

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7366068号  
(P7366068)

(45)発行日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(24)登録日 令和5年10月12日(2023.10.12)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
請求項の数 22 (全67頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2020-566520(P2020-566520)	(73)特許権者	520312865 インスティテュート・フォー・ベイシッ ク・サイエンス INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE
(86)(22)出願日	平成31年2月19日(2019.2.19)	(73)特許権者	596071752 コリア アドバンスト インスティテュー ト オブ サイエンス アンド テクノロジー 大韓民国、デジョン 3 4 1 4 1、ユソ ン - グ、デハ - ロ、2 9 1
(65)公表番号	特表2021-514670(P2021-514670 A)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(43)公表日	令和3年6月17日(2021.6.17)	(74)代理人	100106518
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/001983		
(87)国際公開番号	WO2019/164219		
(87)国際公開日	令和1年8月29日(2019.8.29)		
審査請求日	令和4年2月17日(2022.2.17)		
(31)優先権主張番号	62/633,038		
(32)優先日	平成30年2月20日(2018.2.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	10-2019-0018769		
(32)優先日	平成31年2月18日(2019.2.18)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗アンジオポエチン2抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトアンジオポエチン2 (Ang2) に特異的に結合し Tie2 活性化を誘導する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体またはその抗原結合フラグメントが、  
( a ) 配列番号3のHCDR1アミノ酸配列、配列番号4のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号5のHCDR3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)、  
ならびに配列番号6のLCDR1アミノ酸配列、配列番号7のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号8のLCDR3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDRを含む抗体またはその抗原結合フラグメント、または  
( b ) 配列番号13のHCDR1アミノ酸配列、配列番号14のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号15のHCDR3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR、  
ならびに配列番号16のLCDR1アミノ酸配列、配列番号17のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号18のLCDR3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDRを含む抗体またはその抗原結合フラグメント  
 である、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項2】

抗体またはその抗原結合フラグメントが前記 ( a ) の抗体またはその抗原結合フラグメントであり、配列番号116のアミノ酸および配列番号117のアミノ酸に結合する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項3】

抗体またはその抗原結合フラグメントが前記 ( b ) の抗体またはその抗原結合フラグメントであり、配列番号 1 1 5 のアミノ酸に結合する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒトおよびマウスの A n g 2 に結合する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

抗体が、ポリクローナルまたはモノクローナルである、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

抗原結合フラグメントが、 s c F v または F a b である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

抗体がヒト化されている、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

( a ) 配列番号 3 の H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 5 の H C D R 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域の相補性決定領域 ( C D R )、ならびに配列番号 6 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 8 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

( b ) 配列番号 1 3 の H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 4 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 1 5 の H C D R 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域の相補性決定領域 ( C D R )、ならびに配列番号 1 6 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 7 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 1 8 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 1 0】

抗体またはその抗原結合フラグメントが、前記 ( a ) の抗体またはその抗原結合フラグメントであり、

( i ) 配列番号 9 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 1 の軽鎖可変領域を含む、  
( ii ) 配列番号 4 3 の重鎖可変領域および / または配列番号 4 4 の軽鎖可変領域を含む、  
( iii ) 配列番号 4 7 の重鎖可変領域および / または配列番号 4 8 の軽鎖可変領域を含む、  
または

( iv ) 配列番号 5 1 の重鎖可変領域および / または配列番号 5 2 の軽鎖可変領域を含む；  
または抗体またはその抗原結合フラグメントが、前記 ( b ) の抗体またはその抗原結合フラグメントであり、

( i ) 配列番号 1 9 の重鎖可変領域および / または配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含む、  
( ii ) 配列番号 5 5 の重鎖可変領域および / または配列番号 5 6 の軽鎖可変領域を含む、  
( iii ) 配列番号 5 9 の重鎖可変領域および / または配列番号 6 0 の軽鎖可変領域を含む、  
( iv ) 配列番号 6 3 の重鎖可変領域および / または配列番号 6 4 の軽鎖可変領域を含む、  
( v ) 配列番号 6 7 の重鎖可変領域および / または配列番号 6 8 の軽鎖可変領域を含む、  
( vi ) 配列番号 7 1 の重鎖可変領域および / または配列番号 7 2 の軽鎖可変領域を含む、  
( vii ) 配列番号 7 5 の重鎖可変領域および / または配列番号 7 6 の軽鎖可変領域を含む、  
( viii ) 配列番号 7 9 の重鎖可変領域および / または配列番号 8 0 の軽鎖可変領域を含む、  
( ix ) 配列番号 8 3 の重鎖可変領域および / または配列番号 8 4 の軽鎖可変領域を含む、  
( x ) 配列番号 8 7 の重鎖可変領域および / または配列番号 8 8 の軽鎖可変領域を含む、  
( xi ) 配列番号 9 1 の重鎖可変領域および / または配列番号 9 2 の軽鎖可変領域を含む、  
( xii ) 配列番号 9 5 の重鎖可変領域および / または配列番号 9 6 の軽鎖可変領域を含む、  
( xiii ) 配列番号 9 9 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 0 0 の軽鎖可変領域を含む

10

20

30

40

50

む、

(xiv) 配列番号 1 0 3 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 0 4 の軽鎖可変領域を含む、

(xv) 配列番号 1 0 7 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 0 8 の軽鎖可変領域を含む、または

(xvi) 配列番号 1 1 1 の重鎖可変領域および / または配列番号 1 1 2 の軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 1 1】

ヒトアンジオポエチン 2 ( A n g 2 ) に特異的に結合し T i e 2 活性化を誘導する、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、受託番号 K C L R F - B P - 0 0 4 1 7 または K C L R F - B P - 0 0 4 1 8 で寄託された細胞株から産生される抗体の相補性決定領域 ( C D R ) を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 1 2】

薬学的に有効な量の請求項 1 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは請求項 1 1 に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメント、および薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 3】

化学療法に用いられる低分子阻害剤をさらに含む、または化学療法に用いられる低分子阻害剤と組み合わせて投与される、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 4】

血管内皮増殖因子 ( V E G F ) アンタゴニストをさらに含む、または V E G F アンタゴニストと組み合わせて投与される、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

V E G F アンタゴニストが、抗 V E G F 抗体、V E G F 阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤である、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

患者において腫瘍増殖を抑制するための、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 7】

眼疾患患者において、脈絡膜血管新生を抑制する、眼血管漏出を抑制する、または同時に脈絡膜毛細血管再生を誘導するための、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

眼疾患が、滲出型加齢黄斑変性 ( w A M D )、糖尿病黄斑浮腫 ( D M E )、または糖尿病網膜症 ( D R ) である、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは請求項 1 1 に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメントをコードする核酸。

40

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗 A n g 2 抗体またはその抗原結合フラグメントを生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

本発明は、血管形成および維持を調節するリガンドとして知られるアンジオポエチン 2 (Ang 2) に特異的に結合する、抗 Ang 2 抗体またはその抗原結合フラグメント、それを含む医薬組成物、それをコードする核酸、核酸を含むベクター、ベクターを含む宿主細胞、ならびに抗体またはその抗原結合フラグメントを生産する方法を包含する。

【背景技術】

【0002】

生物の発達、成長、維持およびホメオスタシスにおいて、血管形成はさまざまな調節因子によってダイナミックに起こる。このプロセスにおいて新たに形成される血管は、周辺の細胞において、栄養物、酸素およびホルモンといったさまざまな生体材料の輸送チャネルとして機能する。機能的および構造的に異常な血管は、さまざまな疾患の発症および進行の、直接的または間接的な原因となる。腫瘍血管は、その機能的および構造的欠陥の故に低酸素を悪化させ、その結果、腫瘍の進行および他組織への転移を引き起こし、また、腫瘍塊中心部への抗癌剤デリバリーの低下をもたらす。血管の欠陥は、癌に加え、さまざまな他の疾患および状態においても見られる。その例としては、さまざまな、眼疾患（例えば、糖尿病黄斑浮腫、滲出型加齢黄斑変性）、ウイルス感染、および急性炎症反応、例えば敗血症が挙げられる。したがって、異常な血管を正常化することのできる処置剤が利用可能であれば、血管異常を有するさまざまな患者の処置に適用することができる。

10

【0003】

アンジオポエチンファミリーは、血管の形成および維持において重要な役割を担い、4つのアンジオポエチン (Ang 1、Ang 2、Ang 3 および Ang 4) からなる。アンジオポエチン 1 (Ang 1) は、血管内皮細胞表面上に存在する Tie 2 受容体に結合して、Tie 2 受容体をリン酸化および活性化し、それによって血管を安定化する。一方、アンジオポエチン 2 (Ang 2) は、Tie 2 受容体に結合するが、アンタゴニストとして作用し、Tie 2 受容体の不活性化を誘導し、それによって血管の不安定化および血管の漏出をもたらす。癌患者、眼疾患、ウイルスおよび細菌感染ならびに炎症性疾患において血液中の Ang 2 の発現レベルが非常に高いことが報告されている (Saharinen P et al., 2017, Nature Review Drug Discovery)。しかしながら、Ang 2 はまた、リンパのチューブ形成および維持を包含するいくつかのプロセスにおいて、Tie 2 受容体の活性化を誘導するアゴニストとして作用することが知られており、したがって、Ang 2 は状況によってさまざまな機能を示すと考えられる。

20

30

【0004】

Ang 2 結合抗体がいくつかの文献に報告されている（例えば米国特許第 7 6 5 8 9 2 4 号および米国特許第 8 9 8 7 4 2 0 号）。これまでに報告された Ang 2 抗体の多くが、Ang 2 の Tie 2 への結合を阻害し、したがって、そのような Ang 2 中和効果によって新血管の形成を阻害することがわかっている。現在、さまざまな Ang 2 抗体がさまざまな癌患者に対する臨床試験に付されているが、その抗癌作用は不十分であることがわかっている。例えば、Amgen が実施した第 3 相臨床試験により、Ang 2 抗体の卵巣癌患者における抗癌作用は有意ではないことが示された (Marth C et al., 2017, Eur. J. Cancer)。

【0005】

抗体に加え、Tie 2 受容体に直接結合して Tie 2 のリン酸化および活性化を誘導する組換えタンパク質も報告されている。その例には、COMP-Ang1 (Cho et al., 2004, PNAS)、および 5 つのアンジオポエチン 1 タンパク質フラグメントからなる Vasculotide (David S et al., 2011, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol) ペプチドがある。しかしながら、これらのタンパク質は半減期が非常に短く、不安定な物理化学的性質を有すると考えられる。さらに、リン酸化された Tie 2 からリン酸基を除去して Tie 2 を不活性化する VE-PTP と称されるホスファターゼが存在し、VE-PTP 酵素の活性を阻害することによって間接的に Tie 2 活性を維持する低分子化合物 (AKB-9778) の開発もなされている (Goel S, 2013, J Natl Cancer Inst)。しかしながら、この化合物は、Tie 2 に加え、他の受容体も活性化するという欠点を有する (Frye M, 2015, J

40

50

Exp. Med, Hayashi M, 2013, Nature Communication, Mellberg S et al., 2009, FASEB J.)。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、ヒトアンジオポエチン2に特異的に結合しTie2活性化を誘導する、抗体またはその抗原結合フラグメントに関し、該抗体またはその抗原結合フラグメントは、水素/重水素交換法による決定で、配列番号1のアミノ酸289～299、配列番号1のアミノ酸316～322、または配列番号1のアミノ酸336～353に結合する。

【0007】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒトおよびマウスのAng2に結合しうる。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルでありうる。抗原結合フラグメントはscFvまたはFabでありうる。抗体またはそのフラグメントはヒト化されうる。

10

【0008】

他の一態様において、本発明は、

(a) 配列番号3のHCDR1アミノ酸配列、配列番号4のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号5のHCDR3アミノ酸配列を有する重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)；および

(b) 配列番号6のLCDR1アミノ酸配列、配列番号7のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号8のLCDR3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR

を含む、抗体または抗原結合フラグメントに関する。

20

【0009】

他の一態様において、本発明は、

(a) 配列番号13のHCDR1アミノ酸配列、配列番号14のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号15のHCDR3アミノ酸配列を有する重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)；および

(b) 配列番号16のLCDR1アミノ酸配列、配列番号17のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号18のLCDR3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR

を含む、抗体または抗原結合フラグメントに関する。

【0010】

一態様において、本発明は、受託番号KCLRF-BP-00417またはKCLRF-BP-00418で寄託された細胞株から産生される抗体の相補性決定領域(CDR)を含む、抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。

30

【0011】

他の一態様において、本発明は、薬学的に有効な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを、薬学的に許容しうる担体と共に含む医薬組成物に関する。医薬組成物は、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニストをさらに含む。一態様において、VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体、VEGF阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

【0012】

他の一態様において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を患者に投与することを含む、患者において腫瘍増殖を抑制する方法に関する。該方法は、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与と同時に、または前後して、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニストを投与することをさらに含む。VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体、VEGF阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

40

【0013】

他の一態様において、本発明は、前記医薬組成物を眼疾患患者に投与することを含む、該患者において脈絡膜血管新生を抑制する、眼血管漏出を抑制する、または同時に脈絡膜毛細血管再生を促進する方法に関する。該方法は、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与と同時に、または前後して、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮

50

増殖因子 ( V E G F ) アンタゴニストを投与することをさらに含む。 V E G F アンタゴニストは、抗 V E G F 抗体、 V E G F 阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。眼疾患は、滲出型加齢黄斑変性 ( w A M D )、糖尿病黄斑浮腫 ( D M E )、または糖尿病網膜症 ( D R ) である。

【 0 0 1 4 】

上記のおよび他の本発明の課題は、後述の本発明の説明、添付の図面および特許請求の範囲から、より明確に理解されうる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

本発明は、後述の詳細な説明および添付の図面から、より明確に理解されうるが、それらは説明のためのものであるり、本発明を限定するものではない。

10

【 図 1 】 抗 A n g 2 抗体によって誘導される A k t リン酸化。 H U V E C を 6 時間の血清飢餓に付し、ヒト A n g 2 ( 1 μ g / m l ) の不存在下または存在下に、 C O M P - A n g 1 ( C A 1、 0 . 5 μ g / m l ) または抗 A n g 2 抗体 ( 対照、 2 C 8、 4 B 9、 2 F 1 0 および 4 E 2 のそれぞれ ) と共に 3 0 分間インキュベートした。細胞溶解物を S D S - P A G E / ウエスタンブロッティングに付し、プロットを抗ホスホ A k t ( S 4 7 3 ) または抗 A k t 抗体でプローブした。

【 図 2 】 水素 / 重水素交換質量分析によって分析した抗 A n g 2 抗体のエピトープを示す図。組換え h A n g 2 - R B D 単独、または h A n g 2 - R B D / A n g 2 抗体複合体を重水素で標識した。標識したタンパク質をペプシンカラムにおいて消化し、質量分析により分析した。 h A n g 2 - R B D 単独および h A n g 2 - R B D / A n g 2 抗体複合体の重水素取り込みを分析し、重水素取り込みの差を比較した。重水素取り込みの質量差が 0 . 5 ~ 1 D a を上回ったペプチドを、抗 A n g 2 抗体との結合を仲介する特異的エピトープであると決定した。 P y M o l ソフトウェアを用いて作製した A n g 2 - R B D 結晶構造 ( P D B : 2 G Y 7 ) の画像において、 2 C 8 エピトープ ( 赤 ) および 4 B 9 エピトープ ( 緑 ) を示した。

20

【 図 3 】 ヒト化抗 A n g 2 抗体 4 B 9 H 1 1 および 2 C 8 H 1 1 による用量依存的 A k t リン酸化 ( p A k t )。血清飢餓 H U V E C を、ヒト A n g 2、抗 A n g 2 抗体、またはヒト A n g 2 とさまざまな濃度の抗 A n g 2 抗体との組み合わせと共に 3 0 分間インキュベートした。細胞溶解物を S D S - P A G E / ウエスタンブロッティングに付した。

30

【 図 4 】 ヒト化抗 A n g 2 抗体 4 B 9 H 1 1 および 2 C 8 H 1 1 による用量依存的 T i e 2 リン酸化 ( p T i e 2 )。 4 B 9 H 1 1 抗体 ( 図 4 A ) および 2 C 8 H 1 1 抗体 ( 図 4 B ) の T i e 2 リン酸化誘導能力を、免疫沈降およびウエスタンブロッティングによって調べた。血清飢餓 H U V E C を、ヒト A n g 2、抗 A n g 2 抗体単独、またはヒト A n g 2 とさまざまな濃度の抗 A n g 2 抗体との組み合わせと共に 3 0 分間インキュベートした。細胞溶解物を、抗 T i e 2 抗体による免疫沈降、次いで S D S - P A G E / ウエスタンブロッティング分析に付した。

【 図 5 】 ヒト化 A n g 2 抗体による T i e 2 受容体クラスター形成および F O X O 1 移行。 H U V E C を 6 時間の血清飢餓に付し、 C O M P - A n g 1 ( C A 1 )、 A n g 2 ( A 2 )、または A n g 2 と抗 A n g 2 抗体 ( 対照 A b、 2 C 8 H 1 1、または 4 B 9 H 1 1 ) との組み合わせと共に 3 0 分間インキュベートした。固定後、 H U V E C を、 D A P I ( 青 )、抗 T i e 2 抗体 ( 緑 )、抗 F O X O 1 抗体 ( 赤 ) および抗ヒト F c ( シアン ) で染色して、細胞表面における T i e 2 クラスター形成、核からの F O X O 1 移行、および細胞間結合域におけるヒト化 A n g 2 抗体の存在を調べた。矢尻は、細胞間接着においてクラスター形成した T i e 2 および共局在する A n g 2 抗体を示す。

40

【 図 6 】 2 C 8 H 1 1 により誘導される T i e 2 受容体クラスター形成、 F O X O 1 移行、および H U V E C の細胞間結合部における A n g 2 抗体局在の経時変化。血清飢餓 H U V E C を、抗 A n g 2 抗体 ( 対照 A b、または 2 C 8 H 1 1 ) と共に、 1 0 分 ~ 2 4 0 分間のさまざまな時間にわたりインキュベートした。細胞の固定後、細胞表面におけるクラスター形成した T i e 2 受容体、およびエンドサイトーシスを受けた T i e 2 受容体を

50

、抗Tie2抗体での染色によって調べた。細胞表面およびサイトゾルにおけるヒト化抗Ang2抗体を、抗ヒトFc抗体でプローブした。矢尻は、細胞間接着においてクラスター形成したTie2および共局在するAng2抗体を示す。

【図7】ヒト化抗Ang2抗体による血管透過性抑制。HUVECをトランスウェルチャンパーに播種し、3日間培養した。100%のコンフルエンスで、HUVECを、COMP-Ang1(CA1、0.5 $\mu$ g/ml)、Ang2(A2、1 $\mu$ g/ml)、Ang2と対照Ab(A2+対照Ab、1 $\mu$ g/ml)、Ang2と2C8H11(A2+2C8H11、1 $\mu$ g/ml)、またはAng2と4B9H11(A2+4B9H11、1 $\mu$ g/ml)で30分間処理し、その後、上部チャンパーへのTNF-a(100ng/ml)で22時間処理した。上部チャンパーにFITC-デキストランを加え、20分間インキュベートした。FITC-デキストランを上部チャンパーに20分間加えた後の下部チャンパーにおけるFITC蛍光を測定することにより、血管透過性を評価した。値は平均 $\pm$ SDである。一元ANOVAにより、\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01、\*\*\* $p$ <0.001。

