

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6946184号
(P6946184)

(45) 発行日 令和3年10月6日 (2021. 10. 6)

(24) 登録日 令和3年9月17日 (2021. 9. 17)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/22 (2006. 01)

C O 7 K 16/22 Z N A

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 27/02 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 9/10 (2006. 01)

A 6 1 P 27/02

請求項の数 12 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-525016 (P2017-525016)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月6日 (2015. 11. 6)
 (65) 公表番号 特表2017-534645 (P2017-534645A)
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017. 11. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/075877
 (87) 国際公開番号 W02016/075036
 (87) 国際公開日 平成28年5月19日 (2016. 5. 19)
 審査請求日 平成30年10月29日 (2018. 10. 29)
 (31) 優先権主張番号 14192519.8
 (32) 優先日 平成26年11月10日 (2014. 11. 10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 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・シーエイチー４０７０バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ１２４
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (72) 発明者 ベドゥーシャ, マルク
 フランス国、エフー６８２２０ ランシュ
 パッハールーオー、リュ・デ・スルス ７
 (72) 発明者 ブロイアー, セバスティアン
 ドイツ国、８２３７７ ペンツベルク、ハ
 ーゼルベルクシュトラーセ ６
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PDGF-B抗体及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトPDGF-B及びANG2に特異的に結合する二重特異的抗体であって、配列番号92のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン及び配列番号97のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含むヒトPDGF-Bに結合する抗原結合部位を含み、かつ、配列番号117のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン及び配列番号118のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含むANG2に結合する抗原結合部位を含む、抗体。

【請求項 2】

前記二重特異的抗体が、

a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、及び
 b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖、ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の定常ドメインCL及びCH1は、互いにより置き換わっている、
 を含み、ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、二価抗体である、請求項2記載の抗体。

【請求項 4】

T366W突然変異を含む1つのCH3ドメイン、並びにT366S、L368A及びY407V突然変異を含む別のCH3ドメインを含み、すべての番号付けがKabattのEUインデックスによる、請求項2又は3記載の抗体。

10

20

【請求項 5】

Y 3 4 9 C 及び T 3 6 6 W 突然変異を含む 1 つの C H 3 ドメイン、並びに E 3 5 6 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A 及び Y 4 0 7 V 突然変異を含む別の C H 3 ドメインを含み、すべての番号付けが K a b a t の E U インデックスによる、請求項 2 又は 3 記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体がヒトサブクラス I g G 1 又はヒトサブクラス I g G 4 のものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、ヒト P D G F 受容体へのヒト P D G F - B の結合を阻害することによって、ヒト P D G F - B の生物学的活性を遮断する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の抗体

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の抗体と薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤

【請求項 9】

医薬として使用するための請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 10】

医薬の製造における請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項 11】

前記医薬が、眼血管疾患の処置のためのものである、請求項 9 又は 10 記載の使用。

20

【請求項 12】

前記医薬が、P D G F - B と P D G F - B 受容体との間の相互作用を阻害するためのものである、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、抗 P D G F - B 抗体及びその使用方法に関する。

【0002】

背景

30

眼血管疾患、例えば加齢黄班変性症（A M D）及び糖尿病性網膜症（D R）は、それぞれ、異常な脈絡膜又は網膜の新血管新生に起因する。それらは工業国における視力低下の主因である。網膜は、神経細胞成分、グリア細胞成分、及び血管成分の詳細に明らかにされた層からなるので、血管増殖又は浮腫に見られる障害などの比較的小さな障害は、著しい視力機能の低下を引き起こし得る。網膜色素変性症（R P）などの遺伝性網膜変性症もまた、細動脈狭窄及び血管萎縮症などの血管異常症を伴う。それらに 3, 5 0 0 人中 1 人もの個体が罹患し、それらは進行性の夜盲症、視野減少、視神経萎縮症、細動脈狭細、及び完全な失明に進行することが多い中心視野の減少によって特徴付けられる。

【0003】

虚血性網膜症は、血流減少及び低酸素症をもたらす網膜血管の減少又は機能不全によって特徴付けられる。網膜は、新血管を成長させるためのシグナルを発生することによって低酸素症に応答するが、これらの新血管は通常脆弱で組織化されていない。視力に対する大半の脅威を作るのはこれらの異常な新血管の成長である。なぜならそれらは漏出し得るか、出血に至り得るか、又は瘢痕をもたらし得、これらは最終的には網膜剥離となる可能性があるからである。虚血性網膜症に対する現在の処置は、病的血管の成長を停止させることを探索しているが、その成長を駆り立てる基礎となる虚血には取り組まない。さらに、数百万人が罹患している虚血性網膜症である糖尿病性網膜症に対する標準的な処置は、新血管の成長を止め中心視野を保存する試みで、レーザを用いての網膜の一部の破壊を含む。血管増殖の主要な促進因子である血管内皮増殖因子（V E G F）の機能を遮断するための戦略が使用されている。短期間で、抗 V E G F 療法は視力を改善させることができる

40

50

が、基礎にある虚血に取り組みず、事実、有益な側副血管をはじめとする全ての血管増殖を抑制するのでこの容態を悪化させる可能性がある。また、虚血性脳、心臓、又は四肢に新血管の増殖が必要とされ得る高齢者及び／又は糖尿病患者において、これらの薬物が全身に曝されることには深刻な懸念がある。

【 0 0 0 4 】

典型的には、眼疾患では、硝子体内への適用を介して F a b 又は F a b₂ のようなより小さな抗体断片が使用されることが多い。なぜなら、それらは血清中半減期が短く、全身毒性のリスクがより低いからである。しかしながら、このより小さな断片は典型的には、硝子体内半減期がより短く（例えば血清中へのより急速な拡散に因る）、典型的にはより頻繁に投与しなければならない。

10

【 0 0 0 5 】

1 つの結合アーム内にドメインの置換 / 交換を有する多重特異的抗体 (C r o s s M a b V H - V L) が、国際公開公報第 2 0 0 9 / 0 8 0 2 5 2 号及び Schaefer, W. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191 (これは本明細書に参照として組み入れられる) に詳述されている。それらは、第一抗原に対する軽鎖と、第二抗原に対する間違った重鎖とのミスマッチによって引き起こされる副産物を明らかに低減させる (このようなドメインの交換を行わないアプローチと比較して)。しかしながら、その調製は完全に副産物を除外できない。主な副産物は、ペンス・ジョーンズ型相互作用に基づく。Schaefer, W. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191 ; 補足の図 S 1 I も参照されたい。

20

【 0 0 0 6 】

国際公開公報第 2 0 1 4 / 0 7 2 8 7 6 号では、血小板由来増殖因子 B 特異的抗体、並びにその組成物及び使用が報告されている。V E G F / P D G F ファミリーの増殖因子に関する多価抗体材料及び方法は、国際公開公報第 2 0 0 5 / 0 8 7 8 1 2 号に報告されている。Vassbotn, F.S., et al. (Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res. 1054 (1990) 246-249) は、P D G F B 鎖に対するモノクローナル抗体が、C 3 H 線維芽細胞において P D G F により誘発される D N A 合成を抑制し、かつ P D G F のその受容体への結合を妨げることを報告している。

【 0 0 0 7 】

要約

30

本発明は、抗 P D G F - B 抗体及びその使用法を提供する。具体的な実施態様では、該抗体はヒト化抗体である。

【 0 0 0 8 】

本明細書において報告されているような 1 つの態様は、P D G F - B に結合する単離された抗体であり、ここで該抗体は、マウス抗体のヒト化変異体であり、ここでのマウス抗体は配列番号 0 1 の重鎖可変ドメインと配列番号 0 6 の軽鎖可変ドメインとを含む。

【 0 0 0 9 】

本明細書において報告されているような全ての態様の 1 つの実施態様では、ヒト化抗体はさらに、重鎖可変ドメイン内の 2 7 位にチロシニアミノ酸残基、4 0 位にアルギニンアミノ酸残基、4 3 位にヒスチジニアミノ酸残基、7 3 位にトリプトファンアミノ酸残基を含む (番号付けは K a b a t による)。

40

【 0 0 1 0 】

本明細書において報告されているような全ての態様の 1 つの実施態様では、ヒト化抗体はさらに、重鎖可変ドメイン内の 7 8 位にアラニンアミノ酸残基を含む (番号付けは K a b a t による)。

【 0 0 1 1 】

本明細書において報告されているような全ての態様の 1 つの実施態様では、ヒト化抗体はさらに、重鎖可変ドメイン内の 4 3 位にヒスチジニアミノ酸残基、7 1 位にアラニンアミノ酸残基、7 8 位にアラニンアミノ酸残基を含む (番号付けは K a b a t による)。

【 0 0 1 2 】

50

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、ヒト化抗体はさらに、軽鎖可変ドメイン内の43位にアミノ酸残基プロリン、68位にアミノ酸残基アルギニンを含む(番号付けはK a b a tによる)。

【0013】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、ヒト化抗体はさらに、軽鎖可変ドメイン内の43位にアミノ酸残基プロリンを含む(番号付けはK a b a tによる)。

【0014】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であり、該抗体は(a)配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号03のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0015】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d)配列番号07のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号08のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号09のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0016】

本明細書において報告されているような1つの態様は、(a)配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号04のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号07のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号08のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号09のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体と同じヒトPDGF-Bのエピトープに特異的に結合する抗体である。

20

【0017】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であり、該抗体は、

a)(i)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

b)(i)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

30

c)(i)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

d)(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

e)(i)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3、又は

40

f)(i)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0018】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、

a)(vi)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2、(vi)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3、又は

50

b) (v i) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(v) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、(v i) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は
c) (v i) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(v) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、(v i) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は
d) (v i) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(v) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、(v i) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3
を含む。

10

【 0 0 1 9 】

1つの実施態様では、前記抗体は、

a) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は
b) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は
c) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は
d) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は
e) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は
f) 配列番号 35 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
を含む。

【 0 0 2 0 】

20

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、

a) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、又は
b) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、又は
c) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、又は
d) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン
を含む。

【 0 0 2 1 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒト P D G F - B に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

30

【 0 0 2 2 】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 63 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 0 2 3 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒト P D G F - B に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a) 配列番号 66 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 67 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

40

【 0 0 2 4 】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d) 配列番号 71 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 73 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 0 2 5 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒト P D G F - B に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a) 配列番号 75 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

【 0 0 2 6 】

50

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0027】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0028】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0029】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0030】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0031】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であり、該抗体は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0032】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0033】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号10の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

【0034】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号15の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

【0035】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号20の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

40

【0036】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号25の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

【0037】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号30の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

50

【 0 0 3 8 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、配列番号35の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と、配列番号40、配列番号44、配列番号48及び配列番号52の群から選択された軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体である。

【 0 0 3 9 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-BBとヒトPDGF-ABに特異的に結合するが、ヒトPDGF-AAには結合しない抗体である。

【 0 0 4 0 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【 0 0 4 1 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【 0 0 4 2 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【 0 0 4 3 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号89のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号90のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号91のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【 0 0 4 4 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【 0 0 4 5 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

40

【 0 0 4 6 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、ヒトPDGF-BB及びPDGF-AB及びPDGF-AAに特異的に結合する抗体である。

【 0 0 4 7 】

1つの実施態様では、前記抗体は、(a)配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号03のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

50

【 0 0 4 8 】

1つの実施態様では、前記抗体はさらに、(a)配列番号07のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号08のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号09のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【 0 0 4 9 】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体はヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4である。

【 0 0 5 0 】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体は軽鎖を有するヒトサブクラスIgG1である。

10

【 0 0 5 1 】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 0 5 2 】

1つの実施態様では、前記抗体は二重特異的抗体である。

【 0 0 5 3 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体はヒトPDGF-Bには特異的に結合するが、ヒトPDGF-Cには結合しない。

【 0 0 5 4 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体は、ヒト、ラット、マウス、及びカニクイザルPDGF-Bに特異的に結合する。

20

【 0 0 5 5 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体はPDGF-Bのその受容体への結合を阻害することによって、ヒトPDGF-Bの生物学的活性を抑制する。

【 0 0 5 6 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体は細胞遊走を抑制することによってヒトPDGF-Bの生物学的活性を抑制する。

【 0 0 5 7 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体はPDGF-B受容体リン酸化を阻害することによって、ヒトPDGF-Bの生物学的活性を抑制する。

30

【 0 0 5 8 】

全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体は細胞増殖を阻害することによって、ヒトPDGF-Bの生物学的活性を抑制する。

【 0 0 5 9 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、本明細書において報告されているような抗体をコードしている(単離された)核酸である。

【 0 0 6 0 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、本明細書において報告されているような核酸を含む宿主細胞である。

【 0 0 6 1 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、本明細書において報告されているような宿主細胞を培養して抗体を生成し、宿主細胞又は培養培地から該抗体を回収する工程を含む、本明細書において報告されているような抗体の生成法である。

40

【 0 0 6 2 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、本明細書において報告されているような抗体と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤である。

【 0 0 6 3 】

1つの実施態様では、医薬製剤はさらに、追加の治療剤を含む。1つの実施態様では、追加の治療剤は抗ANG2抗体又は抗VEGF抗体である。

【 0 0 6 4 】

50

本明細書において報告されているような１つの態様は、医薬品として使用するための本明細書において報告されているような抗体である。

【００６５】

本明細書において報告されているような１つの態様は、眼血管疾患の処置に使用するための、好ましくは黄班変性症の処置に使用するための本明細書に報告されているような抗体である。

【００６６】

P D G F - B とその受容体との間の相互作用を抑制するために使用するための本明細書において報告されているような抗体。

【００６７】

細胞遊走を抑制するために使用するための本明細書において報告されているような抗体。

【００６８】

増殖を抑制するために使用するための本明細書において報告されているような抗体。

【００６９】

本明細書において報告されているような１つの態様は、医薬品の製造における本明細書において報告されているような抗体の使用である。

【００７０】

１つの実施態様では、前記医薬品は、眼血管疾患の処置のための、好ましくは黄班変性症の処置のためのものである。

【００７１】

１つの実施態様では、前記医薬品は、P D G F - B とその受容体との間の相互作用を抑制するためのものである。

【００７２】

本明細書において報告されているような１つの態様は、本明細書において報告されているような抗体の有効量を個体に投与する工程を含む、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症を有する個体を処置する方法である。

【００７３】

本明細書において報告されているような１つの態様は、本明細書において報告されているような抗体の有効量を個体に投与して、P D G F - B とその受容体との間の相互作用を抑制する工程を含む、個体におけるP D G F - B とその受容体との間の相互作用を抑制する方法である。

【００７４】

発明の実施態様の詳細な説明

I . 定義

本明細書における目的での「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義されているような、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒト共通フレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン(V L)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(V H)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク若しくはヒト共通フレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含んでいても、又は、アミノ酸配列の変化を含有していてもよい。いくつかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、又は２以下である。いくつかの実施態様では、V L アクセプターヒトフレームワークは、V L ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒト共通フレームワーク配列の配列と同一である。

【００７５】

「親和性」は、分子(例えば抗体)の１つの結合部位とその結合対(例えば抗原)との間の非共有結合的相互作用の合計の強度を指す。特記しない限り、本明細書において使用する「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xのその対のYに対する親和性は、一般的に、解

10

20

30

40

50

離定数 (k_d) によって示され得る。親和性は、本明細書に記載のものをはじめとする、当技術分野において公知の一般的な方法によって測定され得る。結合親和性を測定するための具体的な例証的かつ例示的な実施態様を以下に記載する。

【0076】

「親和性の成熟した」抗体は、以下のような改変を有さない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域 (HVR) に1つ以上の改変を有する抗体を指し、このような改変により、抗原に対する抗体の親和性は改善される。

【0077】

「抗PDGF-B抗体」及び「PDGF-Bに結合する抗体」という用語は、十分な親和性でPDGF-Bに結合することのできる抗体を指し、よって該抗体は、PDGF-Bへの標的化における診断剤及び/又は治療剤として有用である。1つの実施態様では、関連性のない非PDGF-Bタンパク質に対する抗PDGF-B抗体の結合度は、例えばELISA又は表面プラズモン共鳴によって測定したところ、PDGF-Bに対する該抗体の結合の約10%未満である。特定の実施態様では、PDGF-Bに結合する抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、又は0.1 nM以下の解離定数 (KD) を有する (例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M \sim 10^{-10} M、例えば 10^{-9} M \sim 10^{-10} M)。特定の実施態様では、抗PDGF-B抗体は、様々な種に由来するPDGF-B間で保存されているPDGF-Bのエピトープに結合する。

【0078】

本明細書における「抗体」という用語は最も広義の意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体 (例えば二重特異的抗体)、及び所望の抗原結合活性を示す限りにおける抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。

【0079】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ディアボディ；鎖状抗体；一本鎖抗体分子 (例えばscFv)；及び抗体断片から形成された多重特異的抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

【0080】

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

【0081】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の一部は特定の起源又は種に由来しているが、重鎖及び/又は軽鎖の残りの部分は異なる起源又は種に由来している、抗体を指す。

【0082】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。5つの主なクラスの抗体が存在し (IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM)、これらのいくつかは、サブクラス (アイソタイプ) にさらに分類され得る (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂)。クラスの異なる免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメインは、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ とそれぞれ呼ばれる。

【0083】

「イムノコンジュゲート」という用語は、抗体と非抗体部分との間の共有結合によるコンジュゲートを示す。このような非抗体部分は、検出可能な標識、エフェクター分子、又は細胞傷害性薬剤であってもよい。

【0084】

本明細書において使用する「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞の機能を抑制若しく

10

20

30

40

50

は妨げる、及び／又は細胞死若しくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害性薬剤としては、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及び Lu の放射性同位体）；化学療剤又は薬物（例えばメトトレキサート、アドリマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン、又は他の挿入剤）；増殖抑制剤；酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば低分子毒素又は酵素的に活性な細菌、真菌、植物、又は動物起源の毒素、例えばその断片及び／又は変異体；並びに、以下に開示されている様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0085】

「エフェクター機能」は、抗体のクラスによって異なる、抗体のFc領域に起因するそうした生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1qへの結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc受容体への結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体のダウンレギュレーション（例えばB細胞受容体）；並びにB細胞活性化が挙げられる。

【0086】

薬剤、例えば医薬製剤の「有効量」は、所望の治療結果又は予防結果を達成するのに有効な用量及び必要とされる期間を指す。

【0087】

20

本明細書の「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有している免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。該用語は、天然配列のFc領域及び変異Fc領域を含む。1つの実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から又はPro230から、重鎖のカルボキシ末端まで延びている。しかしながら、Fc領域のC末端リジン（Lys447）又はC末端グリシル-リジンジペプチド（Gly446Lys447）は存在していても存在していなくてもよい。本明細書において特記しない限り、Fc領域又は定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載のように、EUインデックスとも呼ばれる、EU番号付け体系に従う。

30

【0088】

「フレームワーク」すなわち「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは一般的に、4つのFRドメインからなる（FR1、FR2、FR3、及びFR4）。したがって、HVR配列及びFR配列は一般的に、VH（又はVL）内で以下の順序で出現する：FR1 - H1（L1） - FR2 - H2（L2） - FR3 - H3（L3） - FR4。

【0089】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「完全抗体」という用語は本明細書において同義として使用され、天然の抗体の構造と実質的に類似した構造を有しているか、又は本明細書において定義されているようなFc領域を含有している重鎖を有している、抗体を指す。

40

【0090】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養液」という用語は同義語として使用され、外来性核酸が導入された細胞（このような細胞の子孫を含む）を指す。宿主細胞は、初回に形質転換された細胞、及び継代数に関係なくそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一ではなくてもよいが、突然変異を含んでいても良い。最初に形質転換された細胞についてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異体の子孫も本明細書において含まれる。

【0091】

50

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生されるか又はヒト抗体レパトリ
ー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト起源に由来する、抗体のアミノ酸配
列に相当する、アミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は具体的には、非
ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【 0 0 9 2 】

「ヒト共通フレームワーク」は、ヒト免疫グロブリン V L 又は V H フレームワーク配列
の選択において、最も共通して存在しているアミノ酸残基を示すフレームワークである。
一般的には、ヒト免疫グロブリン V L 配列又は V H 配列の選択は、可変ドメイン配列の亜
群からである。一般的に、配列の亜群は、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins
of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242,
Vols. 1-3におけるような亜群である。1つの実施態様では、V L では、亜群は、上記の
Kabat et al. におけるような亜群 I である。1つの実施態様では、V H では、亜群は
、上記のKabat et al. におけるような亜群 I I I である。

10

【 0 0 9 3 】

「ヒト化」抗体は、非ヒト H V R に由来するアミノ酸残基とヒト F R に由来するアミノ
酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ
、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで H V R (例えば C D R)
の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のそれに相当し、F R の全て又は実質的に全てがヒ
ト抗体のそれに相当する。ヒト化抗体は場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の
少なくとも一部を含んでいてもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト
化を受けた抗体を指す。

20

【 0 0 9 4 】

本明細書において使用する「超可変領域」すなわち「H V R」という用語は、配列が超
可変的で(「相補性決定領域」すなわち「C D R」)及び/又は構造的に定められたルー
プ(「超可変ループ」)を形成し、及び/又は抗原接触残基(「抗原接触部」)を含有し
ている、抗体可変ドメインの各々の領域を指す。一般的には、抗体は6つの H V R を含み
; 3つは V H (H 1、H 2、H 3) に、3つは V L (L 1、L 2、L 3) にある。

【 0 0 9 5 】

本明細書における H V R は、

(a) アミノ酸残基 2 6 ~ 3 2 (L 1)、5 0 ~ 5 2 (L 2)、9 1 ~ 9 6 (L 3)、2
6 ~ 3 2 (H 1)、5 3 ~ 5 5 (H 2)、及び 9 6 ~ 1 0 1 (H 3) に存在する超可変ル
ープ(Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917) ;

30

(b) アミノ酸残基 2 4 ~ 3 4 (L 1)、5 0 ~ 5 6 (L 2)、8 9 ~ 9 7 (L 3)、3
1 ~ 3 5 b (H 1)、5 0 ~ 6 5 (H 2)、及び 9 5 ~ 1 0 2 (H 3) に存在する C D R
(Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. P
ublic Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Pu
blication 91-3242) ;

(c) 2 7 c ~ 3 6 (L 1)、4 6 ~ 5 5 (L 2)、8 9 ~ 9 6 (L 3)、3 0 ~ 3 5 b
(H 1)、4 7 ~ 5 8 (H 2)、及び 9 3 ~ 1 0 1 (H 3) に存在する抗原接触部 (MacC
allum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) ; 並びに

40

(d) (a)、(b)、及び/又は (c) の組合せ (H V R アミノ酸残基 4 6 ~ 5 6 (L
2)、4 7 ~ 5 6 (L 2)、4 8 ~ 5 6 (L 2)、4 9 ~ 5 6 (L 2)、2 6 ~ 3 5 (H
1)、2 6 ~ 3 5 b (H 1)、4 9 ~ 6 5 (H 2)、9 3 ~ 1 0 2 (H 3)、及び 9 4 ~
1 0 2 (H 3) を含む)

を含む。

【 0 0 9 6 】

特記しない限り、可変ドメイン内の H V R 残基及び他の残基 (例えば F R 残基) は、本
明細書において、上記のKabat et al. に従って番号付けされる。

【 0 0 9 7 】

「イムノコンジュゲート」は、1つ以上の異種分子 (群) にコンジュゲートした抗体で

50

ある。

【0098】

「個体」又は「被験者」は哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜動物（例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えばヒト及び非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、及びげっ歯類（例えばマウス及びラット）が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施態様では、個体又は被験者はヒトである。

【0099】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から隔離された抗体である。いくつかの実施態様では、抗体は、例えば電気泳動（例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えばイオン交換又は逆相HPLC）によって決定されるように、95%又は99%を超える純度となるまで精製される。抗体純度の評価法の総説については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。

【0100】

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から隔離された核酸分子を指す。単離された核酸は、普通に核酸分子を含有しているが、該核酸分子は染色体外に存在しているか又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在している、細胞に含有されている核酸分子を含む。

【0101】

「抗PDGF-B抗体をコードしている単離された核酸」は、重鎖と軽鎖（又はその断片）をコードしている1つ以上の核酸分子（1つのベクター又は別々のベクター内のこのような核酸分子（群）、及び宿主細胞内の1つ以上の位置に存在しているこのような核酸分子（群）を含む）を指す。

【0102】

本明細書において使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体を指し、すなわち、該集団を含む個々の抗体は同一である及び/又は同じエпитープに結合し、ただし、例えば天然に起こる突然変異を含有しているか又はモノクローナル抗体調製物の生成中に生じる、例えばあり得る変異抗体は除外され、このような変異体は一般的に少量存在する。様々な決定基（エпитープ）に対して指向される様々な抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法によって抗体の生成が必要とされると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有しているトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない、様々な技術によって作製され得、このような方法及び他の例示的なモノクローナル抗体の作製法が本明細書に記載されている。

【0103】

「裸抗体」は、異種部分（又は細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。裸抗体が、医薬製剤中に存在していてもよい。

【0104】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2本の同一な軽鎖と2つの同一な重鎖とから構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端にかけて各々の重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端にかけて各々の軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽鎖（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）

10

20

30

40

50

）と呼ばれる２種類の中の１つに割り当てられ得る。

【０１０５】

「添付文書」という用語は、適応症、用法、用量、投与、併用療法、禁忌、及び／又はこのような治療用製品の使用に関する警告に関する情報を含有している、治療用製品の市販のパッケージに通例含まれる説明書を指すために使用される。

