

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】令和 2 年 8 月 6 日 (2020.8.6)

【公表番号】特表 2019-521986 (P2019-521986A)

【公表日】令和 1 年 8 月 8 日 (2019.8.8)

【年通号数】公開・登録公報 2019-032

【出願番号】特願 2018-565786 (P2018-565786)

【国際特許分類】

C 0 7 K	1/36	(2006.01)
C 0 7 K	1/18	(2006.01)
C 0 7 K	1/20	(2006.01)
C 0 7 K	1/22	(2006.01)
C 0 7 K	1/34	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	47/68	(2017.01)
C 1 2 N	15/13	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	1/36	
C 0 7 K	1/18	Z N A
C 0 7 K	1/20	
C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	1/34	
C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/68	
C 1 2 N	15/13	

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 18 日 (2020.6.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多重特異性抗体を、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物から精製するための方法であって、多重特異性抗体が複数のアームを含み、各アームが V H / V L 単位を含み、方法が、逐次的な、

a) 組成物を捕獲クロマトグラフィーにかけて、捕獲クロマトグラフィー溶出物を生成するステップと、

b) 捕獲クロマトグラフィー溶出物を第 1 の混合モードクロマトグラフィーにかけて、

第 1 の混合モード溶出物を生成するステップと、

c) 第 1 の混合モード溶出物を第 2 の混合モードクロマトグラフィーにかけて、第 2 の混合モード溶出物を生成するステップと、

d) 多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、

方法が、組成物の生成物特異的不純物の量を低減し、

生成物特異的不純物が、非対抗体のアーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種 (H M W S)、低分子量種 (L M W S)、酸性バリエーション、または塩基性バリエーションのうちの 1 つ以上である、

方法。

【請求項 2】

捕獲クロマトグラフィー溶出物が、第 1 の混合モードクロマトグラフィーの前にイオン交換クロマトグラフィーにかけられ、ここで任意選択的にイオン交換クロマトグラフィーが第四級アミンを含む、または H I C クロマトグラフィーにかけられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

多重特異性抗体を、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物から精製するための方法であって、多重特異性抗体が複数のアームを含み、各アームが V H / V L 単位を含み、多重特異性抗体の各アームが別々に生成され、方法が、逐次的な、

a) 多重特異性抗体の各アームを捕獲クロマトグラフィーにかけて、多重特異性抗体の各アームに対する捕獲溶出物を生成するステップと、

b) 多重特異性抗体を含む組成物を生成するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームの捕獲溶出物を含む混合物を形成するステップと、

c) 多重特異性抗体を含む組成物を第 1 の混合モードクロマトグラフィーにかけて、第 1 の混合モード溶出物を生成するステップと、

d) 第 1 の混合モード溶出物を第 2 の混合モードクロマトグラフィーにかけて、第 2 の混合モード溶出物を生成するステップと、

e) 多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、

方法が、組成物の生成物特異的不純物の量を低減し、

生成物特異的不純物が、非対抗体のアーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種 (H M W S)、低分子量種 (L M W S)、酸性バリエーション、または塩基性バリエーションのうちの 1 つ以上である、

方法。

【請求項 4】

多重特異性抗体を含む組成物が、第 1 の混合モードクロマトグラフィーの前にイオン交換クロマトグラフィーにかけられ、ここで任意選択的にイオン交換クロマトグラフィーが第四級アミンを含む、または H I C クロマトグラフィーにかけられる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

捕獲クロマトグラフィーが、プロテイン L クロマトグラフィー、プロテイン A クロマトグラフィー、プロテイン G クロマトグラフィー、またはプロテイン A 及びプロテイン G クロマトグラフィーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第 1 の混合モードクロマトグラフィー及び第 2 の混合モードクロマトグラフィーが、連続的である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

(a) 第 1 の混合モードクロマトグラフィーが、混合モードアニオン交換クロマトグラフィーである、

(b) 第 2 の混合モードクロマトグラフィーが、混合モードカチオン交換クロマトグラフィーである、

(c) 第 1 の混合モードクロマトグラフィーが、混合モードカチオン交換クロマトグラ

フィーである、または

(d) 第2の混合モードクロマトグラフィーが、混合モードアニオン交換クロマトグラフィーである、

請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

(a) 第1の混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで、またはフロースルーモードで実施される、かつ

