mg/kg)
11	10	Avastin	10 mg/kg (68 nモル/kg)	i. p. 週1度	11	110
12	10	ANG2i- LC06	10 mg/kg (68 nモル/kg)	i. p. 週1度	6	60
13	10	ANG2i- LC06+	10 mg/kg (68 nモル/kg) +	i. p. 週1度	6	60
		Avastin	10 mg/kg (68 nモル/kg)	i. p. 週1度	11	110
14	10	TvAb-2441- bevacizu mab- LC06	13 mg/kg (64 nモル/kg)	i. p. 週1度	6	78

10

【 0 3 5 4 】

モニタリング：

動物を、それらの健康状態のために1週当たり2度、制御した。体重を、細胞注入の後、1週当たり2度、記録した。腫瘍直径を、開始日、キャリパにより測定し、そして続いて、全処理の期間、1週当たり2度、測定した。腫瘍体積を、NCIプロトコル（腫瘍重量 = $1/2ab^2$ ，ここで“a”及び“b”はそれぞれ、腫瘍の長及び短径である）に従って計算した。終了期準は、決定的腫瘍質量（1.7gまで、又は >1.5cm）、基線から20%以上の体重減少、腫瘍潰瘍化、又は動物の不良は一般的状態であった。

20

【 0 3 5 5 】

【表 20】

表20

結果：91日目でのメジアンに基づく腫瘍増殖阻害率（％）：

30

	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nモル/kg) i. p. ; Avastin 10 mg/kg (68 nMol/kg) i. p.	45. 3
ANG2i-LC06 10 mg/kg i. p. (68 nモル/kg)	44. 4
TvAb-2441- bevacizumab- LC06_13mg/kg i. p. (64 nモル/kg)	60. 4

【 0 3 5 6 】

結果は、二重特異的<VEGF-ANG-2>抗体 TvAb-2441- bevacizumab-LC06が、単一特異的抗体ANG2i ; - LC06のみ、又はANG2i - LC06及びAvastinの組合せによる処理に比較して、Sci dページマウスにおけるbevacizumab (Avastin) - 耐性異種移植片腫瘍モデルColo205における高い腫瘍増殖阻害性（低い用量で）を示したことを示す。

40

【 0 3 5 7 】

例17：s.c. Calu-3 NSCLC異種移植片における腫瘍脈管形成のインビボ阻害：

- ラベルされた抗 - CD31を用いての脈管形成の非侵襲性インビボイメージングを通しての検出：

細胞系及び培養条件：

このヒト肺腺癌細胞系は、肺癌を有する白人男性から確立された。細胞は、Roche, Kam akuraから得られ、そして細胞バンクのために内部で継代された。腫瘍細胞を、37 で、5

50

%CO₂で水飽和された雰囲気下で、10%ウシ胎児血清 (PAN Biotech, Germany) 及び2mMのL-グルタミン (PAN Biotech, Germany) により補充されたRPMI1640 培地 (PAN Biotech, Germany)において通常、培養した。培養継代を、1時間/週に分割して、トリプシン/EDT A 1× (PAN) で実施した。

動物：

雌のBALB/c ノードマウス (到着で生後4～5週) (Charles River Germanyから購入された) を、特異的 - 病原体フリー条件下で、ガイドライン (GV-Solas; Felasa; TierschG) に従って、12時間の明/12時間の暗の毎日のサイクルを伴って維持した。実験研究プロトコルが再考され、そして地方自治体により許可された。到着後、動物を動物施設の検疫部で1週間、維持し、新しい環境及び観察のために慣らされた。連続した健康モニターリングを、定期的に実施した。ダイエツト食品 (Provimi Kliba 3337) 及び水 (酸性化された、pH2.5-3) を任意に供給した。研究の開始でのマウスの年齢は、生後約10週であった。

10

【0358】

腫瘍細胞注入：

注入の日で、腫瘍細胞を、培養フラスコ (Greiner) から収穫し (トリプシン - EDTA) 、そして50mlの培養培地中に移し、PBSにより1度洗浄し、そしてPBSに再懸濁した。PBSによる追加の洗浄段階及び濾過 (細胞濾過器; Falcon 100 µm) の後、最終細胞力価を、 5.0×10^7 /mlに調節した。腫瘍細胞懸濁液を、トランスファーピペットにより注意して混合し、細胞凝集を回避した。この後、細胞懸濁液を、広い針 (1.10×40mm) を用いて、1.0mlのツベルクリン注射器 (Braun Melsungen) 中に満たし; 注射針に関しては、交換し (0.45×25mm) 、そしてあらゆる注入に関して、新しい針が使用された。