10

【図8】ELISAによる、マウスAng2に対する抗Ang2抗体のEC<sub>50</sub>値。マウスAng2(mAng2)に対するヒト化抗Ang2抗体の結合親和性を、ELISAによるEC<sub>50</sub>の分析によって測定した。組換えmAng2をコートし、段階希釈した抗Ang2抗体4B9H11および2C8H11と共にインキュベートした。次いで、プレートを、抗ヒトIgG(Fab)-HRP二次抗体と反応させた。プレートをTMB溶液で処理し、450nmにおける吸光度を測定した。PerkinElmerのWorkoOut 2.5プログラムを用いてEC<sub>50</sub>値を分析した。

20

【図9】LLC腫瘍モデルにおけるヒト化2C8H11抗体およびシスプラチン(Cpt)による腫瘍増殖抑制。腫瘍移植後7日目を開始して、示されるように処置されたマウスにおけるLLC腫瘍増殖を比較した。黒の矢印は抗体の注射を示し、赤の矢印はCptの単回注射を示す。各群において、 $n$ =7~9。値は平均 $\pm$ SD。\*Fcに対して $p$ <0.05；#Fc+Cptに対して $p$ <0.05。

【図10】ヒト化2C8H11抗体の腫瘍血管正常化作用。LLC皮下腫瘍モデルにおいて、腫瘍におけるPDGFR<sup>+</sup>ペリサイト域、および腫瘍間領域におけるCD31<sup>+</sup>BVを比較した。スケールバー：100 $\mu$ m。各群において、 $n$ =5。値は平均 $\pm$ SD。\*Fcに対して $p$ <0.05；#Fc+Cptに対して $p$ <0.05。

30

【図11】ヒト化2C8H11抗体による低酸素の軽減および腫瘍血管の灌流増加。LLC腫瘍において、レクチンの腫瘍血管灌流、およびHypoxyprobe<sup>+</sup>低酸素面積を分析し比較した。Hypoxyprobe<sup>+</sup>面積は、総断面積に対するパーセンテージとして示した。スケールバー：100 $\mu$ m。各群において、 $n$ =5。値は平均 $\pm$ SD。\*Fcに対して $p$ <0.05；#Fc+Cptに対して $p$ <0.05。

【図12】ヒト化2C8H11抗体による腫瘍内部へのCptドラッグデリバリーの増加。抗Cpt修飾DNA抗体を用いて、21日目に採取した腫瘍におけるCpt<sup>+</sup>領域を画像化した。Cpt<sup>+</sup>面積を、総断面積に対するパーセンテージとして測定した。スケールバー：100 $\mu$ m。各群において、 $n$ =5。値は平均 $\pm$ SD。#Fc+Cptに対して $p$ <0.05。

40

【図13】レーザー誘発CNVモデルにおける2C8H11抗体の硝子体内注射によるCNV低減および血管漏出抑制。レーザー光凝固後7日目に、抗体の硝子体内投与を行った。レーザー光凝固後6日目および/または14日目に、CD31<sup>+</sup>CNV体積を測定し、CNV周囲の漏出面積を、FA画像において測定された高蛍光の総面積を、ICGA画像において測定された総CNV面積で除したものとして、計算した。スケールバー：100 $\mu$ m。各群において、 $n$ =11。値は平均 $\pm$ SD。\*\*\*一元ANOVA、次いでスチューデント-ニューマン-ケウルのポスト検定により $p$ <0.001；###対応のあるスチューデントのt検定により $p$ <0.001。

【図14】2C8H11抗体の硝子体内注射によるCNV低減および脈絡膜毛細血管再生。レーザー光凝固後7日目に、抗体の硝子体内投与を行った。レーザー光凝固後、6、1

50

4、21および35日目に、眼のOCTA画像によって、CNV体積（白色の点線の境界線で区切られた部分）、およびCNVの周囲の無血管スペース（黄色の点線の境界線で区切られた部分）を測定した。各群において、 $n = 11$ 。値は平均 $\pm$ SD。一元ANOVA、次いでスチューデント-ニューマン-ケウルのポスト検定により、Fcに対して、\*  $p < 0.005$ 、\*\*  $p < 0.005$ 。

【図15】CNVの内皮細胞における2C8H11抗体およびCD31の共局在。レーザー光凝固後1日目に、2C8H11抗体の皮下投与を行った。レーザー光凝固後2、4および8日目に、CNVの内皮細胞における2C8H11抗体およびCD31共局在を、抗ヒトIgG抗体で直接に検出した。

【図16】皮下注射2C8H11抗体のCNV抑制効果。レーザー光凝固後1日目に、2C8H11抗体の皮下投与を行った。レーザー光凝固後8日目に、CD31<sup>+</sup>CNVの体積を測定した。スケールバー：100 $\mu$ m。各群において、 $n = 10$ 。値は平均 $\pm$ SD。\*\*\*対応のないスチューデントのt検定により  $p < 0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0016】

別の定義をしない限り、本書に使用する技術用語および科学用語はいずれも、本発明が属する技術分野の専門家に理解されるのと同じ意味を有する。全般に、本書に使用する命名法は当分野において知られ、普通に使用されるものである。

【0017】

本願において、単数形の記載は、対象が単数である場合および複数である場合の両方を意味する。

【0018】

一態様において、本発明は、ヒトアンジオポエチン2に特異的に結合し、Tie2活性化を誘導する、抗体またはその抗原結合フラグメントに関し、ここで、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号115のアミノ酸、配列番号116のアミノ酸、または配列番号117のアミノ酸に結合する。

【0019】

配列番号115のアミノ酸は、配列番号1のアミノ酸336~353に対応し、配列番号116のアミノ酸は、配列番号1のアミノ酸289~299に対応し、配列番号117のアミノ酸配は、配列番号1のアミノ酸316~322に対応する。

【0020】

本書において、用語「Ang2に特異的に結合する抗体」は、Ang2に結合し、その結果Ang2の生物学的活性を阻害する抗体をさし、「抗Ang2抗体」、「Ang2結合抗体」と互換的に使用される。

【0021】

本書において「抗体」は、特定の抗原に対し免疫学的に反応性の免疫グロブリン分子であり、抗原を特異的に認識する受容体としてはたらくタンパク質分子を意味し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（単クローン抗体）、全抗体、および抗体フラグメントのいずれをも包含しうる。さらに、抗体は、キメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）および二価または二重特異性分子（例えば二重特異性抗体）、ディアボディ、トリアボディおよびテトラボディを包含しうる。

【0022】

全抗体は、2つの完全長軽鎖および2つの完全長重鎖を有し、各軽鎖が重鎖にジスルフィド結合により連結されうるという構造を有する。全抗体はIgA、IgD、IgE、IgMおよびIgGを包含し、IgGはサブタイプであり、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を包含する。

【0023】

本開示において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒトおよびマウスのAng2に結合しうる。

【0024】

10

20

30

40

50

抗体フラグメントとは、抗原結合機能を維持するフラグメントを意味し、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、s c F v、およびF v等を包含する。

【0025】

F a bは、軽鎖および重鎖の可変領域、ならびに軽鎖定常領域および重鎖第1定常領域 ( C H 1 ドメイン ) の構造を有し、1つの抗原結合部位を有する。F a b'は、重鎖 C H 1 ドメイン C 末端に1つまたはそれ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域を有する点で、F a bと異なる。F ( a b' )<sub>2</sub>抗体は、F a b'のヒンジ領域のシステイン残基がジスルフィド結合することによって形成される。

【0026】

F v ( 可変フラグメント ) とは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域のみを有する最小の抗体フラグメントをいう。二本鎖 F v ( d s F v ) においては、重鎖可変領域および軽鎖可変領域がジスルフィド結合によって連結される。一本鎖 F v ( s c F v ) においては、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、一般に、ペプチドリンカーを用いる共有結合によって連結される。これら抗体フラグメントは、タンパク質分解酵素を用いて得ることができ ( 例えば、F a bは、全抗体をパパインで限定切断することによって得ることができ、F ( a b' )<sub>2</sub>フラグメントはペプシンによる切断によって得ることができる )、また、組換え DNA 技術によって作製することができる ( 例えば、抗体重鎖またはその可変領域をコードする DNA および軽鎖またはその可変領域をコードする DNA を鋳型として用い、プライマー対を用いる、PCR ( ポリメラーゼ連鎖反応 ) 法による増幅、および、両端に重鎖またはその可変領域および軽鎖またはその可変領域をそれぞれ連結させるように、プライマー対のペプチドリンカーをコードする DNA を組み合わせた増幅 ) 。

【0027】

本開示において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト化されうる。好ましくは、本発明の抗 A n g 2 抗体は、ヒト抗体ライブラリーから選択される完全ヒト抗体でありうるが、それに限定されない。

【0028】

本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号4のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、配列番号5のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3を含む重鎖可変領域；および配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号7のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、配列番号8のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3を含む軽鎖可変領域を含むことによって特徴付けられる。

【0029】

本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号13のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3を含む重鎖可変領域；および配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号17のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、配列番号18のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3を含む軽鎖可変領域を含むことによって特徴付けられる。

【0030】

本発明において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号9、19、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107または111のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および配列番号11、21、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108または112のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むことによって特徴付けられるが、それに限定されない。

【0031】

抗体のアミノ酸配列は、保存的置換によって置換されうる。「保存的置換」とは、少なくとも1つのアミノ酸の、同様の生化学的性質を有するアミノ酸による置換を含む、ポリペプチドの対応するポリペプチドへの、生物学的または生化学的機能の低下を伴わない改変をいう。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残

10

20

30

40

50

基で置換される置換をいう。同様の側鎖を有するアミノ酸残基の群は、当分野において定義されている。そのような群は、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、荷電していない極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を包含する。本発明の抗体は、保存的アミノ酸置換がなされても活性を維持することができると考えられる。

10

**【0032】**

本発明において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、受託番号 K C L R F - B P - 0 0 4 1 7 または K C L R F - B P - 0 0 4 1 8 で寄託された細胞株から産生される抗体の相補性決定領域（C D R）を含むことによって特徴付けられる。

**【0033】**

本発明の抗 A n g 2 抗体の配列は、本願において提示される配列とは異なっていてよい。例えば、アミノ酸配列は、上記に示したアミノ酸配列とは次のように異なりうる：（a）軽鎖の定常ドメインから可変領域が切り離されうる；（b）アミノ酸が上記に示したものと、該残基の化学的性質への著しい影響はないが異なりうる（いわゆる保存的置換）；（c）アミノ酸が上記に示したものと、あるパーセンテージ、例えば 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の相同性で異なりうる。あるいは、抗体をコードする核酸は、（a）軽鎖の定常ドメインから切り離されうる；（b）上記に示したものと、コードする残基を変更することなく異なりうる；または（c）上記に示したものと、あるパーセンテージ、例えば 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % の相同性で異なりうる。

20

**【0034】**

アミノ酸配列において保存的変異を導入する際、アミノ酸のハイドロパシーインデックスを考慮する。タンパク質に生物学的相互作用機能を付与する際のアミノ酸ハイドロパシーインデックスの重要性は、当分野で一般に理解されている。アミノ酸の相対的なハイドロパシーは、得られるタンパク質の二次構造に影響し、それがタンパク質と他の分子、例えば酵素、基質、受容体、D N A、抗体、抗原等との相互作用を決定付けると認識されている。

30

**【0035】**

また、同様のアミノ酸による置換は、親水性に基づいて効果的になされうることが当分野で理解されている。例えば、隣接するアミノ酸の親水性によって決まる、タンパク質の最大の局部的平均親水性が、タンパク質の生物学的性質に影響する。アミノ酸が、同様の親水性を有する他のアミノ酸で置換され、生物学的または免疫学的に改変されたタンパク質をもたらすことが理解される。そのような変異において、親水性値が  $\pm 2$  以内のアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$  以内のものが特に好ましく、 $\pm 0.5$  のものがより一層好ましい。

40

**【0036】**

上述のように、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基、例えばその疎水性、親水性、荷電性、大きさ等の相対的類似性に基づく。前記のさまざまな性質を考慮した置換の例は当業者に知られており、以下のものを包含する：アルギニンおよびリジン：グルタマートおよびアスパルテート；セリンおよびスレオニン：グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

**【0037】**

他の一態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合フラグメントを有効成分として含む医薬組成物に関する。

50

## 【 0 0 3 8 】

医薬組成物は、薬学的に有効な量の本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、および薬学的に許容しうる担体を含むことによって特徴付けられる。

## 【 0 0 3 9 】

医薬組成物は、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子（V E G F）アンタゴニストをさらに含む。一態様において、V E G Fアンタゴニストは、抗V E G F抗体、V E G F阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

## 【 0 0 4 0 】

他の一態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合フラグメントを有効成分として含む、眼疾患を予防または治療するための医薬組成物に関する。

10

## 【 0 0 4 1 】

他の一態様において、本発明は、前記医薬組成物を眼疾患患者に投与することを含む、該患者において脈絡膜血管新生を抑制する、眼血管漏出を抑制する、または同時に脈絡膜毛細血管再生を促進する方法に関する。

## 【 0 0 4 2 】

眼疾患を予防または治療するための医薬組成物は、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子（V E G F）アンタゴニストをさらに含む。V E G Fアンタゴニストは、抗V E G F抗体、V E G F阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

## 【 0 0 4 3 】

前記方法は、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与と同時に、または前後して、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子（V E G F）アンタゴニストを投与することをさらに含む。V E G Fアンタゴニストは、抗V E G F抗体、V E G F阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

20

## 【 0 0 4 4 】

抗A n g 2抗体またはその抗原結合フラグメントは、A n g 2の機能を阻害することによって異常な血管形成を抑制する機能を有し、したがって、血管異常が関与する眼疾患を予防または治療する作用を有する。

## 【 0 0 4 5 】

本書において、用語「予防する」とは、本発明の組成物の投与による、眼疾患を防ぐ、またはその進行を遅延する任意の作用をいい、用語「治療する」、「処置する」とは、眼疾患を防ぐ、軽減する、またはその発現を抑制することをいう。

30

## 【 0 0 4 6 】

本発明において、眼疾患は、滲出型加齢黄斑変性（w A M D）、糖尿病黄斑浮腫（D M E）、または糖尿病網膜症（D R）であるが、それに限定されない。

## 【 0 0 4 7 】

本書において、用語「黄斑変性」とは、血管新生が異常に増加し、それによって黄斑に損傷が起こり視力が損なわれる状態をさす。黄斑変性は主に50歳を超える年齢で起こり、非滲出型（ドライ型）または滲出型（ウェット型）に分けられる。特に滲出型のA M Dの場合、失明に至りうる。A M Dの原因は未だ解明されていないが、年齢；および喫煙、高血圧、肥満、遺伝的素因、過度のU V暴露、低い血清抗酸化物質濃度等を包含する環境的要因がリスク因子であることがわかっている。

40

## 【 0 0 4 8 】

本書において、用語「黄斑浮腫」とは、網膜の黄斑の腫脹をさし、これは網膜血管からの液体漏出によって起こる。弱い血管壁からの漏出血液が、色覚に係る神経の終末であり網膜錐体が豊富な網膜黄斑の限局域に入る。そして、中心窩右または中心窩中央への像が不鮮明となる。視力が何箇月かにわたって徐々に低下する。本書において、用語「糖尿病網膜症」とは、糖尿病により引き起こされる末梢循環障害による網膜微小循環の障害によって視力が低下する、眼の合併症をいう。初期には視力障害は軽度であるが、最終的に失明に至りうる。糖尿病網膜症は1型糖尿病または2型糖尿病のいずれの患者にも起こりう

50

る。

【0049】

本発明は、処置有効量の抗Ang2抗体、および薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物を提供する。「薬学的に許容しうる担体」とは、製剤の調製または安定化を促進するために活性成分に添加することができ、患者に顕著な有害毒性作用をもたらさない材料である。

【0050】

担体とは、患者に刺激を与えず、投与される化合物の生物学的活性および特性を阻害しない担体または希釈剤をさす。液体溶液として調製される組成物における薬学的に許容しうる担体は、無菌であり、生体に対して適当なものである。食塩液、無菌水、リンガー液、緩衝食塩液、アルブミン注射用溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールを担体として使用し得るか、またはその少なくとも1つの成分を混合して使用し得、他の通常の添加剤、例えば抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤等を必要に応じて添加し得る。さらに、組成物は、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤および滑沢剤のさらなる添加によって、注射用製剤、例えば水溶液、懸濁液、エマルジョン等、丸薬、カプセル剤、顆粒剤または錠剤に調製し得る。他の担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin) に記載されている。組成物は、少なくとも1つの抗Ang2抗体を処置有効量で含み得る。

【0051】

薬学的に許容しうる担体は、無菌水溶液または分散液、および無菌注射用溶液または分散液の用時調製用の無菌粉末を包含する。医薬活性物質にそのような媒体および物質を使用することは、当分野で知られている。組成物は好ましくは、非経口注射用に調製される。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適当な他の処方構造物として調製されうる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）およびその適当な混合物を含む溶媒または分散媒でありうる。いくつかの態様において、組成物は、等張化剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを含みうる。無菌注射用溶液は、必要量の活性化合物を、前記成分の1つまたはその組み合わせと共に適当な溶媒中に組み合わせ、その後必要に応じて滅菌マイクロ濾過することによって調製しうる。一般に、分散液は、ベースの分散媒体および前記成分から選択される他の必要成分を含む無菌ビヒクル中に活性化合物を組み合わせることによって調製される。無菌注射用溶液の調製用の無菌粉末は、活性成分粉末および任意の所望の追加成分の粉末を、予め滅菌濾過した溶液から減圧乾燥および凍結乾燥することによって得られる。

【0052】

医薬組成物は、患者の重篤度によって異なりうる用量および頻度で、経口的または非経口的に投与しうる。組成物は、必要に応じて、ボラスとして、または連続注入によって、患者に投与しうる。例えば、Fabフラグメントとして供される本発明の抗体のボラス投与は、0.0025~100mg/kg体重、0.025~0.25mg/kg、0.010~0.10mg/kg、または0.10~0.50mg/kgの量でありうる。連続注入のためには、Fabフラグメントとして供される本発明の抗体は、0.001~100mg/kg/分、0.0125~1.25mg/kg/分、0.010~0.75mg/kg/分、0.010~1.0mg/kg/分、または0.10~0.50mg/kg/分で、1~24時間、1~12時間、2~12時間、6~12時間、2~8時間、または1~2時間にわたって投与されうる。完全な定常領域を有する全長抗体として供される本発明の抗体が投与される場合、投与量は、およそ1~10mg/kg体重、2~8mg/kg、または5~6mg/kgでありうる。全長抗体は典型的には、30分間~35分間にわたる注入によって投与される。投与頻度は、状態の重篤度による。投与頻度は、毎週3回ないし1週間または2週間に1回でありうる。