(b) 第2の混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで、またはフロースルーモードで実施される、

請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

第1の混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで実施され、溶出が勾配溶出である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

第2の混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで実施され、溶出が勾配溶出である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

第2の混合モード溶出物を限外濾過するステップをさらに含み、任意選択的に、限外濾過が、逐次的に、第1の限外濾過、透析濾過、及び第2の限外濾過を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

捕獲クロマトグラフィーが、プロテインAクロマトグラフィーであり、かつプロテインAクロマトグラフィーが、プロテインA平衡化緩衝液、プロテインA装填緩衝液、またはプロテインA洗浄緩衝液のうちの1つ以上を使用し、平衡化緩衝液、装填緩衝液、及び/または洗浄緩衝液が、約pH7～約pH8である、請求項5～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

プロテインA平衡化緩衝液が、約25mMのトリス及び約25mMのNaClを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

プロテインAクロマトグラフィーが、装填後に平衡化緩衝液で洗浄される、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

捕獲クロマトグラフィーが、プロテインAクロマトグラフィーであり、かつ多重特異性抗体が、pH段階溶出によって、または低いpHを有するプロテインA溶出緩衝液をプロテインAクロマトグラフィーに適用することによって、プロテインAクロマトグラフィーから溶出される、請求項5～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

pH段階溶出が、低いpHを有するプロテインA溶出緩衝液をプロテインAクロマトグラフィーに適用することを含み、プロテインA溶出緩衝液が、約150mMの酢酸を約pH2.9で含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

捕獲クロマトグラフィーが、プロテインAクロマトグラフィーであり、かつプロテインA溶出物がプールされ、溶出物のOD₂₈₀が約0.5を超える、請求項5～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

アニオン交換混合モードクロマトグラフィーが、第四級アミン及び疎水性部分を含む、請求項7～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

カチオン交換混合モードクロマトグラフィーが、N-ベンジル-n-メチルエタノール

アミンを含む、請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

(a) 第 1 の混合モードクロマトグラフィーが、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、混合モード装填緩衝液、または混合モード洗浄緩衝液のうちの 1 つ以上を使用し、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、混合モード装填緩衝液、及び / または混合モード洗浄緩衝液は、約 pH 6 ~ 約 pH 7 である、

(b) 第 2 の混合モードクロマトグラフィーが、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、混合モード装填緩衝液、または混合モード洗浄緩衝液のうちの 1 つ以上を使用し、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、及び / または混合モード洗浄緩衝液が、約 pH 5 ~ 約 pH 8、任意選択的に約 pH 6 . 5 である、または

(c) (a) 及び (b) の両方である、

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

混合モード事前平衡化緩衝液が、約 500 mM の酢酸塩または約 50 mM の酢酸塩を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

第 1 の混合モードクロマトグラフィー、第 2 の混合モードクロマトグラフィー、または第 1 及び第 2 の混合モードクロマトグラフィーが、装填後に洗浄緩衝液で洗浄される、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

多重特異性抗体が、pH 勾配によって、または低い pH を有する混合モード溶出緩衝液を混合モードイオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、第 1 の混合モードクロマトグラフィー、第 2 混合モードクロマトグラフィー、または第 1 及び第 2 の両方の混合モードクロマトグラフィーから溶出される、請求項 9 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

イオン交換クロマトグラフィーが、アニオン交換クロマトグラフィーであり、アニオン交換クロマトグラフィーが、アニオン交換事前平衡化緩衝液、アニオン交換平衡化緩衝液、またはアニオン交換装填緩衝液のうちの 1 つ以上を使用し、アニオン交換事前平衡化緩衝液、アニオン交換平衡化緩衝液、及び / またはアニオン交換装填緩衝液が、約 pH 6 ~ 約 pH 8、任意選択的に約 6 . 5 である、請求項 2、及び 4 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