20

【0359】

麻酔を、密封された循環システムに、ブレインキュベーションチャンバー (ブラキシガラス)、個々のマウス用鼻マスク (シリコーン) を有し、そして燃焼性又は爆発性麻酔化合物イソフルラン (cp-pharma) を有さない、小動物のためのStephens注入ユニットを用いて実施した。注入の2日前、動物の被膜を削り、そして細胞注入のために、麻酔された動物の皮膚を解剖ばさみにより注意して持ち上げ、そして100 µlの細胞懸濁液 (= 5.0×10^6 個の細胞) を、動物の右側面に皮下注入した。

30

【0360】

動物の処理：

研究の35日目で、マウスを、それらの体重及び腫瘍サイズに依存して、統計学的に十分に分配されたグループにランダム化した。治療抗体による処理のために、個々のグループは、10匹のマウスから成り、そして治療抗体による処理は、6週間、1週1度、i.p. 適用された (図19を参照のこと)。

【0361】

グループ1：ビークル (Xolair) 10mg/kg

グループ2：Avastin 10mg/kg

グループ3：単一特異的<VEGF> Avastin 10 mg/kg + 単一特異的<ANG-2> Ang2i-LC06 10 mg/kg (= Avastin / Ang2i-LC06)の組合せ

40

グループ4：二重特異的<VEGF-ANG-2> 抗体2441-Avastin-scFv-LC06 13.3 mg/ kg

【0362】

モニターリング：

動物を、それらの健康状態のために1週当たり2度、制御した。体重を、細胞注入の後、1週当たり2度、記録した。腫瘍直径を、開始日、キャリパにより測定し、そして続いて、全処理の期間、1週当たり2度、測定した。腫瘍体積を、NCIプロトコル (腫瘍重量 = $1/2ab^2$, ここで“a”及び“b”はそれぞれ、腫瘍の長及び短径である) に従って計算した。終了期準は、決定的腫瘍質量 (1.7gまで、又は >1.5cm)、基線から20%以上の体重減少、腫瘍潰瘍化、又は動物の不良は一般的状態であった。

【0363】

50

ラベルされた抗 - CD31抗体による血管及び脈管形成モニターリング：

予備研究は、腫瘍脈管構造をイメージングするための最良の剤として抗 - CD31抗体を示した。この剤は、マウス内皮CD31受容体を標的化し、そして低いシグナル：バックグラウンド比を伴って単一の血管を可視化する。従って、抗 - CD31抗体のイメージングは、腫瘍脈管構造をイメージングするための可能な手段を提供する。個々の治療グループ中の3匹のマウスを選択し、そして35、49及び79日目、有機蛍光Alexa610により共有ラベルされた、50 µg/マウスの抗 - CD31抗体をi.v.注入した。近赤外イメージングを、吸入麻酔下で、ラベルされた抗体の個々の適用の24時間後、実施した。腫瘍脈管構造の上昇又は下降を、MAESTROシステムの比較イメージング用具を用いて可視化した。対照mab Xolair及び治療抗体Avastinによる処理下で、35～79日での腫瘍血管の上昇を観察した。対照的に、Avastin + Ang2i-LC06 及び2441-Avastin-scFv-LC06による組合された処理は、腫瘍脈管構造の低下を示した（図19）。

【 0 3 6 4 】

腫瘍領域を、測定領域を手動的に描くことにより定量化し、そしてシグナル強度を、強度値（合計シグナル/暴露時間）で評価した。35～49日及び49～79日でのCD31シグナルの平均的变化を、図19にプロットした。すべての処理グループは、35～49日目、腫瘍脈管構造における上昇を示した。CD31腫瘍シグナルはグループ1（Xolair）及びグループ2（Avastin）において着実に促進したが、腫瘍脈管構造は、グループ3（Avastin + <ANG-2> Ang2i-LC06）の組合せ）及びグループ4（二重特異的<VEGF-ANG-2> 抗体 2441-Avastin-scFv-LC06）において有意に低下し、そしてグループ4はもっとも著しい抗脈管形成効果を明白に示した（図19）。

【 0 3 6 5 】

最後のインビボイメージング研究の直後、腫瘍を外植し（79日目）、ホルマリンに固定し、そしてエクスピボ研究のためにパラフィンに封入した。蛍光顕微鏡は、対照mab Xolairにより処理された腫瘍において多くの十分に定義された毛細管を示した。いくつかの腫瘍血管がAvastinにより処理されたマウスにおいて観察された。対照的に、処理グループ3及び4は、処理グループ1及び2に比較して、腫瘍において有意に少なく且つ低い定義された血管を有し、ところがグループ4は最も著しい効果を示した。グループ4は、低い微小血管密度を示し、毛細管は一般的に小さく且つ不統一であり、そしてそれらはグループ1、2及び3のように弱い抗 - CD31蛍光シグナルを示した。組織化学的HE - 染色は、他の処理グループについてよりも明白に高い、グループ4の二重特異的抗体による処理グループにおけるすべての領域の90%までに、腫瘍内壊死領域を示した（データは示されていない）。