【0053】

10

20

30

40

50

さらに、組成物は、皮下注射によって患者に投与されうる。例えば、投与量 10 ~ 100 mg の抗 Ang 2 抗体が、1 週間、2 週間または 1 箇月毎に、患者に皮下注射により投与されうる。

【0054】

本書において、「処置有効量」とは、医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット/リスク比で疾患を処置するのに十分な量、および抗 Ang 2 抗体の組み合わせの量を意味する。正確な量は、処置用組成物の成分および物理的性質、意図される患者集団、個々の患者について考慮すべき条件等を包含するがそれに限定されない多くの因子によって異なり得、当業者によって容易に決定され得る。それら因子をすべて考慮するとき、副作用を伴わずに最大の効果を得るのに十分な最小量を投与することが重要であり、該用量は当業者によって容易に決定され得る。

10

【0055】

本発明の医薬組成物の用量は、特に限定されず、患者の健康状態および体重、疾患重篤度、薬物の種類、投与経路ならびに投与時間を包含するさまざまな因子に応じて変更される。組成物は、ラット、マウス、ウシ、ヒト等を包含する哺乳動物において通常許容される経路で、例えば経口、直腸、静脈内、皮下、子宮内または脳血管内に、単回投与または 1 日当たりの多回投与として投与され得る。

【0056】

他の一態様において、本発明は、抗体またはその抗原結合フラグメントを活性成分として含む、癌を予防または治療するための医薬組成物に関する。

20

【0057】

他の一態様において、本発明は、前記の抗体または抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を患者に投与することを含む、患者における腫瘍増殖抑制および癌処置のための方法に関する。該方法は、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与と同時に、または前後して、化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子 (VEGF) アンタゴニストを投与することをさらに含む。VEGF アンタゴニストは、抗 VEGF 抗体、VEGF 阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤でありうる。

【0058】

本書において、用語「癌」または「腫瘍」は典型的には、制御されない細胞成長/増殖によって特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態をいう。

30

【0059】

本発明の組成物で処置することのできる癌は、特に限定されず、固形癌および血液癌の両方を包含する。そのような癌の例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、皮膚癌、皮膚または眼のメラノーマ、直腸癌、肛門癌、食道癌、小腸癌、内分泌癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、慢性または急性白血病、リンパ腫、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、結腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、頭頸部癌、脳腫瘍、骨肉腫等を包含するが、それに限定されない。

【0060】

癌を予防または治療するための組成物は抗 Ang 2 抗体を含み、その構成は、眼疾患を予防または治療するための組成物に含まれる組成と同様であり、したがってその各構成の記述は、癌を予防または治療するための組成物にも同様に適用される。

40

【0061】

本願は、本書に記載される抗 Ang 2 抗体を、化学療法もしくは放射性療法の介入または他の処置と組み合わせて使用することをも意図する。特に、抗 Ang 2 抗体を、Ang 2 の機能の異なる側面を標的とする他の処置と組み合わせることも有効であることが示され得る。

【0062】

他の一態様において、本発明の抗体は、診断または処置剤としての抗体分子の効果を高めるために、少なくとも 1 つの物質と連結されて抗体コンジュゲートを形成しうる。

50

## 【0063】

本発明の他の一態様において、本発明は抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸に関する。

## 【0064】

本書において、核酸は、細胞、細胞溶解物中に存在するものであり得、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在するものであり得る。核酸は、アルカリリノSDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当分野で知られる他の技術を包含する標準的な方法で、他の細胞成分または他の汚染物、例えば他の細胞核酸またはタンパク質から精製されているとき、「単離されている」または「実質的に純粋である」。本発明の核酸は、例えばDNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含むかまたはイントロン配列を含まないものであり得る。

10

## 【0065】

本発明の他の一態様において、本発明は、核酸を含む組換え発現ベクターに関する。

## 【0066】

抗体またはそのフラグメントの発現のために、標準的な分子生物学的技術（例えば、PCR増幅、または標的抗体を発現するハイブリドーマを用いるcDNAクローニング）によって、部分長または完全長を有する軽鎖および重鎖をコードするDNAを得ることができ、DNAを、発現ベクターに挿入されるように、転写および翻訳調節配列に「作動可能に結合」することができる。

## 【0067】

本書において、用語「作動可能に結合」するとは、抗体遺伝子がベクター中に、ベクター中の転写および翻訳調節配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節する意図される機能を持つようにライゲートされることをさしうる。発現ベクターおよび発現調節配列は、使用する発現用宿主細胞との適合性を持つように選択される。抗体の軽鎖遺伝子および抗体の重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入されるか、または同じ発現ベクターに挿入される。抗体は、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限酵素部位のライゲーション、または制限酵素部位が全く存在しない場合は、平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入される。いくつかの態様において、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードしうる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にフレームにしたがって結合するように、ベクター中にクローン化されうる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち免疫グロブリン以外のタンパク質に由来するシグナルペプチド）でありうる。さらに、組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を包含しうる。当業者は、発現ベクターのデザインは、形質転換する宿主細胞の種類、タンパク質の発現レベル等といった因子に応じた調節配列の変更によって変わりうることを認識することができる。

20

30

## 【0068】

他の一態様において、本発明は、組換え発現ベクターが導入された細胞に関する。

40

## 【0069】

本開示の抗体を生産するために使用する細胞は、原核生物、酵母、またはより高等な真核生物の細胞でありうるが、それに限定されない。

## 【0070】

特に、バチルス属の株、例えば大腸菌、枯草菌およびバチルス・チューリングェンシス（*Bacillus tuligensis*）、ストレプトミセス属の株、シュードモナス属の株（例えばシュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*））、ならびに原核生物宿主細胞株、例えばプロテウス・ミラビリス（*Proteus mirabilis*）、およびスタフィロコッカス属の株（例えばスタフィロコッカス・カルノーサス（*Staphylococcus carnosus*））を使用することができる。

50

## 【 0 0 7 1 】

動物細胞の関心が最も高く、有用な宿主細胞株の例は、以下のものを包含するが、それに限定されない：COS - 7、BHK、CHO、CHOK1、DXB - 11、DG - 44、CHO / - DHFR、CV1、COS - 7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL3A、W138、HepG2、SK - Hep、MMT、TRI、MRC5、FS4、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS - 0、U2OS、またはHT1080。

## 【 0 0 7 2 】

核酸またはベクターは、宿主細胞にトランスフェクトされる。「トランスフェクション」のために、原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞に外来核酸（DNAまたはRNA）を導入する、一般に用いられるさまざまな種類の技術、例えば電気泳動、リン酸カルシウム沈殿、DEAE - デキストラントランスフェクション、リポフェクション等を用いる。本発明の抗体は、哺乳動物細胞への適用可能性を考慮して、真核生物細胞において、好ましくは、哺乳動物宿主細胞において発現されうる。抗体の発現に適当な哺乳動物宿主細胞は、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、DHFR選択マーカーと共に用いられるdhfr - CHO細胞を包含する）、NSOミエローマ細胞、COS細胞またはSP2細胞等を包含しうる。

10

## 【 0 0 7 3 】

他の一態様において、本発明は、抗Ang2抗体またはその抗原結合フラグメントを生産する方法であって、宿主細胞を培養し、抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させることを含む方法に関する。

20

## 【 0 0 7 4 】

抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞を、抗体が宿主細胞中で発現されるのに十分な時間培養することによって、より好ましくは、抗体が宿主細胞が培養される培養培地中に分泌されるのに十分な時間培養することによって、抗体を生産しうる。

## 【 0 0 7 5 】

いくつかの態様において、発現された抗体は、宿主細胞から分離され、均一に精製される。抗体の分離または精製は、タンパク質に一般に用いられる分離方法、精製方法、例えばクロマトグラフィーによって実施されうる。クロマトグラフィーは、例えば、プロテインAカラムおよびプロテインGカラムを含む、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または疎水性クロマトグラフィーを包含しうる。クロマトグラフィーに加えて、濾過、限外濾過、塩析、透析等をさらに組み合わせて、抗体を分離および精製しうる。

30

本発明の態様をさらに記載する：

## [ 項 1 ]

ヒトアンジオポエチン2に特異的に結合しTie2活性化を誘導する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号115のアミノ酸、配列番号116のアミノ酸、または配列番号117のアミノ酸に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

## [ 項 2 ]

抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号116のアミノ酸、または配列番号117のアミノ酸に結合する、上記項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## [ 項 3 ]

抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号115のアミノ酸に結合する、上記項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## [ 項 4 ]

抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒトおよびマウスのAng2に結合する、上記項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## [ 項 5 ]

50

抗体が、ポリクローナルまたはモノクローナルである、上記項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[ 項 6 ]

抗原結合フラグメントが、s c F v または F a b である、上記項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[ 項 7 ]

抗体がヒト化されている、上記項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

[ 項 8 ]

( a ) 配列番号 3 の H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 5 の H C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖可変領域の相補性決定領域 ( C D R ) ; および

( b ) 配列番号 6 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 8 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R を含む、上記項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

[ 項 9 ]

( a ) 配列番号 1 3 の H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 4 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 1 5 の H C D R 3 アミノ酸配列を有する重鎖可変領域の相補性決定領域 ( C D R ) ; および

( b ) 配列番号 1 6 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 1 7 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 1 8 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域の C D R を含む、上記項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメントに関する。

[ 項 1 0 ]

配列番号 9、1 9、4 3、4 7、5 1、5 5、5 9、6 3、6 7、7 1、7 5、7 9、8 3、8 7、9 1、9 5、9 9、1 0 3、1 0 7 または 1 1 1 からなる群から選択される重鎖可変領域 ; および

配列番号 1 1、2 1、4 4、4 8、5 2、5 6、6 0、6 4、6 8、7 2、7 6、8 0、8 4、8 8、9 2、9 6、1 0 0、1 0 4、1 0 8 または 1 1 2 からなる群から選択される軽鎖可変領域

を含む、上記項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

[ 項 1 1 ]

受託番号 K C L R F - B P - 0 0 4 1 7 または K C L R F - B P - 0 0 4 1 8 で寄託された細胞株から産生される抗体の相補性決定領域 ( C D R ) を含む、上記項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

[ 項 1 2 ]

薬学的に有効な量の上記項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを、薬学的に許容しうる担体と共に含む医薬組成物。

[ 項 1 3 ]

化学療法に用いられる低分子阻害剤をさらに含む、上記項 1 2 に記載の医薬組成物。

[ 項 1 4 ]

血管内皮増殖因子 ( V E G F ) アンタゴニストをさらに含む、上記項 1 2 に記載の医薬組成物。

[ 項 1 5 ]

V E G F アンタゴニストが、抗 V E G F 抗体、V E G F 阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤である、上記項 1 4 に記載の医薬組成物。

[ 項 1 6 ]

患者において腫瘍増殖を抑制する方法であって、上記項 1 2 に記載の抗体または抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を患者に投与することを含む、方法。

[ 項 1 7 ]

化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子 ( V E G F ) アンタゴニストを投与することをさらに含む、上記項 1 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## [ 項 1 8 ]

VEGFアンタゴニストが、抗VEGF抗体、VEGF阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤である、上記項17に記載の方法。

## [ 項 1 9 ]

眼疾患患者において、脈絡膜血管新生を抑制する、眼血管漏出を抑制する、または同時に脈絡膜毛細血管再生を誘導する方法であって、上記項12に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、方法。

## [ 項 2 0 ]

化学療法に用いられる低分子阻害剤、または血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニストを投与することをさらに含む、上記項19に記載の方法。

10

## [ 項 2 1 ]

VEGFアンタゴニストが、抗VEGF抗体、VEGF阻害融合タンパク質、または低分子キナーゼ阻害剤である、上記項20に記載の方法。

## [ 項 2 2 ]

眼疾患が、滲出型加齢黄斑変性(wAMD)、糖尿病黄斑浮腫(DME)、または糖尿病網膜症(DR)である、上記項19に記載の方法。

## [ 項 2 3 ]

上記項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸。

## [ 項 2 4 ]

上記項23に記載の核酸を含む発現ベクター。

20

## [ 項 2 5 ]

上記項24に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞。

## [ 項 2 6 ]

上記項25に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗Ang2抗体またはその抗原結合フラグメントを生産する方法。

## 【実施例】

## 【0076】

以下、下記実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかしながら、下記実施例は単に本発明を説明するためのものであり、当業者には、本発明の範囲が実施例に限定されると解釈されるものでないことは明らかであろう。

30

## 【実施例1】

## 【0077】

マウスモノクローナル抗Ang2抗体の調製

1-1: ヒトAng2によるマウスの免疫

抗原としての使用のために、ヒトAng2(hAng2、配列番号2)の受容体結合ドメイン(RBD)を、CMVプロモーターを含むベクター中にクローン化し、HEK293F細胞株へのトランスフェクションによって一過性に発現させた。5日間のインキュベーション後、発現された組換えヒトAng2-RBDをアフィニティークラムによって精製した。精製したヒトAng2-RBD(100µg/注射)をアジュバントと混合したのものによって、5週齢のBALB/cマウスを1週間に2回、6週間にわたり免疫した。免疫したマウスの血清における抗Ang2抗体価を、hAng2 ELISAによって調べた。抗体価(1:5000希釈)が適度に上昇したら(OD>1.0)、免疫マウスから脾臓を摘出し、そこからBリンパ球を単離し、培養したミエローマ細胞(SP2/0)と融合した。融合細胞を、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むHAT培地中で培養し、そこから、ミエローマ細胞とBリンパ球の融合物のみからなるハイブリドーマ細胞を選択し、培養した。生き延びたハイブリドーマ細胞を96ウェルプレートに播種し、培養上清をhAng2 ELISAによって試験した。陽性シグナルを示したハイブリドーマのプールを、限界希釈によるクローン選別のために選択した。最終的に、約50のモノクローナルハイブリドーマ株を確立した。そのなかで、いくつかのAng2結合性抗体がTie2活性化活性を示した。Tie2活性化レベルおよびヒトAng2に対する

40

50

高親和性に基づいて候補抗体を選択し、後でヒト化のために処理した。

【 0 0 7 8 】

【 表 1 】

ヒトアンジオポエチン2全長(hAng2)および受容体結合ドメイン(RBD)配列

ヒトアンジオポエチン2全長(配列番号1)		
MMQIVFFTLSCDLVLAAYNNFRKSMDSIGKKQYQVQHGSCSYTFLLPEM	50	
DNCRSSSSPYVSNVQRDAPLEYDDSVQRLQVLENI MENNTQWLMKLENY	100	10
IQDNMKKEMVEIQQNAVQNQTAVMIEIGTNLLNQTAEQTRKLTDEVAQVL	150	
NQTTRELEQLLEHSLSTNKLEKQILDQTSSEINKLQDKNSFLEKKVLAMED	200	
KHI IQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSIIEELEKKIVTATVNNSVLQKQQHD	250	
LMETVNNLLTMMSTNSAKDPTVAKEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTL	300	
<u>TFPNSTEEIKAYCDMEAGGGWTIIQRREDGSDVDFQRTWKEYKVGFGNPS</u>	350	
<u>GEYWLGNEFVSQLTNQORYVLK IHLKDWEAGNEAYSLYEHFYLSSSEELNYR</u>	400	20
<u>IHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFSTKDGNDKICKCSQMLTGGWDFDAC</u>	450	
<u>GPSNLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKATTMMIRPADF</u>	496	
ヒトアンジオポエチン2受容体結合ドメイン(RBD)(配列番号2)		
EEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFPNSTEEIKAYCDMEAGGGWTII	50	
QRREDGSDVDFQRTWKEYKVGFGNPSGEYWLGNEFVSQLTNQORYVLK IHL	100	
KDWEAGNEAYSLYEHFYLSSSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFST	150	
KDGNDKICKCSQMLTGGWDFDACGPSNLNGMYYPQRQNTNKFNGIKWY	200	30
YWKGSGYSLKATTMMIRPADF	221	

【 0 0 7 9 】

1 - 2 : マウスモノクローナル抗Ang2抗体の生産および精製

ELISA陽性反応に基づいて選択した抗Ang2抗体を生産するために、ハイブリドーマ細胞を、T75フラスコ(面積75cm<sup>2</sup>)において10%FBS含有DMEM(ダルベッコ改変イーグル培地)中で培養した。細胞コンフルエンスが約90%に達したら、細胞をPBSで洗い、50mlの無血清培地(SFM, Gibco)と共にインキュベートし37℃で3日間培養した。その後、各モノクローナルハイブリドーマから抗体が分泌された培養培地を収集し、遠心分離によって細胞を除去し、培養上清を収集し、濾過した。次いで、抗体を、プロテインGアフィニティークラム(GE Healthcare)を備えるAKTA精製デバイス(GE Healthcare)を用いて精製した。遠心フィルターユニット(Amicon)を用いて上清をPBSで置換することにより、精製した抗体を濃縮した。

【 0 0 8 0 】

1 - 3 : Tie2受容体活性化抗Ang2抗体の同定およびスクリーニング

マウス抗Ang2抗体が内皮細胞においてTie2受容体の下流シグナル伝達を誘導するかを調べるために、HUVEC(Lonza)をhAng2タンパク質と抗Ang2抗体の組み合わせで処理し、Tie2受容体の主要な下流シグナル伝達タンパク質であるAkt

10

20

30

40

50

のリン酸化レベルを、免疫ブロッティングにより分析した。陰性対照群として、全長 h A n g 2 ( R & D systems ) 単独で細胞を処理した。

【 0 0 8 1 】

具体的には、H U V E C (  $1 \times 10^5$  細胞 / m l ) を、6 0 m m 培養皿において E G M - 2 培地 ( Lonza ) 中で 3 7 °C で培養した。細胞 ( 9 0 % のコンフルエンス ) を、血清飢餓のために、無血清 E B M - 2 培地と共に 4 時間インキュベートした。血清飢餓 H U V E C を抗 A n g 2 抗体と h A n g 2 タンパク質 (  $1 \mu\text{g} / \text{m l}$ 、R & D system ) の混合物で処理し、さらに 3 0 分間インキュベートした。細胞を冷 P B S で洗い、溶解バッファーで処理し、4 °C で 2 0 分間溶解した。次いで、 $13000 \text{ rpm}$  で 1 5 分間の遠心分離により、細胞溶解物を調製した。細胞溶解物に  $5 \times \text{SDS}$  サンプルバッファーを加え、細胞溶解物を 9 5 °C で 5 分間沸騰させた。その後、細胞溶解物を S D S P A G E に付し、タンパク質をニトロセルロース膜 ( G E ) に転写した。