(a) アニオン交換事前平衡化緩衝液が、約 50 mM のトリス、500 mM の酢酸ナトリウムを含む、

(b) アニオン交換平衡化緩衝液が、約 50 mM のトリスを含む、

(c) アニオン交換クロマトグラフィーが、装填後にアニオン交換平衡化緩衝液で洗浄される、

(d) 多重特異性抗体が、塩勾配によって、または増加した塩濃度を有するアニオン交換溶出緩衝液をアニオン交換クロマトグラフィーに適用させることによって、アニオン交換クロマトグラフィーから溶出される、

のうちの 1 つ以上である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

多重特異性抗体が約 50 mM のトリス、100 mM の酢酸ナトリウムを約 pH 8 . 5 で含むアニオン交換溶出緩衝液を適用することによって、アニオン交換クロマトグラフィーから溶出される、請求項 25 の (d) に記載の方法。

【請求項 27】

アニオン交換溶出物がプールされ、溶出物の OD₂₈₀ が約 0 . 5 ~ 約 2 . 0 を超える、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

多重特異性抗体のアームが、原核細胞、任意選択的に *E. coli* 細胞中で産生される、方法であって、ここで、任意選択的に、*E. coli* 細胞が、任意選択的に Fk p A、Ds b A、または Ds b C である 1 つ以上のシャペロンを発現するように操作されており、または多重特異性抗体のアームが、真核細胞中で産生される、ここで、任意選択的に、真核細胞が酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞であり、任意選択的に哺乳動物細胞が CHO 細胞である、

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

細胞が、捕獲クロマトグラフィーの前に、任意選択的に微小流動化剤を使用して、溶解され、多重特異性抗体または多重特異性抗体のアームを含む細胞溶解液が生成する、方法であって、ここで、任意選択的に、ポリエチレンイミン (PEI) が、クロマトグラフィーの前に細胞溶解液に添加される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

方法が、組成物中の宿主細胞タンパク質 (HCP)、浸出されたプロテイン A、核酸、細胞培養培地構成成分、またはウイルス性不純物のうちのいずれか 1 つの量を低減する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、任意選択的に、二重特異性抗体が、ノブインホール (KiH) 二重特異性抗体、または Cross Mab 二重特異性抗体である、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

画分が、少なくとも約 95 % の多重特異性抗体を含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

画分が、

- (a) 5 % の非対抗体のアーム、
- (b) 5 % の抗体ホモ二量体
- (c) 2 % の凝集体または高分子量種 (HMWS)、
- (d) 2 % の低分子量種 (LMWS)、
- (e) 50 % の酸性バリエーション、
- (f) 35 % の塩基性バリエーション、または
- (g) 5 % の 3 / 4 抗体、

のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

画分が、

- a) 少なくとも約 95 % ~ 約 100 % の多重特異性抗体、
- b) 約 1 % ~ 約 5 % 以下の非対抗体のアーム、
- c) 約 1 % ~ 約 5 % 以下の抗体ホモ二量体、
- d) 約 1 % または約 2 % 以下の HMWS、
- e) 約 1 % または約 2 % 以下の LMWS、及び
- f) 約 5 % 以下の 3 / 4 抗体を含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法によって精製された多重特異性抗体を含む組成物。

【請求項 36】

がんまたは眼疾患の治療のための、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法によって精製された多重特異性抗体を含む組成物。

【請求項 37】

マルクステップクロマトグラフィー方法で Fc 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを精製するための方法であって、方法が、親和性クロマトグラフィーのステップを含み、ここ

で、任意選択的に親和性クロマトグラフィーのステップがプロテイン A クロマトグラフィーであり、2つの異なるマルチモーダルイオン交換クロマトグラフィーのステップが後に続き、

それによって、Fc領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを精製する、方法。

【請求項 38】

マルチステップクロマトグラフィー方法が、

i . 親和性クロマトグラフィーのステップ、その後続くマルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップ、その後続くマルチモーダルカチオン交換クロマトグラフィーのステップ、

または

ii . 親和性クロマトグラフィーのステップ、その後続くマルチモーダルカチオン交換クロマトグラフィーのステップ、その後続くマルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップを含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