【 0 3 6 6 】

例18：Scidベージュマウスにおける段階的皮下Colo205異種移植片モデルにおける単一特異的親抗体（単独で又は組合して）に比較しての二重特異的抗体<VEGF-ANG-2>のインビボ効能：

細胞系及び培養条件：

Colo205ヒト結腸直腸癌細胞は本来、ATCCから得られ、そして拡張の後、Roche Penzberg内部細胞バンクに寄託された。腫瘍細胞系は通常、水 - 飽和雰囲気、5%CO₂下で37 °Cで、10%ウシ胎児血清（PAA Laboratories, Austria）及び2mMのL-グルタミンにより補充されたRPMI 1640 培地（PAA, Laboratories, Austria）において培養された。継代2～5を移植のために使用した。

動物：

雌のSCIDベージュマウス（到着で生後4～5週）（Charles River Germanyから購入された）を、特異的 - 病原体フリー条件下で、ガイドライン（GV-Solas; Felasa; TierschG）に従って、12時間の明/12時間の暗の毎日のサイクルを伴って維持した。実験研究プロトコールが再考され、そして地方自治体により許可された。到着後、動物を動物施設の検疫部で1週間、維持し、新しい環境及び観察のために慣らされた。連続した健康モニターリングを、規則的に実施した。ダイエツト食品（Provimi Kliba 3337）及び水（酸性化され

た、pH2.5-3)を任意に供給した。研究の開始でのマウスの年齢は、生後約10週であった。

【0367】

腫瘍細胞注入：

注入の日で、Colo205細胞を遠心分離し、PBSにより1度、洗浄し、そしてPBSに再懸濁した。PBSによりさらに洗浄した後、細胞濃度及び細胞サイズを、細胞カウンター及び分析器システム(Vi-CELL, Beckman Coulter)を用いて決定した。Colo205細胞の注入のために、最終力価を、 5.0×10^7 細胞/ml、生存率約90%に調節した。続いて、動物当たり 2.5×10^6 個の細胞に対応するこの懸濁液100 μ lを、マウスの右側にs.c.注入した。

動物の処理は、それぞれ100mm³の平均腫瘍体積で、細胞移植(研究Ang2_PZ_Colo205_009)の16日後、ランダム化の日に開始した。

【0368】

【表21】

表21

研究Ang2_PZ_Colo205_009の用量スケジュール：

動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与の経路/モード
10	Xolair	10	i. p. 週1度
10	<VEGF> Avastin	10	i. p. 週1度
10	<ANG-2> Ang2i- LC06	10	i. p. 週1度
10	Ang2i-LC06 +Avastin	10 10	i. p. 週1度 i. p. 週1度
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab- LC06	13.3	i. p. 週1度
10	<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- CH1- CL	20	i. p. 週1度
10	<VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin- LC06-2620	16.6	i. p. 週1度

【0369】

モニタリング：

動物を、それらの健康状態のために1週当たり2度、制御した。体重を、細胞注入の後、1週当たり2度、記録した。腫瘍直径を、開始日、キャリパにより測定し、そして続いて、全処理の期間、1週当たり2度、測定した。腫瘍体積を、NCIプロトコル(腫瘍重量 = $1/2ab^2$, ここで“a”及び“b”はそれぞれ、腫瘍の長及び短径である)に従って計算した。終了期準は、決定的腫瘍質量(1.7gまで、又は >1.5cm)、基線から20%以上の体重減少、腫瘍潰瘍化、又は動物の不良は一般的状態であった。

【0370】

【表 2 2】

表22

結果：61日目でのメジアン（％）に基づいての腫瘍増殖阻害率（TGI）：

	TGI
<VEGF> Avastin	66
<ANG-2> Ang2i- LC06	47
Ang2i-LC06+ Avastin	78
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441- bevacizumab- LC06	87
<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- CH1- CL	92
<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin- LC06-2620	86

10

【 0 3 7 1】

結果は、すべての3種の二重特異的<VEGF-ANG-2> Avastin (bevacizumab)- ANG2i-LC06抗体（すべて、bevacizumab配列、配列番号7及び8、及びANG2i-LC06配列、配列番号52及び53に基づく）が、単一特異的抗体ANG2i-LC06及びAvastinのみ又はANG2i-LC06 及びAvastinの組合せによる処理に比較して、Scidページマウスにおける異種移植片腫瘍モデルColo205における高い腫瘍増殖阻害性を示したことを示す。

【 0 3 7 2】

20

例19：二重特異的<VEGF-ANG-2> 抗体分子scFab-Avastin-LC10-2620、scFab- Avastin-LC10-2640及びscFab-Avastin-LC10-2641、Avastin-LC10-KiH-C-scFab、Avastin-LC10-C-Fab-6CSS、Avastin-LC10-CHI-CL、Avastin-LC10-VH-VL及びAvastin-LC10- VH-VL-SS、Avastin-LC10-N-scFab及びAvastin-LC10-N-scFabSSの発現及び精製、及び性質：