10

【 0 0 8 2 】

A k t リン酸化を調べるために、プロットを 5 % スキムミルク含有 T B S - T で室温 ( R T ) で 1 時間ブロックし、抗ホスホ A k t 抗体 ( S 4 7 3 ) と共に 4 °C で約 8 時間インキュベートした。増強化学発光 ( E C L ) により、ホスホ A k t の量を可視化した。その後、膜をストリッピングバッファー ( Thermo ) 中で 1 5 分間インキュベートし、次いで抗 A k t 抗体でリプローブして、全 A k t 量を決定した。

【 0 0 8 3 】

A k t の S 4 7 3 におけるリン酸化が、h A n g 2 と抗 A n g 2 抗体、例えば 2 C 8、4 B 9、2 F 1 0 および 4 E 2 のそれぞれとの組み合わせで処理したいくつかの群において、強く誘導された ( 図 1 ) 。

20

【 0 0 8 4 】

1 - 4 : Octet 分析による、h A n g 2 に対する抗 A n g 2 抗体の親和性測定

h A n g 2 に対するマウスモノクローナル抗体の親和性を、Octet システム ( ForteBio ) を用いて測定した。具体的には、バッファーおよびサンプルを、ブラック 9 6 ウェルプレート ( 9 6 ウェル F 型ブラックプレート、Greiner ) を用いて、全量  $200 \mu\text{l} / \text{ウェル}$  で測定した。親和性測定用のバイオセンサーは、A R 2 G チップ ( ForteBio Octet ) を用いる測定前に 1 0 分間水和した。水和後、h A n g 2 を  $10 \text{ mM}$  酢酸ナトリウム、 $\text{pH } 6.0$  バッファー中に  $10 \mu\text{g} / \text{m l}$  の濃度に希釈し、A R 2 G バイオセンサー上に固定し、 $1 \text{ M}$  エタノールアミンでブロックした。マウスモノクローナル抗 A n g 2 抗体を  $1 \times$  カイネティックバッファーで  $50$ 、 $25$ 、 $12.5$ 、 $6.25$ 、 $3.125$  および  $0 \text{ nM}$  に希釈し、結合に 3 0 0 秒間、解離に 9 0 0 秒間付した。親和性測定 (  $K_D$  ) のために、結合速度 (  $K_{on}$  ) および解離速度 (  $K_{off}$  ) を結合曲線によって分析し ( グローバル )、Octet データ分析 v9.0.0.10 プログラムを用いて 1 : 1 結合モデルにフィットさせた。  $K_D$  値を下記の表 2 に示す。h A n g 2 に対するマウス抗 A n g 2 抗体の親和性を表 2 に示す。

30

【 0 0 8 5 】

40

50

## 【表 2】

hAng2に対するマウス抗Ang2抗体の親和性

抗体	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
2C8	7.78E+04	3.54E-06	4.55E-11
2F10	1.24E+05	1.71E-05	1.38E-10
4B9	1.37E+05	5.04E-07	3.68E-12
4E2	2.83E+04	1.34E-04	4.74E-09

10

## 【実施例 2】

## 【0086】

マウス抗Ang2抗体のDNA遺伝子配列分析

実施例 1 - 3 において選択した抗体（ハイブリドーマ細胞由来）のDNAヌクレオチド配列を分析した。具体的には、ハイブリドーマ細胞（ $2 \times 10^6$  細胞/ml）を 10% FBS 含有 DMEM 中で培養し、その後、RNeasy ミニキット（Qiagen）を用いて全 RNA を得た。その後、RNA 濃度を測定し、逆転写（RT）反応によって cDNA を合成した。各ハイブリドーマ細胞において産生されたモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の変領域遺伝子配列を増幅するために、前記 cDNA を鋳型とし、マウス Ig プライマーセット（Novagen）を使用して、以下の条件下に PCR を行った：94 °C に 1 分間、50 °C に 1 分間、72 °C に 2 分間を 35 サイクル；72 °C に 6 分間；4 °C に冷却。各反応から得た PCR 産物を TA ベクター中にクローン化し、DNA シーケンシングに付し、それによって、各抗体の CDR、重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を得た（表 3 ~ 10）。

20

## 【0087】

## 【表 3】

マウス抗 Ang2 抗体 4B9 の CDR 配列

抗体	CDR 配列		
4B9	重鎖 CDR 配列		
	CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
	DYYMY (配列番号 3)	TISVGGSFYYPDSVKG (配列番号 4)	DWGLFPWFVY (配列番号 5)
	軽鎖 CDR 配列		
	CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
	KASQDVSTAVA (配列番号 6)	WASTRHT (配列番号 7)	QQHYSTPPT (配列番号 8)

40

## 【0088】

50

【表 4】

マウス抗 Ang2 抗体 4B9 の可変領域配列

抗体	可変領域配列
4B9	<p>重鎖可変領域配列</p> <p>EVQLVDSGGGLVFPGGSLKLSCAASGFTFSD<b>DFYHY</b>WVRQTPERLEWV<b>ATISVGGSFITYP</b></p> <p><b>DSVKG</b>RFTISRDNAKNNLYLQMSLKSEDTAMYYCARD<b>WGLRPWFYY</b>WGQGLVTVSA</p> <p>(配列番号 9)</p> <p>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT</p> <p>CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTGAAGTATTACATGTATTGGGTTCGCCAGACTCC</p> <p>GGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCCCAACCATTAGTGTGGTGGTAGTTTCACCTACTATCCA</p> <p>GACAGTGTGAAGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGC</p> <p>AAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGACTGGGGATT</p> <p>ACGACCCTGGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA</p> <p>(配列番号 10)</p>
	<p>軽鎖可変領域配列</p> <p>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSLTCK<b>ASQDVSTAVA</b>WYQQKPGQSPKLLIY<b>ASTRHT</b>GVDPDR</p> <p>FTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYC<b>QQHYSTPPT</b>FGSGTKLEIK</p> <p>(配列番号 11)</p> <p>GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCA</p> <p>TCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGG</p> <p>GCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCAGACTGGAGTCCCTGATCGC</p> <p>ITCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAG</p> <p>ACCTGGCACTTTATTACTGTGACCAACATTATAGCACTCCTCCACGTTCCGCTCGGGGAC</p> <p>AAAGTTGGAAATAAAA</p> <p>(配列番号 12)</p>

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

50

【表 5】

マウス抗 Ang2 抗体 208 の CDR 配列

抗体	CDR 配列		
208	重鎖 CDR 配列		
	CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
	SYWMH	MIDPSDSEYRLNGKFKD	RFYYGSDWYFDV
	(配列番号 13)	(配列番号 14)	(配列番号 15)
	軽鎖 CDR 配列		
	CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
KASQDWGTAVA	VASTRHT	QQYSSYPLT	
(配列番号 16)	(配列番号 17)	(配列番号 18)	

10

【 0 0 9 0 】

20

30

40

50

【表 6】

マウス抗 Ang2 抗体 2C8 の可変領域配列

抗体	可変領域配列
2C8	<p>重鎖可変領域配列</p> <p><u>QVQLQQSGPQLVRFPGASVKISCKRSGYSFTSYWHH#VVKQRPGQGLEWIGHIDPSDSEIRLN</u>  <u>QKFKDKASLTVDKSSSTAYNQLSSPTSGDSAVYYCARRFYYGSDWYFDVWGAGSTVTVSS</u></p> <p>(配列番号 19)</p> <p>CAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGCTCAGCTGGTTAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATAT  CCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCAACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCC  TGGACAAGGTCTTCAGTGGATTGGCATGATTGATCCTCCGATAGTGAAACTAGGTTAAAT  CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCTCATTGACTGTAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC  AACTCAGCAGCCCACATCTGGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGTTTTTACTA  CGGGTCGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGTCCACGGTCACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 20)</p>
	<p>軽鎖可変領域配列</p> <p><u>DIYMTQSHKFMSTSVGDRVSI</u><u>TKASQDVGTAVAVYQOKPGQSPKLLIYWASTRHITGYPDR</u>  <u>PTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGSGTKLEIK</u></p> <p>(配列番号 21)</p> <p>GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCA  TCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG  TCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCTGATCC  TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAG  ACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCTCTCAGGTTCCGGCTCGGGGAC  AAAGTTGAAATAAAA (配列番号 22)</p>

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

50

【表 7】

マウス抗 Ang2 抗体 2F10 の CDR 配列

抗体	CDR 配列		
2F10	重鎖 CDR 配列		
	CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
	DYTYMY (配列番号 23)	TINDGGSYTYYPDSVEG (配列番号 24)	DWGLRPFVY (配列番号 25)
	軽鎖 CDR 配列		
	CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
	KASQDVSTAVA (配列番号 26)	WASTRHT (配列番号 27)	QQHYTTPPT (配列番号 28)

10

【 0 0 9 2 】

20

30

40

50

【表 8】

マウス抗 Ang2 抗体 2F10 の可変領域配列

抗体	可変領域配列
2F10	重鎖可変領域配列
	<p data-bbox="406 385 1265 421">QVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDY<del>YHY</del>WIRQTPEKRL<del>EW</del>VATINDGGSY<del>ITP</del></p> <p data-bbox="406 443 1222 479">DSYKGRFTISRDN<del>AK</del>NNLYLQMS<del>SL</del>KSEDTAMYVCARDVGLRPN<del>VE</del>YWGQGTLVTVSA</p> <p data-bbox="435 497 616 533">(配列番号 29)</p> <p data-bbox="406 604 1265 640">GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT</p> <p data-bbox="406 658 1265 694">CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGA<del>CT</del>AFTACATGTATTGGATTGCCAGACTCC</p> <p data-bbox="406 712 1265 748">GGAAAAGAGGCTGGAGTGGTTCGCAACCATTAAATGATGGTGGTAGTTACACCTACTATCCA</p> <p data-bbox="406 766 1265 801">GACAGTGTGAAGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGC</p> <p data-bbox="406 819 1265 855">AAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGA<del>GA</del>CTGGGGATT</p> <p data-bbox="406 873 1139 909">ACGACCCTGGTTTGT<del>TT</del>ACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA</p> <p data-bbox="435 927 616 963">(配列番号 30)</p>
	軽鎖可変領域配列
<p data-bbox="406 1034 1265 1070">DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI<del>TC</del>KASQDVSTAVAN<del>Y</del>Q<del>Q</del>KPGGSPKLLIYVASTRIHTGV<del>PDR</del></p> <p data-bbox="406 1093 1054 1128">FTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYFCQ<del>Q</del>HY<del>TT</del>PTPGSGTKLEIK</p> <p data-bbox="435 1146 616 1182">(配列番号 31)</p> <p data-bbox="406 1254 1265 1290">GACATTGTGATGACCCAGTCTCACA<del>AA</del>TTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCA</p> <p data-bbox="406 1308 1265 1344">TCACCTGCAAGGCCAGTCAAGATGTGAGTACTGCIGTAGCCTGGTATCAACAAAA<del>ACC</del>AGG</p> <p data-bbox="406 1361 1265 1397">GCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCC</p> <p data-bbox="406 1415 1265 1451">TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAG</p> <p data-bbox="406 1469 1265 1505">ACCTGGCACTTTATTACTGTGAGCAACATTATACCACTCCTCCACGTTCCGGCTCGGGGAC</p> <p data-bbox="406 1523 855 1559">AAAGTTGAAAATAAAA (配列番号 32)</p>	

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

50

【表 9】

マウス抗 Ang2 抗体 4E2 の CDR 配列

抗体	CDR 配列		
4E2	重鎖 CDR 配列		
	CDRH1-KABAT	CDRH2-KABAT	CDRH3-KABAT
	GYNMN (配列番号 33)	NIDPYYGGTSYNQKFKG (配列番号 34)	YGNVVDY (配列番号 35)
	軽鎖 CDR 配列		
	CDRL1-KABAT	CDRL2-KABAT	CDRL3-KABAT
	KASQDVSTAVA (配列番号 36)	WASIRHT (配列番号 37)	QQHYNTPTI (配列番号 38)

10

【 0 0 9 4 】

20

30

40

50

【表 1 0】

マウス抗 Ang2 抗体 4E2 の可変領域配列

抗体	可変領域配列
4E2	重鎖可変領域配列
	<p>BVQLQQSGPELEKPGASVETISCKASGYSFTGYNNWVKQSNGLSLEWIGHIDPTYYGGTSYN</p> <p><u>QKFKG</u>KATLIVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCVR<u>YGNVYDY</u>WGQGTTLTVSS</p> <p>(配列番号 39)</p> <p>CAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTCAGTGAAGATATCCTGCA</p> <p>AGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCAATGGAAA</p> <p>GAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTTACTATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAG</p> <p>TTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCAGCCTACATGCAGCTCA</p> <p>AGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGGTATGGTAACTACGTGGA</p> <p>CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (配列番号 40)</p>
	軽鎖可変領域配列
	<p>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAVYQQKPGQSPKLLIYVASTRHITGVPDR</p> <p>FTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYCC<u>QHYNTP</u>TFGSGTKLEIK (配列番号</p> <p>41)</p> <p>GACATTGTGATGACCCAGTCCCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCA</p> <p>TCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCAGG</p> <p>GCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC</p> <p>TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAG</p> <p>ACCTGGCACTTTATTACTGTGACGCAACATTATAACACTCCTCCACGTTCCGGCTCGGGGAC</p> <p>AAAGTTGAAATAAAA (配列番号 42)</p>

10

20

30

【実施例 3】

【0095】

hAng2 に対するマウス抗 Ang2 抗体のエピトープマッピング

マウスモノクローナル抗体 2C8 および 4B9 によって認識される hAng2 の抗原決定基 (エピトープ) を、HDX-MS (水素/重水素交換質量分析) 法により分析した。HDX-MS 分析法は、下記文献に記載されている: Houde D, Engen JR (2013) Methods Mol. Biol. 988: 269-89 および Houde et al. (2011) J. Pharm. Sci. 100 (6), 2071.

【0096】

抗体 2C8 および 4B9 のエピトープを分析するために、組換え hAng2-RBD タンパク質を用いた。重水素標識反応の前に、hAng2-RBD / 抗体混合物を、15 倍希釈重水素標識バッファの存在下に最大結合 (100%) に維持されるように、3 時間

40

50

以上インキュベートした ( $K_D = 25 \text{ nM}$ )。調製した hAng2 - RBD / 抗体複合体を重水素標識バッファーで15倍希釈し、さまざまな時間で標識し、その後、同体積のクエンチングバッファーでクエンチした。標識反応時間は、0分間(重水素なし)、0.33分間、10分間、60分間および240分間であった。しかしながら、重水素なしの条件においては、重水素標識バッファーを平衡バッファーで置き換え、反応を直ちにクエンチングバッファーで停止させた。質量分析のために、重水素標識した hAng2 - RBD / 抗体サンプルをペプシンカラムにロードし、ペプチド消化を行った。質量分析により、hAng2 - RBDのN末端の13ペプチド、および25~40アミノ酸に対応する消化ペプチドは全く検出されないことが示され、全部で45の消化ペプチドからカバー率83.7%のデータが得られた。

10

## 【0097】

hAng2 - RBD単独およびhAng2 - RBD - 抗体複合体の条件の間の重水素取り込みの差を比較分析した。重水素取り込みの有意な低下を示す領域は、抗体が直接結合しているペプチドであるか、または構造的に変化した領域である。hAng2 - RBD単独とhAng2 - RBD - 抗体複合体との間の重水素取り込みの差が0.5~1Daまたはそれ以上であるとき、有意と見なした。

## 【0098】

重水素取り込みの差の分析により、抗体2C8が結合するエピトープは、hAng2 - RBDの配列番号2の残基61~78: QRTWK EYKVGFGNPSGEY(配列番号115)であり(表11)、抗体4B9が結合するエピトープは、配列番号2の残基14~24: KSGHTTNGIYT(配列番号116)、および配列番号2の残基41~47: EAGGGGW(配列番号117)である(表12)ことが示された。抗体4B9の場合、未決定領域(配列番号2の残基25~40)がエピトープの範囲に含まれる可能性を排除できない。各抗体に対するエピトープ分析結果は、PyMolソフトウェアを用いて作製されたhAng2 - RBDの3次元構造において異なる色で示される(図2)。

20

## 【0099】

30

40

50

## 【表 1 1 - 1】

HDX-MS による、hAng2 への 2C8 結合のエピトープマッピング分析

hAng2-RBD への 2C8 の結合				
残基 (配列番号 2)	暴露時間 (分)	相対取り込み (Da)		
		<b>hAng2-RBD 単独</b>	<b>hAng2-RBD + 2C8</b>	<b>Δ</b>
52-60	0.00	0.79	0.64	0.15
52-60	0.33	1.36	1.14	0.21
52-60	10.00	1.92	1.51	0.41
52-60	60.00	2.10	1.96	0.14
52-60	240.00	2.35	2.28	0.08
61-77	0.00	1.23	1.15	0.08
<b>61-77*</b>	0.33	2.93	1.75	<b>1.18</b>
<b>61-77*</b>	10.00	4.71	2.93	<b>1.78</b>
<b>61-77*</b>	60.00	5.16	3.80	<b>1.36</b>
<b>61-77*</b>	240.00	5.53	4.22	<b>1.31</b>
61-78	0.00	1.27	1.21	0.06
<b>61-78*</b>	0.33	3.01	1.87	<b>1.15</b>

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

61-78*	10.00	4.77	2.97	1.80
61-78*	60.00	5.22	3.90	1.33
61-78*	240.00	5.59	4.25	1.34
67-77	0.00	0.85	0.96	-0.12
67-77*	0.33	2.13	1.24	0.89
67-77*	10.00	3.09	1.51	1.58
67-77*	60.00	3.26	2.05	1.21
67-77*	240.00	3.53	2.46	1.07
67-78	0.00	1.12	0.82	0.30
67-78*	0.33	2.39	1.44	0.95
67-78*	10.00	3.30	1.64	1.66
67-78*	60.00	3.48	2.15	1.33
67-78*	240.00	3.72	2.68	1.04
78-84	0.00	0.59	0.59	0.00
78-84	0.33	0.69	0.70	-0.01
78-84	10.00	0.71	0.69	0.01
78-84	60.00	0.83	0.73	0.11
78-84	240.00	1.07	0.72	0.36

【 0 1 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

HDX-MS による、hAng2 への 4B9 結合のエピトープマッピング分析

hAng2-RBD への 4B9 の結合				
残基 (配列番号 2)	暴露時間 (分)	相対取り込み (Da)		
		hAng2-RBD 単独	hAng2-RBD + 4B9	Δ
14-23	0.00	0.80	0.55	0.25
<b>14-23*</b>	0.33	1.31	0.97	<b>0.34</b>
<b>14-23*</b>	10.00	2.21	1.38	<b>0.83</b>
<b>14-23*</b>	60.00	2.27	1.49	<b>0.78</b>
<b>14-23*</b>	240.00	2.26	1.66	<b>0.60</b>
14-24	0.00	0.77	0.76	0.01
<b>14-24*</b>	0.33	1.59	1.27	<b>0.33</b>
<b>14-24*</b>	10.00	3.25	1.75	<b>1.50</b>
<b>14-24*</b>	60.00	3.40	2.05	<b>1.35</b>
<b>14-24*</b>	240.00	3.41	2.61	<b>0.80</b>
41-47	0.00	0.30	0.16	0.15
<b>41-47*</b>	0.33	1.22	0.20	<b>1.02</b>
<b>41-47*</b>	10.00	1.35	0.43	<b>0.92</b>
<b>41-47*</b>	60.00	1.69	0.54	<b>1.15</b>
<b>41-47*</b>	240.00	1.80	0.61	<b>1.18</b>
47-60	0.00	1.01	0.96	0.05
47-60	0.33	1.81	1.94	-0.13
47-60	10.00	2.47	2.53	-0.06
47-60	60.00	2.68	2.69	-0.01
47-60	240.00	2.95	3.06	-0.11