【０１０６】

基準ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一率（％）」は、配列をアラインさせ、必要であれば、最大の配列同一率を達成するためにギャップを導入した後、配列同一性の一部として保存的な置換を全く考慮せずに、基準ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である、候補配列内のアミノ酸残基の比率として定義される。アミノ酸配列同一率を決定する目的でのアラインメントは、当技術分野の技能範囲内である様々な方法で、例えば公共的に利用できるコンピューターソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して達成され得る。当業者は、比較する配列の完全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされるあらゆるアルゴリズムを含む、配列をアラインさせるための適切なパラメーターを決定することができる。しかしながら、本明細書での目的のために、アミノ酸配列同一率値％は、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用して算出される。ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムは、Genentech, Inc.によって作成され、ソースコードがユーザー文書と共にワシントンD.C. 20559のアメリカ合衆国著作権局に提出され、そこでアメリカ合衆国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州) から公共的に入手可能であるか、又は、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX (登録商標) V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメーターはALIGN-2プログラムによって設定され、変更されない。

【０１０７】

ALIGN-2がアミノ酸配列の比較のために使用される状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに対するアミノ酸配列同一率％（あるいは、所与のアミノ酸配列Bに対して、特定のアミノ酸配列同一率％を有する又は含む、所与のアミノ酸配列Aとして表現されてもよい）は、以下のように計算される：

$$X / Y \text{ の分率 } \times 100$$

【０１０８】

ここで、Xは、プログラムによるAとBのアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同一な一致としてスコアリングされたアミノ酸残基の数であり、Yは、B内のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一率％は、Aに対するBのアミノ酸配列同一率％とは等しくないことが理解されるだろう。具体的に特記しない限り、本明細書において使用する全てのアミノ酸配列同一率値％は、ALIGN-2コンピュータープログラムを使用して直前の段落で記載されているように得られる。

【０１０９】

「医薬製剤」という用語は、そこに含有される活性成分の生物学的活性が効果的であることが可能となるような形態であり、かつ、該製剤が投与されるであろう被験者に対して受け入れられない程に毒性である追加の成分を全く含有していない、調製物を指す。

【０１１０】

「薬学的に許容される担体」は、被験者に対して無毒性である、活性成分以外の、医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、又は保存剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１１１】

本明細書において使用する「PDGF-B」という用語は、ヒトPDGF-Bを指す。

該用語は、「完全長」のプロセシングされていないPDGF-B、並びに細胞内でのプロセシングから得られたあらゆる形態のPDGF-Bを包含する。該用語はまた、天然に存在するPDGF-Bの変異体、例えばスプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。ヒトPDGF-Bのアミノ酸配列を配列番号110に示す。

【0112】

本明細書において使用する「処置」（及びその文法上の変化形、例えば「処置する」又は「処置している」）は、処置される個体の自然経過を改変させる試みでの臨床的介入を指し、予防のために又は臨床上の病態の経過中のいずれかに行なわれ得る。処置の望ましい効果としては、疾患の発生又は再発の予防、症状の寛解、疾患の全ての直接的又は間接的な病的結果の消失、転移の予防、疾患進行速度の低減、疾患状態の軽減又は緩和、及び緩解又は改善された予後が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、本発明の抗体を使用して、疾患の発生を遅延させるか又は疾患の進行を緩徐化する。

10

【0113】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれ、VH及びVL）の可変ドメインは一般的に、類似した構造を有し、各々のドメインは4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007)、91頁を参照されたい）。単一のVHドメイン又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、該抗原に結合する抗体に由来するVHドメイン又はVLドメインを使用して単離して、それぞれ相補的なVLドメイン又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングし得る（例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照）。

20

【0114】

本明細書において使用する「ベクター」という用語は、核酸分子が連結されている別の核酸を増殖させることのできる該核酸分子を指す。該用語は、自己複製性の核酸構造としてのベクター、並びに、それが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれた該ベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている核酸の発現を指令することができる。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

30

【0115】

II. 組成物及び方法

本発明のモノクローナル抗体は、PDGF-Bの受容体への結合及び増殖活性に関与する、PDGF-B分子上の決定基の部位に特異的に結合する。モノクローナルヒト化抗体は、PDGF-Cには結合しない。本明細書において報告されているような具体的な抗体は、ヒトPDGF-BB及びPDGF-ABに結合するが、PDGF-ABには結合しない。本明細書において報告されているような他の具体的な抗体は、ヒトPDGF-BB及びPDGF-AB並びにPDGF-AAに結合する。

【0116】

A. 例示的な抗PDGF-B抗体

本明細書において様々な新規な抗ヒトPDGF-B抗体を提供する。

40

【0117】

第一の抗PDGF-B抗体は、配列番号01のVH及び配列番号06のVLを有する、新規なマウス抗ヒトPDGF-B抗体である。この抗体は以下においてmumAbと命名される。この抗体は、ヒト、カニクイザル、ラット、及びマウスのPDGF-Bに結合し、PDGF-Bとその受容体との間の相互作用を阻害する。

【0118】

前記抗体は、以下の表に列挙されているような以下の特性を有する。

【0119】

【表 1】

| | ヒト P D G F － B B (EC50) | マウス P D G F － B B (EC50) | ラット P D G F － B B (EC50) | ヒト P D G F － A A (EC50) |
|-------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | [ng/mL] | [ng/mL] | [ng/mL] | [ng/mL] |
| mumAb | 16.3 | 8.8 | 5.124 | 2.04 |

【 0 1 2 0 】

10

【表 2】

| | P P I I ヒト P D G F － B B : : ヒト P D G F － R β IC ₅₀ [ng/ml] |
|-------|--|
| mumAb | 12.16 |

【 0 1 2 1 】

【表 3】

| | 収量 | 規模 | 収率 | 単量体 (定性 S E C) | メインピ ーク (CE- SDS/SDS PAGE) [%] |
|-------|------|-----|----------------|----------------------|---|
| | [mg] | [l] | [上清中の mg/L] | [%] | [%] |
| mumAb | 6.4 | 0.2 | 32 | 99 | 98 |

20

【 0 1 2 2 】

【表 4】

| | リン酸化阻害の I C ₅₀ | | 3 T 3 の増殖の I C ₅₀ | |
|-------|---------------------------|-------|------------------------------|-------|
| mumAb | 1.7 | ng/ml | 55.1 | ng/ml |

30

【 0 1 2 3 】

【表 5】

| | 周皮細胞 | | | | Balb-C3T3 | |
|---------------------------|-------------------------------|-----|-------------------------------|-----|-------------------------------|-----|
| | 遊走の E C ₅₀ [nM] | | 増殖の E C ₅₀ [nM] | | 増殖の E C ₅₀ [nM] | |
| ヒト P D G F － B B | 0.02/0.03/0.03 | | 0.03/0.02/0.019 | | 0.028/0.026/0.031 | |
| | IC ₅₀ [nM] | 中和% | IC ₅₀ [nM] | 中和% | IC ₅₀ [nM] | 中和% |
| R & D ポリ クローナル 基準抗体 | 1.13/0.78/0.4 | 100 | 0.49/0.36/0.41 | 100 | 0.079/0.069/0.065 | 100 |
| mumAb | 0.08 | 100 | 0.21 | 100 | 0.179 | 100 |

40

【 0 1 2 4 】

【表 6】

| | 周皮細胞 | | Balb-C3T3 |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | F a b の遊走 [nM] | F a b の増殖 [nM] | F a b の増殖 [nM] |
| mumAb | 0.24 | 2.17 | 2.3 |

【 0 1 2 5 】

【表 7】

| | kd [1/s] | t1/2 [分] |
|-------|-----------------------|----------|
| mumAb | 4.50×10^{-4} | 26 |

10

【 0 1 2 6 】

【表 8】

| Fab | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] | t1/2 [秒] |
|-----------|--------------------|-----------------------|------------|-------------|
| mumAb Fab | 4.39×10^5 | 2.01×10^{-3} | 5 | 345 |

【 0 1 2 7 】

【表 9】

| | 見かけの KD [nM] | T1/2 [秒] | | 見かけの KD** [nM] | T1/2 (秒) |
|-----------|-----------------|-------------|-------|-------------------|----------|
| mumAb Fab | 5 | 345 | mumAb | 0.042 | 2867 |

20

【 0 1 2 8 】

抗体の保存安定性を以下の表に示す（基準表面での有効濃度）。

【 0 1 2 9 】

【表 10】

| | 2週間／40℃、pH 6.0における基準に対する [%] | 2週間／37℃、pH 7.4における基準に対する [%] |
|-------|------------------------------|------------------------------|
| mumAb | 103 | 103 |

30

【 0 1 3 0 】

抗体の熱安定性を、凝集開始温度（Tagg）及び融解温度（Tm）を決定することによって評価した（以下の表を参照）。

【 0 1 3 1 】

【表 11】

| | Tagg [°C] | Tm [°C] |
|-------|-----------|-----------|
| mumAb | 57 | 62 – 63.5 |

40

【 0 1 3 2 】

マウス mumAb のアミノ酸配列（配列番号 01 及び配列番号 06）に基づいて、対応するヒト化抗 PDGF - B 抗体を作製した。VH のヒト化変異体は、ヒト J 配列生殖系列IGHJ5 - 01 と組み合わせたヒト生殖系列IMGT_hVH_1_69、IMGT_hVH_4_59 及びIMGT_hVH_3_23 に基づく。

【 0 1 3 3 】

復帰突然変異を、IMGT_hVH_1_69 変異体のフレームワーク領域 1 の 27 位（G27Y）及び／又はフレームワーク領域 2 の 40 位（A40R）及び／又は 43 位（Q43H）及び／又はフレームワーク領域 3 の 73 位（E73T）に導入した。

50

【 0 1 3 4 】

1つの復帰突然変異を、I M G T _ h V H _ 4 _ 5 9のフレームワーク領域3の78位 (F 7 8 A) に導入した。復帰突然変異をI M G T _ h V H _ 3 _ 2 3のフレームワーク領域2の43位 (K 4 3 H)、並びにフレームワーク領域3の71位 (R 7 1 A) 及び78位 (L 7 8 A) に導入した。

【 0 1 3 5 】

V Lのヒト化変異体は、ヒトJ配列生殖系列I G K J 2 - 0 1と組み合わせたヒト生殖系列I M G T _ h V K _ 3 _ 2 0、I M G T _ h V K _ 4 _ 1及びI M G T _ h V K _ 1 _ 2 7に基づく。

【 0 1 3 6 】

復帰突然変異を、1つの変異体について、I M G T _ h V K _ 3 _ 2 0のフレームワーク領域2の43位 (A 4 3 P) 及びフレームワーク領域3の68位 (G 6 8 R) に導入した。1つの復帰突然変異を、I M G T _ h V K _ 1 _ 2 7のフレームワーク領域3の43位 (V 4 3 P) に導入した。

【 0 1 3 7 】

この抗体は、単一特異的抗体としての抗体0044、及び追加のA N G 2結合特異性を有する二重特異的C r o s s M a bとしての抗体0146として示される。

【 0 1 3 8 】

他の抗体は、ヒトI g遺伝子座トランスジェニックウサギから得られたヒト抗体である。該抗体は、以下の表に列挙されているような結合特性を有する。

【 0 1 3 9 】

【表12】

| | ヒトPD GF-B B [EC50] [ng/mL] | マウスP DGF-B BB [EC50] [ng/mL] | ラットP DGF-B BB [EC50] [ng/mL] | カニクイザ ルPDGF -BB [EC50] [ng/mL] | ヒトPD GF-A A [EC50] [ng/mL] | ヒトPD GF-C C [EC50] [ng/mL] |
|---------|--|--|--|--|--|--|
| 抗体 0058 | 40.15 | 33.16 | 96.58 | 3.4 | 検出されず | 検出されず |
| 抗体 0059 | 35.07 | 57.14 | 154.3 | 8.99 | 検出されず | 検出されず |
| 抗体 0064 | 16.05 | 2.68 | 3.69 | 7.41 | 検出されず | 検出されず |
| 抗体 0060 | 37.54 | 42.76 | 109.82 | 41.5 | 検出されず | 検出されず |
| 抗体 0085 | 7.55 | 24.96 | 15.96 | 15.33 | 検出されず | 検出されず |
| 抗体 0086 | 12.04 | 14.08 | 10.57 | 16.19 | 検出されず | 検出されず |

【 0 1 4 0 】

10

20

30

【表 1 3】

| | SPRによるヒトPDGF-BBの結合力 [M] | SPRによるヒトPDGF-BBの結合速度 (kon) [M-1s-1] | SPRによるヒトPDGF-BBの解離速度 (koff) [s-1] | SPRによるカニクイザルPDGF-BBの結合力 [M] | SPRによるカニクイザルPDGF-BBの結合速度 (kon) [M-1s-1] | SPRによるカニクイザルPDGF-BBの解離速度 (koff) [s-1] |
|---------|----------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|--|--|
| 抗体 0058 | 6.2×10^{-11} | 1.80×10^6 | 1.10×10^{-4} | 2.88×10^{-11} | 2.27×10^6 | 6.53×10^{-5} |
| 抗体 0059 | 6.1×10^{-11} | 1.70×10^6 | 1.04×10^{-4} | 2.88×10^{-11} | 2.36×10^6 | 6.80×10^{-5} |
| 抗体 0064 | 7.69×10^{-11} | 0.72×10^6 | 0.55×10^{-4} | 5.96×10^{-11} | 0.74×10^6 | 4.42×10^{-5} |
| 抗体 0060 | 7.82×10^{-11} | 0.37×10^6 | 0.29×10^{-4} | 1.69×10^{-13} | 0.33×10^6 | 5.646×10^{-8} |
| 抗体 0085 | 4.76×10^{-11} | 0.93×10^6 | 0.44×10^{-4} | 4.78×10^{-11} | 0.94×10^6 | 4.52×10^{-5} |
| 抗体 0086 | 2.18×10^{-11} | 1.04×10^6 | 0.23×10^{-4} | 1.78×10^{-11} | 1.04×10^6 | 1.84×10^{-5} |

10

【 0 1 4 1】

【表 1 4】

| | P P I I ヒトPDGF-BB : : ヒトPDGF-R β __ I C 5 0 [ng/ml] |
|---------|---|
| 抗体 0058 | 42.48 |
| 抗体 0059 | 47.61 |
| 抗体 0064 | 34.32 |
| 抗体 0060 | 55.37 |
| 抗体 0085 | 17.76 |
| 抗体 0086 | 11.73 |

20

【 0 1 4 2】

1つの実施態様では、ヒト化抗PDGF-B抗体は、ヒト、ラット、マウス、及びカニクイザルのPDGF-Bに結合する。

【 0 1 4 3】

30

【表 1 5】

| | 収量 [mg] | 規模 [l] | 収率 [上清中の mg/L] | 単量体 (定性 S E C) [%] | メインピ ーク (CE- SDS/SDS PAGE) [%] |
|---------|------------|-----------|----------------------|-----------------------------|---|
| 抗体 0058 | 17.4 | 0.25 | 87 | 99 | 97 |
| 抗体 0059 | 24.6 | 0.25 | 98 | 97.8 | 97 |
| 抗体 0060 | 24.4 | 0.25 | 98 | 98 | 97 |
| 抗体 0064 | 28.8 | 0.25 | 115 | >95 | 97 |
| 抗体 0085 | 22.5 | 0.25 | 90 | 99 | 96 |
| 抗体 0086 | 20.8 | 0.25 | 83 | 99 | 96 |
| 抗体 0144 | 37.7 | 1.5 | 25.1 | >98 | >95 |
| 抗体 0117 | 46.3 | 1 | 46.3 | >98 | >95 |
| 抗体 0145 | 21.5 | 1 | 21.5 | >98 | >95 |
| 抗体 0146 | 14.6 | 0.5 | 29.2 | >98 | >95 |

10

20

【 0 1 4 4 】

【表 1 6】

| | リン酸化抑制の IC_{50} | | 3 T 3 増殖の IC_{50} | |
|---------|-------------------|-------|---------------------|-------|
| 抗体 0058 | 2.9 | ng/ml | 79.3 | ng/ml |
| 抗体 0059 | 6.2 | ng/ml | 129.9 | ng/ml |
| 抗体 0060 | 1.6 | ng/ml | 36.3 | ng/ml |
| 抗体 0064 | 検出されず | 検出されず | 62 | ng/ml |
| 抗体 0085 | 検出されず | 検出されず | 31.8 | ng/ml |
| 抗体 0086 | 検出されず | 検出されず | 56.0 | ng/ml |

30

【 0 1 4 5 】

多様な活性アッセイでは、前記抗体は、以下の表に提示されるデータから示され得るような生物学的活性を示す。

【 0 1 4 6 】

【表 17】

| | 周皮細胞 | | | | Balb-C3T3 | |
|-----------------|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|
| | 遊走の | | 増殖の | | 増殖の | |
| | E C 5 0 [nM] | | E C 5 0 [nM] | | E C 5 0 [nM] | |
| ヒトPDGF- β | 0.03/0.04 | | 0.02/0.03 | | 0.025/0.023 | |
| | IC50[nM] | 中和% | IC50[nM] | 中和% | IC50[nM] | 中和% |
| R & Dポリクローナル抗体 | 0.56/0.32 | 100 | 0.36/0.41 | 100 | 0.69/0.65 | 100 |
| 抗体 0058 | 0.002 | 100 | 0.08 | 100 | 0.24 | 100 |
| 抗体 0060 | 0.013 | 100 | 0.6 | 100 | 0.29 | 90 |
| 抗体 0059 | 0.22 | 100 | 0.14 | 100 | 0.06 | 100 |
| 抗体 0064 | 0.14 | 100 | 0.08 | 100 | 0.024 | 100 |
| 抗体 0085 | 0.15 | 90 | 0.11 | 100 | 0.06 | 100 |
| 抗体 0086 | 0.09 | 100 | 0.09 | 100 | 0.11 | 100 |

10

20

【0147】

【表 18】

| | F a b による 遊走抑制 [nM] | F a b による 増殖抑制 [nM] | F a b による 増殖抑制 [nM] |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 抗体 0058 | 3.05 | 17.21 | >20 |
| 抗体 0060 | 0.11/>20 | 0.7/>20 | 0.8/>20 |
| 抗体 0059 | 4.47 | 0.97 | 13.09 |
| 抗体 0064 | 0.97 | 6.9 | 4.79 |
| 抗体 0085 | 0.41 | 1.02 | 1.36 |
| 抗体 0086 | 0.14 | 0.62 | 1.18 |

30

【0148】

様々な抗体の速度論的結合特性を、表面プラズモン共鳴技術を使用して決定した（以下の表を参照）。

【0149】

【表 19】

| | kd [1/s] | t1/2 [分] |
|---------|-----------------------|----------|
| 抗体-0058 | 2.91×10^{-4} | 40 |
| 抗体-0060 | 2.64×10^{-4} | 44 |
| 抗体-0064 | 1.35×10^{-4} | 85 |
| 抗体-0085 | 1.02×10^{-4} | 114 |
| 抗体-0086 | 7.93×10^{-5} | 146 |

40

【0150】

【表 2 0】

| Fab | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD* [nM] | t1/2 [秒] |
|---------|--------------------|-----------------------|----------|----------|
| 抗体-0106 | 2.02×10^5 | 3.74×10^{-4} | 2 | 1853 |
| 抗体-0107 | 1.95×10^5 | 3.62×10^{-4} | 2 | 1915 |
| 抗体-0108 | 3.96×10^5 | 7.73×10^{-3} | 20 | 90 |
| 抗体-0109 | 3.14×10^5 | 1.36×10^{-2} | 43 | 51 |
| 抗体-0110 | 1.30×10^5 | 1.01×10^{-3} | 8 | 686 |

【 0 1 5 1】

10

【表 2 1】

| Fab | 見かけのKD* [nM] | T1/2 [秒] | IgG | 見かけのKD** [nM] | T1/2 [秒] |
|---------|-----------------|-------------|---------|------------------|----------|
| 抗体-0104 | - | - | 抗体-0060 | 0.021 | 6829 |
| 抗体-0106 | 2 | 1853 | 抗体-0085 | 0.023 | 8739 |
| 抗体-0107 | 2 | 1915 | 抗体-0086 | 0.030 | 2461 |
| 抗体-0108 | 20 | 90 | 抗体-0059 | 0.031 | 2379 |
| 抗体-0109 | 43 | 51 | 抗体-0058 | 0.046 | 5127 |
| 抗体-0110 | 8 | 686 | 抗体-0064 | 0.021 | 6829 |

20

【 0 1 5 2】

様々な抗体の保存安定性を以下の表に示す（基準表面での有効濃度）。

【 0 1 5 3】

【表 2 2】

| | 2週間／40℃、pH 6.0における基準に対する [%] | 2週間／37℃、pH 7.4における基準に対する [%] |
|---------|------------------------------|------------------------------|
| 抗体-0058 | 101 | 102 |
| 抗体-0059 | 99 | 98 |
| 抗体-0060 | 87 | 81 |
| 抗体-0064 | 99 | 97 |
| 抗体-0086 | 99 | 98 |

30

【 0 1 5 4】

抗体の熱安定性を、凝集開始温度（Tagg）及び融解温度（Tm）を決定することによって評価した（以下の表を参照）。

【 0 1 5 5】

【表 2 3】

| | Tagg [°C] | Tm [°C] |
|---------|-----------|---------|
| 抗体-0086 | 64 | 64.5-68 |

40

【 0 1 5 6】

抗体 0144 は、PDGF - B 結合特異性として抗体 0085 の VH ドメインと VL ドメインを含む、二重特異的抗 ANG2 / PDGF - B 抗体である。

【 0 1 5 7】

抗体 0117 は、PDGF - B 結合特異性として抗体 0085 の VH ドメインと VL ドメインを含む、二重特異的抗 VEGF / PDGF - B 抗体である。

【 0 1 5 8】

50

速度論的結合値の決定のために、実施例 3 2 に報告されているようなアッセイを使用した。

【 0 1 5 9 】

【 表 2 4 】

| ANG2 | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD* [nM] | t1/2 [秒] |
|---------|--------------------|-----------------------|----------|----------|
| 抗体-0144 | 9.06×10^4 | 1.55×10^{-3} | 17 | 446 |

【 0 1 6 0 】

【 表 2 5 】

| VEGF | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD* [nM] | t1/2 [秒] |
|---------|--------------------|---------------------|----------|----------|
| 抗体-0117 | 2.46×10^4 | $<1 \times 10^{-6}$ | <0.1 | - |

10

【 0 1 6 1 】

【 表 2 6 】

| PDGF-BB | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD* [nM] | t1/2 [秒] |
|---------|--------------------|-----------------------|----------|----------|
| 抗体-0106 | 2.94×10^5 | 2.91×10^{-4} | 1 | 40 |
| 抗体-0117 | 7.67×10^4 | 2.45×10^{-4} | 3 | 47 |
| 抗体-0144 | 8.31×10^4 | 2.15×10^{-4} | 3 | 53 |

20

【 0 1 6 2 】

全ての二重特異的抗体が、両方のその抗原に同時に結合する特性を有することが S P R 分析によって示された。

【 0 1 6 3 】

二重特異的抗体は、細胞に基づいたアッセイで結合活性及び生物学的活性を示す。

【 0 1 6 4 】

【 表 2 7 】

| | ヒト周皮細胞の増殖の I C ₅₀ | | 3 T 3 の増殖の I C ₅₀ | |
|-----------------|---------------------------------|----|------------------------------|----|
| 抗体 0117 | 0.016 | nM | 0.019 | nM |
| 抗体 0144 | 0.030 | nM | 0.020 | nM |
| 抗体 0085 の F A B | 0.012 | nM | 検出されず | |

30

【 0 1 6 5 】

【 表 2 8 】

| | ヒト周皮細胞のリン酸化 抑制の I C ₅₀ | | ヒト周皮細胞の遊走抑制 の I C ₅₀ | |
|-----------------|--------------------------------------|----|------------------------------------|----|
| 抗体 0117 | 0.055 | nM | 0.06 | nM |
| 抗体 0144 | 0.055 | nM | 0.06 | nM |
| 抗体 0085 の F A B | 検出されず | | 0.27 | nM |

40

【 0 1 6 6 】

ANG2 特異的 p T i e 2 - E L I S A では、抗体 0 1 4 4 は、国際公開公報第 2 0 1 4 / 0 9 4 6 5 号に報告されている抗 ANG2 / V E G F 抗体と比べて 6 倍活性が高い。

【 0 1 6 7 】

VEGF 特異的レポーターアッセイでは、抗体 0 1 1 7 は、国際公開公報第 2 0 1 4 / 0 9 4 6 5 号に報告されている抗 ANG2 / V E G F 抗体と類似した活性を有する。

【 0 1 6 8 】

50

抗体 0085 は、配列番号 92 ~ 100 の配列と共に記載されている（結合部位、HVR、VH、VL）。抗体 0085 の二重特異的形式は、配列番号 131 ~ 134、147 ~ 150、及び 163 ~ 166 の配列に記載されている。これらの全ての配列は、単独で及び本発明の組合せ態様で構成される。

【0169】

抗体 0086 は、配列番号 101 ~ 109 の配列と共に記載されている（結合部位、HVR、VH、VL）。抗体 0086 の二重特異的形式は、配列番号 135 ~ 138、151 ~ 154、及び 167 ~ 167 の配列に記載されている。これらの全ての配列は、単独で及び本発明の組合せ態様で構成される。