Ang2i-LC10（配列番号84及び85）のその対応するVH及びVLドメインにより、Ang2i-LC06（配列番号52及び53）のVH及びVLドメインを置換し、そして例10～14に記載される類似する（そのような置換とは別の）方法及び配列を用いることにより、すべて<VEGF> bevacizumab 及び<ANG-2>Ang2i-LC10に基づく、二重特異的<VEGF-ANG-2> 抗体分子 scFab- Avastin-LC10-2620、scFab-Avastin-LC10-2640 及びscFab-Avastin-LC10-2641、Avastin-LC10-KiH-C-scFab、Avastin-LC10-C-Fab-6CSS、Avastin-LC10-CHI-CL、Avastin-LC10-VH-VL 及びAvastin-LC10-VH-VL-SS、Avastin-LC10-N-scFab及びAvastin-LC10-N-scFabSSを、発現し、そして精製した。

30

結合親和性及び他のインビトロ性質を、上記例に記載のようにして決定する。

【 0 3 7 3】

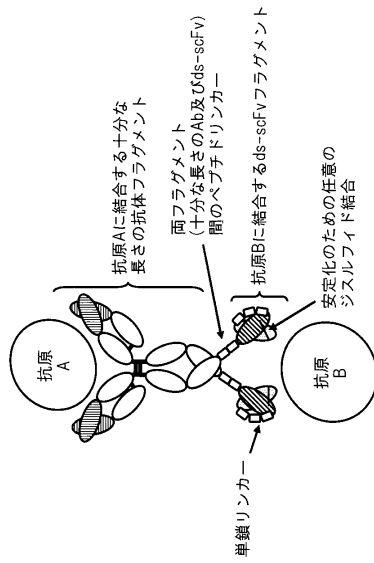
例20：二重特異的抗体<VEGF-ANG-2> 分子 scFab-Avastin-LC10-2620、scFab-Avastin-LC10-2640及び scFab-Avastin-LC10-2641、Avastin-LC10-KiH-C-scFab、 Avastin-LC10-C-Fab-6CSS、Avastin-LC10-CHI-CL、Avastin-LC10-VH-VL及びAvastin-LC10-VH-VL-SS、 Avastin-LC10-N- scFab 及び Avastin-LC10-N-scFabSSのインビボ効能：

二重特異的抗体<VEGF-ANG-2> 分子 scFab-Avastin-LC10-2620、scFab-Avastin-LC10-2640及びscFab-Avastin-LC10-2641、 Avastin-LC10-KiH-C-scFab、 Avastin-LC10-C-Fab-6CSS、Avastin-LC10-CHI-CL、Avastin-LC10- VH-VL 及び Avastin-LC10-VH-VL-SS、Avastin-LC10-N-scFab及びAvastin-LC10-N-scFabSSのインビボ効能を、上記の対応する例に類似して決定する。