マルチステップクロマトグラフィー方法が、正確に3つのクロマトグラフィーのステップを含む、請求項 37 または 38 に記載の方法。

【請求項 40】

マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップが、フロースルーモードで行われる、請求項 38 または 39 に記載の方法。

【請求項 41】

(a) マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップが、約 7 の pH で行われる、

(b) マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップが、結合及び溶出モードで行われる、または

(d) (a) 及び (b) の両方である、

請求項 38 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップにおいて、Fc領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、

(a) 約 7 mS / cm 未満の伝導性、

(b) 約 6 mS / cm ~ 約 2 mS / cm の伝導性、

(c) 約 4 . 5 mS / cm の伝導性、及び

(d) 約 4 . 5 mS / cm の伝導性及び約 7 の pH、

を有する溶液中に適用される、請求項 38 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップにおいて、Fc領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、クロマトグラフィー材料の、1リットル当たり約 100 g ~ 約 300 g の範囲で適用される、請求項 38 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

マルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィー材料が、

(a) マルチモーダル強アニオン交換クロマトグラフィー材料である、または

(b) 高流量アガロースのマトリックス、リガンドとしてのマルチモーダル強アニオン交換体、36 ~ 44 μm の平均粒子サイズ、及び 0 . 08 ~ 0 . 11 mmol / mL メディウム のイオン容量を有する、

請求項 38 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

マルチモーダルカチオン交換クロマトグラフィーメディウムが、

(a) マルチモーダル弱カチオン交換クロマトグラフィーメディウムである、または

(b) 高流量アガロースのマトリックス、リガンドとしてのマルチモーダル弱アニオン交換体、36 ~ 44 μm の平均粒子サイズ、及び 25 ~ 39 $\mu\text{mol} / \text{mL}$ のイオン容量

を有する、

請求項 38 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

Fc 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、

(a) 抗体、

(b) 二重特異性抗体、ここで、任意選択的に、二重特異性抗体が、

(i) 第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖及び軽鎖を含む、かつ

(ii) 定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いによって置き換えられた、第 2 の抗原に特異的に結合する全長抗体の修飾された重鎖及び修飾された軽鎖を含む、

(c) Fc - 融合タンパク質、または

(d) C r o s s M a b、

である、請求項 37 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

Fc 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、

(a) A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体、

(b) A N G - 2 及び V E G F に結合する C r o s s M a b、または

(c) 二重特異性抗体の v a n u c i z u m a b、

である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

Fc 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、

(a) 重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 1、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 2 を含む第 1 の抗原結合部位、ならびに重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 3、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 4 を含む第 2 の抗原結合部位、

(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖、ならびに配列番号 11 のアミノ酸配列を有する第 1 の軽鎖、及び配列番号 12 のアミノ酸配列を有する第 2 の軽鎖、

(c) 重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 5、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 6 を含む第 1 の抗原結合部位、ならびに重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 7、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 8 を含む第 2 の抗原結合部位、または

(d) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖、及び配列番号 14 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖、ならびに配列番号 15 のアミノ酸配列を有する第 1 の軽鎖、及び配列番号 16 のアミノ酸配列を有する第 2 の軽鎖、

を含む二重特異性抗体である、請求項 45 ~ 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

精製された Fc 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドが、約 5 % 以下の 3 / 4 抗体を含む、請求項 45 ~ 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

マルチステップクロマトグラフィー方法で A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を精製するための方法であって、方法が、親和性クロマトグラフィーのステップ、その後に続くマルチモーダルアニオン交換クロマトグラフィーのステップ、その後に続くマルチモーダルカチオン交換クロマトグラフィーのステップを含み、

それによって、A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を精製し、

二重特異性抗体が、

(i) 重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 1、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 2 を含む第 1 の抗原結合部位、ならびに重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 3、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 4 を含む第 2 の抗原結合部位を含む、または

(ii) 重鎖可変ドメイン (V H) として配列番号 5、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 6 を含む第 1 の抗原結合部位、ならびに重鎖可変ドメイン (V H) として

配列番号 7、及び軽鎖可変ドメイン (V L) として配列番号 8 を含む第 2 の抗原結合部位を含む、
方法。

【請求項 5 1】

二重特異性抗体または C r o s s M a b 抗体を含む組成物であって、組成物が、少なくとも約 9 5 %、二重特異性抗体または C r o s s M a b 抗体を含む、組成物。