## 【実施例 4】

## 【0102】

マウス抗 Ang2 抗体のヒト化および全長 IgG 変換

マウス抗 Ang2 抗体 2C8 および 4B9 をヒトに投与する際の免疫原性を低下するために、抗体を次のようにヒト化した。

## 【0103】

4-1: 重鎖のヒト化

IGHV1-46-01 は、抗体 2C8 の重鎖配列と 64% の相同性を示すヒト抗体重鎖可変遺伝子であった。この分析に基づいて、2C8 抗体の CDR 領域をヒト抗体重鎖可

10

20

30

40

50

変遺伝子IGHV1-46-01に挿入した。このプロセスにおいて、5つのヒト化重鎖抗体遺伝子をデザインした(表13)。ヒト化2C8の重鎖遺伝子に、表13のタンパク質配列中に太字で示すマウス配列への復帰変異を導入した。

【0104】

IGHV3-11-01は、抗体4B9の重鎖配列と80%の相同性を示すヒト抗体重鎖可変遺伝子であった。この分析に基づいて、4B9抗体のCDR領域をヒト抗体重鎖可変遺伝子IGHV3-11-01に挿入した。その結果、このプロセスにおいて、3つのヒト化重鎖抗体遺伝子をデザインした(表13)。ヒト化4B9の重鎖遺伝子に、表13のタンパク質配列中に太字で示すマウス配列への復帰変異を導入した。

【0105】

4-2: 軽鎖のヒト化

IGKV1-9-01は、抗体2C8の軽鎖配列と67%の相同性を示すヒト抗体軽鎖可変遺伝子であった。この分析に基づいて、2C8抗体のCDR領域をヒト抗体軽鎖可変遺伝子IGHV1-9-01に挿入した。このプロセスにおいて、3つのヒト化軽鎖抗体遺伝子をデザインした(表13)。ヒト化2C8の軽鎖遺伝子に、表13のタンパク質配列中に太字で示すマウス配列への復帰変異を導入した。

【0106】

IGKV1-39-01は、抗体4B9の軽鎖配列と70%の相同性を示すヒト抗体軽鎖可変遺伝子であった。この分析に基づいて、4B9抗体のCDR領域をヒト抗体軽鎖可変遺伝子IGHV1-39-01に挿入した。このプロセスにおいて、1つのヒト化軽鎖抗体遺伝子をデザインした(表13)。

【0107】

4-3: ヒト化遺伝子合成およびヒト全長IgG抗体へのクローニング

表15の抗体のヒト化可変領域を、ヒトIgG1抗体の重鎖および軽鎖ベクター中に組み込んだ。抗体のヒト化重鎖可変領域(VH)に対応するコーディングヌクレオチドは、「EcoRI-シグナル配列-VH-NheI-CH-XhoI」からなるように、Bioneer, Inc.によって合成された。抗体のヒト化軽鎖可変領域(VL)に対応するコーディングヌクレオチドは、「EcoRI-シグナル配列-VL-BsiWI-CL-XhoI」からなるように、Bioneer, Inc.によって合成された。全長ヒトIgG抗体発現用のベクターを作製するためにEcoRIおよびXhoIを用いて、重鎖をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ、OptiCHO(商標)抗体発現キット(Invitrogen)に含まれるpOptiVEC(商標)-TOPO TAクローニングキットのベクターにクローン化し、軽鎖をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ、pcDNA(商標)3.3-TOPO TAクローニングキット(Invitrogen)のベクターにクローン化した。2C8H11および4B9H11のヒトIgG4クラスの抗体(それぞれ、2C8H11G4および4B9H11G4と称する)の作製のためには、2C8H11重鎖遺伝子および4B9H11重鎖遺伝子の定常領域(CH1-ヒンジ-CH2-CH3)を、IgG4クラス重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドに置き換えた。

【0108】

10

20

30

40

50

【表 13 - 1】

マウス 4B9 および 2C8 抗体に由来するヒト化抗 Ang2 抗体

抗体	抗体配列 (VH)	抗体配列 (VL)
	(タンパク質配列) QVQLVESGGGLVFPGGSLRLSCAASGF TFSDYMYWIRQAPGKGLEWVSIISYG GSPTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNGLRPWFVY WGQGLVTVSS (配列番号 43)	(タンパク質配列) DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASD DVSTAVAWYQKPKKLLIYWASTR HIGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQOHYSTPPTFGQGTKVEIK (配列番号 44)
4B9H11	(コーディングヌクレオチド配列) CAGGTACAGCTCGTGGAGTCTGGTGGGA GGCTTGGTGAACCTGGAGGGTCCCTG AGACTTAGCTGTGCAGCTCCGGCTTC ACATTTTCAGACTATTATATGTATTGG ATCAGACAGGCTCCCGGAAGGGCTTG GAGTGGGTTTCAACCATTAGTGTGGC GGATCTTTTACTTACTACCCAGACAGT GTGAAGGGGAGATTCACAATCTCCAGG GATAACGGGAAAAACAGCCTGTATCTC CAAATGAATAGCCTGAGAGCGAAGAT ACCGCCGTGTACTACTIGGCCAGAGAC TGGGGATTACGGCCCTGGTTCGTGTAC TGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTC TCCTCA (配列番号 45)	(コーディングヌクレオチド配列) GACATCCAGATGACACAGTCCCCAAGC TCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGG GTGACCATCACTTGTAAAGCCTCACAG GATGTTTCTACTGCTGTCCATGGTAC CAGCAAAAGCCGGTAAAGCTCCCAAG CTTTTGATATACTGGGCAGCACCAGG CACACAGGCGTCCATCAAGATTCAGT GGGTCCGGATCCGGCACGGATTTTACA CTCACTATTAGCTCACTGCAACCTGAA GACTTTGCCACCTATTACTGCCAGCAG CATTATAGCACCCCTCCACCTTCGGT CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA (配列番号 46)

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF  <u>TFSDYYMYWRQAPGKGLEWVSTISVG</u>  <u>GSEFTYYPDSVKGFRFTISRDAKNSLYL</u>  <u>QMN<del>SL</del>RAEDTAVYYCARDWGLRPFVY</u>  WGGTLVTVSS</p> <p>(配列番号 47)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQ  <u>DVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYWASTR</u>  <u>HTGVPSRPSGSGSGTDPTLTISSLQPE</u>  DFATYYCQGHYSTPPTFGGGTKVEIK</p> <p>(配列番号 48)</p>	10
4B9H21	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTCCAGCTGGTGGAAATCCGGGGA  GGCTTGGTGAAGCCTGGAGGCAGCCTA  AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGCTTC  ACCTTCTCTGACTATTACATGTATTGG  GTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCTC  GAGTGGGTTTCAACAATTAGTGTAGGT  GGAAGCTTCACTACTATCCTGACTCC  GTGAAAGGAAGATTACGATCTCTAGG  GATAATGCCAAGAACTCACTGTACCTT  CAGATGAACAGCCTGAGAGCGGAGGAC  ACAGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAT  TGGGGATTAAGACCCTGGTTTGTAT  TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC  TCCTCA</p> <p>(配列番号 49)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGATGACACAGTCCCAAGC  TCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGG  GTGACCATCACTTGTAAAGGCTCACAG  GATGTTTCTACTGCTGTGGCATGGTAC  CAGCAAAAGCCGGTAAAGCTCCCAAG  CTTTTGATATACTGGCCAGCACCAGG  CACACAGGCGTGCCATCAAGATTCAGT  GGGTCCGGATCCGGCAGGATTTTACA  CTCACTATTAGCTCACTGCAACCTGAA  GACTTTGCCACCTATTACTGCCAGCAG  CATTATAGCACCCCTCCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 50)</p>	20
4B9H31	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF  <u>TFSDYYMYWRQAPGKGLEWVAISVG</u></p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQ  <u>DVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYWASTR</u></p>	30

40

50

【表 1 3 - 3】

	<u>GSFTYYPDSVEGRFTISRDN</u> <u>AEENSLYL</u> <u>QMNSLRAEDTAVYYCARDWGLRPFVY</u> <u>WGQGLLTVSS</u> (配列番号 51)	<u>HTGVPSRPSGSGSGTDFTLTISSLOPE</u> <u>DFATYYCQQHYSTPPTFGQGTKVEIK</u> (配列番号 52)
	(コーディングヌクレオチド 配列) CAGGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGA GGCTTGGTGAAACCTGGGGGTCCTG AGACTCTCTGTGCAGCCTCCGGCTTT ACCTTTCTGACTACTACATGTATTGG GTTCGCCAGGCTCCCGTAAGGGGTTA GAGTGGGTGGCTACCATTAGTGTGGC GGTTCAATTACTTATTACCCAGATAGT GTGAAAGGACGGTTCACCATCAGCAGG GACAATGCAAAGAACTCACTCTATCTA CAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGAT ACAGCGGTGTATTACTGCGCCAGAGAT TGGGGACTTCGACCATGGTTCGTCTAC TGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC TCCTCA (配列番号 53)	(コーディングヌクレオチド 配列) GACATCCAGATGACACAGTCCCCAAGC TCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACCGG GTGACCATCACTTGTAAAGGCCTCACAG GATGTTCTACTGCTGTGGCATGGTAC CAGCAAAAGCCGGTAAAGCTCCCAAG CTTTTGATATACTGGGCCAGCACCAGG CACACAGGCGTCCCATCAAGATTCAGT GGGTCCGGATCCGGCACGGATTTTACA CTCACTATTAGCTCACTGCAACCTGAA GACTTTGCCACCTATTACTGCCAGCAG CATTATAGCACCCCTCCACCTTCGGT CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA (配列番号 54)
2C2H11	(タンパク質配列) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY</u> <u>TFTSYWMHWVRQAPGQGLEWGMIDPS</u> <u>DSEIRLNQRFKDRVTMRDTSSTSTVYM</u> <u>ELSSLRSEDTAVYYCARRFYYSWYF</u> <u>DYWGQGLLTVSS</u>	(タンパク質配列) <u>DIQLTQSPSFLSASVGRVTITCKASQ</u> <u>DVGTAVAVYQQKPGKAPKLLIYWASTR</u> <u>HTGVPSRPSGSGSGTEPTLTISSLOPE</u> <u>DFATYYCQQYSSYPLTIFGQGTKVEIK</u> (配列番号 56)

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

	(配列番号 55)	
	(コーディングヌクレオチド配列) CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGAGCT GAGGTAAAAAGCCCGGCCAGTGTG AAGGTTAGTTGCAAGGCTCTGGATAC ACCTTCACAAGCTATTGGATGCACTGG GTGGGACAAGCTCCTGGGCAGGGGCTT GAGTGGATGGGAATGATCGACCCATCC GATTCAGAACTAGGCTCAACCAGAAA TTCAAAGATAGAGTGACTATGACCAGG GACACCTCCACGAGCAGTCTACATG GAATTGTCAAGCCTGCCCTCTGAGGAC ACAGCCGTGTACTATTGTGCAAGACGG TTTTACTATGGTAGCGATTGGTACTTT GATGTTTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTC ACCGTCTCTCA (配列番号 57)	(コーディングヌクレオチド配列) GACATACAGTTGACCCAGTCTCCTTCC TTCCTGTCCGCTCCGTGGGCGATAGA GTTACCATTACTTGCAAAGCTAGTCAG GACGTGGGTACCGCAGTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCTAAG CTCCTGATCTACTGGGCATCAACCGG CACACAGGGGTCCCAAGCAGGTTTCT GGCAGCGGATCAGGAACCGAATTTACA CTGACGATCTOGTCTCTGCAGCCCGAG GATTTGGCTACTTACTACTGTCAACAA TATAGTAGCTATCCCCTCACTTTCCGT CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA (配列番号 58)
2C8H21	(タンパク質配列) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY SFTSYWMHWVROAPGGLEWIGMIDPS DSEIRLNQEKDRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARREYYGSDWYE DYWGQGLVTVSS (配列番号 59)	(タンパク質配列) DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQ DVGTAVAWYQQKPKAPKLLIYWASTR HTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DFATYYCOQYSSYPLTFGGGTKVEIK (配列番号 60)

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 5】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTCGTGCAGTCTGGAGCT  GAAGTGAAGAAACCCGGGCTCAGTG  AAGGTGAGTTGCAAAGCATCTGGGTAC  TCATTTACCAGCTATTGGATGCACDGG  GTGGCGCAGGCCCCAGGACAAAGGCCTG  GAGTGGATTGGCATGATCGACCCCTCC  GATAGTGAAACGAGGCTGAACCAGAAG  TTTAAAGATCGCGTCACCATGACCAGG  GACACAAGTACTTCTACAGTCTACATG  GAGTTGAGCAGCCTGAGATCAGAGGAC  ACAGCCGTTTACTACTGTGCTAGACGA  TTCTATTATGGCAGCGACTGGTATTTT  GATGTATGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 61)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATACAGTTGACCCAGTCTCCTTCC  TTCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGA  GTTACCATTACTTGCAAAGCTAGTCAG  GACGTGGGTACCGCAGTGGCCTGGTAT  CAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCTAAG  CTCCTGATCTACTGGGCATCAACCGG  CACACAGGGGTCCCAAGCAGGTTTTCT  GGCAGCGGATCAGGAACCGAATTTACA  CTGACGATCTCGTCTCTGCAGCCCGAG  GATTTGCTACTTACTACTGTCAACAA  TATAGTAGCTATCCCTCAGTTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 62)</p>
2C8H31	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  <u>SFTSYWMMHWVRQAPGQGLEWIGMIDPS</u>  <u>DSETRLNQRKFKASMTTRDTSTSTVYM</u>  <u>ELSSLRSEDTAVYYCARRFYTGSDWYE</u>  <u>DVWGQGLVTVSS</u></p> <p>(配列番号 63)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCKASQ  <u>DVGTAVAWYQQKPKAPELLIYWASTR</u>  <u>HIGVPSRFRSGSGGTFTLTISLQPE</u>  <u>DFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKVEIK</u></p> <p>(配列番号 64)</p>

10

20

30

40

50

【表 13 - 6】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTGGTGCAGTCTGGTGCT  GAGGTGAAGAAACCAGGCGCTTCAGTC  AAGGTAAGCTGCAAGCAAGTGGATAC  TCCTTCACCTCTTATTGGATGCACTGG  GTTAGACAGGCCCTGGTCAAGGCCTC  GAGTGGATTGGCATGATCGACCCCTCT  GACAGCGAAACTAGGCTGAATCAGAAA  TTTAAGGACAAGGCTCCATGACACGG  GATACATCCACAAGCACCCTTTACATG  GAACTGAGCTCGCTGAGAAGTGAGGAC  ACTGCGTGTATTACTGTGCGAGACGC  TTTTATTACGGGTCAGATTGGTACTTC  GATGTGTGGGGCCAGGGAACDCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 65)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATACAGTTGACCCAGTCTCCTTCC  TTCCTGTCCGCTCCGTGGGCGATAGA  GTTACCATTACTTGCAAAGCTAGTCAG  GACGTGGGTACCGCAGTGGCCTGGTAT  CAGCAGAAACCAGGTAAGCCCTAAG  CTCCTGATCTACTGGGCATCAACACGG  CACACAGGGGTCCCAAGCAGGTTTCT  GGCAGCGGATCAGGAACCGAATTTACA  CTGACGATCTCGTCTCTGCAGCCCGAG  GATTTGCTACTTACTACTGTCAACAA  TATAGTAGCTATCCCCTCACTTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 66)</p>	10
2C8H41	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  SFTSYWMHWVKQAPGGGLEWIGMIDPS  DSETRLNQQEKDKASMTDRDSTSTVYM  ELSSLRSEDTAVYYCARREYYGSDWYF  DYWGQGLVTVSS</p> <p>(配列番号 67)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGRVTITCKASQ  DVGTAVANVYQQKPGKAPKLLIYWASTR  HTGVPSRPSGSGGTEPTLTISSLQPE  DFATYYCQQYSSYPLTFGGGTKEIK</p> <p>(配列番号 68)</p>	30

40

50

【表 1 3 - 7】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCT  GAGGTGAAAAAGCCAGGCGCTTCCGTC  AAAGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTAC  TCTTTTACAAGCTATTGGATGCACTGG  GTGAAGCAGGCCCGGACAAGGCCTC  GAGTGGATTGGCATGATCGATCCTCC  GATAGTGAAACACGCTTGAATCAGAAA  TTCAAGGACAAGGCCAGTATGAOCAGG  GATACTAGCACAAGCACIGTATATATG  GAGCTTAGCTCACTGAGATCAGAAGAC  ACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGACGG  TTTTACTATGGCTCCGACTGGTATTTC  GACGTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 69)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATACAGTTGACCCAGTCTCCTTCC  TTCCTGTCCGCCTCCGTGGGGGATAGA  GTTACCATTACTTGCAAAGCTAGTCAG  GACGTGGGTACCCGAGTGGCCTGGTAT  CAGCAGAAAACCAGGTAAAGCCCTAAG  CTCCTGATCTACTGGGCATCAACACGG  CACACAGGGGTCCCAAGCAGGTTTTCT  GGCAGCGGATCAGGAACCGAATTTACA  CTGACGATCTCGTCTCTGCAGCCCGAG  GATTCGCTACTTACTACTGTCAACAA  TATAGTAGCTATCCCTCACTTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAAATCAAA</p> <p>(配列番号 70)</p>
2C8H51	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  SPTSYWMHIVKQAPGGLEWIGMIDPS  DSEIRLNQKFEKASLTVDTSSTVYM  ELSSLRSEDTAVYYCARREYYGSDWYF  D<del>V</del>WGGTLVTSS</p> <p>(配列番号 71)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGD<del>R</del>VITCKASQ  D<del>V</del>GTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR  HTGVPSRFRSGSGSTEFTLTISLQPE  DFATYYCQQYSSYPLT<del>F</del>GGGTRVEIK</p> <p>(配列番号 72)</p>