40

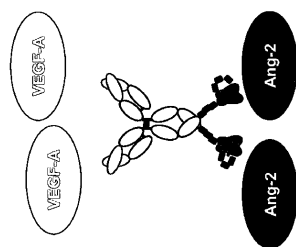
【図 1 A】

Figure 1A



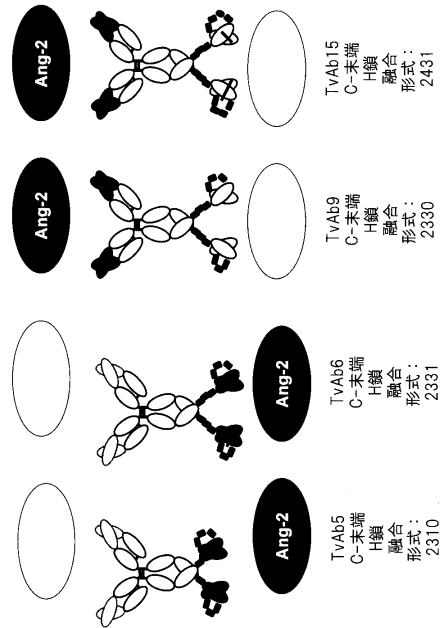
【図 2 A】

Figure 2A



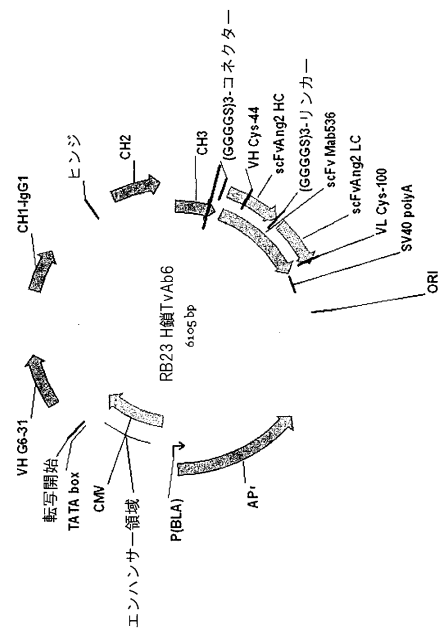
【図 1 B】

Figure 1B



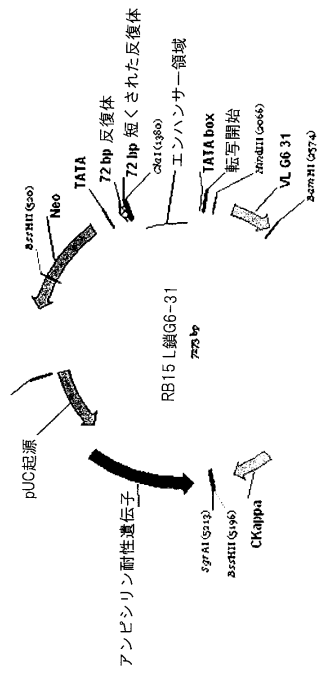
【図 2 B - 1】

Figure 2B - part one



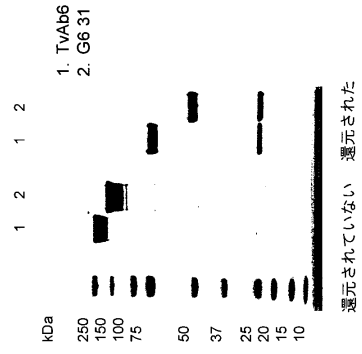
【 図 2 B - 2 】

Figure 2B-part two



【 図 3 】

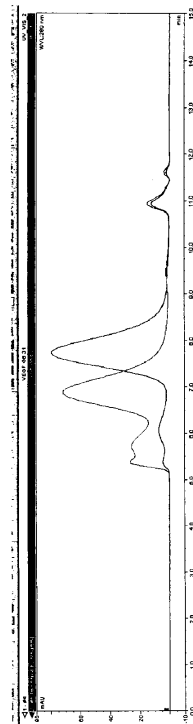
Figure 3



【 図 4 A 】

Fig. 4A

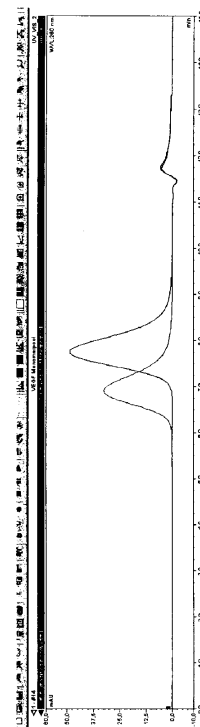
1. プロテインAプル
G6-31 : 10%凝集体
TvAb6 : 25%凝集体