【0170】

抗体 0144 は、配列番号 147 ~ 150 の配列と共に記載されている（Cross Mab 形式、2 本の重鎖、2 本の軽鎖）。

【0171】

抗体 0117 は、配列番号 171 ~ 174 の配列と共に記載されている（Cross Mab 形式、2 本の重鎖、2 本の軽鎖）。

【0172】

抗体 0144 及び 0145 を、様々な pH 値で 2 週間インキュベートし、その後、それぞれ PDGF-BB 及び ANG2 に対するその結合を決定した。

【0173】

【表 29】

| 抗体 0144 | 以下に対する結合 | 基準に対する結合率 [%] | SD |
|--------------------|----------|---------------|----|
| 開始時の基準値 | PDGF-BB | 100 | |
| pH 6 でのインキュベーション | | 101 | 4 |
| pH 7.4 でのインキュベーション | | 94 | 6 |
| 開始時の基準値 | ANG2 | 100 | |
| pH 6 でのインキュベーション | | 100 | 1 |
| pH 7.4 でのインキュベーション | | 91 | 4 |

【0174】

【表 30】

| 抗体 0145 | 以下に対する結合 | 基準に対する結合率 [%] | SD |
|--------------------|----------|---------------|----|
| 開始時の基準値 | PDGF-BB | 100 | |
| pH 6 でのインキュベーション | | 99 | 1 |
| pH 7.4 でのインキュベーション | | 95 | 2 |
| 開始時の基準値 | ANG2 | 100 | |
| pH 6 でのインキュベーション | | 99 | 2 |
| pH 7.4 でのインキュベーション | | 94 | 0 |

【0175】

本明細書において報告されているような 1 つの態様は、（a）配列番号 02 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、（b）配列番号 03 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び（c）配列番号 05 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む、ヒト化抗ヒト PDGF-B 抗体である。1 つの実施態様では、該抗体はさらに、（d）配列番号 07 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；（e）配列番号 08 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び（f）配列番号 09 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む。

【0176】

本明細書において報告されているような1つの態様は、(a)配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号04のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、ヒト化抗ヒトPDGF-B抗体である。1つの実施態様では、該抗体はさらに、(d)配列番号07のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号08のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号09のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0177】

本明細書において報告されているような1つの態様は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗ヒトPDGF-B抗体である。1つの実施態様では、該抗体はさらに、(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0178】

1つの態様では、本発明は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのHVRを含む抗PDGF-B抗体を提供する。

20

【0179】

1つの好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。また1つの好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような抗PDGF-B抗体は、配列番号92のアミノ酸配列を有するVHと、配列番号97のアミノ酸配列を有するVLとを含む。また1つの好ましい実施態様では、抗PDGF-B抗体は二重特異的抗体である。

30

【0180】

1つの態様では、本発明は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択された、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH-HVR配列を含む抗体を提供する。1つの実施態様では、該抗体は、配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、該抗体は、配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。さらなる実施態様では、該抗体は、配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、該抗体は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

40

【0181】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL-HVR配列を含む抗体を提供する。1つの実施態様では、該抗体は、(a)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

50

【0182】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号96から選択されたアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0183】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号100から選択されたアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0184】

別の態様では、抗PDGF-B抗体は、配列番号92のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一率を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一率を有するVH配列は、基準配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含有しているが、該配列を含んでいる抗PDGF-B抗体は、PDGF-Bに対する結合能を保持している。特定の実施態様では、配列番号92における合計で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、及び/又は欠失している。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の領域(すなわちFR内)で起こる。場合により抗PDGF-B抗体は、配列番号92のVH配列(その配列の翻訳後修飾も含む)を含む。特定の実施態様では、VHは、(a)配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択された1つ、2つ、又は3つのHVRを含む。

【0185】

別の態様では、抗PDGF-B抗体が提供され、ここで該抗体は、配列番号97のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一率を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一率を有するVL配列は、基準配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含有しているが、その配列を含む抗PDGF-B抗体は、PDGF-Bに対する結合能を保持している。特定の実施態様では、配列番号97における合計で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、及び/又は欠失している。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の領域(すなわちFR内)で起こる。場合により、抗PDGF-B抗体は、配列番号97のVL配列(その配列の翻訳後修飾も含む)を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された1つ、2つ、又は3つのHVRを含む。

【0186】

別の態様では、抗PDGF-B抗体が提供され、ここで該抗体は、上記に提供された実施態様のいずれかにおけるようなVHと、上記に提供された実施態様のいずれかにおけるようなVLとを含む。1つの実施態様では、該抗体は、それぞれ配列番号92及び配列番号97のVH配列及びVL配列(そうした配列の翻訳後修飾も含む)を含む。

【0187】

本明細書において報告されているような1つの態様は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗ヒトPDGF-B抗体である。1つの実施態様では、該抗体はさらに、(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0188】

1つの態様では、本発明は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つのHVRを含む、抗PDGF-B抗体を提供する。

【0189】

1つの好ましい実施態様では、抗PDGF-B抗体は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。また1つの好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような抗PDGF-B抗体は、配列番号101のアミノ酸配列を有するVHと、配列番号106のアミノ酸配列を有するVLとを含む。また1つの好ましい実施態様では、抗PDGF-B抗体は二重特異的抗体である。

【0190】

1つの態様では、本発明は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH-HVR配列を含む抗体を提供する。1つの実施態様では、該抗体は、配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、該抗体は、配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。さらなる実施態様では、該抗体は、配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、該抗体は、(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0191】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVL-HVR配列を含む抗体を提供する。1つの実施態様では、該抗体は、(a)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0192】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択された少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのVH-HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i

10

20

30

40

50

）配列番号 107 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 109 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択された少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、又は 3 つ全ての V L H V R 配列を含む V L ドメインを含む。

【 0 1 9 3 】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号 102 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1；(b) 配列番号 104 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2；(c) 配列番号 105 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3；(d) 配列番号 107 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1；(e) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2；及び (f) 配列番号 109 から選択されたアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、抗体を提供する。

10

【 0 1 9 4 】

別の態様では、抗 P D G F - B 抗体は、配列番号 101 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一率を有する重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。特定の実施態様では、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % の同一率を有する V H 配列は、基準配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含有しているが、その配列を含んでいる抗 P D G F - B 抗体は、P D G F - B に対する結合能を保持している。特定の実施態様では、配列番号 101 における合計で 1 ~ 10 個のアミノ酸が、置換、挿入、及び / 又は欠失している。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の領域（すなわち F R 内）で起こる。場合により、抗 P D G F - B 抗体は、配列番号 101 の V H 配列（その配列の翻訳後修飾も含む）を含む。特定の実施態様では、V H は、(a) 配列番号 102 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 103 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 105 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択された 1 つ、2 つ、又は 3 つの H V R を含む。

20

【 0 1 9 5 】

別の態様では、抗 P D G F - B 抗体が提供され、ここで該抗体は、配列番号 106 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % の配列同一率を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。特定の実施態様では、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % の同一率を有する V L 配列は、基準配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含有しているが、その配列を含む抗 P D G F - B 抗体は、P D G F - B に対する結合能を保持している。特定の実施態様では、配列番号 106 における合計で 1 ~ 10 個のアミノ酸が、置換、挿入、及び / 又は欠失している。特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、H V R 外の領域（すなわち F R 内）で起こる。場合により、抗 P D G F - B 抗体は、配列番号 106 の V L 配列（その配列の翻訳後修飾も含む）を含む。特定の実施態様では、V L は、(a) 配列番号 107 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1；(b) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2；及び (c) 配列番号 109 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択された 1 つ、2 つ、又は 3 つの H V R を含む。

30

40

【 0 1 9 6 】

本明細書において報告されているような 1 つの態様は、2 本の重鎖と 2 本の軽鎖とを含む抗体であり、ここで a) 第一の重鎖は、配列番号 147 のアミノ酸配列を有し、第二の重鎖は配列番号 148 のアミノ酸配列を有し、第一の軽鎖は配列番号 149 のアミノ酸配列を有し、第二の軽鎖は配列番号 150 のアミノ酸配列を有するか、又は b) 該抗体は、項目 a) のアミノ酸配列 (F c 領域内での突然変異である翻訳後修飾も含む) を含む。

【 0 1 9 7 】

1 つの好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような二重特異的抗体は、P 3 2 9 G、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及び H 4 3 4 A の突然変異（番号付けは K a b a t のインデックスによる）を有する。

50

【 0 1 9 8 】

別の態様では、抗 P D G F - B 抗体が提供され、ここで該抗体は、上記に提供された実施態様のいずれかにおけるような V H と、上記に提供された実施態様のいずれかにおけるような V L とを含む。1つの実施態様では、該抗体は、それぞれ配列番号 1 0 1 及び配列番号 1 0 6 の V H 配列及び V L 配列（そうした配列の翻訳後修飾も含む）を含む。

【 0 1 9 9 】

本発明のさらなる態様では、上記の実施態様のいずれかに記載の抗 P D G F - B 抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 2 0 0 】

1つの実施態様では、抗 P D G F - B 抗体は抗体断片、例えば F v、F a b、F a b'、s c F v、ディアボディ、又は F (a b')₂ 断片である。

10

【 0 2 0 1 】

別の実施態様では、該抗体は、完全長抗体、例えばインタクトな I g G 1 抗体又は本明細書に定義されているような他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

【 0 2 0 2 】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、抗 P D G F - B 抗体は、エフェクターサイレントな抗 P D G F - B 抗体である。本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、抗 P D G F - B 抗体は、エフェクターサイレントな抗 P D G F - B 抗体であり、ヒト F c R n には結合しない。本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、ヒトサブクラス I g G 1 の抗 P D G F - B 抗体であり、両方の重鎖において L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及び H 4 3 4 A の突然変異を有する（番号付けは K a b a t のインデックスによる）。

20

【 0 2 0 3 】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、抗 P D G F - B 抗体は二重特異的抗体である。

【 0 2 0 4 】

本明細書において報告されているような1つの態様は、
a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖（ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の可変ドメイン V L 及び V H は、互いによって置換されている）を含む二価の二重特異的抗体であり、ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒト P D G F - B である。

30

【 0 2 0 5 】

a) の下の抗体は、b) の下で報告されているような改変を含有せず、a) の下の重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【 0 2 0 6 】

b) の下の抗体では、軽鎖内では、軽鎖可変ドメイン V L は該抗体の重鎖可変ドメイン V H によって置換され、重鎖内では、重鎖可変ドメイン V H は該抗体の軽鎖可変ドメインによって置換されている。

40

【 0 2 0 7 】

1つの実施態様では、
i) a) の下の第一の軽鎖の定常ドメイン C L では、1 2 4 位のアミノ酸（番号付けは K a b a t による）は正に荷電したアミノ酸によって置換され、a) の下の第一の重鎖の定常ドメイン C H 1 では、1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）は、負に荷電したアミノ酸によって置換されている、又は、

i i) b) の下の第二の軽鎖の定常ドメイン C L では、1 2 4 位のアミノ酸（番号付けは K a b a t による）は正に荷電したアミノ酸によって置換され、b) の下の第二の重鎖の定常ドメイン C H 1 では、1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸（番号付けは K a

50

b a t の E U インデックスによる) は、負に荷電したアミノ酸によって置換されている。

【 0 2 0 8 】

1 つの好ましい実施態様では、

i) a) の下の第一の軽鎖の定常ドメイン C L では、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R)、又はヒスチジン (H) によって独立して置換され (番号付けは K a b a t による) (1 つの好ましい実施態様では独立してリジン (K) 又はアルギニン (R) によって)、a) の下の第一の重鎖の定常ドメイン C H 1 では、1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、あるいは
i i) b) の下の第二の軽鎖の定常ドメイン C L では、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン (K)、アルギニン (R)、又はヒスチジン (H) によって独立して置換され (番号付けは K a b a t による) (1 つの好ましい実施態様では独立してリジン (K) 又はアルギニン (R) によって)、b) の下の第二の重鎖の定常ドメイン C H 1 では、1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸 (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる) は、グルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている。

10

【 0 2 0 9 】

1 つの実施態様では、第二の重鎖の定常ドメイン C L における 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸は、K によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)。

【 0 2 1 0 】

1 つの好ましい実施態様では、第二の軽鎖の定常ドメイン C H 1 における 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸は、E によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)。

20

【 0 2 1 1 】

1 つの実施態様では、第一の軽鎖の定常ドメイン C L における 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸は K によって置換され、第一の重鎖の定常ドメイン C H 1 における 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸は E によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)。

【 0 2 1 2 】

1 つの実施態様では、第二の重鎖の定常ドメイン C L における 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸は K によって置換され、第二の軽鎖の定常ドメイン C H 1 における 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸は E によって置換され、第一の軽鎖の可変ドメイン V L における 3 8 位のアミノ酸は K によって置換され、第一の重鎖の可変ドメイン V H における 3 9 位のアミノ酸は E によって置換され、第二の重鎖の可変ドメイン V L における 3 8 位のアミノ酸は K によって置換され、第二の軽鎖の可変ドメイン V H における 3 9 位のアミノ酸は E によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)。

30

【 0 2 1 3 】

本明細書において報告されているような 1 つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖 (ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の可変ドメイン V L 及び V H は、互いによって置換され、第二の軽鎖及び第二の重鎖の定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている)
を含む、二価の二重特異的抗体であり、ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒト P D G F - B である。

40

【 0 2 1 4 】

a) の下の抗体は、b) の下で報告されているような改変を含有せず、a) の下の重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【 0 2 1 5 】

b) の下の抗体では、軽鎖内では、軽鎖可変ドメイン V L は該抗体の重鎖可変ドメイン V H によって置換され、軽鎖定常ドメイン C L は該抗体の重鎖定常ドメイン C H 1 によ

50

て置換され、そして、重鎖内では、重鎖可変ドメインVHは該抗体の軽鎖可変ドメインVLによって置換され、重鎖定常ドメインCH1は該抗体の軽鎖定常ドメインCLによって置換されている。

【0216】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

- a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
- b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖（ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の定常ドメインCL及びCH1は、互いによって置換されている）を含む、二価の二重特異的抗体であり、ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである。

10

【0217】

a) の下の抗体は、b) の下で報告されているような改変を含有せず、a) の下の重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【0218】

b) の下の抗体では、軽鎖内では、軽鎖定常ドメインCLは該抗体の重鎖定常ドメインCH1によって置換され、重鎖内では、重鎖定常ドメインCH1は該抗体の軽鎖定常ドメインCLによって置換されている。

【0219】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

- a) 第一の抗原に特異的に結合し、かつ2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長の抗体、及び
- b) 1から4つのさらに他の抗原（すなわち、第二及び／又は第三及び／又は第四及び／又は第五の抗原、好ましくは1つのさらに他の抗原、すなわち第二の抗原に特異的に結合する）に特異的に結合する1つ、2つ、3つ、又は4つの一本鎖Fab断片を含む、多重特異的抗体であり、ここで、b) の下の前記の一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端でペプチド性リンカーを介してa) の下の前記の完全長抗体に融合し、ここで第一の抗原又はさらに他の抗原の中の1つはヒトPDGF-Bである。

20

【0220】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する1つ又は2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

30

【0221】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する1つ又は2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の重鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

【0222】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する1つ又は2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の軽鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

40

【0223】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の各々の重鎖又は軽鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

【0224】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の各々の重鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

【0225】

1つの実施態様では、第二の抗原に結合する2つの同一な一本鎖Fab断片は、前記の

50

完全長抗体の各々の軽鎖のC末端でペプチド性リンカーを介して前記の完全長抗体に融合している。

【0226】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合し、かつ2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長の抗体、

b) b a) 抗体の重鎖可変ドメイン(VH)、又は

b b) 抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体の定常ドメイン1(CH1)

からなる第一のポリペプチド(ここで、前記の第一のポリペプチドは、そのVHドメインのN末端で、前記の完全長抗体の2本の重鎖の片方のC末端にペプチド性リンカーを介して融合している)、

c) c a) 抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)、又は

c b) 抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体の軽鎖定常ドメイン(CL)

からなる第二のポリペプチド(ここで、前記の第二のポリペプチドは、VLドメインのN末端で、前記の完全長抗体の2本の重鎖の他方のC末端にペプチド性リンカーを介して融合している)

を含む、三価の二重特異的抗体であり、

ここで、第一のポリペプチドの抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及び第二のポリペプチドの抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)は第二の抗原に特異的に結合する抗原結合部位と一緒に形成し、

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである。

【0227】

1つの実施態様では、b)の下ポリペプチドの抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及びc)の下ポリペプチドの抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)は、以下の位置の間へのジスルフィド結合の導入によって鎖間ジスルフィド橋を介して連結され安定化されている：

i) 重鎖可変ドメイン44位と軽鎖可変ドメイン100位、又は

i i) 重鎖可変ドメイン105位と軽鎖可変ドメイン43位、又は

i i i) 重鎖可変ドメイン101位と軽鎖可変ドメイン100位(番号付けは常にKabattのEUIンデックスによる)。

【0228】

安定化のために非天然のジスルフィド橋を導入する技術は、例えば、国際公開公報第94/029350号、Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59; 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つの実施態様では、b)及びc)の下でのポリペプチドの可変ドメイン間の任意選択のジスルフィド結合は、44位の重鎖可変ドメインと100位の軽鎖可変ドメインとの間である。1つの実施態様では、b)及びc)の下でのポリペプチドの可変ドメイン間の任意選択のジスルフィド結合は、105位の重鎖可変ドメインと43位の軽鎖可変ドメインとの間である。(番号付けはKabattのEUIンデックスによる)。1つの実施態様では、一本鎖Fab断片の可変ドメインVHとVLとの間に前記の任意選択のジスルフィドによる安定化を含まない三価の二重特異的な抗体が好ましい。

【0229】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに

b) 第二の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第二の(改変された)軽鎖及び第二の(改変された)重鎖(ここで、可変ドメインVL及びVHは互いによって置換され、及び/又は定常ドメインCL及びCH1は互いによって置換されている)、

を含む、三重特異的又は四重特異的な抗体であり、

c) ここで、1つ又は2つのさらに他の抗原(すなわち第三及び/又は第四の抗原)に特異的に結合する1から4つの抗原結合性ペプチドは、ペプチド性リンカーを介して、a)

及び／又はb)の軽鎖又は重鎖のC末端又はN末端に融合し、
ここで、第一の抗原若しくは第二の抗原又はさらに他の抗原の中の1つはヒトPDGF-Bである。

【0230】

a)の下で報告されているような改変を含有せず、a)の下で重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【0231】

1つの実施態様では、三重特異的又は四重特異的抗体は、c)の下で、1つ又は2つのさらに他の抗原に特異的に結合する1つ又は2つの抗原結合性ペプチドを含む。

【0232】

1つの実施態様では、抗原結合性ペプチドは、scFv断片及びscFab断片の群から選択される。

【0233】

1つの実施態様では、抗原結合性ペプチドはscFv断片である。

【0234】

1つの実施態様では、抗原結合性ペプチドはscFab断片である。

【0235】

1つの実施態様では、抗原結合性ペプチドは、a)及び／又はb)の重鎖のC末端に融合している。

【0236】

1つの実施態様では、三重特異的又は四重特異的抗体は、c)の下で、1つのさらに他の抗原に特異的に結合する1つ又は2つの抗原結合性ペプチドを含む。

【0237】

1つの実施態様では、三重特異的又は四重特異的抗体は、c)の下で、第三の抗原に特異的に結合する2つの同一な抗原結合性ペプチドを含む。1つの好ましい実施態様では、このような2つの同一な抗原結合性ペプチドは、両方共、同じペプチド性リンカーを介して、a)及びb)の重鎖のC末端に融合している。1つの好ましい実施態様では、2つの同一な抗原結合性ペプチドは、scFv断片又はscFab断片のいずれかである。

【0238】

1つの実施態様では、三重特異的又は四重特異的抗体は、c)の下で、第三及び第四の抗原に特異的に結合する2つの抗原結合性ペプチドを含む。1つの実施態様では、前記の2つの抗原結合性ペプチドは、両方共、同じペプチド性コネクターを介して、a)及びb)の重鎖のC末端に融合している。1つの好ましい実施態様では、前記の2つの抗原結合性ペプチドは、scFv断片又はscFab断片のいずれかである。

【0239】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

a)第一の抗原に特異的に結合する(及び2つのFab断片を含む)、抗体の2本の軽鎖及び2本の重鎖、

b)第二の抗原に特異的に結合する、抗体の2つのさらなるFab断片(ここで、前記のさらなるFab断片は、ペプチド性リンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はN末端に融合している)

を含む二重特異的な四価の抗体であり、

ここで、Fab断片において以下の改変が行なわれている

i) a)の両方のFab断片において、又はb)の両方のFab断片において、可変ドメインVL及びVHは互いによって置換され、及び／又は、定常ドメインCL及びCH1は互いによって置換されている、あるいは

ii) a)の両方のFab断片において、可変ドメインVL及びVHは互いによって置換され、定常ドメインCL及びCH1は互いによって置換され、

そして、b)の両方のFab断片において、可変ドメインVL及びVHは互いによって置換されているか、又は定常ドメインCL及びCH1は互いによって置換されている、ある

10

20

30

40

50

いは

i i i) a) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換されているか、又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換され、

そして、b) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている、あるいは

i v) a) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、b) の両方の F a b 断片において、定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている、あるいは

v) a) の両方の F a b 断片において、定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換され、b) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、

10

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒト P D G F - B である。

【 0 2 4 0 】

1 つの実施態様では、前記の追加の F a b 断片は両方共、ペプチド性リンカーを介して、a) の重鎖の C 末端又は a) の重鎖の N 末端のいずれかに融合している。

【 0 2 4 1 】

1 つの実施態様では、前記の追加の F a b 断片は両方共、ペプチド性リンカーを介して、a) の重鎖の C 末端に融合している。

【 0 2 4 2 】

1 つの実施態様では、前記の追加の F a b 断片は両方共、ペプチド性コネクターを介して a) の重鎖の N 末端に融合している。

20

【 0 2 4 3 】

1 つの実施態様では、F a b 断片において、以下の改変が行なわれている：

i) a) の両方の F a b 断片において、又は b) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換されている、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている。

【 0 2 4 4 】

1 つの実施態様では、F a b 断片において、以下の改変が行なわれている：

i) a) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、及び / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている。

30

【 0 2 4 5 】

1 つの実施態様では、F a b 断片において、以下の改変が行なわれている：

i) a) の両方の F a b 断片において、定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている。

【 0 2 4 6 】

1 つの実施態様では、F a b 断片において、以下の改変が行なわれている：

i) b) の両方の F a b 断片において、可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、及び / 又は

定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている。

40

【 0 2 4 7 】

1 つの実施態様では、F a b 断片において、以下の改変が行なわれている：

i) b) の両方の F a b 断片において、定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている。

【 0 2 4 8 】

本明細書において報告されているような 1 つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合しかつ第一の V H - C H 1 ドメイン対を含む、第一の抗体の (改変された) 重鎖 (ここで、該重鎖の C 末端に、前記の第一の抗体の第二の V H - C H 1 ドメイン対の N 末端がペプチド性リンカーを介して融合している) 、

b) a) の前記の第一の抗体の 2 本の軽鎖、

50

c) 第二の抗原に特異的に結合しかつ第一のVH - CLドメイン対を含む、第二の抗体の(改変された)重鎖(ここで、該重鎖のC末端に、前記の第二の抗体の第二のVH - CLドメイン対のN末端がペプチド性リンカーを介して融合している)、及び
d) c)の前記の第二の抗体の2本の(改変された)軽鎖(各々がCL - CH1ドメイン対を含む)

を含む、二重特異的で四価の抗体であり、

ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである。

【0249】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する第一の完全長抗体の重鎖及び軽鎖、並びに
b) 第二の抗原に特異的に結合する第二の完全長抗体の重鎖及び軽鎖(ここで、重鎖のN末端は、ペプチド性リンカーを介して軽鎖のC末端に接続されている)
を含む、二重特異的な抗体であり、

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである。

【0250】

a)の下で報告されているような改変を含有せず、重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【0251】

本明細書において報告されているような1つの態様は、

a) 第一の抗原に特異的に結合し、かつ2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長の抗体、及び

b) VH²ドメイン及びVL²ドメインを含んでいる第二の抗原に特異的に結合するFv断片(ここで、両方のドメインが互いにジスルフィド橋を介して接続されている)

を含む二重特異的な抗体であり、

ここで、VH²ドメイン又はVL²ドメインのいずれか一方のみが、ペプチドリナーを介して、第一の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合し、

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである。

【0252】

二重特異的では、a)の下で重鎖及び軽鎖は単離された鎖である。

【0253】

1つの実施態様では、VH²ドメイン又はVL²ドメインの他方は、ペプチドリナーを介して、第一の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合していない。

【0254】

本明細書において報告されているような全ての態様では、第一の軽鎖はVLドメイン及びCLドメインを含み、第一の重鎖はVHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む。

【0255】

全ての態様の1つの実施態様では、本明細書において報告されているような抗体は、少なくとも2つの重鎖ポリペプチドのヘテロ二量体化を必要とする多重特異的な抗体であり、ここで該抗体は、ヒトPDGF - B及び第二の非ヒトPDGF - B抗原に特異的に結合する。

【0256】

ヘテロ二量体化を支援するためのCH3改変のためのいくつかのアプローチが、例えば、国際公開公報第96/27011号、国際公開公報第98/050431号、欧州特許第1870459号、国際公開公報第2007/110205号、国際公開公報第2007/147901号、国際公開公報第2009/089004号、国際公開公報第2010/129304号、国際公開公報第2011/90754号、国際公開公報第2011/143545号、国際公開公報第2012/058768号、国際公開公報第2013/157954号、国際公開公報第2013/096291号に記載され、これらは参照により本明細書に含まれる。典型的には、当技術分野において公知であるアプローチでは