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 8】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCT  GAGGTGAAGAAACCTGGGGCTCAGTG  AAGGTTTCCTGTAAAGCAAGTGGATAC  TCTTTCACCCAGCTACTGGATGCACTGG  GTGAAACAGGCCCGCCGCAAGGGCTT  GAGTGGATTGGTATGATCGATCCATCC  GACAGCGAAACTAGGCTCAACCAGAAG  TTCAAGGATAAAGCGTCTTGACAGTA  GATACATCCACGAGCACAGTTTATATG  GAGCTGTCTAGTCTGCGGTCTGAAGAC  ACCGCGGTGTATTATTGCGCTAGACGC  TTTTATTACGGCTCGGACTGGTACTTT  GACGTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 73)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATACAGTTGACCCAGTCTCCTTCC  TTCCTGTCCGCCCTCCGTGGGCGATAGA  GTTACCATTACTTGCAAAGCTAGTCAG  GACGTGGGTACCCGAGTGGCCTGGTAT  CAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCTAAG  CTCCTGATCTACTGGGCATCAACACGG  CACACAGGGGTCCCAAGCAGGTTTTCT  GGCAGCGGATCAGGAACCGAATTTACA  CTGACGATCTCGTCTCTGCAGCCCGAG  GATTCGCTACTTACTACTGTCAACAA  TATAGTAGCTATCCOCTCACTTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 74)</p>
2C8H12	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  TFTSYWMHWVRQAPGQGLEWVGMIDPS  DSEIRLNQKPKDRVTMTRDTSTSTVYM  ELSSLRSEDTAVYYCARREYFGSDWYF  DVGQGTLLVTYSS</p> <p>(配列番号 75)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQ  DVGTAVAWYQQKPKAPKLLIYWASTR  HTGVDPRESGSGSGTEFTLTISLSLOPE  DFATYYQQYSSYPLIFGQGTREVEIK</p> <p>(配列番号 76)</p>

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 9】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGAGCT  GAGGTAAAAAGCCCGGCCAGTGTG  AAGGTTAGTTGCAAGGCCTCTGGATAC  ACCTTCACAAGCTATTGGATGCACTGG  GTGCGACAAGCTCCTGGGCAGGGCTT  GAGTGGATGGGAATGATCGACCCATCC  GATTCAGAACTAGGCTCAACCAGAAA  TTCAAAGATAGAGTGACTATGACCAGG  GACACCTCCACGAGCACAGTCTACATG  GAATTGTCAAGCCTGCGCTCTGAGGAC  ACAGCCGTGTACTATTGTGCAAGAGGG  TTTTACTATGGTAGCGATTGGTACTTT  GATGTTTGGGGCCAGGGAACCOCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 77)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GATATTCAACTCACCCAGAGTCCATCC  TTCTGTCTGCCTCAGTGGGCGACAGA  GTGTCAATCACATGCAAGGCAAGCCAG  GATGTTGGCACTGCTGTGGCTTGGTAT  CAGCAAAAACCAGGTAAGGCCCCAAA  CTGCTTATTTACTGGGCATCAACCCCG  CACACGGGTGTCCCGACAGGTTTCAGC  GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTTACC  CTGACTATCAGCTCCCTGCAGCCTGAA  GACTTTGCCACTTATTACTGTGAGCAG  TACTCTAGCTATCCTCTCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAAATCAAAA</p> <p>(配列番号 78)</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>2C8H22</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  <u>SFTSYWVHWVRQAPGGLEWIGMIDPS</u>  <u>DSETRLNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYM</u>  <u>ELSSLRSEDTAVYYCARREYYGSDWYF</u>  DYNQGGLVTVSS</p> <p>(配列番号 79)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQ  <u>DVGTAVANWYQKPKGKAPLLIYWASTR</u>  <u>HIGVPDRFSGSGSTEFTLTISSLQPE</u>  DEATVYCCQYSSYPLTFGGGTKVEIK</p> <p>(配列番号 80)</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 13 - 10】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTCGTGCAGTCTGGAGCT  GAAGTGAAGAAAACCGGGGCCTCAGTG  AAGGTGAGTTGCCAAAGCATCTGGGTAC  TCATTTACCAGCTATTGGATGCACTGG  GTGCGGCAGGCCCCAGGACAAGGCCTG  GAGTGGATTGGCATTGATCGACCCCTCC  GATAGTGAACGAGGCTGAACCAGAAG  TTTAAAGATCGCGTCACCATGACCAGG  GACACAAGTACTTCTACAGTCTACATG  GAGTTGAGCAGCCTGAGATCAGAGGAC  ACAGCCGTTTACTACTGTGCTAGACGA  TTCTATTATGGCAGCGACTGGTATPFC  GATGTATGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 81)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GATATTCAACTCAGCCAGAGTCCATCC  TTCCTGTCTGCCTCAGTGGGCGACAGA  CTGTCAATCAGATGCAAGGCAAGCCAG  GATGTTGGCACTGCTGTGGCTTGGTAT  CAGCAAAAACCAGGTAAGGCCCCCAAA  CTGCTTATTACTGGGCATCAACCCGG  CACACGGGTGTCCCGACAGGTTCCAGC  GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTTACC  CTGACTATCAGCTCCCTGCAGCCTGAA  GACTTTGCCACTTATTACTGTGACGAG  TACTCTAGCTATCCTCTCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 82)</p>
<p>2C8H32</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QWQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  SFTSYWMHWVRQAPGGLEWIGMIDPS  DSEIRLNQKFKDKASMTTRDTSTSTVYM  ELSSLRSEDTAVYYCARREYVGSRWYF  DVMGGGTLVTVSS</p> <p>(配列番号 83)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQ  DVGTAFAVWYQQKPGKAPKLLIYFASR  HIGVDPDRFSGSGSTEFTLTISSLOPE  DFATYYCQQYSSYPLTFGGGTKVEIK</p> <p>(配列番号 84)</p>

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 1】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTGGTGCAGTCTGGTGCT  GAGGTGAAGAAACCAGGCGCTTCAGTC  AAGGTAAGCTGCAAAGCAAGTGGATAC  TCCTTCACCTCTTATTGGATGCACTGG  GTTAGACAGGCCCTGGTCAAGGCCTC  GAGTGGATTGGCATGATCGACCCCTCT  GACAGCGAAACTAGGCTGAATCAGAAA  TTTAAGGACAAGGCCTCCATGACACGG  GATACATCCACAAGCACCGTTACATG  GAACTGAGCTCGCTGAGAAAGTGAAGAC  ACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGC  TTTTATTADGGGTCAGATTGGTACTTC  GATGTGTGGGGCCAGGGAACCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 85)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GATATTCAACTCAGCCAGAGTCCATCC  TTCTGTCTGCCTCAGTGGGCGACAGA  GTGTCAATCACATGCAAGGCAAGCCAG  GATGTGGCACTGCTGTGGCTTGGTAT  CAGCAAAAACCAGGTAAGGCCCCCAAA  CTGCTTATTTACTGGGCATCAACCCGG  CACACGGGTGTCCCGACAGGTTACGC  GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTTACC  CTGACTATCAGCTCCCTGCAGCCTGAA  GACTTTGCCACTTATTACTGTCAGCAG  TACTCTAGCTATCCTCTCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 86)</p>	10
2C8H42	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  <u>SPTSYWHHWVKQAPGQGLEWIGMIDPS</u>  <u>DSEIRLNQKPKDKASMTDRDTSTSTVYM</u>  ELSSLRSEDTAVYYCARRFYYGSDWYF  D<del>Y</del>WGQGLVTVSS</p> <p>(配列番号 87)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGD<del>R</del>VSITCKASQ  <u>DVGTAVAWYQQKPKAPKLLIYWASTR</u>  <u>HTGV<del>P</del>DRFSGSGSGTEPTLTIS<del>S</del>LQPE</u>  DFATYYCQ<del>Q</del>YSSYPLT<del>F</del>GGTKVEIK</p> <p>(配列番号 88)</p>	30

40

50

【表 1 3 - 1 2】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCT  GAGGTGAAAAAGCCAGGCGCTTCCGTC  AAAGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTAC  TCTTTTACAAGCTATTGGATGCACTGG  GTGAAGCAGGCCCCCGGACAAGGCTC  GAGTGGATTGGCATGATCGATCCTTCC  GATAGTGAAACACGCTTGAATCAGAAA  TTCAAGGACAAGGCCAGTATGACCAGG  GATACTAGCACAAAGCACTGTATATATG  GAGCTTAGCTCACTGAGATCAGAAGAC  ACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGACGG  TTTTACTATGGCTCCGACTGGTATTTT  GACGTCTGGGGCCAGGGAACCTCGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 89)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GATATTCAACTCACCCAGAGTCCATCC  TTCCTGTCTGCCTCAGTGGGCGACAGA  GTGTCAATCACATGCAAGGCAAGCCAG  GATGTTGGCACTGCTGTGGCTTGGTAT  CAGCAAAAACCAGGTAAGGCCCCCAAA  CTGCTTATTTACTGGGCATCAACCCGG  CACACGGGTGTCCCGACAGGTTACGC  GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTTACC  CTGACTATCAGCTCCCTGCAGCCTGAA  GACTTTGCCACTTATTACTGTCAGCAG  TACTCTAGCTATCCTCTCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCANA</p> <p>(配列番号 90)</p>	10
2C8H52	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGY  <u>SPTSYWMHVVEQAPGQGLEWIGMIDPS</u>  <u>DSETRLNQRKFKDKASLTVDTSSTVYM</u>  <u>ELSSLRSEDTAVYYCARREYYGSDWYE</u>  <u>DVWGQGLVTVSS</u></p> <p>(配列番号 91)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQ  <u>DVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTR</u>  <u>HIGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISSLOPE</u>  <u>DFATYYCQQYSSYFLTPGQGTKVEIK</u></p> <p>(配列番号 92)</p>	30

40

50

【表 1 3 - 1 3】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCT  GAGGTGAGAGAACCTGGGGCTCAGTG  AAGGTTTCCTGTAAAGCAAGTGGATAC  TCTTTCACCAGCTACTGGATGCACTGG  GTGAAACAGGCCCGCCGCAAGGGCTT  GAGTGGATTGGTATGATCGATCCATCC  GACAGCGAAACTAGGCTCAACCAGAAG  TTCAAGGATAAAGCGTCTTGACAGTA  GATACATCCACGAGCACAGTTTATATG  GAGCTGTCTAGTCTGCGGTCTGAAGAC  ACCGCCGTGTATTATTGCGCTAGACGC  TTTTATTACGCTCGGACTGGTACTTT  GACGTCTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 93)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GATATTCAACTCAGCCAGAGTCCATCC  TTCCTGTCTGCCTCAGTGGGCGACAGA  GTGTCAATCACATGCAAGGCAAGCCAG  GATGTTGGCACTGCTGTGGCTTGGTAT  CAGCAAAAACCAGGTAAGGCCCCCAAA  CTGCTTATTTACTGGGCATCAACCCGG  CACACGGGTGTCCCCGACAGGTTTCAGC  GGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTTACC  CTGACTATCAGCTCCCTGCAGCCTGAA  GACTTTGCCACTTATTACTGTCAGCAG  TACTCTAGCTATCCTCTCACCTTCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAAA</p> <p>(配列番号 94)</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>2C8H13</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKEKPGASVKVCSCKASGY  TFTSYWMHWVRQAPGQGLBWMGMIDPS  DSETRLNQEKEKDRVTMTRDTSTSTWYM  ELSSLRSEDTAVVYCARRFYTGSDWYF  DYWGQGLVTVSS</p> <p>(配列番号 95)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSELSASVGD<del>RV</del>SITCKASQ  DVGTA<del>V</del>AVNYQKPKGKAPKLLIYWASTR  HTGVPDRPSSGSGTEFTLTIS<del>SL</del>QPE  DFADYFCQQYSSYPLIFGQGTKVEIK</p> <p>(配列番号 96)</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 1 3 - 1 4】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGAGCT  GAGGTAAAAAAGCCCGGCCAGTGTG  AAGGTTAGTTGCAAGGCTCTGGATAC  ACCTTCACAAGCTATTGGATGCACTGG  GTGCGACAAGCTCCTGGCCAGGGGCTT  GAGTGGATGGGAATGATCGACCCATCC  GATTCAGAAACTAGGCTCAACCAGAAA  TTCAAAAGATAGAGTGACTATGACCAGG  GACACCTCCACGAGCACAGTCTACATG  GAATTGTCAAGCCTGCGCTCTGAGGAC  ACAGCCGTGTACTATTGTGCAAGACGG  TTTTACTATGGTAGGATTGGTACTTT  GATGTTTGGGGCCAGGGAACCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 97)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGTTGACCCAATCACCATCC  TTCTGTCTGCCTCTGTGGGAGATAGA  GTCTCCATTACTTGCAAGGCCAGTCAG  GATGTGGGGACCGCTGTTCCTGGTAC  CAGCAAAAACCCGAAAGGCACCTAAA  CTCCTTATCTACTGGGCATCCACCCGG  CACACAGGAGTGCCAGACAGGTTTAGC  GGGTCAGGCTCTGCTACAGAGTTCCT  CTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAA  GACTTCGCTGATTATTTCTGTGACGAG  TATAGCAGTTACCCCTCAGGTTGGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 98)</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>2C8H23</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGY  SFTSYNHVWRQAPGGGLEWIGMIDPS  DSEIRLNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYM  ELSSLRSEDTAVVYCARREYFGSDWYF  DWWGGGLVTVSS</p> <p>(配列番号 99)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQ  DVGTAVAWYQQKPKGKPKLLIYWASTR  HTGVDPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPE  DFADYFCQQYSSYPLTIPGGGKVEIK</p> <p>(配列番号 100)</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 13 - 15】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTCGTGCAGTCTGGAGCT          GAAGTGAAGAAACCCGGGCTCAGTG          AAGGTGAGTTGCAAAGCATCTGGGTAC          TCATTTACCAGCTATTGGATGCACTGG          GTGCGGCAGGCCCCAGGACAAGGCCTG          GAGTGGATTGGCATGATCGACCCCTCC          GATAGTGAAACGAGGCTGAACCAGAAG          TTTAAAGATCGCGTCACCATGACCAGG          GACACAAGTACTTCTACAGTCTACATG          GAGTTGAGCAGCCTGAGATCAGAGGAC          ACAGCCGTTTACTACTGTGCTAGACGA          TTCTATTATGGCAGCGACTGGTATTTT          GATGTATGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC          ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 101)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGTTGACCCAATCACCATCC          TTTCTGTCTGCCTCTGTGGGAGATAGA          GTCTCCATTACTTGCAAGGCCAGTCAG          GATGTGGGGACCGCTGTTGCCTGGTAC          CAGCAAAAACCCGGAAAGGCACCTAAA          CTCCTTATCTACTGGGCATCCACCCGG          CACACAGGAGTGCCAGACAGGTTTAGC          GGGTCAGGCTCTGGTACAGAGTTCACT          CTGACAATTTCTAGCCTGCAGCCTGAA          GACTTCGCTGATTATTTCTGTCAGCAG          TATAGCAGTTACCCDCTCAGGTTCCGT          CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 102)</p>
<p>2C8H33</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY  <u>SFTSYW<del>HH</del>VVRQAPGQGLEWIGMIDPS</u>  <u>DSETRLNQRKEDKASNTRDTSSTVYM</u>  <u>ELSSLRSDTAVYYCARREYYGSDWYF</u>  <u>DVWGQGLVTVSS</u></p> <p>(配列番号 103)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSELSASVGDVRSITCKASQ  <u>DVGTAVAVYQQRPGKAPKLLIYWASTR</u>  <u>HTGWPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE</u>  <u>DFADYFCQQYSSYPLTFGGGTKVEIK</u></p> <p>(配列番号 104)</p>

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1 6】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAACTGGTGCAGTCTGGTGCT  GAGGTGAAGAAACCAGGGCTTCAGTC  AAGGTAAGCTGCAAAGCAAGTGGATAC  TCCTTCACCTCTTATTGGATGCACTGG  GTTAGACAGGCCCTGGTCAAGGCCTC  GAGTGGATTGGCATGATGACCCCTCT  GACAGCGAAACTAGGCTGAATCAGAAA  TTTAAGGACAAGGCCTCCATGACACGG  GATACATCCACAAGCACCGTTTACATG  GAACTGAGCTCGCTGAGAAGTGAGGAC  ACTGCCGTGTATTACTGTGGAGAGCGC  TTTTATTACGGGTCAGATTGGTACTTC  GATGTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 105)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGTTGACCCAATCACCATCC  TTTCTGTCTGCCTCTGTGGGAGATAGA  GTCTCCATTACTTGCAAGGCCAGTCAG  GATGTGGGGACCGCTGTTGCCTGGTAC  CAGCAAAAACCCGGAAAGGCACCTAAA  CTCCTTATCTACTGGGCATCCACCCGG  CACACAGGAGTGCCAGACAGGTTTAGC  GGGTCAGGCTCTGGTACAGAGTTCCT  CTGACAA<del>TT</del>TCTAGCCTGCAGCCTGAA  GACTTCGCTGATTATTTCTGTGAGCAG  TATAGCAGTTACCCCTCAGGTTGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 106)</p>
<p>2C8H43</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKYSCKASGY  SFTSYMMHWKQAPGGLEWIGHIDFS  DSE<del>TRLNQRDKAS</del>MTRDTSTSTVYK  ELSSLRSEDAVYYCARREYYGSDWYF  D<del>V</del>WGQGLVTVSS</p> <p>(配列番号 107)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGD<del>R</del>VSITCKASQ  DVGTA<del>V</del>AWYQKPGKAPKLLIYWASTR  HIGVPDRFSGSGSGTEFTLTIS<del>S</del>LQPE  DFADYFCQQYSSYPLTFGQGT<del>R</del>VBIK</p> <p>(配列番号 108)</p>

10

20

30

40

50

【表 13 - 17】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCT  GAGGTGAAAAAGCCAGGGCTTCCGTC  AAAAGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTAC  TCTTTTACAAGCTATTGGATGCACTGG  GTGAAGCAGGCCCGGACAAGGGCTC  GAGTGGATTGGCATGATCGATCCTTCC  GATAGTGAAACACGCTTGAATCAGAAA  TTCAAGGACAAGGCCAGTATGACCAGG  GATACTAGCACAGCACTGTATATATG  GAGCTTAGCTCACTGAGATCAGAAGAC  ACGGCCGTGTACTACTGTGGGAGACGG  TTTTACTATGGCTCCGACTGGTATTTT  GACGTCTGGGGCCAGGGAAACCTGGTC  ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 109)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGTTGACCCAATCACCATCC  TTTCTGTCTGCCTCTGTGGGAGATAGA  GTCTCCATTACTTGCAAGGCCAGTCAG  GATGTGGGGACCGCTGTTGCCTGGTAC  CAGCAAAAACCCGGAAAGGCACCTAAA  CTCCTTATCTACTGGGCATCCACCCGG  CACACAGGAGTGCCAGACAGGTTTAGC  GGGTCAGGCTCTGGTACAGAGTTCACT  CTGACAATTCTAGCCTGCAGCCTGAA  GACTTCGCTGATTATTTCTGTGAGCAG  TATAGCAGTTACCCCTCAGGTTCCGGT  CAGGGCACTAAAGTAGAAATCAAA</p> <p>(配列番号 110)</p>	10
2C8H53	<p>(タンパク質配列)</p> <p>QVQLVQSGAEVKEKPGASVKVSKASGY  SFTSYWMMHWVKQAPGQGLEWIGMIDFS  DSE<del>TLN</del>QKFE<del>DKAS</del>LTVD<del>TST</del>STVYM  ELSSLRSEDTAVYYCARRE<del>VY</del>YGS<del>DW</del>YF  D<del>V</del>W<del>Q</del>GT<del>L</del>V<del>T</del>VSS</p> <p>(配列番号 111)</p>	<p>(タンパク質配列)</p> <p>DIQLTQSPSFLSASVGD<del>R</del>PSIT<del>CK</del>ASQ  D<del>V</del>GT<del>A</del>V<del>A</del>WYQ<del>K</del>PK<del>A</del>PK<del>L</del>L<del>I</del>Y<del>W</del>AST<del>R</del>  HTGV<del>F</del>DR<del>F</del>SGSGSGTE<del>F</del>TLTISSLQPE  DFADY<del>F</del>C<del>Q</del>QYSSY<del>P</del>L<del>T</del>FG<del>Q</del>GT<del>K</del>VE<del>L</del>K</p> <p>(配列番号 112)</p>	30