【 図 4 B 】

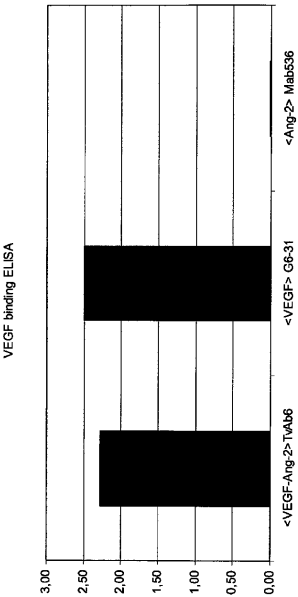
Fig. 4B

2. SECプル、精製の後
G6-31 : >99%モノマー
TvAb6 : >99%モノマー



【 図 5 - 1 】

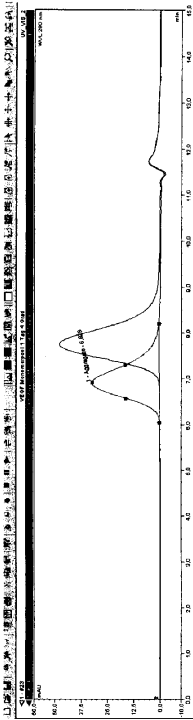
Figure 5 –part one



【 図 4 C 】

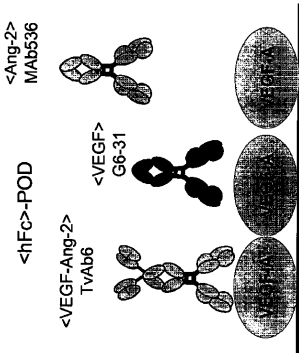
Fig. 4C

3. SECブール4℃で24時間後
G6-31 : >99%モノマー
TvAb6 : >99%モノマー



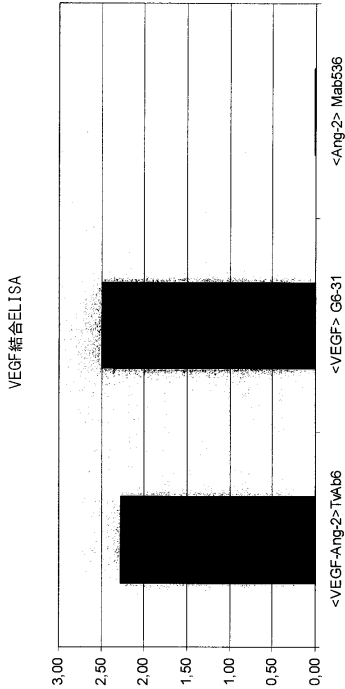
【 図 5 - 2 】

Figure 5 –part two

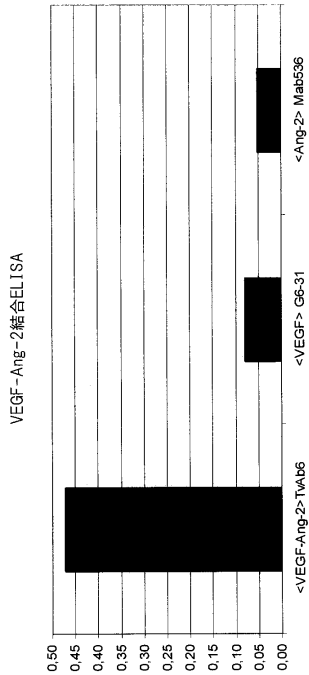


【 図 5 】

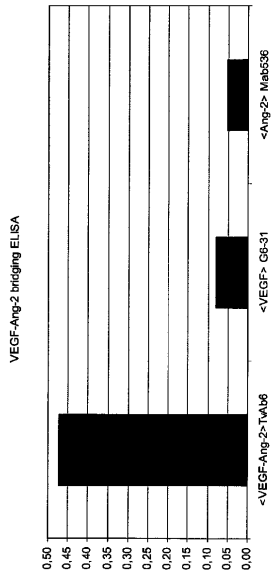
Figure 5 –part one



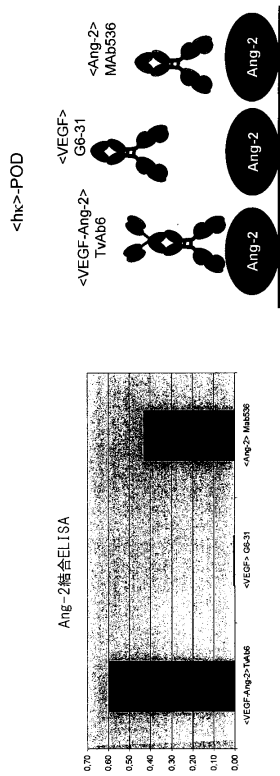
【 図 7 】
Figure 7-part one



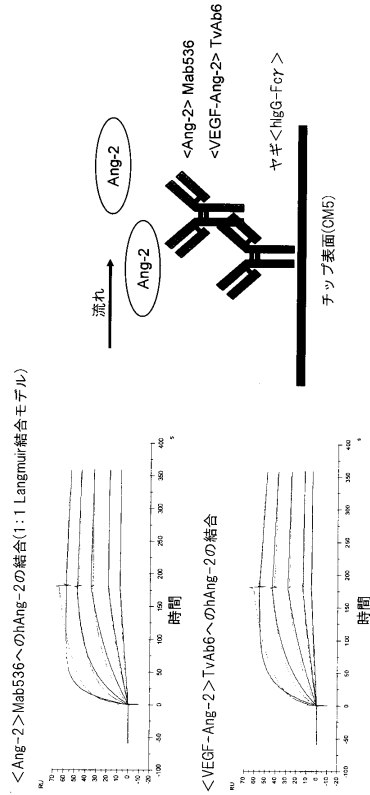
【 図 7 - 1 】
Figure 7-part one



【 図 6 A 】
Figure 6A

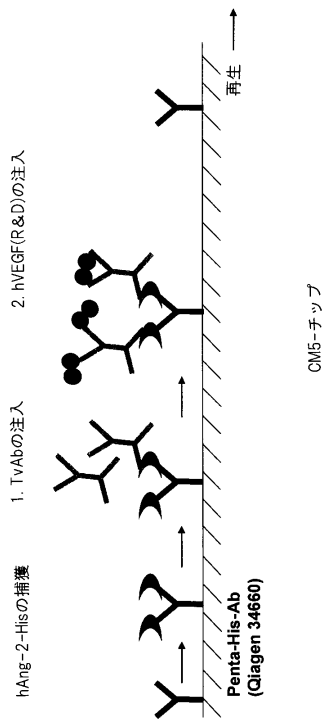


【 図 6 B 】
Figure 6B



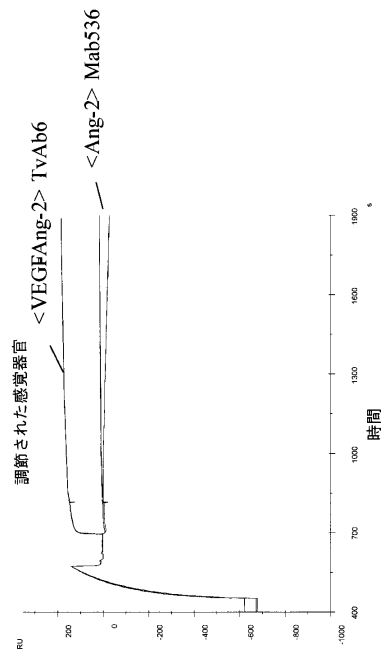
【図 13】

Figure 13



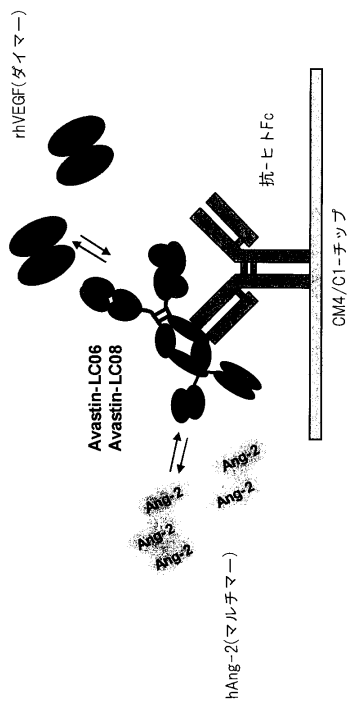
【図 14】

Figure 14



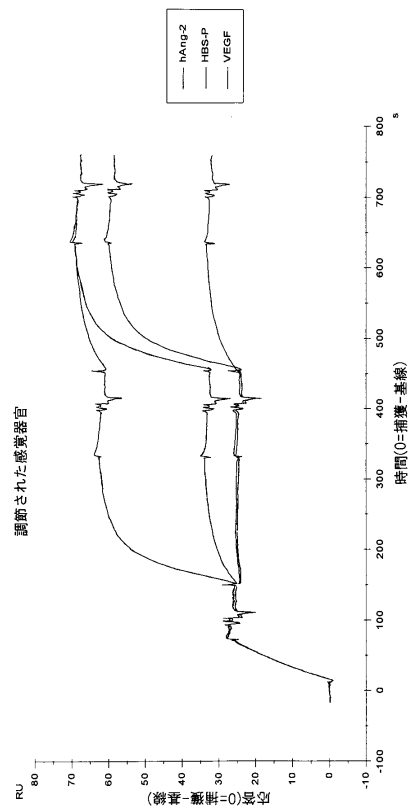
【図 15 A】

Fig 15A



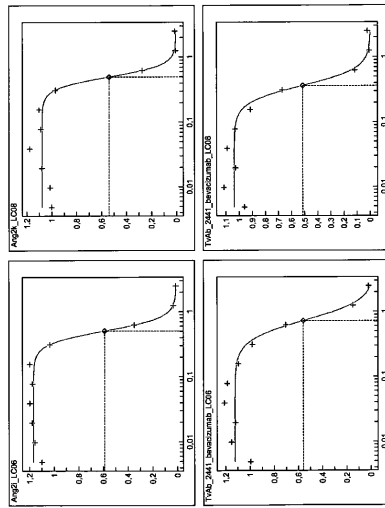
【図 15 B】

Fig 15B



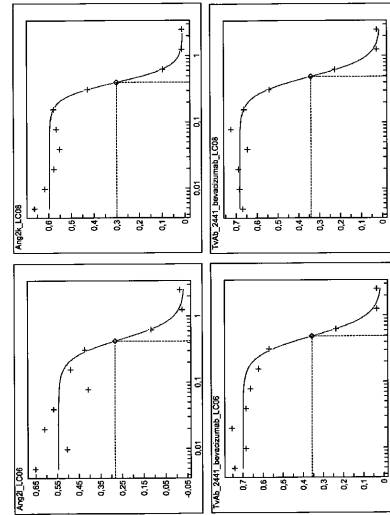
【 図 1 6 A 】

Fig 16A



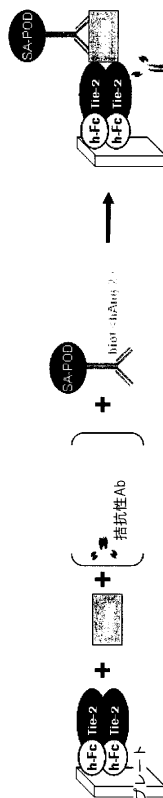
【 図 1 6 B 】