10

20

30

40

50

、第一の重鎖のC H 3ドメイン及び第二の重鎖のC H 3ドメインは両方共、一方の工学操作されたC H 3ドメインを含む重鎖が、同じ構造の別の重鎖ともはやホモ二量体化できないように、相補的な様式で工学操作されている（例えば、C H 3の工学操作された第一の重鎖は、別のC H 3の工学操作された第一の重鎖ともはやホモ二量体化できない；C H 3の工学操作された第二の重鎖は、別のC H 3の工学操作された第二の重鎖ともはやホモ二量体化できない）。それにより、一方の工学操作されたC H 3ドメインを含む重鎖は、相補的な様式で工学操作されているC H 3ドメインを含む別の重鎖と強制的にヘテロ二量体化する。本発明のこの実施態様では、第一の重鎖のC H 3ドメイン及び第二の重鎖のC H 3ドメインは、アミノ酸の置換によって相補的な様式で工学操作され、よって第一の重鎖及び第二の重鎖は強制的にヘテロ二量体化し、一方、第一の重鎖及び第二の重鎖はもはやホモ二量体化できない（例えば立体的な理由のために）。

10

【 0 2 5 7 】

上記に引用され含まれている、当技術分野において公知である重鎖ヘテロ二量体化を支援するための様々なアプローチは、第一の抗原に特異的に結合する第一の抗体に由来する「交差していないF a b領域」及び第二の抗原に特異的に結合する第二の抗体に由来する「交差しているF a b領域」を、本発明のために上記された特定のアミノ酸置換と組み合わせる、本発明に記載の多重特異的抗体に使用される様々な代替選択肢として考えられる。

【 0 2 5 8 】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体のC H 3ドメインを、例えば国際公開公報第9 6 / 0 2 7 0 1 1号、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621；及びMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681にいくつかの例と共に詳述されている「ノブ・イントゥ・ホール（突起を空隙に）（knob-into-hole s）」技術によって改変させることができる。この方法では、2つのC H 3ドメインの相互作用表面を改変させて、これらの2つのC H 3ドメインを含有している両方の重鎖のヘテロ二量体化を増加させる。（2本の重鎖の）2つのC H 3ドメインの各々は「突起」であり得、一方、他方は「空隙」である。ジスルフィド橋の導入はさらにヘテロ二量体を安定化させ（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35）、収率を増加させる。

20

【 0 2 5 9 】

1つの好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、「突起鎖」のC H 3ドメインにT 3 6 6 W突然変異を、そして「空隙鎖」のC H 3ドメインにT 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V突然変異を含む（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。C H 3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド橋も、例えばY 3 4 9 C突然変異を「突起鎖」のC H 3ドメインに、「空隙鎖」のC H 3ドメインにE 3 5 6 C突然変異又はS 3 5 4 C突然変異を導入することによって使用することができる（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681）。したがって、別の好ましい実施態様では、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、2つのC H 3ドメインの一方にY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を、2つのC H 3ドメインの他方にE 3 5 6 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及びY 4 0 7 V突然変異を含むか、又は、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、2つのC H 3ドメインの一方にY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を、2つのC H 3ドメインの他方にS 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及びY 4 0 7 V突然変異を含む（一方のC H 3ドメイン内の追加のY 3 4 9 C突然変異と、他方のC H 3ドメイン内の追加のE 3 5 6 C又はS 3 5 4 C突然変異は、鎖間ジスルフィド橋を形成している）（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

30

40

【 0 2 6 0 】

しかしまた、欧州特許第1 8 7 0 4 5 9 A 1号によって記載されているような他のノブ・イン・ホール技術も代替的に又は追加して使用することができる。1つの実施態様では、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、「突起鎖」のC H 3ドメイ

50

ンに R 4 0 9 D 及び K 3 7 0 E 突然変異を、「空隙鎖」の C H 3 ドメインに D 3 9 9 K 及び E 3 5 7 K 突然変異を含む（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 6 1 】

1 つの実施態様では、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、「突起鎖」の C H 3 ドメインに T 3 6 6 W 突然変異、並びに「空隙鎖」の C H 3 ドメインに T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 突然変異、並びにさらに「突起鎖」の C H 3 ドメインに R 4 0 9 D 及び K 3 7 0 E 突然変異、並びに「空隙鎖」の C H 3 ドメインに D 3 9 9 K 及び E 3 5 7 K 突然変異を含む（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 6 2 】

1 つの実施態様では、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、2 つの C H 3 ドメインの一方に Y 3 4 9 C 及び T 3 6 6 W 突然変異、並びに 2 つの C H 3 ドメインの他方に S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 突然変異を含むか、又は、本明細書において報告されているような多重特異的抗体は、2 つの C H 3 ドメインの一方に Y 3 4 9 C 及び T 3 6 6 W 突然変異、並びに 2 つの C H 3 ドメインの他方に S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V 突然変異、並びにさらに「突起鎖」の C H 3 ドメインに R 4 0 9 D 及び K 3 7 0 E 突然変異、並びに「空隙鎖」の C H 3 ドメインに D 3 9 9 K 及び E 3 5 7 K 突然変異を含む（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 6 3 】

「ノブ・イントゥ・ホール技術」とは別の、ヘテロ二量体化を強制する多重特異的抗体の重鎖の C H 3 ドメインを改変させるための他の技術も当技術分野において公知である。これらの技術、特に、国際公開公報第 9 6 / 2 7 0 1 1 号、国際公開公報第 9 8 / 0 5 0 4 3 1 号、欧州特許第 1 8 7 0 4 5 9 号、国際公開公報第 2 0 0 7 / 1 1 0 2 0 5 号、国際公開公報第 2 0 0 7 / 1 4 7 9 0 1 号、国際公開公報第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号、国際公開公報第 2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4 号、国際公開公報第 2 0 1 1 / 9 0 7 5 4 号、国際公開公報第 2 0 1 1 / 1 4 3 5 4 5 号、国際公開公報第 2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8 号、国際公開公報第 2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 4 号及び国際公開公報第 2 0 1 3 / 0 9 6 2 9 1 号に記載されている技術は、本明細書において報告されているような多重特異的抗体と組み合わせて「ノブ・イントゥ・ホール技術」に対する代替選択肢として本明細書において考えられている。

【 0 2 6 4 】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、欧州特許第 1 8 7 0 4 5 9 号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。このアプローチは、第一の重鎖と第二の重鎖の両方の間の C H 3 / C H 3 ドメイン界面の特定のアミノ酸の位置への逆の荷電を有する荷電アミノ酸の導入に基づく。

【 0 2 6 5 】

したがって、この実施態様は、本明細書において報告されているような多重特異的抗体に関し、ここで、該抗体の 3 次構造において、第一の重鎖の C H 3 ドメインと第二の重鎖の C H 3 ドメインは、それぞれの抗体の C H 3 ドメイン間に位置する界面を形成し、ここで、第一の重鎖の C H 3 ドメイン及び第二の重鎖の C H 3 ドメインのそれぞれのアミノ酸配列は各々、該抗体の 3 次構造内の該界面内に位置する一連のアミノ酸を含み、ここで、一方の重鎖の C H 3 ドメイン内の界面内に位置する一連のアミノ酸に由来する第一のアミノ酸は、正に荷電したアミノ酸によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメイン内の界面内に位置する一連のアミノ酸に由来する第二のアミノ酸は、負に荷電したアミノ酸によって置換されている。この実施態様に記載された多重特異的抗体は本明細書において、「C H 3 (+ / -) の工学操作された多重特異的抗体」とも称される（「+ / -」という略称は、それぞれの C H 3 ドメインに導入された逆に荷電したアミノ酸を意味する）。

【 0 2 6 6 】

本明細書において報告されているような前記の C H 3 (+ / -) の工学操作された多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、正に荷電したアミノ酸は、K、R 及び H から選択され、負に荷電したアミノ酸は E 又は D から選択される。

【 0 2 6 7 】

本明細書において報告されているような前記の C H 3 (+ / -) の工学操作された多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、正に荷電したアミノ酸は K 及び R から選択され、負に荷電したアミノ酸は E 又は D から選択される。

【 0 2 6 8 】

本明細書において報告されているような前記の C H 3 (+ / -) の工学操作された多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、正に荷電したアミノ酸は K であり、負に荷電したアミノ酸は E である。

【 0 2 6 9 】

本明細書において報告されているような前記の C H 3 (+ / -) の工学操作された多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、一方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 4 0 9 位のアミノ酸 R は D によって置換され、位のアミノ酸 K は E によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 9 9 位のアミノ酸 D は K によって置換され、3 5 7 位のアミノ酸 E は K によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 7 0 】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、国際公開公報第 2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 3 号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、一方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 6 6 位のアミノ酸 T は K によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 5 1 位のアミノ酸 L は D によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。本明細書において報告されているような前記の多重特異的抗体の別の実施態様では、一方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 6 6 位のアミノ酸 T は K によって置換され、3 5 1 位のアミノ酸 L は K によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 5 1 位のアミノ酸 L は D によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 7 1 】

本明細書において報告されているような前記の多重特異的抗体の別の実施態様では、一方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 6 6 位のアミノ酸 T は K によって置換され、3 5 1 位のアミノ酸 L は K によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 5 1 位のアミノ酸 L は D によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。さらに、以下の置換の少なくとも 1 つが、他方の重鎖の C H 3 ドメインに含まれている：3 4 9 位のアミノ酸 Y は E によって置換され、3 4 9 位のアミノ酸 Y は D によって置換され、3 6 8 位のアミノ酸 L は E によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。1 つの実施態様では、3 6 8 位のアミノ酸 L は E によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。

【 0 2 7 2 】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、国際公開公報第 2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8 号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の 1 つの実施態様では、一方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 5 1 位のアミノ酸 L は Y によって置換され、4 0 7 位のアミノ酸 Y は A によって置換され、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 3 6 6 位のアミノ酸 T は A によって置換され、4 0 9 位のアミノ酸 K は F によって置換されている（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）。別の実施態様では、前記の置換に加えて、他方の重鎖の C H 3 ドメインにおいては 4 1 1 位（元来 T ）、3 9 9 位（元来 D ）、4 0 0 位（元来 S ）、4 0 5 位（元来 F ）、3 9 0 位（元来 N ）、及び 3 9 2 位（元来 K ）における少なくとも 1 つの

10

20

30

40

50

アミノ酸が置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。好ましい置換は以下である：

- 411位のアミノ酸Tを、N、R、Q、K、D、E、及びWから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）、
- 399位のアミノ酸Dを、R、W、Y、及びKから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）、
- 400位のアミノ酸Sを、E、D、R、及びKから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）、
- 405位のアミノ酸Fを、I、M、T、S、V、及びWから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）、
- 390位のアミノ酸Nを、R、K、及びDから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）、並びに
- 392位のアミノ酸Kを、V、M、R、L、F、及びEから選択されたアミノ酸によって置換（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

10

【0273】

本明細書において報告されているような前記の多重特異的抗体（国際公開公報第2012/058768号に従って工学操作）の別の実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては351位のアミノ酸LはYによって置換され、407位のアミノ酸YはAによって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては366位のアミノ酸TはVによって置換され、409位のアミノ酸KはFによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては407位のアミノ酸YはAによって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては366位のアミノ酸TはAによって置換され、409位のアミノ酸KはFによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。最後の前記の実施態様では、前記の他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては392位のアミノ酸KはEによって置換され、411位のアミノ酸TはEによって置換され、399位のアミノ酸DはRによって置換され、400位のアミノ酸SはRによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

20

【0274】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2011/143545号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の1つの実施態様では、両方の重鎖のC H 3ドメイン内のアミノ酸の改変は、368位及び/又は409位に導入されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

30

【0275】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2011/090762号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。国際公開公報第2011/090762号は、「ノブ・イントゥ・ホール」技術によるアミノ酸の改変に関する。本明細書において報告されているような前記のC H 3（K i H）の工学操作された多重特異的抗体の1つの実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては366位のアミノ酸TはWによって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては407位のアミノ酸YはAによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。本明細書において報告されているような前記のC H 3（K i H）の工学操作された多重特異的抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては366位のアミノ酸TはYによって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては407位のアミノ酸YはTによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

40

【0276】

50

I g G 2 アイソタイプである、本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2011/090762号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。

【0277】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2009/089004号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の1つの実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては392位のアミノ酸K又はNは負に荷電したアミノ酸（好ましい実施態様ではE又はDによって、1つの好ましい実施態様ではDによって）によって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては399位のアミノ酸D、356位のアミノ酸E若しくはD、又は357位のアミノ酸Eは正に荷電したアミノ酸（1つの好ましい実施態様ではK又はRによって、1つの好ましい実施態様ではKによって、1つの好ましい実施態様では399位又は356位のアミノ酸はKによって置換されている）によって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。1つのさらなる実施態様では、前記の置換に加えて、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては409位のアミノ酸K又はRは、負に荷電したアミノ酸（1つの好ましい実施態様ではE又はDによって、1つの好ましい実施態様ではDによって）によって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。1つのまたさらなる実施態様では、前記の置換に加えて又はその代わりに、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては439位のアミノ酸K及び/又は370位のアミノ酸Kは、互いに独立して、負に荷電したアミノ酸（1つの好ましい実施態様ではE又はDによって、1つの好ましい実施態様ではDによって）によって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

【0278】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2007/147901号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。本明細書において報告されているような該多重特異的抗体の1つの実施態様では、一方の重鎖のC H 3ドメインにおいては253位のアミノ酸KはEによって置換され、282位のアミノ酸DはKによって置換され、322位のアミノ酸KはDによって置換され、他方の重鎖のC H 3ドメインにおいては239位のアミノ酸DはKによって置換され、240位のアミノ酸EはKによって置換され、292位のアミノ酸KはDによって置換されている（番号付けはK a b a tのE Uインデックスによる）。

【0279】

本明細書において報告されているような多重特異的抗体の1つの実施態様では、国際公開公報第2007/110205号に記載されたアプローチを使用して、多重特異的抗体の第一の重鎖と第二の重鎖のヘテロ二量体化を支援する。

【0280】

本明細書において報告されているような全ての態様及び実施態様の中の1つの実施態様では、多重特異的抗体は、二重特異的抗体又は三重特異的抗体である。本発明の1つの好ましい実施態様では、多重特異的抗体は二重特異的抗体である。

【0281】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、前記抗体は二価又は三価抗体である。1つの実施態様では、該抗体は二価抗体である。

【0282】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、多重特異的抗体はI g G型抗体の定常ドメイン構造を有する。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がヒトサブクラスI g G 1であるか、又はL 2 3 4 A及びL 2 3 5 Aの突然変異を有するヒトサブクラスI g G 1であることを特徴とする。本明細書において報告されているような全

ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がヒトサブクラスIgG2であることを特徴とする。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がヒトサブクラスIgG3であることを特徴とする。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がヒトサブクラスIgG4であるか、又は追加のS228Pの突然変異を有するヒトサブクラスIgG4であることを特徴とする。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4であることを特徴とする。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体が、L234A及びL235Aの突然変異を有するヒトサブクラスIgG1であることを特徴とする（番号付けはKabatのEUインデックスによる）。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がL234A、L235A、及びP329Gの突然変異を有するヒトサブクラスIgG1であることを特徴とする（番号付けはKabatのEUインデックスによる）。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がS228P及びL235Eの突然変異を有するヒトサブクラスIgG4であることを特徴とする（番号付けはKabatのEUインデックスによる）。本明細書において報告されているような全ての態様の1つのさらなる実施態様では、多重特異的抗体は、該多重特異的抗体がS228P、L235E、及びP329Gの突然変異を有するヒトサブクラスIgG4であることを特徴とする（番号付けはKabatのEUインデックスによる）。

【0283】

本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、本明細書に明記されたCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、追加のC末端のグリシン-リジンジペプチド（G446及びK447、番号付けはKabatのEUインデックスによる）を含む。本明細書において報告されているような全ての態様の1つの実施態様では、本明細書に明記されたCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、追加のC末端のグリシン残基（G446、番号付けはKabatのEUインデックスによる）を含む。

【0284】

さらなる態様では、上記の実施態様のいずれかに記載の抗PDGF-B抗体は、以下の第1～5章に記載のような特色のいずれかを単独で又は組み合わせて取り込み得る。

【0285】

1. 抗体の親和性

特定の実施態様では、本明細書に提供された抗体は、1 μ M以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下、又は0.1nM以下の解離定数（KD）を有する（例えば 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M～ 10^{-10} M、例えば 10^{-9} M～ 10^{-10} M）。

【0286】

KD値を決定するための方法は、以下の実施例に概略が示されている。

【0287】

ピアコア（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用する場合、KD値は以下の様に代替的に測定され得る：ピアコア（登録商標）-2000又はピアコア（登録商標）-3000（ピアコア社、ピスカタウェイ、NJ州）を使用したアッセイを、25℃で、約10のレスポンスユニット（RU）で抗原の固定されたCM5チップを用いて行なう。1つの実施態様では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、ピアコア社）を、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて業者の説明書に従って活性化する。抗原を10mMの酢酸ナトリウム（pH4.8）を用いて5 μ g/ml（約0.2 μ M）となるまで希釈し、その後、5 μ l/分の流速で注入して、約10レスポンスユニット（RU）の結合タンパク質に到達した。抗原の注入後、1Mのエタノールアミン

を注入して、未反応の基を遮断する。速度論の測定のために、0.05%ポリソルベート20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤 (PBST) を含むPBS中のFabの2倍連続希釈液 (0.78 nMから500 nM) を、25 で約25 μ l/分の流速で注入した。結合速度定数 (k_a) 及び解離速度定数 (k_d) を、結合センサーグラムと解離センサーグラムを同時に当てはめることによって、単純一対一ラングミュア結合モデル (ピアコア (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン3.2) を使用して計算する。平衡解離定数 (K_D) は、 k_d / k_a 比として計算される (例えば、Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881参照)。結合速度値が上記の表面プラズモン共鳴アッセイによって $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を上回る場合、結合速度は、分光光度計、例えばストップフローを備えた分光光度計 (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズのSLM - AMINCO (商標) 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定されるような、漸増濃度の抗原の存在下におけるpH7.2のPBS中の20 nMの抗原に対する抗体 (Fab形態) の25 における蛍光発光強度 (励起 = 295 nm; 発光 = 340 nm、16 nmのバンドパス) の増加又は減少を測定する蛍光消光技術を使用することによって決定され得る。

【0288】

2. 抗体断片

特定の実施態様では、本明細書において提供された抗体は、抗体断片である。抗体断片としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及びscFv断片、並びに下記した他の断片が挙げられるがこれらに限定されない。特定の抗体断片の総説については、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照されたい。scFv断片の総説については、例えば、Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315を参照されたい; また、国際公開公報第93/16185号; 米国特許第5,571,894号及び米国特許第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含みかつインビボでの延長された半減期を有する、Fab及びF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

【0289】

ディアボディは、二価又は二重特異的であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第0404097号; 国際公開公報第1993/01161号; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; 及びHolliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディはもまた、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134に記載されている。

【0290】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部、又は、軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む、抗体断片である。特定の実施態様では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6,248,516号を参照)。

【0291】

抗体断片は、本明細書に記載のような、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化、並びに、組換え宿主細胞 (例えば大腸菌 (E. coli) 又はファージ) による産生を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製され得る。

【0292】

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

特定の実施態様では、本明細書において提供された抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号; 及びMorrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域) 及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体とは変化している「クラススイッチ」抗体である

。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0293】

特定の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減させるためにヒト化されているが、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持している。一般的には、ヒト化抗体は1つ以上の可変ドメインを含み、この中のHVR、例えばCDR（又はその一部）は非ヒト抗体に由来し、FR（又はその一部）はヒト抗体配列に由来している。ヒト化抗体は場合によりまた、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むだろう。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基を、非ヒト抗体（例えばHVR残基の由来する抗体）に由来する対応する残基で置換することにより、例えば、抗体の特異性又は親和性は回復又は改善される。

10

【0294】

ヒト化抗体及びそれらの作製法は、例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633に総説され、さらに、例えば、Riechmann, I. et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、米国特許第7,527,791号、米国特許第6,982,321号、及び米国特許第7,087,409号; Kashmiri, S.V. et al., *Methods* 36 (2005) 25-34（特異性決定領域（SDR）移植を記載）; Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498（「リサーフェシング」を記載）; Dall'Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60（「FRシャッフリング」を記載）; 並びに Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68、及び Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260（FRシャッフリングに対する「誘導選択」アプローチを記載）に記載されている。

20

【0295】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域は、「ベストフィット」法を使用して選択されたフレームワーク領域（例えば、Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308を参照）; 軽鎖又は重鎖の可変領域の特定の亜群のヒト抗体の共通配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; 及び Presta, L.G. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632を参照）; ヒト成熟（体細胞の突然変異した）フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域（例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633を参照）; 及び、FRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 and Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618）を参照）が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0296】

4. 多重特異的抗体

特定の実施態様では、本明細書において提供された抗体は、多重特異的抗体、例えば二重特異的抗体である。多重特異的抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、結合特異性の一方はPDGF-Bに対するものであり、他方はいずれかの他の抗原に対するものである。特定の実施態様では、二重特異的抗体は、PDGF-Bの2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異的抗体はまた、PDGF-Bを発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化させるために使用され得る。二重特異的抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製され得る。

40

【0297】

多重特異的抗体の作製技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリンの重鎖-軽鎖対の組換え共発現（Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540、国際公開公報第93/08829号、及び Traunecker, A. et al., *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659参照）、及び「ノブ・イン・ホール」工学操作（例えば、米国特許第5,731,168号を参照）が挙げられるがこれらに限定されない。多重特異的抗体はまた、

50

抗体Fc-ヘテロ二量体分子の作製のための静電的ステアリング効果の工学操作（国際公開公報第2009/089004号）；2つ以上の抗体又は断片の架橋（例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennan, M. et al., Science229 (1985) 81-83を参照）；二重特異的抗体を生成するためのロイシンジッパーの使用（例えば、Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553参照）；二重特異的抗体断片の作製のための「ディアボディ」技術の使用（例えば、Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448参照）；及び、一本鎖Fv(sFv)二量体の使用（例えば、Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374参照）；及び例えばTutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991)60-69に記載のような三重特異的抗体の調製によって作製され得る。

10

【0298】

「タコ抗体」をはじめとする、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する工学操作された抗体も本明細書に含まれる（例えば米国特許第2006/0025576号参照）。

【0299】

本明細書における抗体又は断片はまた、PDGF-Bに結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab(Dual Acting Fab)」すなわち「DAF」、並びに、別の異なる抗原（例えば、米国特許第2008/0069820号参照）も含む。

【0300】

本明細書における抗体又は断片はまた、国際公開公報第2009/080251号、国際公開公報第2009/080252号、国際公開公報第2009/080253号、国際公開公報第2009/080254号、国際公開公報第2010/112193号、国際公開公報第2010/115589号、国際公開公報第2010/136172号、国際公開公報第2010/145792号、及び国際公開公報第2010/145793号に記載の多重特異的抗体も含む。

20

【0301】

5. 抗体変異体

特定の実施態様では、本明細書において提供された抗体のアミノ酸配列変異体も考えられる。例えば、該抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、該抗体をコードしているヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。このような改変としては、例えば、該抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又は該残基への挿入、及び/又は該残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、及び置換のあらゆる組合せを行なって最終構築物に到達することができる。ただし、最終構築物は、所望の特徴、例えば抗原への結合を有する。

30

【0302】

a) 置換変異体、挿入変異体、及び欠失変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸の置換を有する抗体変異体が提供される。置換による突然変異誘発のための関心対象の部位としては、HVR及びFRが挙げられる。保存的置換は、表中に「好ましい置換」という表題の下で示されている。「例示的な置換」という表題の下で表1に、より実質的な変化が提供され、アミノ酸の側鎖のクラスに関して以下にさらに記載されている。アミノ酸の置換を関心対象の抗体に導入し得、産物を所望の活性、例えば保持された/改善された抗原への結合、低減された免疫原性、又は改善されたADC若しくはCDCについてスクリーニングし得る。

40

【0303】

【表 3 1】

表

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

【 0 3 0 4 】

アミノ酸は、側鎖の共通の特性に従って分類され得る：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性で親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 側鎖の方向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【 0 3 0 5 】

非保存的置換は、これらのクラスの中の1つのメンバーを別のクラスのものと交換することを含む。

【 0 3 0 6 】

1種類の置換変異体は、親抗体（例えばヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域の残基を置換することを含む。一般的に、さらなる研究のために選択された得られた変異体（群）は、親抗体と比較して特定の生物学的活性の改変（例えば改善）（例えば高まった親和性、低減された免疫原性）を有し、及び／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているだろう。例示的な置換変異体は、例えば本明細書に記載の技術のようなファージディスプレイに基づいた親和性成熟技術を使用して慣用的に作製され得る、親和性の成熟した抗体である。端的に言えば、1つ以上のHVR残基を突然変異させ、変異抗体をファージ上にディスプレイし、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングする。

【 0 3 0 7 】

例えば、抗体の親和性を改善させるために、HVRに改変（例えば置換）を行ない得る。このような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち体細胞突然変異過程の最中に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えばChowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196参照）、及び／又は抗原と接触する残基において行なわれ得、結果として得られた変異体VH又はVLを結合親和性について試験する。

第二ライブラリーを構築しこれから再度選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al. in *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施態様では、多様性を、様々な方法（例えばエラーしがちなPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発）のいずれかによって、成熟について選択された可変的な遺伝子に導入する。次いで、第二のライブラリーを作成する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、HVRに向けられたアプローチを含み、ここではいくつかのHVR残基（例えば一度に4～6個の残基）を無作為化する。抗原との結合に關与するHVR残基を、例えば、アラニン走査突然変異誘発又はモデリングを使用して具体的に同定し得る。CDR-H3及びCDR-L3が特に標的化されることが多い。