40

50

【表 1 3 - 1 8】

	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCT</p> <p>GAGGTGAAGAAOCTGGGGCCTCAGTG</p> <p>AAGGTTTCTGTAAAGCAAGTGGATAC</p> <p>TCTTTCACCAGCTACTGGATGCACTGG</p> <p>GTGAAACAGGCCCGCCAGGGCTT</p> <p>GAGTGGATTGGTATGATCGATCCATCC</p> <p>GACAGOGAACTAGGCTCAACCAGAAG</p> <p>TTCAGGATAAAGCGTCCTTGACAGTA</p> <p>GATACATCCACGAGCACAGTTTATATG</p> <p>GAGCTGTCTAGTCTGCGGTCTGAAGAC</p> <p>ACCGCOGTGTATTATTGCGCTAGACGC</p> <p>TTTTATTACGGCTCGGACTGGTACTTT</p> <p>GACGTCTGGGCCAGGGAACCCCTGGTC</p> <p>ACCGTCTCCTCA</p> <p>(配列番号 113)</p>	<p>(コーディングヌクレオチド配列)</p> <p>GACATCCAGTTGACCCAATCACCATCC</p> <p>TTTCTGTCTGCCTCTGTGGCAGATAGA</p> <p>GTCTCCATTACTTGAAGGCCAGTCAAG</p> <p>GATGTGGGGACCGCTGTGCCTGGTAC</p> <p>CAGCAAAAACCCGGAAAGGCACCTAAA</p> <p>CTOCTTATCTACTGGGCATCCACCCGG</p> <p>CACACAGGAGTGCCAGACAGGTTTAGC</p> <p>GGGTCAGGCTCTGGTACAGAGTTCACT</p> <p>CTGACAATTTCTAGCCCTGCAGCCTGAA</p> <p>GACTTCGCTGATTATTTCTGTCAGCAG</p> <p>TATAGCAGTTACCCCTCAGCTTCGGT</p> <p>CAGGGCCTAAAGTAGAAATCAAAA</p> <p>(配列番号 114)</p>
--	--	---

10

20

【 0 1 0 9】

30

4 - 4 : ヒト化抗 A n g 2 抗体の生産および精製

ヒト化抗 A n g 2 抗体を生産するために、組換えタンパク質を高効率で産生することができる E x p i 2 9 3 F ( Gibco ) 細胞を使用した。 E x p i 2 9 3 F 細胞 ( 2 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / m l ) をエルレンマイヤーフラスコ中で培養し、重鎖および軽鎖をコードするプラスミドを、ExpiFectamine 293トランスフェクションキットを用いて E x p i 2 9 3 F 細胞に同時トランスフェクトした。細胞を振盪インキュベーター ( オービタルシェーカー、1 2 5 r p m ) 内で、3 7 %、8 % C O <sub>2</sub> にて5日間培養した。培養した培地を収集し、遠心分離して細胞を除去した。分泌された抗体を含む培養上清を分離し、4 ℃ で貯蔵するか、または直ちに、アフィニティーカラム ( プロテイン A アガロースカラム、GE Healthcare ) を備える AKTA 精製システム ( GE Healthcare ) を用いて精製した。精製した抗体を、0 . 2 μ m タンパク質遠心式フィルター ( Amicon ) に通して濃縮し、溶液を P B S で置換した。

40

【実施例 5】

【 0 1 1 0】

h A n g 2 に対するヒト化抗 A n g 2 抗体の親和性測定

h A n g 2 に対するヒト化抗 A n g 2 抗体の親和性を、Octetシステム ( ForteBio ) を用いて測定した。具体的には、バッファーおよびサンプルを、ブラック 9 6 ウェルプレート ( 9 6 ウェル F 型ブラックプレート、Greiner ) を用いて、全量 2 0 0 μ l / ウェルで測定した。親和性測定用のバイオセンサーは、A R 2 G チップ ( ForteBio Octet ) を用いる測定前に 1 0 分間水和した。水和後、ヒト化抗 A n g 2 抗体を 1 0 m M 酢酸ナトリウム

50

、pH 6.0 バッファー中に  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈し、AR2G バイオセンサー上に固定し、1 M エタノールアミンでブロックした。組換え hAng2 を  $1 \times$  カイネティック バッファーで 50、25、12.5、6.25、3.125 および 0 nM に希釈し、結合に 300 秒間、解離に 900 秒間付した。親和性測定 ( $K_D$ ) のために、結合速度 ( $K_{on}$ ) および解離速度 ( $K_{off}$ ) を結合曲線によって分析し (グローバル)、Octet データ分析 v9.0.0.10 プログラムを用いて 1 : 1 結合モデルにフィットさせた。 $K_D$  値を下記の表 14 ~ 15 に示す。

【0111】

hAng2 に対するヒト化 4B9 抗体の親和性を表 14 に示す。hAng2 に対するヒト化 2C8 抗体の親和性を表 15 に示す。さらに、IgG4 クラスの 2C8H11G4 および 4B9H11G4 抗体も、hAng2 抗原に対しナノモル以下の高い親和性を示した (表 16)。

【0112】

【表 14】

hAng2に対するヒト化4B9抗体の親和性

抗体	$K_{on}$ (1/Ms)	$K_{dis}$ (1/s)	$K_D$ (M)
4B9H11	9.29E+04	1.58E-06	1.71E-11
4B9H21	7.37E+04	8.94E-06	1.21E-10
4B9H31	9.39E+04	1.56E-05	1.67E-10

【0113】

10

20

30

40

50

## 【表 1 5】

hAng2に対するヒト化2C8抗体の親和性

抗体	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
2C8H11	6.60E+04	1.40E-05	2.12E-10
2C8H21	1.11E+05	1.50E-05	1.35E-10
2C8H31	8.32E+04	2.21E-05	2.66E-10
2C8H41	6.70E+04	1.67E-05	2.49E-10
2C8H51	7.02E+04	9.61E-06	1.37E-10
2C8H12	9.52E+04	1.33E-05	1.39E-10
2C8H22	5.96E+04	6.84E-06	1.15E-10
2C8H32	7.57E+04	1.49E-05	1.97E-10
2C8H42	8.06E+04	3.07E-05	3.81E-10
2C8H52	8.19E+04	1.99E-05	2.43E-10
2C8H13	1.13E+05	2.77E-05	2.46E-10
2C8H23	7.95E+04	2.28E-05	2.87E-10
2C8H33	8.96E+04	3.99E-06	4.45E-11
2C8H43	7.11E+04	2.65E-05	3.73E-10
2C8H53	8.09E+04	3.11E-05	3.84E-10

## 【 0 1 1 4】

## 【表 1 6】

hAng2に対するIgG4クラス2C8H11G4および4B9H11G4抗体の親和性

抗体	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
2C8H11G4	4.15E+05	4.35E-06	1.05E-11
4B9H11G4	4.32E+05	3.46E-05	8.00E-11

## 【実施例 6】

## 【 0 1 1 5】

選択したヒト化抗Ang2抗体のインビトロ生物学的性質の分析

## 6 - 1 : Aktリン酸化

ヒト化抗Ang2抗体が内皮細胞においてTie2受容体の下流シグナル伝達を誘導するかを調べるために、HUVEC(Lonza)をAng2タンパク質とヒト化抗Ang2抗体とで処理した。その後、Tie2受容体の主要な下流シグナル伝達タンパク質であるAktのリン酸化のレベルを、免疫プロットングにより測定した。本試験において、Akt

t 活性化の程度を比較するために、細胞を、完全長 h A n g 2 ( R & D systems ) 単独、または抗体単独で処理した。

【 0 1 1 6 】

具体的には、60 mm 培養皿において H U V E C 細胞 (  $1 \times 10^5$  細胞 / m l ) を E G M - 2 ( Lonza ) 中で 37 °C で培養した。コンフルエンス 90% の細胞を E B M - 2 ( Lonza ) と共に 4 時間インキュベートした。血清飢餓 H U V E C を、抗 A n g 2 抗体と h A n g 2 タンパク質 (  $1 \mu\text{g} / \text{m l}$ 、R & D system ) の混合物で処理し、さらに 30 分間インキュベートした。細胞を冷 P B S で洗い、溶解バッファーで処理し、4 °C で 20 分間溶解した。次いで、 $13000 \text{ r p m}$  で 15 分間の遠心分離により細胞溶解物を調製した。細胞溶解物に  $5 \times \text{S D S}$  サンプルバッファーを加え、混合物を 95 °C で 5 分間沸騰させた。その後、混合物を S D S - P A G E、次いでウエスタンブロッティングに付した。

10

【 0 1 1 7 】

A k t のリン酸化を調べるために、膜を 5% スキムミルク含有 T B S T で R T で 1 時間ブロックし、抗ホスホ A k t 抗体 ( S 4 7 3 ) と共に 4 °C で約 8 時間インキュベートした。増強化学発光 ( E C L ) によって、ホスホ A k t の量を可視化した。次いで、膜をストリッピングバッファー ( Thermo ) 中で 15 分間インキュベートし、その後、抗 A k t 抗体でリプローブして全 A k t の量を決定した。

【 0 1 1 8 】

図 3 に示すように、4 B 9 H 1 1 および 2 C 8 H 1 1 処理群のいずれにおいても、A k t リン酸化は、h A n g 2 存在下の抗 A n g 2 抗体  $0.5 \mu\text{g} / \text{m l}$  での処理によって顕著に増加し、 $50 \mu\text{g} / \text{m l}$  の抗体濃度まで維持された。データはヒト化抗 A n g 2 抗体は、内皮細胞において T i e 2 受容体の主要な下流シグナル伝達分子である A k t の活性化を強く誘導できることを示している。ヒト化 4 B 9 H 1 1 - または 2 C 8 H 1 1 - I g G 4 抗体を試験した場合も同様のパターンが見られた。

20

【 0 1 1 9 】

6 - 2 : ヒト化抗 A n g 2 抗体により誘導される T i e 2 リン酸化

A n g 2 は T i e 2 受容体に結合して、弱いアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する。本発明の抗 A n g 2 抗体は、A n g に結合して A n g 2 - 抗体複合体を誘導し、さらに T i e 2 受容体のクラスター形成を引き起こし、結果的に T i e 2 受容体の活性化を高める。H U V E C を用いて、T i e 2 リン酸化に対する抗 A n g 2 抗体の効果を分析する実験を行った。

30

【 0 1 2 0 】

具体的には、100 mm 培養皿において H U V E C ( Lonza ) を E G M - 2 ( Lonza ) 中で 37 °C および 5% の  $\text{CO}_2$  濃度で培養した。80 ~ 90% のコンフルエンスで、細胞を血清飢餓のために E B M - 2 ( Lonza ) 培地に 2 ~ 6 時間交換した。ヒト化抗 A n g 2 抗体をさまざまな濃度 (  $0.02 \mu\text{g} / \text{m l} \sim 50 \mu\text{g} / \text{m l}$  ) で h A n g 2 タンパク質 (  $1 \mu\text{g} / \text{m l}$ 、R & D systems ) と 30 分間混合した。その後、混合物で培養細胞を処理し、さらに 30 分間インキュベートした。細胞を冷 P B S で 2 回洗い、 $1000 \mu\text{l}$  の溶解バッファー (  $10 \text{mM}$  T r i s - C l ( p H 7 . 4 )、 $150 \text{mM}$  N a C l、 $5 \text{mM}$  E D T A、10% グリセロール、1% Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤 ) で溶解し、4 °C で 60 分間溶解した。細胞抽出物を調製し、 $12000 \text{ r p m}$  で 10 分間遠心分離した。上清を B C A アッセイによる測定に付した。

40

【 0 1 2 1 】

$0.5 \text{m g}$  の細胞溶解物に、 $1 \mu\text{g}$  の T i e 2 抗体 ( R & D systems、AF313 ) を加え、4 °C で一晩インキュベートした。その後、Dynabeads ( 商標 ) プロテイン G ( Life technologies ) を加えて 2 時間反応させ、免疫沈降を行った。ビーズをチューブの 1 つの側に磁石で集め、溶解バッファーで 3 回洗い、還元剤を含む  $2 \times \text{S D S}$  サンプルバッファーと共に  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。ビーズをサンプルから取り出し、4 ~ 15% S D S タンパク質ゲル ( Bio-Rad ) 上で電気泳動し、 $0.45 \mu\text{m}$  の P V D F 膜に転写した。

50

## 【0122】

膜を、5% (v/v) BSAと混合したTBS-Tにより室温で1時間ブロックし、抗ホスホチロシン抗体(4G10、Millipore)と共に4で8時間インキュベートし、次いでHRP結合抗マウス抗体とインキュベートした後、ウエスタンブロッティングを行った。免疫沈降Tie2の量を測定するために、膜をストリッピングバッファー(Thermo)中で15分間反応させ、次いで再度ブロックし、抗Tie2抗体(R&D systems、AF313)でリプローブした。図4に示すように、図3に示したのと同様、抗Ang2抗体をAng2と共にHUVEC細胞に加えたとき、Tie2リン酸化が用量依存的に強く誘導された。同様のパターンが、ヒト化4B9H11-または2C8H11-IgG4抗体を試験したときにも見られた。これらのデータは、ヒト化抗Ang2抗体2C8H11および4B9H11は、ヒト内皮細胞においてTie2受容体の活性化を直接に誘導することを示している。

10

## 【0123】

## 6-3: HUVECにおけるTie2クラスター形成およびFOXO1移行

抗Ang2抗体による、細胞間結合部位におけるTie2クラスター形成、および核からサイトゾルへのFOXO1の移行を、HUVECにおいて免疫蛍光により試験した。具体的には、HUVECを8ウェルスライドチャンバー(Lab-TekII)に播種し、EGM-2培地中に2~3日間維持した。100%コンフルエンスで、細胞をEBM-2培地で4時間の血清飢餓に付し、その後1µg/mlの抗Ang2抗体と1µg/mlのhAng2とで30分間処置した。その後、細胞をPBS中の4%ホルムアルデヒドで室温(RT)で10分間固定し、PBS中の0.1%Triton X-100で透過性とし、PBS中の1%のBSAでRTで60分間ブロックし、一次抗体と共にRTで1時間インキュベートした。hTie2、FOXO1およびヒトFcに対する一次抗体を使用した。次いで、細胞を二次抗体(Invitrogen)と共に暗所においてRTで1時間インキュベートし、DAPI(Vector Labs)と共にVectashieldマウンティング培地を用いてマウントした。レーザー走査共焦点顕微鏡(LSM880, CarlZeiss)で画像を撮影した。

20

## 【0124】

図5に示すように、2C8H11または4B9H11とhAng2による処理は、Tie2クラスター形成および活性化を誘導することが知られているComp-Ang1(CA1)または対照Ang2抗体(Han et al., 2016, Science Translation Medicine)とまったく同じように、細胞間接着へのTie2移行/クラスター形成を誘導した。リン酸化後の細胞質におけるFOXO1局在化の過去の報告(Zhang et al, JBC 2002, 277, 45276-45284)と一致して、FOXO1は血清飢餓基底状態において核内に局在したが、2C8H11+hAng2または4B9H11+hAng2による処理によって、血清飢餓対照と比較して、核から顕著に消失した(赤)。一方、Ang2による処理は、核からサイトゾルへのFOXO1移行をわずかに誘導した。興味深いことに、2C8H11、4B9H11ヒト化抗体(シアン)は、細胞間接着におけるクラスター形成Tie2受容体およびサイトゾル中に取り込まれたTie2受容体と共局在することが観察され(図5)、抗Ang2抗体はAng2との結合を介してTie2受容体と3成分複合体を形成することが示された。

30

40

## 【0125】

2C8H11により誘導されるTie2クラスター形成およびFOXO1移行を経時試験(10分~240分)において調べた。図6に示すように、hAng2の存在下に対照Ang2Abは、細胞間接着におけるTie2クラスター形成(緑)を10分以内に誘導し、クラスター形成したTie2受容体のエンドサイトーシスを誘導した。対照Ang2Ab+hAng2での30分間の処理後、細胞間接着におけるTie2受容体は明らかに減少し、120分および240分後にTie2受容体はほぼ消失した。対照Ang2抗体を抗ヒトFc抗体で染色すると(シアン)、Tie2受容体とまったく同様のパターンが示された。対照的に、2C8H11とhAng2の場合は、細胞間接着におけるTie2クラスター形成は、240分の処理後にも維持された。これに一致して、細胞間接着にお

50

いてTie 2受容体と共局在した2C8H11抗体も、240分後まで維持された(図6)。

#### 【0126】

##### 6-4: ヒト化抗Ang 2抗体による血管透過性抑制

インビトロ血管透過性アッセイキット(Millipore)を製造者の指示にしたがって使用して、HUV ECにおいて血管漏出アッセイを行った。HUV ECをトランスウェルプレートのインサートに播種し、100%コンフルエンスとなるまで3日間培養した。HUV ECを、Ang 2(1 $\mu$ g/ml)、Ang 2(1 $\mu$ g/ml)と対照、2C8H11または4B9H11抗体(1 $\mu$ g/ml)の組み合わせと共に30分間インキュベートし、その後TNF-a(100ng/ml)を加え、細胞を37 $^{\circ}$ Cで22時間インキュベートした。上部チャンバーにFITC-デキストランを加え、20分間インキュベートした。FITC-デキストランのHUV EC単層透過を、それぞれ485nmおよび535nmの励起波長および発光波長で蛍光リーダーにより測定した。図7に示すように、Ang 2と抗Ang 2抗体の組み合わせによる前処理は、血管漏出促進因子TNF-aにより誘発される血管漏出を顕著に抑制した。