Fig 16B



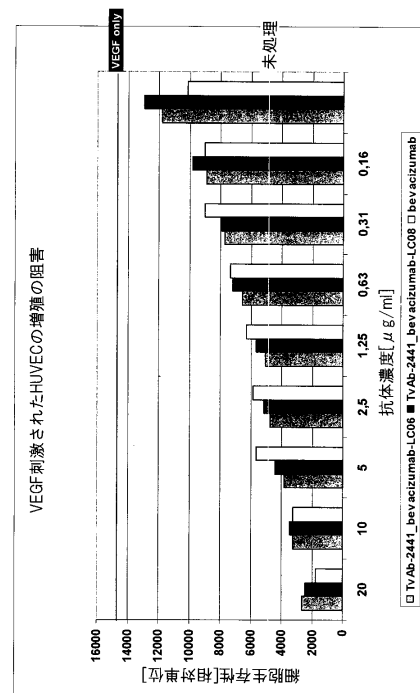
【 図 1 7 】

Fig 17



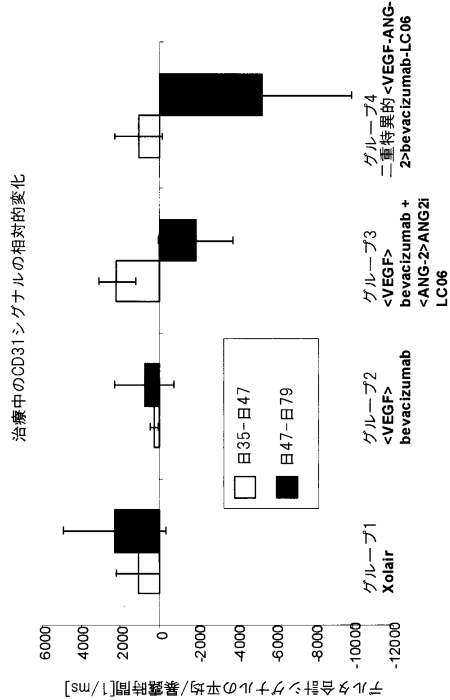
【 図 1 8 】

Fig 18



【図 19】

Fig 19



【配列表】

0005368570000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/06 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 27/00 (2006.01)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)
A 6 1 P 1/00 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)
A 6 1 P 17/06 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 27/00
A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 17/06

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ベーナー, モニカ

ドイツ連邦共和国, 8 1 3 7 9 ミュンヘン, スレーフォクトシュトラッセ 2 4

(72)発明者 ブリンクマン, ウルリッヒ

ドイツ連邦共和国, 8 2 3 6 2 バイルハイム, ファイヒトルシュトラッセ 1 2

(72)発明者 ジョルジュ, ギュイ

ドイツ連邦共和国, 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 グリープ, レムコ アルベルト

ノルウェー国, エンオー - 3 4 7 0 スレメスタッド, オダルスベイエ 3 1 ベー

(72)発明者 イムホフ - ユング, ザビーネ

ドイツ連邦共和国, 8 2 1 5 2 プラネック, エゲンホーフエン - シュトラッセ 2 6 ベー

(72)発明者 カブリエ, アニータ

ノルウェー国, エンオー - 0 2 8 7 オスロ, ストロムスボーグベイエ 3 9 ハー

(72)発明者 ケッテンベルガー, フーベルト