10

【0308】

特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は1つ以上のHVR内で、このような改変が実質的に、抗原に対する抗体の結合能を低減させない限り、起こり得る。例えば、結合親和性を実質的に低減させない保存的改変（例えば本明細書において提供されているような保存的置換）がHVR内で行なわれ得る。このような改変は、例えば、HVR内の抗原接触残基の外であり得る。上記に提供されたVH及びVLの変異配列の特定の実施態様では、各々のHVRは改変されていないか、又は1つ以下、2つ以下、若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含有している。

【0309】

20

突然変異誘発のために標的化され得る抗体の残基又は領域の同定のために有用な方法は、Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085によって記載されているような「アラニン走査突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の中の1つの残基又は基（例えば、荷電した残基、例えばarg、asp、his、lys、及びglu）を同定し、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えばアラニン又はポリアラニン）によって置換し、抗原と抗体の相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換を、最初の置換に対して機能的感受性を示したアミノ酸の位置に導入してもよい。代わりに又は追加して、抗体と抗原との間の接触点を同定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。このような接触残基及び隣接残基を、置換のための候補として標的化又は排除し得る。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有しているかどうかを決定し得る。

30

【0310】

アミノ酸配列の挿入は、1残基から100以上の残基を含有しているポリペプチドまでの長さにおよぶアミノ末端及び/又はカルボキシル末端への融合、並びに、1つ又は複数のアミノ酸残基の配列間への挿入を含む。末端への挿入例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、抗体のN末端又はC末端への酵素（例えばADEPT）又は抗体の血清中半減期を延長させるポリペプチドの融合が挙げられる。

【0311】

b) グリコシル化変異体

40

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗体を改変させて、該抗体がグリコシル化される程度を増加又は低減させる。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作成されるか又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって慣用的に成し遂げられ得る。

【0312】

前記抗体がFc領域を含む場合、それに付着した糖鎖を改変させ得る。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN結合によって一般的に付着している分岐した、二分岐のオリゴ糖を含む（例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32参照）。オリゴ糖としては、様々な糖鎖、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース、

50

及びシアル酸、並びに、二分岐オリゴ糖構造の「基部」にあるGlcNAcに付着したフコースが挙げられる。いくつかの実施態様では、本発明の抗体内のオリゴ糖の改変は、特定の改善された特性を有する抗体変異体を作成するために行なわれ得る。

【0313】

1つの実施態様では、Fc領域に（直接的に又は間接的に）付着しているフコースを欠失した糖鎖構造を有する抗体変異体を提供する。例えば、このような抗体内のフコースの量は、1%～80%、1%～65%、5%～65%、又は20%～40%であり得る。フコースの量は、例えば国際公開公報第2008/077546号に記載されているような、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるような、Asn297に付着している全ての糖構造（例えば複合構造、ハイブリッド構造、及び高マンノース構造）の合計と比較した、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域内のおよそ297位に位置するアスパラギン残基を指す（Fc領域残基のEUによる番号付け）；しかしながら、Asn297はまた、抗体の僅かな配列の変異に因り、297位より約±3アミノ酸だけ上流又は下流に、すなわち294位から300位の間に位置し得る。このようなフコシル化変異体は、ADCC機能を改善させ得る。例えば、米国特許第2003/0157108号；米国特許第2004/0093621号を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠失」抗体変異体に関連した刊行物の例としては、米国特許第2003/0157108号；国際公開公報第2000/61739；国際公開公報第2001/29246号；米国特許第2003/0115614号；米国特許第2002/0164328号；米国特許第2004/0093621号；米国特許第2004/0132140号；米国特許第2004/0110704号；米国特許第2004/0110282号；米国特許第2004/0109865号；国際公開公報第2003/085119号；国際公開公報第2003/084570号；国際公開公報第2005/035586号；国際公開公報第2005/035778号；国際公開公報第2005/053742号；国際公開公報第2002/031140号；Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することのできる細胞株の例としては、タンパク質のフコシル化の欠失したLecl3CHO細胞（Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545；米国特許第2003/0157108号；及び国際公開公報第2004/056312号、特に実施例11）、及びノックアウト細胞株、例えば-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子（FUT8）ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688；及び国際公開公報第2003/085107号参照）が挙げられる。

【0314】

二分されたオリゴ糖を有する抗体変異体がさらに提供され、例えば、ここでは抗体のFc領域に付着した二分岐のオリゴ糖はGlcNAcによって二分されている。このような抗体変異体は、低減されたフコシル化及び/又は改善されたADCC機能を有し得る。このような抗体変異体の例は、例えば、国際公開公報第2003/011878号；米国特許第6,602,684号；及び米国特許第2005/0123546号に記載されている。Fc領域に付着したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。このような抗体変異体は、例えば、国際公開公報第1997/30087号；国際公開公報第1998/58964号；及び国際公開公報第1999/22764号に記載されている。

【0315】

c) Fc領域変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸の改変を、本明細書において提供された抗体のFc領域に導入し得、これによりFc領域変異体を作製し得る。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸の位置にアミノ酸の改変（例えば置換）を含むヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のFc領域）を含み得る。

【0316】

特定の実施態様では、本発明は、いくつかのエフェクター機能を有しているか全てのエフェクター機能を有しているわけではない抗体変異体を考え、これにより、該抗体変異体は、インビボでの抗体の半減期は重要であるが、特定のエフェクター機能（例えば補体及びADCC）は不必要であるか又は有害であるような適用のための望ましい候補となる。インビトロ及び／又はインビボでの細胞傷害アッセイを行なって、CDC及び／又はADCC活性の低減／欠乏を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行なって、該抗体がFcR結合を欠失しているが（したがってADCC活性を欠失しているようである）、FcRn結合能は保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fcを発現する（RIIIのみ、一方、単球はFcRI、FcRII、及びFcRIIIを発現する）。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492の464頁の表3に要約されている。関心対象の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非制限的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063；及びHellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502参照）；米国特許第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361参照）に記載されている。あるいは、非放射能アッセイ法を使用し得る（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（CellTechnology, Inc.、マウンテンビュー、CA州）；及びCytotox96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega、マディソン、WI州）を参照）。このようなアッセイのために有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代わりに又は追加して、関心対象の分子のADCC活性をインビボで、例えばClynes, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656に開示されているような動物モデルにおいて評価し得る。C1q結合アッセイもまた行なって、該抗体がC1qに結合することができず、したがってCDC活性を欠失していることを確認し得る（例えば国際公開公報第2006/029879号並びに国際公開公報第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISA参照）。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ない得る（例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171；Cragg, M.S. et al., *Blood* 101 (2003) 1045-1052；及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743参照）。FcRnへの結合及びインビボでのクリアランス／半減期の決定もまた、当技術分野において公知の方法を使用して行なうことができる（例えば、Petkova, S.B. et al., *Int. Immunol.* 18 (2006: 1759-1769)を参照）。

【0317】

エフェクター機能の低減された抗体は、Fc領域の238、265、269、270、297、327、及び329残基の1つ以上の置換を有するものが挙げられる（米国特許第6,737,056号）。このようなFc突然変異体としては、265及び297残基のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体をはじめとする、アミノ酸位置265、269、270、297、及び327の2つ以上において置換を有するFc突然変異体が挙げられる（米国特許第7,332,581号）。

【0318】

FcRに対する改善された結合又は消失した結合を有する特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開公報第2004/056312号、及びShields, R.L. et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604参照）。

【0319】

特定の実施態様では、抗体変異体は、ADCCを改善させる1つ以上のアミノ酸置換、例えばFc領域の298位、333位、及び／又は334位に置換を有するFc領域を含む（EUによる残基の番号付け）。

【0320】

いくつかの実施態様では、例えば米国特許第 6, 194, 551 号、国際公開公報第 9 / 51642 号、及び Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184 に記載のような、改変された（すなわち改善されるか又は消失するかのいずれかの）C1q への結合及び／又は補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす、Fc 領域内の改変を行なう。

【0321】

半減期が延長され、母体 IgG から胎仔への移行に関与する（Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593、及び Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434）新生仔 Fc 受容体（FcRn）への結合が改善された抗体が、米国特許第 2005 / 0014934 号に記載されている。そうした抗体は、FcRn に対する Fc 領域の結合を改善させる 1 つ以上の置換をそこに有する Fc 領域を含む。このような Fc 変異体としては、Fc 領域残基（238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 又は 434）の 1 つ以上における置換を有する変異体、例えば Fc 領域残基 434 の置換を有する変異体（米国特許第 7, 371, 826 号）が挙げられる。

【0322】

また、Fc 領域変異体の他の例に関する、Duncan, A.R. 及び Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；米国特許第 5, 648, 260 号；米国特許第 5, 624, 821 号；並びに国際公開公報第 94 / 29351 号を参照されたい。

【0323】

d) システインの工学操作された抗体変異体

特定の実施態様では、システインの工学操作された抗体、例えば「チオモノクローナル抗体」を作製することが望ましくあり得、ここでは抗体の 1 つ以上の残基がシステイン残基で置換されている。特定の実施態様では、置換された残基は、抗体の近づきやすい部位に存在する。こうした残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基はこれにより抗体の近づきやすい部位に位置し、これを使用して抗体を他の部分に、例えば薬物部分又はリンカー - 薬物部分にコンジュゲートさせて、本明細書においてさらに記載されているようなイムノコンジュゲートを作製し得る。特定の実施態様では、以下の残基のいずれか 1 つ以上をシステインで置換し得る：軽鎖の V205（Kabab の番号付け）；重鎖の A118（EU による番号付け）；及び重鎖 Fc 領域の S400（EU による番号付け）。システインの工学操作された抗体は、例えば米国特許第 7, 521, 541 号に記載されているように作製され得る。

【0324】

e) 抗体誘導体

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗体を、当技術分野において公知であり容易に入手可能である追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに改変させ得る。抗体の誘導体化に適した部分としては水溶性ポリマーが挙げられるがこれらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン、ポリ - 1, 3, 6 - トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマー）、及びデキストラン又はポリ（n - ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、及びその混合物が挙げられるがこれらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中におけるその安定性に因り製造において利点を有し得る。ポリマーは任意の分子量であり得、分岐していても分岐していなくてもよい。抗体に付着するポリマーの数は変化し得、1 つを超えるポリマーが付着している場合には、それらは同じ分子であっても異なる分子であってもよい。一般

的に、誘導体化のために使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善しようとする抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体を規定の条件下で療法に使用するのであるかどうかなどを含むがこれらに限定されない考慮に基づいて決定され得る。

【0325】

別の実施態様では、放射線への曝露によって選択的に加熱される可能性がある抗体と非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。1つの実施態様では、非タンパク質性部分はカーボンナノチューブである (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線は任意の波長であり得、これには、普通の細胞は害さないが、抗体-非タンパク質性部分の近くにある細胞が死滅する温度まで非タンパク質性部分を加熱させる波長が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0326】

B. 組換え法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第4,816,567号に記載のような、組換え法及び組成物を使用して産生され得る。1つの実施態様では、本明細書に記載の抗PDGF-B抗体をコードしている単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び／又はVHを含むアミノ酸配列をコードし得る (例えば抗体の軽鎖及び／又は重鎖)。さらなる実施態様では、このような核酸を含む1つ以上のベクター (例えば発現ベクター) が提供される。さらなる実施態様では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのこのような実施態様では、宿主細胞は、(1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び、抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクターを含む (例えばこれで形質転換されている)。1つの実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞又はリンパ球系細胞 (例えばY0、NS0、Sp20細胞) である。1つの実施態様では、抗PDGF-B抗体の作製法が提供され、ここで該方法は、上記に提供されたような抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養し、場合により宿主細胞 (又は宿主細胞培養地) から該抗体を回収する工程を含む。

20

【0327】

抗PDGF-B抗体の組換え産生のために、例えば上記のような抗体をコードしている核酸を単離し、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び／又は発現のために1つ以上のベクターに挿入する。このような核酸は、慣用的な手順を使用して容易に単離及びシーケンスすることができる (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)。

30

【0328】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適した宿主細胞としては、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞が挙げられる。例えば、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合には、抗体を細菌において産生し得る。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号及び米国特許第5,840,523号を参照されたい (E. coli における抗体断片の発現を記載した、Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照されたい)。

40

【0329】

発現後、抗体を、細菌細胞ペーストから可溶性画分中へと単離し得、さらに精製することができる。

【0330】

原核細胞に加えて、真核微生物、例えば線維状真菌又は酵母が、抗体をコードするベクターのために適したクローニング用又は発現用の宿主であり、これには、そのグリコシル化経路が「ヒト化」され、その結果、部分的な又は完全なヒトグリコシル化パターンを有

50

する抗体が産生される真菌株及び酵母株が挙げられる。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; and Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照されたい。

【0331】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。特にヨウトガ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクション用の、昆虫細胞と共に使用し得る、数多くのバキュロウイルス株が同定されている。

【0332】

植物細胞培養液はまた、宿主として使用することもできる（例えば、米国特許第5,959,177号、米国特許第6,040,498号、米国特許第6,420,548号、米国特許第7,125,978号、及び米国特許第6,417,429号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANT ANTIBODIES（商標）技術）を記載）を参照）。

【0333】

脊椎動物細胞もまた宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中での増殖に適合した哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）；ヒト胚性腎臓株（例えばGraham, F. L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載のような293又は293細胞）；ペビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えばMather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載のようなTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；パッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳房腫瘍（MMT060562）；例えばMather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載のようなTRI細胞；MRC5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、例えばDHFR⁻CHO細胞（Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220）；並びに骨髓腫細胞株、例えばY0、NS0、及びSp2/0が挙げられる。抗体の生成に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

【0334】

C. アッセイ

本明細書において提供される抗PDGF-B抗体は、当技術分野において公知である様々なアッセイによってその物理的／化学的特性及び／又は生物学的活性について同定、スクリーニング、又は特徴付けられ得る。例示的なアッセイを実施例において報告する。

【0335】

D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、1つ以上の細胞傷害性薬剤、例えば化学療法剤若しくは化学療法薬、増殖阻害剤、毒素（例えばタンパク質毒素、酵素的に活性な細菌、真菌、植物、又は動物起源の毒素、又はその断片）、又は放射性同位体にコンジュゲートさせた、本明細書において報告されているような、抗PDGF-B抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0336】

1つの実施態様では、イムノコンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲート（antibody-drug conjugate）（ADC）であり、ここでは抗体は、メイタンシノイド（例えば米国特許第5,208,020号、米国特許第5,416,064号及び欧州特許第0425235B1号）；オーリスタチン、例えばモノメチルオーリスタチン薬物部分DE及びDF（MMAE及びMMAF）（米国特許第5,635,483号、米国特許第5,780,588号、及び米国特許第7,498,298号参照）；ドラスタチン；カリケアマイ

シン又はその誘導体（米国特許第5,712,374号、米国特許第5,714,586号、米国特許第5,739,116号、米国特許第5,767,285号、米国特許第5,770,701号、米国特許第5,770,710号、米国特許第5,773,001号及び米国特許第5,877,296号；Hinman, L.M. et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342；及びLode, H.N. et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928参照）；アントラサイクリン、例えばダウノマイシン又はドキソルピシン（Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S.C., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362；Torgov, M.Y., et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721；Nagy, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834；Dubowchik, G.M., et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532；King, H.D., et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343；及び米国特許第6,630,579号参照）；メトトレキサート；ビンデシン；タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル；トリコテシン；並びにCC1065を含むがこれらに限定されない1つ以上の薬物にコンジュゲートしている。

【0337】

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、ニガウリ抑制物質、クルシン、クロチン、サボウンソウ抑制物質、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン類を含むがこれらに限定されない酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした本明細書に記載のような抗体を含む。

【0338】

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性元素にコンジュゲートして放射性コンジュゲートを形成した本明細書に記載のような抗体を含む。様々な放射性同位体が、放射性コンジュゲートの生成のために利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射性同位体が挙げられる。放射性コンジュゲートを検出のために使用する場合、それは、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば Tc^{99m} 若しくは I^{123} 、又は核磁気共鳴（NMR）画像法のためのスピン標識（磁気共鳴画像法、MRIとしても知られる）、例えば再度ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、又は鉄を含んでもよい。

【0339】

抗体と細胞傷害性薬剤とのコンジュゲートは、様々な二官能基を有するタンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばアジブイミド酸ジメチルHCL）、活性エステル（例えばスベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えばトルエン2,6-ジイソシアネート）、及びビス活性フッ素化合物（例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を使用して作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta, E.S. et al., *Science* 238 (1987) 1098-1104に記載のように調製され得る。14Cの標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性核種のコンジュゲートのための例示的なキレート剤である。国際公開公報第94/11026号を参照されたい。リンカーは、細胞内での細胞傷害性薬物の遊離を促進する「切断可能なリンカー」であってもよい

。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光に不安定なリンカー、ジメチルリンカー、又はジスルフィド含有リンカー (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; 米国特許第 5, 208, 020 号) を使用し得る。

【0340】

本明細書におけるイムノコンジュゲート又はADCは、(例えばPierce Biotechnology, Inc. (ロックフォード、IL州、米国) から) 市販されている、BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン) ベンゾエート) を含むがこれらに限定されない、架橋試薬を用いて調製されたこのようなコンジュゲートを考えるがこれらに限定されない。

10

【0341】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗PDGF-B抗体のいずれかが、生物学的試料中のPDGF-Bの存在を検出するのに有用である。本明細書において使用する「検出する」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。

【0342】

1つの実施態様では、診断法又は検出法に使用するための抗PDGF-B抗体が提供される。さらなる態様では、生物学的試料中のPDGF-Bの存在を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、PDGF-Bに対する抗PDGF-B抗体の結合を許容する条件下で、生物学的試料を、本明細書に記載のような抗PDGF-B抗体と接触させ、抗PDGF-B抗体とPDGF-Bとの間に複合体が形成されるかどうかを検出する工程を含む。このような方法は、インビトロ又はインビボでの方法であり得る。1つの実施態様では、抗PDGF-B抗体を使用して、抗PDGF-B抗体を用いての治療に適格な被験者を選択し、例えばここではPDGF-Bは患者の選択のためのバイオマーカーである。

20

【0343】

特定の実施態様では、標識された抗PDGF-B抗体が提供される。標識としては、直接的に検出される標識又は部分 (例えば蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識) 並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用を通して間接的に検出される部分、例えば酵素又はリガンドが挙げられるがこれらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレート剤又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ、及び細菌ルシフェラーゼ (米国特許第4, 737, 456号)、ルシフェリン、2, 3-ジヒドロフタラジンジオン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を使用する酵素と結合して、HRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化させるヘテロ環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0344】

F. 医薬製剤

本明細書に記載のような抗PDGF-B抗体の医薬製剤は、所望の純度を有するこのような抗体を1つ以上の任意選択の薬学的に許容される担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)) と混合することによって、凍結乾燥製剤又は液剤の剤形で調製される。薬学的に許容される担体は一般的に、使用される用量

50

及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、これには、緩衝液、例えばリン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンズアルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル、又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリ（ビニルピロリドン）；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；単糖、二糖、及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、又はデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体としてはさらに、間質薬物分散剤、例えば可溶性で中性で活性のヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhupH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）が挙げられる。rhupH20をはじめとする、特定の例示的なsHASEGP及び使用法は、米国特許第2005/0260186号及び米国特許第2006/0104968号に記載されている。1つの態様では、sHASEGPを、1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと配合する。

10

20

【0345】

例示的な凍結乾燥抗体製剤が米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及び国際公開公報第2006/044908号に記載されたものが挙げられ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0346】

本明細書の製剤はまた、処置される特定の適応症にとって必要とされるような1つを超える活性成分、好ましくは互いに有害な影響を及ぼさない補完的な活性を有するものを含有する。例えば、抗ANG2抗体又は抗VEGF抗体をさらに提供することが望ましくあり得る。このような活性成分は、意図する目的にとって有効な量で組み合わせられて適切に存在する。

30

【0347】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセルに、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達システムに（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）、又はマクロエマルジョンに封入され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.（編）（1980）に記載されている。

【0348】

持続放出調製物を調製してもよい。持続放出調製物の適切な例としては、抗体を含有している固体で疎水性のポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、該マトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形状である。

40

【0349】

インビボでの投与のために使用される製剤は一般的に無菌である。無菌性は、例えば滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に成し遂げられ得る。

【0350】

G．治療法及び組成物

本明細書において提供される抗PDGF-B抗体のいずれかを治療法に使用し得る。

【0351】

50

1つの態様では、医薬品としての使用のための抗PDGF-B抗体が提供される。さらなる態様では、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症の処置に使用するための抗PDGF-B抗体が提供される。特定の実施態様では、処置法に使用するための抗PDGF-B抗体が提供される。特定の実施態様では、本発明は、有効量の抗PDGF-B抗体を個体に投与する工程を含む、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症を有する個体を処置する方法において使用するための抗PDGF-B抗体を提供する。1つのこのような実施態様では、該方法はさらに、例えば下記したような少なくとも1つの追加の治療剤の有効量を個体に投与する工程を含む。さらなる実施態様では、本発明は、血管新生を抑制するために使用するための抗PDGF-B抗体を提供する。特定の実施態様では、本発明は、血管新生を抑制するために有効量の抗PDGF-B抗体を個体に投与する工程を含む、個体における血管新生を抑制する方法において使用するための抗PDGF-B抗体を提供する。上記のいずれかの実施態様に記載の「個体」は好ましくはヒトである。

10

【0352】

さらなる態様では、本発明は、医薬品の製造又は調製における抗PDGF-B抗体の使用を提供する。1つの実施態様では、医薬品は、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症の処置用である。さらなる実施態様では、医薬品は、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症を有する個体に有効量の医薬品を投与する工程を含む、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症を処置する方法に使用するためである。1つのこのような実施態様では、該方法はさらに、例えば下記したような少なくとも1つの追加の治療剤の有効量を個体に投与する工程を含む。さらなる実施態様では、医薬品は血管新生を抑制するためである。さらなる実施態様では、医薬品は、血管新生を抑制するために有効量の医薬品を個体に投与する工程を含む、個体における血管新生を抑制する方法において使用するためである。上記のいずれかの実施態様に記載の「個体」はヒトであり得る。

20

【0353】

さらなる態様では、本発明は、眼血管疾患、好ましくは黄班変性症の処置法を提供する。1つの実施態様では、該方法は、このような眼血管疾患、好ましくは黄班変性症を有する個体に、有効量の抗PDGF-B抗体を投与する工程を含む。1つのこのような実施態様では、該方法はさらに、以下に記載したような少なくとも1つの追加の治療剤の有効量を個体に投与する工程を含む。上記のいずれかの実施態様に記載の「個体」はヒトであり得る。

30

【0354】

さらなる態様では、本発明は、個体における血管新生を抑制するための方法を提供する。1つの実施態様では、該方法は、血管新生を抑制するために有効量の抗PDGF-B抗体を個体に投与する工程を含む。1つの実施態様では、「個体」はヒトである。

【0355】

さらなる態様では、本発明は、例えば上記のいずれかの治療法に使用するための、本明細書において提供される抗PDGF-B抗体のいずれかを含む医薬製剤を提供する。1つの実施態様では、医薬製剤は、本明細書において提供される抗PDGF-B抗体のいずれか及び薬学的に許容される担体を含む。別の実施態様では、医薬製剤は、本明細書において提供される抗PDGF-B抗体のいずれか及び例えば以下に記載されているような少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

40

【0356】

本発明の抗体は、療法において単独で又は他の薬剤と組み合わせてのいずれかで使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの追加の治療剤と共投与され得る。特定の実施態様では、追加の治療剤は、抗VEGF抗体又は抗ANG2抗体である。

【0357】

上記のこのような併用療法は、併用投与（ここでは2つ以上の治療剤が同じ製剤又は別々の製剤に含まれる）及び別々の投与（この場合には、本発明の抗体の投与は、追加の治療剤又は治療剤群の投与前、同時に、及び／又は投与後に行なわれ得る）を包含する。1

50

つの実施態様では、抗PDGF-B抗体の投与及び追加の治療剤の投与は、互いに約1か月間以内、又は約1、2、若しくは3週間以内、又は約1、2、3、4、5、若しくは6日間以内に行なう。

【0358】

本発明の抗体（及び追加の治療剤）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、局所的処置を所望する場合には病巣内投与をはじめとする、任意の適切な手段によって投与され得る。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が挙げられる。投与は、一部には投与が瞬時であるか慢性であるかに依存して、任意の適切な経路によって、例えば注射、例えば静脈内又は皮下注射によってであり得る。様々な時点におよぶ1回又は複数回の投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投与計画が本明細書において考えられる。

10

【0359】

本発明の抗体は、良質な医療に沿った様式で製剤化、用量化、及び投与されるだろう。この脈絡で考慮される因子としては、処置される具体的な障害、処置される具体的な哺乳動物、個体の患者の臨床容態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与計画、及び医療従事者には公知である他の因子が挙げられる。抗体は、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤と共に製剤化される必要はないが、場合によりそれと共に製剤化されてもよい。有効量のこのような他の薬剤は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類、及び上記に考察される他の因子に依存する。これらは一般的に本明細書に記載のものと同一用量及び投与経路で、又は本明細書に記載の用量の1~99%で、又は適切であると経験的に/臨床的に決定された任意の用量及び経路によって使用される。