【請求項 5 2】

組成物が、二重特異性抗体を含み、かつ

- (a) 5 % の非対抗体のアーム、
- (b) 5 % の抗体ホモ二量体、
- (c) 2 % の凝集体または高分子量種 (H M W S)、
- (d) 2 % の低分子量種 (L M W S)、
- (e) 5 0 % の酸性バリエーション、
- (f) 3 5 % の塩基性バリエーション、または
- (g) 5 % の 3 / 4 抗体、

のうちの 1 つ以上を含む、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

組成物が、二重特異性抗体または C r o s s M a b 抗体を含み、かつ

- (a) 2 % の凝集体または高分子量種 (H M W S)、
- (b) 2 % の低分子量種 (L M W S)、
- (c) 5 0 % の酸性バリエーション、
- (d) 3 5 % の塩基性バリエーション、または
- (e) 5 % の 3 / 4 抗体、

のうちの 1 つ以上を含む、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

組成物が、二重特異性抗体を含み、かつ

- a) 少なくとも約 9 5 % ~ 約 1 0 0 % の二重特異性抗体、
- b) 約 1 % ~ 約 5 % 以下の非対抗体のアーム、
- c) 約 1 % ~ 約 5 % 以下の抗体ホモ二量体、
- d) 約 1 % または約 2 % 以下の H M W S、
- e) 約 1 % または約 2 % 以下の L M W S、及び
- f) 約 5 % 以下の 3 / 4 抗体を含む、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

二重特異性抗体が、A N G - 2 及び V E G F に結合し、任意選択的に、二重特異性抗体が、

- a) 第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の全長抗体の重鎖及び軽鎖、及び
 - b) 定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いによって置き換えられた、第 2 の抗原結合部位を含む全長抗体の修飾された重鎖及び修飾された軽鎖、
- を含む、請求項 5 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 6】

A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を含む組成物であって、組成物が、約 5 %、約 4 %、約 3 %、約 2 %、または約 1 % 以下の 3 / 4 抗体を含み、

任意選択的に、組成物が請求項 5 0 に記載の方法を使用して得られ、

任意選択的に、A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異的抗体が、

- a) 第 1 の抗原結合部位を含む第 1 の全長抗体の重鎖及び軽鎖、及び
 - b) 定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いによって置き換えられた、第 2 の抗原結合部位を含む全長抗体の修飾された重鎖及び修飾された軽鎖、を含む、
- 組成物。

【請求項 5 7】

F c 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを生成する方法であって、

i . F c 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養するステップと、

i i . F c 領域含有ヘテロ二量体タンパク質を細胞または培養培地から回収するステップと、

i i i . 請求項 37 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法で F c 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを精製するステップと、を含み、

それによって、F c 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを生成する、方法。

【請求項 58】

A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を産生する方法であって、

i . 二重特異性抗体をコードする核酸を含む細胞を培養するステップと、

i i . 二重特異性抗体を細胞または培養培地から回収するステップと、

i i i . 請求項 40 に記載の方法で二重特異性抗体を精製するステップと、を含み、

それによって、A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を産生する、方法。

【請求項 59】

請求項 1 ~ 34、37 ~ 50、57 及び 58 のいずれか一項に記載の方法を含む、がんまたは眼疾患の治療のための医薬を製造するための方法。

【請求項 60】

請求項 37 ~ 49 のいずれか一項に記載の F c 領域含有ヘテロ二量体ポリペプチドを精製するための方法、または請求項 50 に記載の A N G - 2 及び V E G F に結合する二重特異性抗体を精製するための方法を含む、がんまたは眼疾患の治療のための医薬を製造するための方法。

【請求項 61】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法を含む、多重特異性抗体を含む組成物を製造するための方法。

【請求項 62】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法を含む、多重特異性抗体を含むがんまたは眼疾患の治療のための組成物を製造するための方法。

【請求項 63】

請求項 50 に記載の方法を含む、請求項 56 に記載の組成物を製造するための方法。