ドイツ連邦共和国, 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 クライン, クリスティアン

スイス国, 8 9 0 6 ボンシュテッテン クリュツァッハーベーク 4 1

(72)発明者 レグラ, イェルク トマス

ドイツ連邦共和国, 8 0 6 3 9 ミュンヘン, リールシュトラッセ 1 5

(72)発明者 シェーファー, ボルフガンク

ドイツ連邦共和国, 6 8 1 9 9 マンハイム, タンホイザーリンク 1 9 0

- (72)発明者 シャンツァー, ユールゲン ミヒャエル
ドイツ連邦共和国, 8 0 4 6 9 ミュンヘン, アウエンシュトラッセ 3 1
- (72)発明者 ショイアー, ベルナー
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ベンツベルク, プリメルシュトラッセ 3
- (72)発明者 ゼーバー, シュテファン
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ベンツベルク, プロイネッツリーダー ベーク 2 2
- (72)発明者 トマス, マルクス
ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ベンツベルク, ザンクト クララ - シュトラッセ 2 7

審査官 三原 健治

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 0 8 9 4 4 5 (WO, A 1)
JENDREYKO N, SIMULTANEOUS, PHENOTYPIC KNOCKOUT OF VEGF-R2 AND TIE-2 WITH AN INTRADIABO
DY 以下備考, KLINISCHE PAEDIATRIE, 2 0 0 6 年 5 月, V218 N3, P143-151, ENHANCES ANTIA
NGIOGENIC EFFECTS IN VIVO
FISCHER NICOLAS, BISPECIFIC ANTIBODIES: MOLECULES THAT ENABLE NOVEL THERAPEUTIC STRATE
GIES, PATHOBIOLOGY, スイス, KARGER BASEL, 2 0 0 7 年 5 月 1 日, V74 N1, P3-14

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)