20

【0360】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の適切な用量（単独で又は1つ以上の他の追加の治療剤と併用して使用する場合）は、処置しようとする疾患の種類、抗体の種類、疾患の重度及び経緯、抗体が予防目的で投与されるのか治療目的で投与されるのか、以前の療法、患者の病歴及び抗体に対する応答、並びに担当医師の裁量に依存するだろう。該抗体は患者に一度に又は一連の処置におよび適切に投与される。疾患の種類及び重度に依存して、約1µg/kgから15mg/kg（例えば0.5mg/kgから10mg/kg）の抗体が、例えば1回以上の別々の投与によるものであれ、又は連続注入によるものであれ、患者への投与のための初回候補用量であり得る。1回の典型的な1日量は、上記の因子に依存して、約1µg/kgから100mg/kg又はそれ以上の範囲であり得る。数日間又はそれ以上におよぶ反復投与では、容態に依存して、処置は一般的に、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで持続されるであろう。抗体の例示的な1回量は、約0.05mg/kgから約10mg/kgの範囲内であろう。したがって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、又は10mg/kgの1つ以上の用量（又はその任意の組合せ）を患者に投与し得る。このような用量は、断続的に、例えば1週間に1回又は3週間に1回投与されてもよい（例えば患者が約2から約20、又は例えば約6用量の抗体を受けるように）。初回のより高い添加用量に続いて、1回以上のより低用量を投与してもよい。しかしながら、他の投与処置計画も有用であり得る。この療法の進行は、慣用的な技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

30

40

【0361】

上記のいずれかの製剤又は治療法は、抗PDGF-B抗体の代わりに又はそれに加えて本発明のイムノコンジュゲートを使用して行なわれ得ることが理解される。

【0362】

III. 製品

本発明の別の態様では、上記の障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な材料を含有している製品が提供される。製品は、容器と、容器上の又は容器と付随したラベル若しくは添付文書を含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、静注用バッグなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得

50

る。容器は、単独で存在するか又は容態を治療、予防及び／又は診断するのに有効な別の組成物と配合されている組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る（例えば容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静注用バッグ又はバイアルであり得る）。該組成物中の少なくとも1つの活性成分が本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、該組成物が、選択された容態を処置するために使用されることを表示する。さらに、製品は、（a）組成物が含有されている第一の容器（ここで該組成物は、本発明の抗体を含む）；及び（b）組成物が含有されている第二の容器（ここで、該組成物はさらに他の細胞傷害性剤又は別様の治療剤を含む）を含み得る。本発明のこの実施態様における製品はさらに、該組成物を使用して特定の容態を処置することができることを表示する添付文書を含み得る。代わりに又は追加して、製品はさらに、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝食塩水、リンガー液、及びデキストロス溶液を含む、第二（又は第三）の容器を含み得る。それはさらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジをはじめとする、商業的見地及びユーザーの見地から望ましい他の材料も含んでいてもよい。

10

【0363】

上記のいずれかの製品は、抗PDGF-B抗体の代わりに又はそれに追加して本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

【0364】

IV．具体的な実施態様

1．ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体であって、ここでの該抗体は、配列番号01の重鎖可変ドメインと配列番号06の軽鎖可変ドメインとを含むマウス抗体のヒト化変異体である。

20

【0365】

2．ヒトPDGF-Bに特異的に結合するヒト化抗体であって、ここでのヒト化抗体は、（a）配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号03のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0366】

3．ヒトPDGF-Bに特異的に結合するヒト化抗体であって、ここでのヒト化抗体は、（a）配列番号02のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号04のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号05のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

30

【0367】

4．ヒト化抗体は、（a）配列番号07のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号08のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号09のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様2～3のいずれか1つに記載のヒト化抗体。

【0368】

5．（a）配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体。

40

【0369】

6．（a）配列番号93のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号95のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体。

【0370】

7．前記抗体はさらに、（d）配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様5～6のいずれか1つに記載の抗体。

【0371】

8．（a）配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号103

50

のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体。

【0372】

9.(a)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、ヒトPDGF-Bに特異的に結合する抗体。

【0373】

10.前記抗体はさらに、(d)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号109のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様8~9のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0374】

11.実施態様1~4のいずれか1つに記載の抗体と同じエピトープに特異的に結合する抗体、又は実施態様5~7のいずれか1つに記載の抗体と同じエピトープに特異的に結合する抗体、又は実施態様8~10のいずれか1つに記載の抗体と同じエピトープに特異的に結合する抗体。

【0375】

12.前記抗体がヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4である、実施態様1~11のいずれか1つに記載の抗体。

【0376】

13.前記抗体は軽鎖を有するヒトサブクラスIgG1である、実施態様1~12のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0377】

14.前記抗体はモノクローナル抗体である、実施態様1~13のいずれか1つに記載の抗体。

【0378】

15.配列番号92の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と配列番号97の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体、又は、配列番号101の重鎖可変ドメインアミノ酸配列と配列番号106の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列とを含む抗体。

【0379】

16.前記抗体は二重特異的抗体である、実施態様1~15のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0380】

17.前記抗体は、ヒトPDGF-Bには特異的に結合するが、ヒトPDGF-Cには結合しない、実施態様1~16のいずれか1つに記載の抗体。

【0381】

18.前記抗体は、ヒトPDGF-BB、ヒトPDGF-AB、及びヒトPDGF-AAに特異的に結合する、実施態様1~4のいずれか1つに記載の抗体。

【0382】

19.前記抗体は、ヒトPDGF-Bのその受容体への結合を阻害することによって、ヒトPDGF-Bの生物学的活性を遮断する、実施態様1~17のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0383】

20.前記抗体は、

a)第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
b)第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖(ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の可変ドメインVL及びVHは互いによって置換されている)

(ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである)

を含む二価の二重特異的抗体である、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

【0384】

21.前記抗体は、

50

i) a) の下の第一の軽鎖の定常ドメイン C L において 1 2 4 位のアミノ酸はリジン (K)、アルギニン (R)、又はヒスチジン (H) によって独立的に置換され (番号付けは K a b a t による) (1 つの好ましい実施態様では独立的にリジン (K) 又はアルギニン (R) によって)、a) の下の第一の重鎖の定常ドメイン C H 1 において 1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸は独立的にグルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D) によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、あるいは
 i i) b) の下の第二の軽鎖の定常ドメイン C L において 1 2 4 位のアミノ酸は独立的にリジン (K)、アルギニン (R) 又はヒスチジン (H) によって置換され (番号付けは K a b a t による) (1 つの好ましい実施態様では独立的にリジン (K) 又はアルギニン (R) によって)、b) の下の第二の重鎖の定常ドメイン C H 1 において 1 4 7 位のアミノ酸又は 2 1 3 位のアミノ酸は独立的にグルタミン酸 (E) 又はアスパラギン酸 (D) によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)
 を含む、実施態様 2 0 に記載の抗体。

10

【 0 3 8 5 】

2 2 . 前記抗体は、第二の重鎖の定常ドメイン C L において K によって置換された 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸を含む (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、実施態様 2 0 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 8 6 】

2 3 . 前記抗体は、第二の軽鎖の定常ドメイン C H 1 において E によって置換された 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸を含む (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、実施態様 2 0 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の抗体。

20

【 0 3 8 7 】

2 4 . 前記抗体は、第一の軽鎖の定常ドメイン C L において K によって置換された 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸、及び、第一の重鎖の定常ドメイン C H 1 において E によって置換された 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸を含む (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、実施態様 2 0 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 8 8 】

2 5 . 前記抗体は、第二重鎖の定常ドメイン C L において K によって置換された 1 2 4 位及び 1 2 3 位のアミノ酸を含み、ここで、第二の軽鎖の定常ドメイン C H 1 において 1 4 7 位及び 2 1 3 位のアミノ酸は E によって置換され、第一の軽鎖の可変ドメイン V L において 3 8 位のアミノ酸は K によって置換され、第一の重鎖の可変ドメイン V H において 3 9 位のアミノ酸は E によって置換され、第二の重鎖の可変ドメイン V L において 3 8 位のアミノ酸は K によって置換され、第二の軽鎖の可変ドメイン V H において 3 9 位のアミノ酸は E によって置換されている (番号付けは K a b a t の E U インデックスによる)、実施態様 2 0 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の抗体。

30

【 0 3 8 9 】

2 6 . 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
 b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖 (ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の可変ドメイン V L 及び V H は互いによって置換され、第二の軽鎖及び第二の重鎖の定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている)
 (ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒト P D G F - B である)
 を含む二価の二重特異的抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の抗体。

40

【 0 3 9 0 】

2 7 . 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
 b) 第二の抗原に特異的に結合する抗体の第二の軽鎖及び第二の重鎖 (ここで、第二の軽鎖及び第二の重鎖の定常ドメイン C L 及び C H 1 は互いによって置換されている)
 (ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒト P D G F - B である)
 を含む二価の二重特異的抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の抗体。

50

【 0 3 9 1 】

28. 前記抗体は、

- a) 第一の抗原に特異的に結合し、2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、及び
- b) 1～4つのさらに他の抗原に特異的に結合する1、2、3、又は4つの一本鎖Fab断片（すなわち、第二及び／又は第三及び／又は第四及び／又は第五の抗原、好ましくは1つのさらに他の抗原、すなわち第二の抗原に特異的に結合する）
- （ここで、b)の下の前記の一本鎖Fab断片は、前記の完全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端でペプチド性リンカーを介してa)の下の前記の完全長抗体に融合し、ここで第一の抗原又はさらに他の抗原の中の1つはヒトPDGF-Bである）
- を含む多重特異的抗体である、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

10

【 0 3 9 2 】

29. 前記抗体は、

- a) 第一の抗原に特異的に結合し、かつ2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長の抗体、
- b) ba) 抗体の重鎖可変ドメイン(VH)、又は
- bb) 抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体の定常ドメイン1(CH1)からなる第一のポリペプチド（ここで、前記の第一のポリペプチドは、そのVHドメインのN末端で、前記の完全長抗体の2本の重鎖の片方のC末端にペプチド性リンカーを介して融合している）、
- c) ca) 抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)、又は
- cb) 抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体の軽鎖定常ドメイン(CL)からなる第二のポリペプチド（ここで、前記の第二のポリペプチドは、VLドメインのN末端で、前記の完全長抗体の2本の重鎖の他方のC末端にペプチド性リンカーを介して融合している）
- （ここで、第一のポリペプチドの抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及び第二のポリペプチドの抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)は第二の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を一緒に形成し、
- ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである）
- を含む、三価の二重特異的抗体である、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

20

30

【 0 3 9 3 】

30. b)の下ポリペプチドの抗体の重鎖可変ドメイン(VH)及びc)の下ポリペプチドの抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)は、以下の位置：

- i) 重鎖可変ドメイン44位と軽鎖可変ドメイン100位、又は
- ii) 重鎖可変ドメイン105位と軽鎖可変ドメイン43位、又は
- iii) 重鎖可変ドメイン101位と軽鎖可変ドメイン100位（番号付けは常にKabattのEUIンデックスによる）の間へのジスルフィド結合の導入によって鎖間ジスルフィド橋を介して連結され安定化されている、実施態様29に記載の抗体。

【 0 3 9 4 】

31. a) 第一の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第一の軽鎖及び第一の重鎖、並びに
- b) 第二の抗原に特異的に結合する完全長抗体の第二の（改変された）軽鎖及び第二の（改変された）重鎖（ここで、可変ドメインVL及びVHは互いによって置換され、及び／又は定常ドメインCL及びCH1は互いによって置換されている）、
- を含む、三重特異的又は四重特異的な抗体であり、
- c) ここで、1つ又は2つのさらに他の抗原（すなわち第三及び／又は第四の抗原）に特異的に結合する1から4つの抗原結合性ペプチドは、ペプチド性リンカーを介して、a)及び／又はb)の軽鎖又は重鎖のC末端又はN末端に融合し、
- ここで、第一の抗原若しくは第二の抗原又はさらに他の抗原の中の1つはヒトPDGF-Bである、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

40

50

【 0 3 9 5 】

32. 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する（及び2つのF a b断片を含む）、抗体の2本の軽鎖及び重鎖、

b) 第二の抗原に特異的に結合する、抗体の2つの追加のF a b断片（ここで、前記の追加のF a b断片は両方共、a)の重鎖のC末端又はN末端のいずれかにペプチド性リンカーを介して融合している）

を含む二重特異的な四価の抗体であり、

ここで、F a b断片において、以下の改変が行なわれている：

i) a)の両方のF a b断片において、又はb)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換されている、並びに/又は定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換されているか、あるいは

ii) a)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換され、定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換され、

b)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換され、定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換されているか、あるいは

iii) a)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換されているか、又は定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換され、

b)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換され、定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換されているか、あるいは

iv) a)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換され、b)の両方のF a b断片において、定常ドメインC L及びC H 1は互いによって置換されているか、あるいは

v) a)の両方のF a b断片において、定常ドメインV L及びC H 1は互いによって置換され、b)の両方のF a b断片において、可変ドメインV L及びV Hは互いによって置換され、

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

【 0 3 9 6 】

33. 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合しかつ第一のV H - C H 1ドメイン対を含む、第一の抗体の（改変された）重鎖（ここで、該重鎖のC末端に、前記の第一の抗体の第二のV H - C H 1ドメイン対のN末端がペプチド性リンカーを介して融合している）、

b) a)の前記の第一の抗体の2本の軽鎖、

c) 第二の抗原に特異的に結合しかつ第一のV H - C Lドメイン対を含む、第二の抗体の（改変された）重鎖（ここで、該重鎖のC末端に、前記の第二の抗体の第二のV H - C Lドメイン対のN末端がペプチド性リンカーを介して融合している）、及び

d) c)の前記の第二の抗体の2本の（改変された）軽鎖（各々がC L - C H 1ドメイン対を含む）

を含む、二重特異的で四価の抗体であり、

ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

【 0 3 9 7 】

34. 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合する第一の完全長抗体の重鎖及び軽鎖、並びに

b) 第二の抗原に特異的に結合する第二の完全長抗体の重鎖及び軽鎖（ここで重鎖のN末端は軽鎖のC末端にペプチド性リンカーを介して接続されている）

を含む二重特異的な抗体であり、ここで第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF - Bである、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

【 0 3 9 8 】

35. 前記抗体は、

a) 第一の抗原に特異的に結合し、かつ2本の抗体重鎖と2本の抗体軽鎖からなる、完全長抗体、及び

b) VH^2 ドメイン及び VL^2 ドメインを含んでいる第二の抗原に特異的に結合する Fv 断片(ここで、両方のドメインは互いにジスルフィド橋を介して接続されている)

を含む二重特異的抗体であり、

ここで、 VH^2 ドメイン又は VL^2 ドメインのどちらか一方のみが、第一の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖又は軽鎖にペプチド性リンカーを介して融合し、

ここで、第一の抗原又は第二の抗原はヒトPDGF-Bである、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0399】

36. 前記抗体は、第一のFc領域ポリペプチドと第二のFc領域ポリペプチドとを含み、

ここで、i) 第一のFc領域ポリペプチドは、

- ヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、
- ヒトIgG2Fc領域ポリペプチド、
- ヒトIgG3Fc領域ポリペプチド、
- ヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235Aの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、
- Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

20

- S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235A、Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235A、S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- P329Gの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235A、P329Gの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

30

- P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- L234A、L235A、P329G、S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG1Fc領域ポリペプチド、

- S228P、L235Eの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

40

- S228P、L235E、P329Gの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- S228P、L235E、Y349C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- S228P、L235E、S354C、T366S、L368A、Y407Vの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

- P329Gの突然変異を有するヒトIgG4Fc領域ポリペプチド、

50

- P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- K 3 9 2 Dの突然変異を有するヒト I g G 1、I g G 2、又は I g G 4、及び
- N 3 9 2 Dの突然変異を有するヒト I g G 3

10

を含む群から選択され、

i i) 第二の F c 領域ポリペプチドは、

- ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- ヒト I g G 2 F c 領域ポリペプチド、
- ヒト I g G 3 F c 領域ポリペプチド、
- ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 Aの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 Eの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

20

30

40

50

- S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - D 3 9 9 K、D 3 5 6 K、及び / 又は E 3 5 7 Kの突然変異を有するヒト I g G 1、並びに
 - D 3 9 9 K、E 3 5 6 K、及び / 又は E 3 5 7 Kの突然変異を有するヒト I g G 2、I g G 3、又は I g G 4
 を含む群から選択される、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 0 】

3 7 . 前記抗体が、第一の F c 領域ポリペプチドと第二の F c 領域ポリペプチドとを含み、

10

ここで

i) 第一の F c 領域ポリペプチドはヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドはヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

i i) 第一の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 Aの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 Aの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

i i i) 第一の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

20

i v) 第一の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

v) 第一の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

v i) 第一の F c 領域ポリペプチドは、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

30

v i i) 第一の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 Eの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 Eの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

v i i i) 第一の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 Gの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

i x) 第一の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであるか、又は

40

x) 第一の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 Wの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第二の F c 領域ポリペプチドは、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 Vの突然変異を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドである、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 1 】

3 8 . 前記抗体は第一の F c 領域ポリペプチドと第二の F c 領域ポリペプチドとを含み、

50

ここで、該抗体は、第一のF c領域ポリペプチド及び第二のF c領域ポリペプチドにおいて

- i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及びH 4 3 5 A、又は
- ii) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及びY 4 3 6 A、又は
- iii) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及びL 4 3 2 D、又は
- iv) i) からiii) の組合せ

という突然変異の組合せを含む、実施態様1～37のいずれか1つに記載の抗体。

【0402】

39．前記抗体は第一のF c領域ポリペプチドと第二のF c領域ポリペプチドとを含み、ここで

a) 第一及び第二のF c領域ポリペプチドは両方共、ヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(ヒト起源に由来)であり、そして第一のF c領域ポリペプチドにおいてi) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及びH 4 3 5 Aの群、又はii) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及びY 4 3 6 Aの群、又はiii) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及びL 4 3 2 Dの群(番号付けはKabattのEUインデックス番号付け体系による)から選択された1つ又は2つの突然変異、並びに第二のF c領域ポリペプチドにおいてL 2 5 1 D、I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、L 3 1 4 D、L 4 3 2 D、H 4 3 3 A、H 4 3 5 A及びY 4 3 6 Aの突然変異(番号付けはKabattのEUインデックス番号付け体系による)を含む群から選択された1つ又は2つの突然変異を含み、よって第一及び第二のF c領域ポリペプチドにおける全ての突然変異を合わせると、i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及びH 4 3 5 A、又はii) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及びY 4 3 6 A、又はiii) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及びL 4 3 2 Dの突然変異が変異体(ヒト)IgGクラスFc領域に含まれることになるか、あるいは

b) 第一及び第二のF c領域ポリペプチドは両方共にヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(すなわちヒト起源に由来)であり、どちらもFc領域においてI 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A又はH 3 1 0 A / H 4 3 3 A / Y 4 3 6 A又はL 2 5 1 D / L 3 1 4 D / L 4 3 2 D又はその組合せ(番号付けはKabattのEUインデックス番号付け体系による)を含み、これにより全ての突然変異が第一若しくは第二のFc領域ポリペプチドに存在するか、又は1つ若しくは2つの突然変異が第一のFc領域ポリペプチドに存在し、1つ若しくは2つの突然変異が第二のFc領域ポリペプチドに存在し、よって第一及び第二のFc領域ポリペプチド内の全ての突然変異を合わせると、i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、及びH 4 3 5 A、又はii) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A、及びY 4 3 6 A、又はiii) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D、及びL 4 3 2 Dの突然変異がFc領域に含まれるか、あるいは

c) 第一及び第二のFc領域ポリペプチドは両方共にヒトIgG1又はヒトIgG4サブクラス(すなわちヒト起源に由来)であり、第一並びに第二のFc領域ポリペプチドにおいてI 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A又はH 3 1 0 A / H 4 3 3 A / Y 4 3 6 A又はL 2 5 1 D / L 3 1 4 D / L 4 3 2 Dの突然変異を含むか(番号付けはKabattのEUインデックス番号付け体系による)、又は第一のFc領域ポリペプチドにおいてI 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 Aの突然変異の組合せ、及び、第二のFc領域ポリペプチドにおいてH 3 1 0 A / H 4 3 3 A / Y 4 3 6 Aの突然変異の組合せを含む(番号付けはKabattのEUインデックス番号付け体系による)、実施態様1～37のいずれか1つに記載の抗体。

【0403】

40．前記抗体は第一のFc領域ポリペプチドと第二のFc領域ポリペプチドとを含み、ここで

a) 第一の変異Fc領域ポリペプチドは、第一の親IgGクラスFc領域ポリペプチドに由来し、第二の変異Fc領域ポリペプチドは、第二の親IgGクラスFc領域ポリペプチドに由来し、これにより、第一の親IgGクラスFc領域ポリペプチドは、第二の親IgGクラスFc領域ポリペプチドと同一であるか又は異なり、

b) 第一の親 I g G クラス F c 領域ポリペプチドが第二の親 I g G クラス F c 領域ポリペプチドとは異なっているアミノ酸残基以外の 1 つ以上のアミノ酸残基において、第一の変異 F c 領域ポリペプチドは第二の変異 F c 領域ポリペプチドとは異なり、及び

c) 第一の変異 F c 領域ポリペプチドと第二の変異 F c 領域ポリペプチドとを含む I g G クラス F c 領域は、a) の第一の親 I g G クラス F c 領域ポリペプチドと a) の第二の親 I g G クラス F c 領域ポリペプチドとを含む I g G クラス F c 領域とは異なる、ヒト F c 受容体に対する親和性を有し、

ここで、第一の F c 領域ポリペプチド若しくは第二の F c 領域ポリペプチドのいずれか、又は両方の F c 領域ポリペプチドは、互いに独立して、以下の突然変異の 1 つ又は突然変異の組合せを含む：

- T 3 0 7 H、又は
- Q 3 1 1 H、又は
- E 4 3 0 H、又は
- N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H、又は
- T 3 0 7 H 及び E 4 3 0 H、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び E 4 3 0 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y、又は
- T 3 0 7 Q 及び V 3 0 8 P 及び N 4 3 4 Y 及び Y 4 3 6 H、又は
- T 3 0 7 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び E 4 3 0 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 H 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 A 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は
- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は

10

20

30

40

50

- T 3 0 7 Q 及び Q 3 1 1 H 及び E 4 3 0 H 及び N 4 3 4 Y 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、又は

- T 3 0 7 Q 及び V 3 0 8 P 及び N 4 3 4 Y 及び Y 4 3 6 H 及び M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E、

実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 4 】

4 1 . 前記抗体は、第一の F c 領域ポリペプチドと第二の F c 領域ポリペプチドとを含み、

ここで、第一の F c 領域ポリペプチドは、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V の突然変異を含み（空隙鎖）、第二の F c 領域ポリペプチドは S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W の突然変異を含み（突起鎖）、

ここで、第一の F c 領域ポリペプチド（空隙鎖）は、

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、及び

i i) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D

の突然変異を含み、

ここで、第一の F c 領域ポリペプチドと第二の F c 領域ポリペプチドは 1 つ以上のジスルフィド橋によって接続され、

ここで、第一のポリペプチドの C H 3 ドメイン及び第二のポリペプチドの C H 3 ドメインは両方共プロテイン A に結合しているか又は両方共プロテイン A に結合していない（番号付けは K a b a t の E U インデックスによる）、

実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 5 】

4 2 . 前記抗体は、

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、及び

i i) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D、及び

i i i) T 2 5 0 Q、及び / 又は

i v) T 2 5 6 E 又は T 2 5 6 A

の突然変異を含む、実施態様 4 1 に記載の抗体。

【 0 4 0 6 】

4 3 . 前記抗体は、

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、及び

i i) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D、及び

i i i) 場合により a) T 2 5 0 Q 及び / 又は T 2 5 6 E 又は T 2 5 6 A、並びに

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

の突然変異を含む、実施態様 4 1 ~ 4 2 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 7 】

4 4 . 前記抗体は、

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、及び

i i) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D、及び

i i i) a) T 2 5 0 Q 及び / 又は T 2 5 6 E 又は T 2 5 6 A、並びに

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

v) 場合により a) T 3 0 7 A 若しくは T 3 0 7 H 若しくは T 3 0 7 Q 若しくは T 3 0 7 P、及び / 又は b) Q 3 1 1 H、及び / 又は c) M 2 5 2 Y、及び / 又は d) S 2 5 4 T

の突然変異を含む、実施態様 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 8 】

4 5 . 前記抗体は、

i) T 2 5 0 Q、及び / 又は

i i) M 2 5 2 Y、及び / 又は

10

20

30

40

50

i i i) S 2 5 4 T、及び / 又は

i v) T 2 5 6 E 若しくは T 2 5 6 A、及び / 又は

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

v i) Q 3 1 1 H

の突然変異を含む、実施態様 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 0 9 】

4 6 . 医薬品としての使用のための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 1 0 】

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

【 0 4 1 1 】

4 8 . 眼疾患、特に眼血管疾患の処置のための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体の使用。

【 0 4 1 2 】

4 9 . 眼疾患の処置に使用するための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 1 3 】

5 0 . 眼疾患、特に眼血管疾患の処置に使用するための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 4 1 4 】

5 1 . 実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体の有効量を個体に投与する工程を含む、眼血管疾患を有する個体を処置する方法。

【 0 4 1 5 】

5 2 . 実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体を含む医薬製剤。

【 0 4 1 6 】

5 3 . 眼血管疾患の処置に使用するための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体を含む医薬製剤。

【 0 4 1 7 】

5 4 . 眼血管疾患の処置のための医薬品の製造のための実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体の使用。

【 0 4 1 8 】

5 5 . 実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体をこのような処置を必要とする患者に投与することによる、眼血管疾患を患う患者の処置法。

【 0 4 1 9 】

5 6 . 前記抗体を硝子体内適用を介して投与する、実施態様 5 2 ~ 5 3 のいずれか 1 つに記載の医薬製剤。

【 0 4 2 0 】

5 7 . 投与が硝子体内への適用である、実施態様 5 5 ~ 5 6 のいずれか 1 つに記載の投与。

【 0 4 2 1 】

5 8 . 実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードしている核酸。

【 0 4 2 2 】

5 9 . 実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードしている 1 つ以上の核酸を含む細胞。

【 0 4 2 3 】

6 0 . 前記方法は、以下の工程：

a) 場合により、哺乳動物細胞に、実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードしている 1 つ以上の核酸をトランスフェクトする工程、

b) 細胞を培養して該抗体を発現させる工程、及び

c) 細胞又は培養培地から該抗体を回収し、これにより該抗体を生成する工程を含む、実施態様 1 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体を生成するための方法。

10

20

30

40

50

【0424】

V. 実施例

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。上記に提供された一般的な記述があれば、様々な他の実施態様が実践され得ることが理解される。

【0425】

実施例 1

免疫化

マウス (NMRI マウス) 及びウサギ (ヒト Ig 遺伝子座トランスジェニックウサギ) の免疫化のために、RIMMS (「迅速な免疫化、複数の部位 (Rapid Immunization, Multiple Sites)」) に基づいた計画を使用した。抗原はヒト PDGF-BB (Cell Signaling Tech.) であった。

10

【0426】

実施例 2

抗 PDGF-B 抗体血清力価の決定

ヒト組換え PDGF-B を、PBS 中 2.5 µg/ml (マウス) 又は 1.0 µg/ml (ウサギ)、100 µl/ウェルで 96 ウェル NUNC Maxisorb プレート上に固定し、その後、該プレートを PBS 中 2% クロテイン C (200 µl/ウェル) を用いて遮断し; PBS 中 0.5% クロテイン C 中の抗血清の連続希釈液 (100 µl/ウェル) (2 つ複製) を適用; マウス血清については PBS 中 0.5% クロテイン C で 1:16,000 で希釈された HRP にコンジュゲートしたヤギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いるか又は 1:5,000 で希釈されたビオチニル化ヤギ抗ヒト抗体 (Southern Biotech) を用いて、及びウサギ血清については PBS 中 0.5% クロテイン C で 1:8,000 で希釈された HRP にコンジュゲートしたストレプトアビジン (100 µl/ウェル) を用いて検出した。全ての工程について、プレートを 37 °C で 1 時間インキュベートした。全ての工程の間で、プレートを PBS 中 0.05% Tween 20 で 3 回洗浄した。BM ブルー POD 基質、可溶性 (Roche Diagnostics GmbH、マンハイム、独国) (100 µl/ウェル) の添加によってシグナルを発生させ; 1M HCl (100 µl/ウェル) の添加によって停止させた。基準としての 690 nm に対して、450 nm の吸光度を解釈した。力価は、シグナルの最大半量を生じる抗血清の希釈率として定義された。

20

【0427】

実施例 3

ウサギからの B 細胞クローニング

ウサギ末梢血単核細胞 (PBMC) の単離

血液試料を、3 匹の免疫化ウサギから採取した。EDTA を含有している全血を、1 × PBS (PAA、パッシング、オーストリア) を用いて 2 倍に希釈し、その後、製造業者の仕様書に従って哺乳動物用の lympholyte (Cedarlane Laboratories、バーリントン、オンタリオ州、カナダ) を使用して密度勾配遠心分離にかけた。PBMC を 1 × PBS で 2 回洗浄した。

30

【0428】

EL-4 B5 培地

10% FCS (Hyclone、ローガン、UT 州、米国)、2 mM グルタミン、1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (PAA、パッシング、オーストリア)、2 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES (PAN Biotech、アイデンバッハ、独国) 及び 0.05 mM メルカプトエタノール (Gibco、ペイズリー、スコットランド) で補充された、RPMI 1640 (PAN Biotech、アイデンバッハ、独国) を使用した。

40

【0429】

プレートのコーティング

無菌細胞培養 6 ウェルプレートを、炭酸塩緩衝液 (0.1 M 重炭酸ナトリウム、3.4 mM 炭酸水素ナトリウム、pH 9.55) 中の PBGF-BB タンパク質 (2 µg/ml)、又は PDGF-AA タンパク質と PDGF-CC タンパク質の混合物 (1 µg/ml の PDGF-BB

50

AA及びPDGF-CC)のいずれかを用いて一晩かけて4でコーティングした。プレートを使用前に無菌PBSで3回洗浄した。

【0430】

マクロファージ/単球の枯渇

血液試料の半分のPBMCを、非特異的な接着を通してマクロファージ及び単球を枯渇させるために滅菌6ウェルプレート(細胞培養グレード)に播種した。残りの50%のPBMCを、PDGF-AAタンパク質とPDGF-CCタンパク質の混合物で予めコーティングされたプレートに播種して、これらのタンパク質に結合しているB細胞を除去し、かつ工程でマクロファージ及び単球を除去した。

【0431】

各ウェルを、最大で4mlの培地及び免疫化ラットに由来する 6×10^6 個以下のPBMCで充填し、37のインキュベーター中で1時間かけて結合させた。

【0432】

上清中の細胞(末梢血リンパ球(PBL))を、抗原パニング工程に使用した。

【0433】

PDGF-BBタンパク質上におけるB細胞の濃縮

PDGF-BBタンパク質でコーティングされた6ウェル組織培養プレートに、培地4mlあたり 6×10^6 個以下のPBLを播種し、37のインキュベーター中で1時間結合させた。ウェルを1×PBSで1~2回注意深く洗浄することによって非接着細胞を除去した。残りの粘着性細胞を37のインキュベーター中で10分間かけてトリプシンによって剥離した。トリプシン化をEL-4B5培地を用いて停止した。免疫蛍光染色を行なうまで細胞を氷上で保持した。

【0434】

免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー

抗IgG抗体FITC(AbD Serotec、デュッセルドルフ、独国)を単一細胞選別のために使用した。表面染色のために、枯渇工程及び濃縮工程からの細胞を、PBS中でFITCにコンジュゲートさせた抗IgG抗体と共にインキュベートし、暗所で4で45分間インキュベートした。染色後、PBMCを氷冷PBSを用いて2回洗浄した。最後にPBMCを氷冷PBS中に再懸濁し、FACS分析に直ちにかけた。死滅細胞と生細胞とを区別するために、5µg/mlの濃度のヨウ化プロピジウム(BD Pharmingen、サンディエゴ、CA州、米国)をFACS分析前に加えた。

【0435】

コンピューター及びFACS Divaソフトウェア(BD Biosciences、米国)を備えたBecton Dickinson社のFACS Ariaを単一細胞選別のために使用した。

【0436】

B細胞の培養

端的に言えば、単一細胞選別されたウサギB細胞を、96ウェルプレート中で、パンソルビン細胞(1:100,000)(Calbiochem(Merck)、ダルムシュタット、独国)、5%ウサギ胸腺細胞上清(MicroCoat、ベルンリエド、独国)及び線照射されたマウスEL-4B5胸腺腫細胞(2.5×10^4 個の細胞/ウェル)を含有している200µl/ウェルのEL-4B5培地と共に37のインキュベーター中で7日間インキュベートした。B細胞培養上清を、スクリーニングのために除去し、残りの細胞を直ちに収集し、RLT緩衝液100µl(Qiagen、ヒルデン、独国)中で-80で凍結させた。

【0437】

実施例4

ハイブリドーマの作製

細胞培養液

マウス骨髄腫細胞株P3x63-Ag8.653を、マウス-マウスハイブリドーマの生成のための融合対として使用した。細胞を融合の約14日前に解凍し、8-アザグアニンの存在下で培養する。3から4日間毎に細胞を分割し、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞/mlの濃

10

20

30

40

50

度に調整した。

【0438】

細胞融合

材料：

室温に調整された、マウスハイブリドーマ培地（RPMI 1640（PAN）、FBS ウルトラロー（ultra-low）- IgG、2mM L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、NEAA、マウスIL-6を有するニュートリドーマCS、HAZ（SIGMA、A9666番）。

RPMI 1640培地（37）

RPMI 1640培地（4）

PEG（37）

【0439】

融合前に骨髓腫細胞を遠心分離にかける（250rpm、7分間）。細胞ペレットを培養培地に再懸濁する。1つの脾臓について約 $1 \sim 5 \times 10^7$ 個の細胞が必要とされる。

【0440】

細胞融合のために、約5：1のリンパ球対骨髓腫細胞の比を使用すべきである。P3x63-Ag8.653細胞をRPMI 1640培地 50mlに再懸濁し、遠心分離にかける（250rpm、7分間）。上清を除去する。その後、細胞を脾臓細胞に加える。

【0441】

融合中の水浴の温度を37に調整する。

【0442】

PEG溶液（37）を細胞に滴下して加える。

【0443】

融合混合物を37のインキュベーター中で15～120分間インキュベートする。その後、融合混合物を遠心分離にかけ（250rpm、7分間）、再懸濁した1200μlの培地に再懸濁する。細胞懸濁液 100μlを半固体ハイブリドーマ培地 50mlに加え、ホモジナイズし、6ウェルプレートの1ウェルあたり各4mlを加える。9～13日間培養した後、単クローンを拾い上げる。

【0444】

実施例5

ハイブリドーマ培養

約 5×10^6 個の細胞をハイクローン培地 50mlに懸濁する。培養混合物を96時間インキュベートする。その後、ハイクローン培地 75mlを加える。培養を7日間継続する。生存率が40%未満に下降すると、細胞懸濁液を0.22μmフィルターを通してろ過し、ろ液を精製のために使用した。

【0445】

実施例6

B細胞クローニング

VドメインのPCRによる増幅

全RNAを、製造業者のプロトコールに従って、NucleoSpin 8/96 RNAキット（Macherey&Nagel; 740709.4, 740698）を使用してB細胞溶解液（RLT緩衝液 - Qiagen - 製造番号79216に再懸濁）から調製した。RNAをリボヌクレアーゼフリーの水 60μlを用いて溶出した。RNA 6μlを使用して、製造業者の説明書に従ってSuperscript IIIファーストストランド合成スーパーミックス（Invitrogen 18080-400）及びオリゴdT-プライマーを使用して逆転写酵素によってcDNAを作製した。全ての工程をHamilton社のML Starシステムで行なった。cDNA 4μlを使用して、野生型ウサギB細胞の重鎖についてはプライマーrbHC.up及びrbHC.do、軽鎖についてはrbLC.up及びrbLC.do、トランスジェニックウサギB細胞の軽鎖についてはBcPCR__FHL__leader_fw及びBcPCR__huCkappa_revを使用して最終容量 50μl中でAccuPrime SuperMix（Invitrogen 12344-040）を用いて免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ン重鎖及び軽鎖の可変領域（V H及びV L）を増幅した。全ての正方向プライマーは、（それぞれV H及びV Lの）シグナルペプチドに対して特異的であるが、逆方向プライマーは、（それぞれV H及びV Lの）定常領域に対して特異的であった。R b V H + R b V LのP C R条件は以下の通りであった：9 4 で5分間；9 4 で2 0秒間、7 0 で2 0秒間、6 8 で4 5秒間の3 5サイクル；及び6 8 で7分間の最終伸張というホットスタート。H u V LのP C R条件は以下の通りであった：9 4 で5分間；9 4 で2 0秒間、5 2 で2 0秒間、6 8 で4 5秒間の4 0サイクル、及び6 8 で7分間の最終伸張というホットスタート。

【 0 4 4 6 】

【表 3 2 】

10

rbHC.up AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGC
TGGCTTC

配列番号：1 1 1

rbHCf.do CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG

配列番号：1 1 2

rbLC.up AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCC
ACTC

20

配列番号：1 1 3

rbLC.do CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

配列番号：1 1 4

BcPCR_FHLC_leader.fw ATGGACATGAGGGTCCCCGC

配列番号：1 1 5

BcPCR_huCkappa.rev GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

30

配列番号：1 1 6

【 0 4 4 7 】

5 0 μL中8 μLのP C R溶液を、4 8 E - G e l 2 %（Invitrogen G8008-02）にロ－ディングした。陽性P C R反応を、製造業者のプロトコールに従ってNucleoSpin Extract IIキット（Macherey&Nagel；740609250）を使用して洗浄し、溶出緩衝液 5 0 μLで溶出した。全ての洗浄工程をHamilton ML Starletシステムで行なった。

【 0 4 4 8 】

実施例 7

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現

40

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現のために、V H又はV LをコードしているP C R産物を、オーバーハングクローニング法（RS Haun et al., BioTechniques 13 (1992) 515-518; MZ Li et al., Nature Methods 4 (2007) 251-256）によってc D N Aとして発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、イントロンAを含む5' C M Vプロモーター及び3' B G Hポリアデニル化配列からなる発現カセットを含有していた。発現カセットに加えて、プラスミドは、p U Cに由来する複製起点、及びE . c o l iにおけるプラスミド増幅のためのアンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼ遺伝子を含有していた。3つの基本的なプラスミド変異体を使用した：1つのプラスミドは、V H領域を受け入れるように設計されたウサギI g G定常領域を含有し；2つのプラスミドは、V L領域を受け入れるためのウサギ又はヒト L C定常領域を含有している。

50

【0449】

又は 定常領域及びV L / V H挿入断片をコードしている鎖状化発現プラスミドを、重複しているプライマーを使用してP C Rによって増幅した。

【0450】

精製されたP C R産物を、一本鎖オーバーハングを生成するT 4 D N Aポリメラーゼと共にインキュベートした。反応をd C T Pの添加によって停止した。

【0451】

次の工程では、プラスミド及び挿入断片を合わせ、部位特異的組換えを誘導したr e c Aと共にインキュベートした。組換えプラスミドをE . c o l iに形質転換した。翌日、成長したコロニーを拾い上げ、プラスミド調製、制限酵素分析、及びD N Aシーケンスによって正しい組換えプラスミドについて試験した。

10

【0452】

抗体の発現のために、単離されたH C及びL Cプラスミドを一過性にH E K 2 9 3細胞にトランスフェクトし、上清を1週間後に収集した。

【0453】

実施例8

ウサギモノクローナル一価抗体の組換え発現

モノクローナル一価抗体として選択された候補の組換え発現のために、全てのV H鎖のウサギ定常領域を、C H 3セグメントに突起突然変異を封入したヒト定常領域へと変換した。ウサギ野生型B細胞に由来するV L鎖については、ウサギC 定常領域をヒトに変換した。選択された候補のc D N A 4 µ lを使用して、最終容量 5 0 µ l中でAccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040)を用いて、シグナルペプチドに特異的な正方向プライマー、及び(それぞれV H及びV Lの)ヒト定常領域に相同な(3'末端における)重複配列(20bp)を有するC D R 3 - J領域に対して特異的な逆方向プライマーを用いて免疫グロブリン重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を増幅した。V H鎖及びV L鎖増幅のP C R条件は以下の通りであった：94 で5分間；94 で20秒間、68 で20秒間、68 で45秒間を35サイクル、及び68 で7分間の最後の伸張というホットスタート。

20

【0454】

V H又はV LをコードしているP C R産物を、c D N Aとして、オーバーハングクローニング法(RS Haun et al., BioTechniques 13 (1992) 515-518; MZ Li et al., Nature Methods 4 (2007) 251-256)によって発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、イントロンAを含む5'CMVプロモーター及び3'BGHポリアデニル化配列からなる発現カセットを含有していた。発現カセットに加えて、プラスミドは、pUCに由来する複製起点、及びE . c o l iにおけるプラスミド増幅のためのアンピシリン耐性を付与する-lacタマーゼ遺伝子を含有していた。2つの基本的プラスミド変異体を使用した：一方のプラスミドは、新たに増幅されたV H鎖を受け入れるように設計されたヒトI g G定常領域を含有し、第二のプラスミドは、V L鎖を受け入れるためのヒト L C定常領域を含有している。

30

【0455】

又は 定常領域及びV L / V H挿入断片をコードしている鎖状化発現プラスミドを、重複プライマーを使用してP C Rによって増幅した。

40

【0456】

精製P C R産物を、一本鎖オーバーハングを生成するT 4 D N Aポリメラーゼと共にインキュベートした。反応をd C T Pの添加によって停止した。

【0457】

次の工程では、プラスミド及び挿入断片を合わせ、部位特異的組換えを誘導するr e c Aと共にインキュベートした。組換えプラスミドをE . c o l iに形質転換した。翌日、成長したコロニーを拾い上げ、プラスミド調製、制限酵素分析、及びD N Aシーケンスによって正しい組換えプラスミドについて試験した。

50

【0458】

実施例9

ヒトPDGF - BB結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。ヒトPDGF - BB抗原 (Cell Signaling、製造番号8921BF) を、384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上のPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中、25 µL中、125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µlを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1 : 3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

10

【0459】

実施例10

カニクイザルPDGF - BB結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。ヒトPDGF - BB抗原を384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上でPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中の25 µL中125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µl、0.5% BSA、0.05% Tweenを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1 : 3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

20

30

【0460】

実施例11

マウスPDGF - BB結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。マウスPDGF - BB抗原 (Peprotec 315-18) を384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上でPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中の25 µL中125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µl、0.5% BSA、0.05% Tweenを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1 : 3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

40

【0461】

実施例12

50

ラットPDGF - BB結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。ラットPDGF - BB抗原 (R & D、520 - BB) を384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上でPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中の25 µL中125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µl、0.5% BSA、0.05% Tweenを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1：3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

10

【0462】

実施例13

ヒトPDGF - AA結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。ヒトPDGF - AA抗原 (Peprotec、製造番号AF - 100 - 13A) を384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上でPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中の25 µL中125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µl、0.5% BSA、0.05% Tweenを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1：3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

20

30

【0463】

実施例14

ヒトPDGF - CC結合ELISA

結合分析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) に基づいた技術を使用して行なった。ヒトPDGF - CC抗原 (Peprotec AF - 100 - 00C) を384ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号464718) 上でPBS、0.5% BSA、及び0.05% Tween中の25 µL中125 ng/mLの濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常のPBS 90 µl、0.5% BSA、0.05% Tweenを用いての3回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1時間、2% BSA)；2) 漸増濃度の抗PDGF - BB抗体で1時間；3) 検出抗体、希釈率 = 1：3000 (ECL抗ウサギIgG抗体 - POD、NA9340V + ECL抗ヒトIgG抗体 - POD、NA933V又は代替的にはマウス抗体についてはECL抗マウスIgG抗体 - POD；NA9310V)。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (TMB、Piercenet、製造番号34021) を添加してから20 ~ 30分後、370 nmにおける吸光度を決定した。EC₅₀を、GraphPad Prism 6.0ソフトウェアを使用して4つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

40

【0464】

実施例15

タンパク質間相互作用阻害アッセイ：ヒトPDGF - B：ヒトPDGF - BB受容体

ヒトPDGF - BB受容体に対するヒトPDGF - BBのタンパク質間相互作用阻害分

50

析を、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) に基づいた技術を使用して行なった。ヒト F c タグ化 P D G F - B B 受容体タンパク質 (R n D、製造番号 3 8 5 - P R - 1 0 0) を、3 8 4 ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Scientific、製造番号 4 6 4 7 1 8) 上で P B S、0.5 % B S A、及び 0.05 % T w e e n 中の 25 μ L 中 750 μ g/mL の濃度で固定した。以下の各々の工程の後に、通常の P B S 90 μ L を用いての 3 回の洗浄と分注と吸引を行なった：1) 遮断工程：非結合表面の飽和 (1 時間、2 % B S A)；2) 漸増濃度の抗 P D G F - B B 抗体 15 μ L を、30 μ L の容量中 75 nM のビオチニル化ヒト P D G F - B B (Cell Signaling、製造番号 8 9 2 1 B F) 15 μ L と共にインキュベートした；3) 検出を、ペルオキシダーゼで標識されたストレプトアビジン (Roche Diagnostics GmbH、マンハイム、独国、製造番号 1 1 0 8 9 1 5 3 0 0 1) を使用して行なった。3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン基質 (T M B、Piercenet、製造番号 3 4 0 2 1) を添加してから 20 ~ 30 分後、370 nm における吸光度を決定した。I C₅₀ を、GraphPad Prism 6.0 ソフトウェアを使用して 4 つのパラメーターロジスティックモデルを用いて計算した。

【0465】

実施例 16

マウスハイブリドーマからの抗体の精製

抗体を含有しているハイブリドーマ上清をろ過し、2 回のクロマトグラフィー工程によって精製する。抗体を、pH 7.4 の P B S (1 mM K H₂ P O₄、10 mM N a₂ H P O₄、137 mM N a C l、2.7 mM K C l) で平衡化した H i T r a p プロテイン G (GE Healthcare) を使用してアフィニティクロマトグラフィーによって捕捉した。非結合タンパク質を、平衡緩衝液を用いての洗浄によって除去し、抗体を pH 3.0 の 25 mM クエン酸緩衝液を用いて回収し、溶出後直ちに pH 9.0 の 1 M トリス塩基を用いて pH 6.0 まで中和する。Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを 2 回目の精製工程として使用する。サイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジン緩衝液、0.14 M N a C l (pH 6.0) 中に行なう。抗体含有溶液を Biomax-SK 膜 (Millipore、ビレリカ、MA 州) を備えた Ultrafree-CL 遠心式フィルターユニットを用いて濃縮し、-80 °C で保存する。

【0466】

抗体を含有しているハイブリドーマ上清をろ過し、2 回のクロマトグラフィー工程によって精製する。上清を 50 % v/v 2 M グリシン、pH 8.6、600 mM N a C l と混合し、1 M グリシン、pH 8.6、300 mM N a C l を備えた HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用してアフィニティクロマトグラフィーによって捕捉する。非結合タンパク質を平衡緩衝液を用いての洗浄によって除去し、抗体を 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 2.8) を用いて回収し、溶出後直ちに 1 M トリス塩基 (pH 8.5) を用いて pH 6.0 まで中和する。Superdex (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを 2 回目の精製工程として使用する。サイズ排除クロマトグラフィーを、20 mM ヒスチジン緩衝液、0.14 M N a C l、pH 6.0 中に行なう。抗体を含有している溶液を、Biomax-SK 膜 (Millipore、ビレリカ、MA 州) を備えた Ultrafree-CL 遠心式フィルターユニットを用いて濃縮し、-80 °C で保存する。

【0467】

実施例 17

ヒト P D G F - B B 結合表面プラズモン共鳴分光アッセイ

結合分析を、ピアコア B 4 0 0 0 システム (GE Healthcare) を適用している表面プラズモン共鳴分光法に基づいた技術を使用して行なった。ヒト P D G F - B B 抗原 (Cell Signaling、製造番号 8 9 2 1 B F) を、C 1 センサーチップ (GE Healthcare、製造番号 B R - 1 0 0 5 - 3 5) 上でのアミンカップリング化学反応を使用して P B S、0.1 % B S A、0.05 % T w e e n 中 1 μ g/mL の濃度で固定した。漸増濃度の抗 P D G F - B B 抗体を 10 mM H E P E S (pH 7.2)、150 mM N a C l 中に適用した。180 秒間の会合相及び 600 秒間の解離相の読取時間を使用して、見かけの k_a 及び見かけの k_d

ン酸緩衝液 (pH 2.8) を用いて回収し、溶出直後に 1M トリス塩基 (pH 9.0) を用いて pH 6.0 まで中和した。Superdex200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを、2 回目の精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーを 20mM ヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl (pH 6.0) 中に行なった。抗体を含有している溶液を、Biomax-SK 膜 (Millipore、ビレリカ、MA 州) を備えた Ultrafree-CL 遠心式フィルターユニットを用いて濃縮し、-80 で保存した。

【0476】

実施例 2 1

抗体調製物の分析

抗体調製物のタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数を使用して、280nm での吸光度 (OD) を測定することによって決定した。

10

【0477】

抗体の純度及び完全度を、プロテイン・エクスプレス・チップ及び HT プロテイン・エクスプレス試薬キットと共に LabChip GX II (PerkinElmer) を使用して CE-SDS によって分析した。

【0478】

抗体調製物の凝集物の含量を、ランニング緩衝液として 2xPBS (pH 7.4) を使用して TSK-GEL Qc-PAK GFC300 を使用して高性能 SEC によって、又は、ランニング緩衝液として 200mM KH_2PO_4 / KH_2PO_4 、250mM KCl (pH 7.0) を使用して BioSuite 高分解能 SEC、250、5 μm の分析用サイズ排除カラム (Waters GmbH) を使用して高性能 SEC によって決定した。

20

【0479】

実施例 2 2

抗体からの Fab 断片の調製及び分析：

抗体 5mg (20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH 6.0 中で約 1mg/ml) を、L-システイン溶液 90 μl (Merck Millipore; 20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH 6.0 中で 250mM) 及び パパイン 12 μl (Roche Life Science; 3.2U/mg の抗体) と共に 37 で 120 分間インキュベートした。切断後、PBS (1mM KH_2PO_4 、10mM Na_2HPO_4 、137mM NaCl、2.7mM KCl) (pH 7.4) で平衡化した HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) を使用したアフィニティークロマトグラフィーを、インタクトな IgG 及び Fc 断片の除去のために使用した。続いて、MabSelect Sure クロマトグラフィーのフロースルーをさらに、2 回目の精製工程としての Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。サイズ排除クロマトグラフィーを、20mM ヒスチジン緩衝液、0.14M NaCl、pH 6.0 中に行なった。Fab 断片を含有している溶液を、Biomax-SK 膜 (Millipore、ビレリカ、MA 州) を備えた Ultrafree-CL 遠心式フィルターユニットを用いて濃縮し、-80 で保存した。

30

【0480】

Fab 断片のタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数を使用して 280nm での吸光度 (OD) を測定することによって決定した。

40

【0481】

Fab 断片の純度及び完全度を、還元剤 (5mM の 1,4-ジチオトレイトール) の存在下及び非存在下で Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) で染色して SDS-PAGE (NuPAGE 4~12% ビス-トリスゲル、Invitrogen) によって分析した。

【0482】

Fab 調製物の凝集物の含量を、ランニング緩衝液として 2xPBS (pH 7.4) を使用して Superdex200 10/300GL 分析用サイズ排除カラム (GE Healthcare) を使用して高性能 SEC によって決定した。

【0483】

実施例 2 3

50

3 T 3 細胞増殖 E L I S A

増殖抑制の決定のために、製造業者のマニュアルによる B r d U 比色定量アッセイを使用した (Roche Diagnostics GmbH、独国、1 1 6 4 7 2 2 9 0 0 1 番)。アッセイでは 5 ng/ml のヒト P D G F - B B 及び抗体を使用した。

【 0 4 8 4 】

実施例 2 4

リン酸化 P D G F - R (T r y 7 5 1) サンドイッチ E L I S A

1 0 , 0 0 0 個の 3 T 3 細胞 / ウェルを、1 0 % 新生仔胎児血清の補充された D M E M 培地中で 2 4 時間培養した。その後、細胞を、H u n g e r 培地 (0 . 5 % 新生仔胎児血清を有する D M E M 培地) 中で 2 4 時間インキュベートした。

【 0 4 8 5 】

添加前に抗体 (1 µg/ml) を、5 ng/ml の P D G F - B B を含有している培地中で 2 時間プレインキュベートした。3 T 3 細胞を、5 ng/ml のヒト P D G F - B B 及び抗体を含む H u n g e r 培地中で 1 0 分間インキュベートした。

【 0 4 8 6 】

溶解前に、細胞を、P B S で 4 回洗浄した。細胞の溶解を、1 0 0 µl の溶解緩衝液中で行なった。

【 0 4 8 7 】

溶解溶液を、ウサギ抗 P D G F - R 抗体でコーティングされた 9 6 ウェルプレートのウェル中で 4 晩インキュベートした。その後、ウェルを、P B S で 4 回洗浄した。マウス抗リン酸化 P D G F 受容体 抗体と共に 1 時間インキュベートした後、ウェルを洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。検出のために、ウェルを T M B 基質溶液 1 0 0 µl と共に 3 0 分間インキュベートした。反応を停止溶液 1 0 0 µl の添加によって停止した。4 5 0 nm における吸光度を決定した。

【 0 4 8 8 】

実施例 2 5

細胞遊走アッセイ

C I M プレート 1 6 の使用 (ACEA Biosciences Inc.、0 5 6 6 5 8 1 7 0 0 1 番、膜の孔径 8 µm)。

【 0 4 8 9 】

プロトコール

使用前に初代ヒト網膜周皮細胞 ((ACBRI 183 CellSystems)、h T E R T で不死化) を、増殖因子を含まない CellSystems CSC 無血清培地 (S F - 4 Z R - 5 0 0 - S 番) 中で一晩飢餓させる (5 0 ~ 7 0 % の集密度)。

【 0 4 9 0 】

プレート調製

上のチャンバー : (培地 5 0 µl + 細胞懸濁液 1 0 0 µl)
両面を P B S 中フィブロネクチン (Sigma F0895 番、2 mg) 2 0 µg/ml でコーティングする。

【 0 4 9 1 】

各ウェルのセンサー側 (下側) にフィブロネクチン溶液 4 0 µl を加え、フード中で上のチャンバーを 3 0 分間インキュベートする。センサー側からフィブロネクチン溶液を注意深く吸引し、電極に触れるのを回避する。U C をひっくり返し、ウェル側を上、センサー側を下にする。フィブロネクチン溶液 5 0 µl をウェルに加え、室温でフード下で 3 0 分間インキュベートする。ウェル内から溶液を注意深く吸引する。ウェル内に増殖因子を含まない C S C 無血清培地 5 0 µl を加える。

【 0 4 9 2 】

下のチャンバー : 試験すべき 1 6 0 µl / ウェルの試料 (1 倍濃縮)。

【 0 4 9 3 】

増殖因子を含まない CellSystems CSC 無血清培地中の全ての希釈液 (S F - 4 Z R - 5

10

20

30

40

50

00 - S 番) ; フード中で試料 / 抗体の混合液を 2 時間インキュベートする ; 試料 160 μ l / ウェルを加える ; C I M - プレート 16 アセンブリツールを使用して U C 及び L C を構築する ; 平衡化するために C I M - プレート 16 を 37 のインキュベーターに 1 時間入れる ; RTCA DP 分析装置に C I M - プレート 16 を置く ; R T C A ソフトウェアで工程 1 を開始することによってバックグラウンド測定を開始する。

【 0 4 9 4 】

細胞の調製

細胞解離緩衝液で細胞を剥離し、増殖因子を含まない Cell Systems CSC 無血清培地 (S F - 4 Z R - 5 0 0 - S 番) 中に細胞を 1.5×10^5 個の細胞 / ml で再懸濁する ; R T C A 分析装置から C I M - プレート 16 を取り出し、U C に、基礎培地 (増殖因子を含まない Cell Systems CSC 無血清培地、S F - 4 Z R - 5 0 0 - S 番) 中の 15,000 個の初代ヒト網膜周皮細胞 ((ACBRI 183 Cell Systems))、h T E R T で不死化) / ウェル / 100 μ l を加える ; R T C A 分析装置にプレートを戻し、10 ~ 20 時間以内に直ちに測定を開始する。

10

【 0 4 9 5 】

実施例 26

細胞増殖アッセイ

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, G3580) 。初代ヒト網膜周皮細胞 ((ACBRI 183 Cell Systems))、h T E R T で不死化)、2500 個の細胞 / ウェル / 100 μ l 。

20

【 0 4 9 6 】

培地

増殖培地 = C S C 完全培地、培養ブースト (ACBRI 4 Z = - 5 0 0 番) 。アッセイ培地 = 増殖因子を含まない C S C 無血清培地 (A C B R I S F - 4 Z R - 5 0 0 - S 番) 。B a l b s 3 T 3、5000 個の細胞 / ウェル / 100 μ l 。

【 0 4 9 7 】

培地

増殖培地 = D M E M (Gibco 41966 番)、10 % N B C S (新生仔胎児血清) 。アッセイ培地 = D M E M (Gibco 41966 番)、0.4 % N B C S 。

30

【 0 4 9 8 】

増殖アッセイ

アッセイの 24 ~ 48 時間前に増殖培地に細胞を播種する。細胞が 80 ~ 90 % 集密となると、トリプシン溶液を用いて細胞を収集する。細胞を増殖培地に 0.25×10^5 個の細胞 / ml (又は 0.5×10^5 個の細胞 / ml) で再懸濁する。細胞懸濁液 100 μ l を 96 ウェルプレートの各ウェルに加える。37 で 24 時間インキュベートする。増殖培地を除去し、アッセイ培地 100 μ l を各ウェルに加える。24 時間インキュベートする。標準物質又は試料 100 μ l を各ウェルに加える (2 倍濃縮、アッセイ培地で希釈) 。37 で 5 % C O ₂ で 72 時間インキュベートする。細胞上に色素溶液 40 μ l を加え、37 でインキュベートする。様々な時点 (1 時間から 8 時間まで) で 490 nm で解読する。

40

【 0 4 9 9 】

実施例 27

抗 P D G F - B B 抗体の動態スクリーニング

ヒト P D G F - B B に対する抗 P D G F - B B 抗体の結合を、ピアコア T 200 機器 (GE Healthcare) を使用して表面プラズモン共鳴によって調べた。組換えヒト P D G F - B B (5 μ g/ml ; 発注番号 220 - B B ; R&D Systems) の約 20 共鳴単位 (R U) を、GE Healthcare によって供給されたアミンカップリングキットを使用することによって p H 4.0 でシリーズ S C 1 チップ (GE Healthcare BR-1005-35) 上に結合させた。固定のためのランニング緩衝液は p H 7.4 の H B S - N (10 mM H E P E S、150 mM N a

50

C1、pH 7.4、GE Healthcare)であった。以下の動態特徴付けのために、ランニング緩衝液及び希釈緩衝液はpH 7.4のHBS-P(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05%界面活性剤P20、pH 7.4、GE Healthcare)であった。フローセルを25に設定し、試料ブロックを12に設定し、ランニング緩衝液を用いて2回刺激した。

【0500】

溶液中30nM及び3nMの濃度の抗PDGF-BB抗体の100μl/分の流速での30秒間の注入によって会合を測定した。解離相を600秒までモニタリングし、試料溶液からランニング緩衝液まで切り替えることによってトリガーした。5μl/分の流速で60秒間の0.85% H_3PO_4 (リン酸) 溶液の2回の連続注入を用いて洗浄することによって表面を再生した。ブランク表面から得られた応答を差し引くことによってバルク屈折率の差を修正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動態パラメーターの計算のために、ラングミュア1:1モデルを使用した。

10

【0501】

実施例28

抗PDGF-BB Fab抗体の動態特徴付け

ヒトPDGF-BBに対する抗PDGF-BB Fab試料の結合を、ピアコアT200機器(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴によって調べた。約50共鳴単位(RU)の組換えヒトPDGF-BB(0.5μg/ml; 発注コード220-BB; R&D Systems)を、GE Healthcareによって供給されたアミンカップリングキットを使用することによってpH 4.0でシリーズSCM3チップ(GE Healthcare BR-1005-36)上に結合させた。固定のためのランニング緩衝液はpH 7.4のHBS-Nであった(10mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)。以下の動態特徴付けのために、ランニング緩衝液及び希釈緩衝液はpH 7.4のHBS-Pであった(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05%界面活性剤P20、pH 7.4、GE Healthcare)。フローセルを25に設定し、試料ブロックを12に設定し、ランニング緩衝液で2回刺激した。

20

【0502】

1:3の連続希釈液で300nMから始めて30μl/分の流速で溶液中の様々な濃度の抗PDGF-BB Fab抗体の180秒間の注入によって会合を測定した。解離相を900秒までモニタリングし、試料溶液からランニング緩衝液へと切り替えることによってトリガーした。表面を、0.85% H_3PO_4 (リン酸) 溶液で5μl/分の流速で60秒間洗浄することによって表面を再生した。ブランク表面から得られた応答を差し引くことによってバルク屈折率の差を修正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動態パラメーターの計算のために、ラングミュア1:1モデルを使用した。

30

【0503】

実施例29

化学物質分解試験

試料を3つのアリコートに分け、20mM His/His*HCl、140mM NaCl、pH 6.0又はPBS中にそれぞれ再緩衝化し、40で(His/NaCl)又は37で(PBS)保存した。対照試料を-80で保存した。

40

【0504】

インキュベーション終了後、試料を、相対的な有効濃度(ピアコア)、凝集(SEC)、及び断片化(キャピラリー電気泳動又はSDS-PAGE)について分析し、非処置対照と比較した。

【0505】

実施例30

熱安定性

試料を、20mMヒスチジン/ヒスチジクロリド、140mM NaCl(pH 6.0)中1mg/mLの濃度で調製し、0.4μmフィルタープレートを通しての遠心分離によって光

50

学384ウェルプレートに移し、パラフィン油で覆った。流体力学的半径を、DynaProプレートリーダー(Wyatt)での動的光散乱によって繰り返し測定したが、試料を0.05 /分の割合で25 から80 まで加熱した。

【0506】

あるいは、試料を10 µLのマイクロキュベットアレイに移し、静的光散乱データ並びに266nmレーザーでの励起時の蛍光データを、Optim1000装置(Avacta Inc.)を用いて記録し、その間、それらを0.1 /分の速度で25 から90 まで加熱した。

【0507】

凝集開始温度は、流体力学的半径(DLS)又は散乱光強度(Optim1000)が増加し始める温度として定義される。

【0508】

融解温度は、蛍光強度対波長のグラフにおける変曲点として定義される。

【0509】

前記の本発明は幾分詳細に説明及び実施例を用いて理解を明瞭とするために記載されているが、記載及び実施例は、本発明を範囲を制限すると捉えるべきではない。本明細書に引用されている全ての特許文献及び科学文献の開示は、その全体が参照により明瞭に組み入れられる。

【0510】

実施例31

二重特異的抗体の生成及び精製

トランスフェクション試薬293-free(Novagen)を用いてのDNAのトランスフェクション後の、懸濁液に適合したHEK293F(FreeStyle 293-F細胞; Invitrogen)細胞中の二重特異的抗体の一過性発現。

【0511】

細胞を、3日間毎又は4日間毎に、125mlの振とうフラスコ中で解凍した後、希釈によって少なくとも4回(容量30ml)継代した(37、7%CO₂、85%湿度、135rpmでインキュベート/振とう)。細胞を、3×10⁵個の細胞/mlの細胞密度で250mlの培地に播種することによって細胞を増殖させた。3日後、細胞を分割し、2×10⁵個の細胞/mlの密度で500mlの培地に新しく播種した。4日後、細胞を分割し、7×10⁵個の細胞/mlで1リットルの培地に新しく播種した(37、7%CO₂、85%湿度、110rpmでインキュベート/振とう)。約1.4~2.0×10⁶個の細胞/mlの細胞密度で24時間後にトランスフェクションを行なった。

【0512】

トランスフェクション前に、プラスミド-DNA 1000 µg(軽鎖をコードしているプラスミドDNA 2×250 µg、及び重鎖をコードしているプラスミドDNA 2×250 µg)を予め加熱された(水浴; 37)Opti-MEM(Gibco)を有する最終容量40mlで希釈した。溶液を穏やかに混合し、室温で5分間以内インキュベートした。その後、293-freeトランスフェクション試薬 1333 µlをDNA-Opti-MEM溶液に加えた。混合物を穏やかに混合し、室温で15~20分間インキュベートした。混合物の全容量を注意深くHEK細胞培養液 1リットルに加えた。細胞をさらに、110rpmで37、7%CO₂、85%湿度で振とうしながら7日間インキュベートした。

【0513】

上清を、2000 rpmで4 で10分間の1回目の遠心分離工程によって7日後に収集した。その後、上清を、4000 rpm、4 で20分間の2回目の遠心分離工程のために新たな遠心分離用フラスコに移した。無細胞上清を0.22 µmフィルター(Millipore)を通してろ過し、精製手順が開始されるまで冷凍庫(-20)で保存した。

【0514】

抗体を含有している培養上清をろ過し、少なくとも2回のクロマトグラフィー工程によって精製した。抗体を、PBS(1mM KH₂PO₄、10mM Na₂HPO₄、137mM NaCl、2.7mM KCl)(pH7.4)で平衡化したCaptureSelectプレパックカ

10

20

30

40

50

ラム I g G - C H 1 (l i f e t e c h n o l o g i e s 、 4 9 4 3 2 0 0 0 5 番) を使用してアフィニティクロマトグラフィーによって捕捉した。非結合タンパク質を、平衡緩衝液で洗浄することによって除去し、抗体を 2 5 m M クエン酸緩衝液 (p H 3 . 0) を用いて回収し、溶出直後に 1 M トリス塩基 (p H 9 . 0) を用いて p H 6 . 0 まで中和した。

【 0 5 1 5 】

Superdex200 (商 標) (G E H e a l t h c a r e) でのサイズ排除クロマトグラフィーを 2 回目の精製工程として使用した。サイズ排除クロマトグラフィーを、2 0 m M ヒスチジン緩衝液、0 . 1 4 M N a C l 、 p H 6 . 0 中に行なった。抗体を含有している溶液を、Biomax-SK 膜 (M i l l i p o r e 、 ビレリカ、 M A 州) を備えたUltrafree-CL遠心式フィルターユニットを用いて濃縮し、 - 8 0 ° C で保存した。

10

【 0 5 1 6 】

抗 P D G F - B 抗体 / 抗 A N G 2 抗体 (クローン 0 1 4 4 - 0 0 0 4) をさらに、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) を使用して精製した。硫酸アンモニウムを、抗体含有溶液に 1 M の最終濃度となるまで加えた。溶液を 1 M 硫酸アンモニウム、3 5 m M 酢酸塩 (p H 5 . 6) で平衡化されたButyl Sepharose 4 Fast Flow (G E H e a l t h c a r e) カラムに適用した。抗体を 3 5 m M 酢酸塩 (p H 5 . 6) を用いて線形勾配 (0 ~ 1 0 0 %) で溶出した。抗体含有画分をプールし、サイズ排除クロマトグラフィーに適用した。

【 0 5 1 7 】

抗体調製物のタンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数を使用して、2 8 0 n m での吸光度 (O D) を測定することによって決定した。

20

【 0 5 1 8 】

抗体の純度及び完全度を、プロテイン・エクスプレス・チップ及び H T プロテイン・エクスプレス試薬キットと共にLabChip GX II (P e r k i n E l m e r) を使用して C E - S D S によって分析した。

【 0 5 1 9 】

抗体調製物の凝集物含量は、2 0 0 m M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 、 2 5 0 m M K C l 、 p H 7 . 0 をランニング緩衝液として使用して、BioSuite高分解能 S E C 、 2 5 0 Å 、 5 μ m の分析用サイズ排除カラム (W a t e r s G m b H) を使用して高性能 S E C によって決定した。

【 0 5 2 0 】

30

【 表 3 3 】

| | 抗体 | 規模 [l] | 収量 [mg] | 収率 [上清中の mg/l] | 単量体 (SE-HPLC) [%] | 単量体 (CE-SDS) [%] | カラム |
|---------------------------------|------|-----------|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| 抗 P D G F - B 抗体 / 抗 A N G 2 抗体 | 0144 | 1.5 | 37.7 | 25.1 | >98 | >95 | CH1 select, HIC, SEC |
| 抗 P D G F - B 抗体 / 抗 V E G F 抗体 | 0117 | 1 | 46.3 | 46.3 | >98 | >95 | CH1 select, SEC |
| 抗 P D G F - B 抗体 / 抗 A N G 2 抗体 | 0145 | 1 | 21.5 | 21.5 | >98 | >95 | CH1 select/SEC |
| 抗 P D G F - B 抗体 / 抗 A N G 2 抗体 | 0146 | 0.5 | 14.6 | 29.2 | >98 | >95 | CH1 select/SEC |

40

【 0 5 2 1 】

抗体 0 1 4 4 は、配列番号 1 1 7 (V H) 及び配列番号 1 1 8 (V L) の A N G 2 結合

50

部位、並びに配列番号 92 (VH) 及び配列番号 97 (VL) の PDGF - B 結合部位を含む、Cross Mab 抗体である。

【0522】

抗体 0117 は、配列番号 119 (VH) 及び配列番号 120 (VL) の VEGF 結合部位、並びに配列番号 92 (VH) 及び配列番号 97 (VL) の PDGF - B 結合部位を含む、Cross Mab 抗体である。

【0523】

抗体 0145 は、配列番号 119 (VH) 及び配列番号 120 (VL) の ANG2 結合部位、並びに配列番号 101 (VH) 及び配列番号 106 (VL) の PDGF - B 結合部位を含む、Cross Mab 抗体である。

【0524】

抗体 0146 は、配列番号 117 (VH) 及び配列番号 118 (VL) の ANG2 結合部位、並びに配列番号 121 (VH) 及び配列番号 122 (VL) の PDGF - B 結合部位を含む、Cross Mab 抗体である。

【0525】

実施例 32

二重特異的抗体の動態特徴付け

PDGF - BB

ヒト PDGF - BB に対する二重特異的抗 PDGF - BB 抗体 / 抗 ANG2 抗体の結合を、ピアコア T200 機器 (GE Healthcare) を使用して表面プラズモン共鳴によって調べた。約 50 共鳴単位 (RU) の組換えヒト PDGF - BB (0.5 µg/ml; 発注番号 220 - BB; R&D Systems) を、GE Healthcare によって供給されたアミンカップリングキットを使用することによって pH 4.0 のシリーズ SCM3 チップ (GE Healthcare BR - 1005 - 36) 上に結合させた。固定のためのランニング緩衝液は pH 7.4 の HBS - N であった (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)。以下の動態特徴付けのための、ランニング緩衝液及び希釈緩衝液は pH 7.4 の HBS - P であった (10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05 % 界面活性剤 P20、pH 7.4、GE Healthcare)。フローセルを 25 に設定し、試料ブロックを 12 に設定し、ランニング緩衝液で 2 回刺激した。

【0526】

1 : 3 連続希釈液の 300 nM で始めて溶液中の様々な濃度の二重特異的抗体の 30 µl / 分の流速での 180 秒間の注入によって会合を測定した。解離相を、900 秒までモニタリングし、試料溶液からランニング緩衝液への切り替えによってトリガーした。0.85 % の H₃PO₄ (リン酸) 溶液を 5 ml / 分の流速で用いて 60 秒間洗浄することによって表面を再生した。バルク屈折率の差を、ブランク表面から得られた応答を差し引くことによって修正した。ブランク注入も差し引いた (= 二重参照)。KD 及び他の動態パラメータの計算のために、ラングミュア 1 : 1 モデルを使用した。

【0527】

ANG2

ヒト ANG2 - RBD - マウス Fc 領域融合に対する二重特異的抗体の結合を、ピアコア T200 機器 (GE Healthcare) を使用して表面プラズモン共鳴によって調べた。約 4000 RU の抗マウス Fc 領域抗体 (10 µg/ml の抗マウス (Fc) 抗体) を、GE Healthcare によって供給されたアミンカップリングキットを使用することによって、pH 5.0 のシリーズ SCM5 チップ (GE Healthcare BR - 1005 - 36) 上に結合させた。HBS - N (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare) を、固定手順中のランニング緩衝液として使用した。以下の動態特徴付けのための、試料及びランニング緩衝液は HBS - P であった (10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、0.05 % 界面活性剤 P20; GE Healthcare)。フローセルを 25 に設定し、試料ブロックを 12 に設定し、動態特徴付けの前にランニング緩衝液で 2 回刺激した。

【 0 5 2 8 】

ヒトANG2 - RBD - マウスFc領域融合物を、5 μ l/分の流速で1 μ g/ml溶液を30秒間注入することによって捕捉した。1 : 3の連続希釈液の300 nMで始めて90 μ l/分の流速での溶液中の様々な濃度の二重特異的抗体の90秒間の注入によって会合を測定した。解離相を600秒までモニタリングし、試料溶液からランニング緩衝液への切り替えによってトリガーした。5 μ l/分の流速で3 M MgCl₂溶液を用いて60秒間洗浄することによって全ての表面を再生した。バルク屈折率の差を、抗マウスIgG抗体(Fc)表面から得られた応答を差し引くことによって修正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動態パラメーターの計算のために、ラングミュア1 : 1モデルを。

10

【 0 5 2 9 】

VEGF

ヒトVEGFアイソフォーム121に対する二重特異的抗体の結合を、ピアコアT200機器(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴によって調べた。抗ヘキサヒスチジン抗体を、製造業者の説明書に従って、GE Healthcareによって供給されたアミンカップリングキットを使用することによってCM5チップ(GE Healthcare BR - 1005 - 30)上に結合させた。HBS - N(10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、GE Healthcare)を、固定手順中にランニング緩衝液として使用した。以下の動態特徴付けのための、試料及びランニング緩衝液はHBS - Pであった(10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、0.05%界面活性剤P20; GE Healthcare)。

20

【 0 5 3 0 】

ヒスチジntagを含むヒトVEGFアイソフォーム121を、5 μ l/分の流速で30秒間溶液を注入することによって捕捉した。1 : 3の連続希釈液で300 nMで始めて90 μ l/分の流速での溶液中の様々な濃度の二重特異的抗体の90秒間の注入によって会合を測定した。解離相を600秒までモニタリングし、試料溶液からランニング緩衝液に切り替えることによってトリガーした。5 μ l/分の流速で3 M MgCl₂溶液を用いて60秒間洗浄することによって全ての表面を再生した。バルク屈折率の差を、抗ヘキサヒスチジン抗体表面から得られた応答を差し引くことによって修正した。ブランク注入も差し引いた(=二重参照)。KD及び他の動態パラメーターの計算のために、ラングミュア1 : 1モデルを使用した。

30

【 配列表 】

0006946184000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/13 (2006.01) A 6 1 P 9/10
 C 1 2 N 15/13

- (72)発明者 デングル, シュテファン
 ドイツ国、8 0 3 3 3 ミュンヘン、シュライスハイマー・シュトラッセ 4 4 アー
- (72)発明者 ガスナー, クリステリアン
 ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ハビヒトヴェーク 4
- (72)発明者 ジョルジュ, ギー
 ドイツ国、8 2 3 9 2 ハーバツハ、アム・ベルクグラベン 1 1
- (72)発明者 グリュナー, ザビーネ
 ドイツ国、7 9 6 3 9 グレンツァッハ - ヴィレン、ソルヴァイシュトラッセ 1 0
- (72)発明者 ハルトマン, ガイド
 ドイツ国、7 9 5 3 9 レラハ、ハングシュトラッセ 3 4
- (72)発明者 ヒュールスマン, ペーター・ミヒャエル
 ドイツ国、8 2 3 9 2 ハーバツハ、イム・ゾンネンタール 2 0
- (72)発明者 モルケン, イェルク
 ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、オシエツキーシュトラッセ 2
- (72)発明者 ムンディグル, オラフ
 ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、タッシーロリング 1 6
- (72)発明者 レグラ, イェルク・トーマス
 ドイツ国、8 1 3 7 7 ミュンヘン、インナーコフラーシュトラッセ 1 7 ・ペー
- (72)発明者 ヴァイザー, バルバラ
 ドイツ国、8 2 4 0 4 ジンデルスドルフ、ケーニヒベルクシュトラッセ 5 1

審査官 藤澤 雅樹

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 7 2 8 7 6 (W O , A 1)
 国際公開第2 0 1 4 / 0 0 9 4 6 5 (W O , A 1)
 特表2 0 0 8 - 5 2 3 4 8 1 (J P , A)
 BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (1990) Vol.1054, pp.246-249
 Journal of Leukocyte Biology (2007) Vol.81, pp.1496-1503
 Inflammation (2009) Vol.32, No.6, pp.393-401

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q