10

#### 【実施例7】

#### 【0127】

##### mAng 2に対するヒト化抗Ang 2抗体の親和性測定

マウスAng 2(mAng 2)に対するヒト化抗体の親和性をELISAによって分析した。具体的には、ハーフ96ウェルプレート(Corning 3690)においてウェル当たり20ngで、mAng 2を30 $\mu$ lのコートイングバッファー(0.1M炭酸ナトリウムバッファー)で希釈し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。TBS-T溶液で3回洗った後、ウェルプレートを3%スキムミルクにより室温で1時間ブロックし、その後再度洗った。2C8H11および4B9H11を3mg/mlから300ng/mlまで連続希釈した。希釈した抗Ang 2抗体30 $\mu$ lをウェルに入れ、ウェルプレートを室温で2時間インキュベートした。次いで、1:30000希釈した抗ヒトIgG(Fab)-HRP(Jackson)二次抗体30 $\mu$ lを各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。全ての反応の完了後、プレートを再びTBS-Tで洗い、各ウェルを30 $\mu$ lのTMB溶液で処理した。5分間発色させた後、プレートを1N硫酸で処理して反応を停止させ、450nmにおける吸光度を測定した。測定したOD値に基づき、PerkinElmerのWorkoOut 2.5プログラムを用いてEC<sub>50</sub>値を分析した。mAng 2結合における4B9H11および2C8H11のEC<sub>50</sub>はそれぞれ、105 $\mu$ g/mlおよび97 $\mu$ g/mlであった(図8)。

20

30

#### 【実施例8】

#### 【0128】

##### LLC皮下モデルにおける腫瘍増殖抑制効果の評価

2C8H11抗Ang 2抗体の腫瘍増殖抑制能力を、LLC(ルイス肺癌)細胞株腫瘍モデルにおいて試験した。具体的には、LLC細胞株(ATCC)を、10%FBS(Gibco)を補充したDMEM(Gibco)中で培養した。ケタミンおよびキシラジンの混合物で麻酔した6~8週齢C57BL/6マウス(Jackson Laboratory)に、LLC細胞(PBS 100 $\mu$ l中 $1 \times 10^6$ )を皮下注射した。腫瘍体積が50~100mm<sup>3</sup>に達したら、マウスに10mg/kgの2C8H11抗体を2~3日毎に腹腔内投与した。単剤処置群および併用処置群の両方に、シスプラチン(Cpt)を3mg/kgの用量で1回腹腔内注射した。その後の日々の腫瘍体積の変化を追跡した。腫瘍体積(V)は、式:

40

$$V = (\text{幅}^2 \times \text{長さ}) / 2$$

にしたがって求めた。

#### 【0129】

試験は次の4群において行った:Fc(対照群)、Fc+Cpt群、2C8H11群、および2C8H11+Cpt群。図9に示すように、2C8H11抗体はFcと比較して、腫瘍増殖を29%抑制し、これは、Fc+Cpt注射による腫瘍増殖抑制効果と同程度

50

であった。2 C 8 H 1 1 および C p t の併用処置は、F c と比較して腫瘍増殖を 4 7 % 遅延させた。したがって、これらの結果は、2 C 8 H 1 1 および C p t の併用処置が腫瘍増殖を最も強力に抑制したことを示している。

【実施例 9】

【0130】

2 C 8 H 1 1 抗体の腫瘍血管正常化作用

2 C 8 H 1 1 抗体による腫瘍血管の変化を調べるために、腫瘍サンプルの凍結切片を調達し、血管特異的マーカーである C D 3 1 およびペリサイト特異的マーカーである P D G F R の染色によって免疫蛍光分析を行った。具体的には、実施例 8 に記載の実験のマウスから腫瘍サンプルを採取し、4 % パラホルムアルデヒド ( P F A、Merck) で固定し、3 0 % スクロース ( Junsei) で脱水し、O C T 化合物 ( Leica) に包埋し、クリオスタット ( Leica) を用いて切断した。得られた凍結切片を、タンパク質ブロッキングバッファー ( DAKO) を用いて 1 時間ブロックした。次いで、P B S 中のハムスター抗 C D 3 1 抗体 ( 1 : 2 0 0、Millipore) およびラット抗 P D G F R 抗体 ( 1 : 2 0 0、eBioscience) により、4 で 8 時間染色処理した。P B S で 3 回洗った後、切片を P B S 中の Alexa488 結合抗ハムスター I g G 抗体および Alexa594 結合抗ラット I g G 抗体 ( 1 : 1 0 0 0、Jackson ImmunoResearch) により、室温で 1 時間染色した。P B S でさらに 3 回洗った後、切片を、カバースリップ ( Marienfeld) を用いて蛍光マウンティング培地 ( DAKO) 中でマウントした。染色切片を、LSM880 共焦点顕微鏡 ( Zeiss) を用いて画像化した。

10

20

【0131】

結果を図 1 0 に示す。赤色のシグナルは C D 3 1 + 領域を示し、緑色のシグナルは P D G F R + 領域を示す。F c または F c + C p t で処理した腫瘍と比較して、2 C 8 H 1 1 または 2 C 8 H 1 1 + C p t で処理した腫瘍において腫瘍血管 ( B V ) 密度が 5 6 % 低下し、該血管系の形態学が正常血管と同様となるよう正常化された。さらに、2 C 8 H 1 1 または 2 C 8 H 1 1 + C p t で処理した腫瘍では P D G F R + ペリサイト領域が増加し ( 2 . 4 倍増加)、血管および血管周囲細胞が互いにより密に会合していた。これらの結果は、2 C 8 H 1 1 抗体が腫瘍塊内の血管密度を低下し、その形態学を正常化することができることを示している。

【実施例 1 0】

30

【0132】

2 C 8 H 1 1 抗体による腫瘍血管機能の向上

2 C 8 H 1 1 で処置後の腫瘍血管の機能を分析するために、血管灌流性および低酸素状態を評価した。腫瘍塊を採取する前に、マウスに 1 0 0 μ l の DyLight488-レクチン ( Vector laboratory) を腹腔内注射し、P B S に溶解した 6 0 m g / k g のピモニダゾール - H C l ( Hypoxyprobe) を 殺前 3 0 分間腹腔内注入した。マウスを 4 % P F A で灌流固定した。腫瘍塊から凍結切片を調達し、P B S 中のハムスター抗 C D 3 1 抗体 ( 1 : 2 0 0、Millipore) および 4.3.11.3 マウスパシフィックブルー - M a b ( 1 : 5 0、Hypoxyprobe) で染色した。LSM880 共焦点顕微鏡 ( Zeiss) を用いて切片を画像化し、得られた画像を、ImageJ ソフトウェア ( <http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いてレクチン + 領域 / C D 3 1 + 領域および Hypoxyprobe + 領域を定量して分析した。

40

【0133】

結果を図 1 1 に示す。F c または F c + C p t による処置と比較して、2 C 8 H 1 1 または 2 C 8 H 1 1 + C p t で処置した腫瘍は、レクチン + 領域 ( 緑 ) / C D 3 1 + 領域 ( 赤 ) の増加で判断されるように、灌流が増加しており ( 約 3 倍の灌流増加)、腫瘍血管の正常化を示した。さらに、Hypoxyprobe + 領域 ( 緑 ) で示される低酸素は、2 C 8 H 1 1 または 2 C 8 H 1 1 + C p t で処置した腫瘍において、F c または F c + C p t で処置した腫瘍と比較して 7 2 % 減少した。これらの結果は、2 C 8 H 1 1 抗体は、腫瘍血管の形態学を正常化するだけでなく、その機能をも、血管灌流の増加によって向上し、それによって低酸素の軽減をもたらすことを示している。

50

## 【実施例 1 1】

## 【0 1 3 4】

## 2 C 8 H 1 1 抗体による腫瘍塊中への抗癌剤デリバリーの増加

薬剤 C p t は DNA 合成の阻害によって腫瘍増殖を抑制するものであり、ヒト癌患者において広く用いられている。この薬剤の腫瘍へのデリバリーを 2 C 8 抗体が腫瘍血管正常化によって増加しうるかを調べるために、腫瘍の凍結切片を、抗シスプラチン修飾 DNA 抗体 ( 1 : 1 0 0、Abcam ) およびハムスター抗 C D 3 1 抗体 ( 1 : 2 0 0、Millipore ) で染色した。図 1 2 に示すように、C p t 修飾 DNA ( 緑 ) のレベルは、2 C 8 H 1 1 / C p t 処置群において、F c + C p t 処置群と比較して 2 . 1 倍の顕著な増加を示した。この結果は、腫瘍塊への C p t デリバリーが、2 C 8 H 1 1 抗体による腫瘍血管の正常化によって高められたこと、それによって腫瘍増殖が強力に抑制されることを示している。

10

## 【実施例 1 2】

## 【0 1 3 5】

レーザー誘発 C N V モデルにおける 2 C 8 H 1 1 抗体の C N V 低減および血管漏出抑制効果

2 C 8 H 1 1 抗体について、滲出型加齢黄斑変性 ( A M D ) の指標である脈絡膜血管新生 ( C N V ) を抑制する能力を、レーザー誘発 C N V モデルを用いて試験した。5 m g / m l のフェニレフリンおよび 5 m g / m l のトロピカミドの点眼剤 ( Santen Pharmaceutical ) による散瞳、および局所麻酔用の 0 . 5 % プロパラカイン塩酸塩点眼剤 ( Alcon ) の点眼後に、スリットランプデリバリーシステムを備えるレーザー光凝固装置 ( Lumenis Inc. ) を、網膜観察用コンタクトレンズとしてのカバーガラスと共に用いた。各眼の 4 つの位置 ( 後極の 3、6、9 および 1 2 時の位置 ) に十分なレーザーエネルギー ( 波長 5 3 2 n m、出力 2 5 0 m W、持続時間 1 0 0 m s、スポットサイズ 5 0 μ m ) をデリバリーした。レーザー光凝固時にプルーフ膜の裂傷を意味する泡を生じた傷害のみを、本試験に含めた。レーザー部位において出血を含むスポットを、分析から除外した。臨床的状況を模すために、2 C 8 H 1 1 ( 5 μ g ) をレーザー光凝固後 7 日目のマウスに、硝子体内投与した ( 図 1 3 A )。対照として、または比較のために、F c または V E G F - T r a p ( 各 5 μ g ) を同じ方法でマウスに投与した。所定の薬剤を硝子体内投与するために、各薬剤 5 μ g を含む約 1 μ l ( 5 m g / m l ) を、ガラスキャピラリーピペットを取り付けた Nanoliter 2 0 0 0 マイクロインジェクター ( World Precision Instruments ) を用いて、硝子体腔内に注入した。レーザー光凝固後 1 4 日目に、網膜色素上皮 ( R P E ) - 脈絡膜 - 強膜フラットマウントの C D 3 1 + C N V の体積を、MATLAB 画像処理ツールボックス ( MathWorks ) を用いて計算した。C N V の内皮細胞の検出のために、抗 C D 3 1 抗体 ( 1 : 2 0 0、Millipore ) を使用した。V E G F - T r a p は効果的に、F c と比較して 6 4 . 4 % の C N V 低減をもたらし、2 C 8 H 1 1 も同様に C N V 低減をもたらした ( 6 5 . 3 % ) ( 図 1 3 B、C )。フルオレセイン血管造影 ( F A ) およびインドシアニングリーン血管造影 ( I C G A ) を組み合わせることにより、レーザー傷害部位付近の新血管における血管漏出を測定することができた。フルオレセインおよび I C G の励起光源として、それぞれ 4 8 8 n m および 7 8 5 n m の連続波レーザーモジュールを使用した。回転ポリゴンミラー ( MC-5; Lincoln Laser ) およびガルバノメーターベースの走査ミラー ( 6 2 3 0 H; Cambridge technology ) からなるスキャナーシステムによって、励起レーザーのラスタースキャンパターンを達成し、撮影レンズの後部開口にデリバリーした。広視野の眼底蛍光画像を提供する撮影レンズとして、高開口数 ( N A ) の対物レンズ ( Plan Apo , N A 0.75; Nikon ) を使用した。光電子増倍管 ( R 9 1 1 0; Hamamatsu Photonics ) により検出した蛍光シグナルを、リアルタイムで、フレームグラバーによってデジタル変換し、フレーム当たり 5 1 2 × 5 1 2 ピクセルのサイズの画像へと再構成した。血管造影システムを用いる、後期相 ( 6 分間 ) の F A および I C G A 画像の可視化のために、1 0 m g のフルオレセインナトリウム ( Alcon ) および 0 . 1 5 m g の I C G ( Daiichi Pharmaceutical ) をそれぞれ腹腔内および静脈内に投与した。画像の質を高めるために、撮影手順を全身麻酔および散瞳下に行った。C N V からの漏出面積を、F A 画像において

20

30

40

50

測定された高蛍光の総面積を、ICGA画像において測定された総CNV面積で除したものと、Javaベースのイメージングソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health) を用いて計算した。Fcと比較して、VEGF-Trap (37.0%) および2C8H11 (38.3%) の両方が同じように血管漏出を抑制した (図13B、D)。注目すべきことに、Fc処置群はレーザー光凝固後6~14日目の間に血管漏出の顕著な変化を示さなかったが、VEGF-Trapおよび2C8H11は血管漏出を顕著に低下させた (それぞれ45.6%および50.0%) (図13B、D)。したがって、レーザー誘発CNVのマウスモデルにおいてCNVおよび血管漏出の抑制の程度は、VEGF-Trapと2C8H11との間で、量的に差が無かった。

#### 【実施例13】

##### 【0136】

##### 2C8H11抗体のCNV低減および脈絡膜毛細血管再生作用

CNV確立後のCNV低減および脈絡膜毛細血管再生における2C8H11の効果を調べるために、レーザー光凝固後7日目のマウスに、Fc、VEGF-Trap、対照抗体または2C8H11 (各5 $\mu$ g) を、Nanoliter 2000マイクロインジェクター (World Precision Instruments) によって硝子体内投与した。レーザー光凝固後、6、14、21および35日目に、生体光コヒーレンストモグラフィー血管造影 (OCTA) を行った (図14A)。プロトタイプの高速波長掃引型光コヒーレンストモグラフィー (OCT) システムを使用して、1048nmを中心とするカスタムリングキャビティ波長掃引レーザーを用い、Aスキャンレート230kHzで網膜脈絡膜層を撮影した。薬剤の硝子体内注入後のレーザー光凝固部位における脈絡膜血管構造の再生をモニターするために、網膜-脈絡膜層内の1.7mm $\times$ 1.7mmの視野のOCT画像を集めた。網膜および脈絡膜実質を伴わず血管の選択的可視化を可能にする断面OCT血管画像を得るために、繰り返し記録されたBスキャン画像を比較して、血管内の赤血球の移動によって主に引き起こされた該画像のピクセル毎の強度の脱相関を検出した。次いで、自動の層平坦化およびセグメンテーションアルゴリズムを使用することにより、断面OCT血管画像をRPEに対して平坦化し、網膜内層、網膜外層および脈絡膜層の3つの深度範囲における各平坦化断面OCT血管画像の個別の投影によってen face OCT血管画像を作製した。外網状層およびブルッフ膜を、網膜内層、網膜外層および脈絡膜層を隔てる境界層として規定した。網膜および脈絡膜血管の密度を、閾値レベルを上回る脱相関値を有するピクセルとして定義される、血流のある血管の占める測定面積の割合として、自動計算した。無血管ピクセルを、脈絡膜層を示すen face OCT血管画像から、MATLABの画像処理ツールボックス (MathWorks) によって検出した。その後、レーザー傷害部位の周囲の無血管スペースの総体積を、1ピクセルの体積を掛けた無血管ピクセルの数を合計することによって計算した。無血管スペース体積の変化する様相を分析するために、各眼において連続的に測定された値をベースライン値からの変化パーセンテージに変換した。Fc処置した場合、網膜外層のCNV体積にわずかな減少が見られ、VEGF-Trapおよび2C8H11で処置した場合はCNV体積は顕著に低下した (図14B、C)。Fc処置した場合、脈絡膜の無血管スペースのわずかな減少が見られた。興味深いことに、2C8H11処置眼の脈絡膜は、レーザー光凝固後14、21および35日目にそれぞれ30.1%、36.4% および37.0%という、段階的な著しい無血管スペース減少を示した (図14B、D)。同様に、対照Ab処置眼の脈絡膜は、レーザー光凝固後14、21および35日目にそれぞれ21.7%、30.2%および38.0%という、無血管スペースの減少を示した (図14B、D)。しかしながら、VEGF-Trap処置眼の脈絡膜は、14、21および5日目にそれぞれ11.4%、16.0%および18.1%の無血管スペース増加を示した (図14B、D)。これらの知見は全体として、レーザー誘発CNVモデルにおいて、2C8H11および対照Abの両方が脈絡膜毛細血管の再生を促進するが、VEGF-Trapは脈絡膜毛細血管の退化をもたらすことを示している。

#### 【実施例14】

##### 【0137】

10

20

30

40

50

CNVの内皮細胞における2C8H11抗体およびCD31の共局在

皮下注射された2C8H11も、CNVに対して処置効果を示すことができるかを調べるために、まず、CNVの内皮細胞における2C8H11抗体およびCD31の共局在を評価した。レーザー光凝固後1日目に、2C8H11抗体(25mg/kg)の皮下投与を行った。対照として、Fc(25mg/kg)を同じ様式でマウスに投与した。レーザー光凝固後2、4および8日目に、CNVの内皮細胞における2C8H11抗体および抗CD31抗体(1:200、Millipore)の共局在を、抗ヒトIgG抗体(1:1000、Jackson ImmunoResearch Laboratories)で直接に検出した(図15A)。投与された2C8H11は、CNV領域におけるCD31<sup>+</sup>内皮細胞において高度に検出可能であった(図15B~D)。

10

【実施例15】

【0138】

皮下注射2C8H11抗体のCNV抑制効果

CNV抑制における皮下注射2C8H11抗体の効果を調べるために、レーザー光凝固後1日目に、2C8H11抗体(25mg/kg)の皮下投与を行った。対照として、Fc(25mg/kg)を同じ様式でマウスに投与した。レーザー光凝固後8日目に、抗CD31抗体(1:200、Millipore)を用いてCNVの内皮細胞を検出し、RPE-脈絡膜-強膜フラットマウントのCD31<sup>+</sup>CNVの体積を、MATLAB画像処理ツールボックス(MathWorks)を用いて計算した(図16A)。2C8H11は効果的に、CNV形成をFcと比較して69.9%抑制した(図16B、C)。このことは、2C8H11は、硝子体内注射だけでなく皮下注射によっても、CNV抑制作用を示すことを示している。

20

【0139】

本発明の微生物は2C8と称され、Cancer Research Institute, Seoul National University, College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-744, KoreaのKorean Cell Line Bank(KCLB)に2018年1月30日に寄託された(受託番号:KCLRF-BP-00417)。

【0140】

本発明の微生物は4B9と称され、Cancer Research Institute, Seoul National University, College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-744, KoreaのKorean Cell Line Bank(KCLB)に2018年1月30日に寄託された(受託番号:KCLRF-BP-00418)。

30

【産業上の利用可能性】

【0141】

本発明は、Ang2を阻害すると同時にTie2を活性化して下流シグナル伝達を促進する抗体に関する。本発明はそれにより、Ang2により誘導される血管形成を抑制し、血管透過性を低下する方法を提供する。さらに、本発明の抗体は、異常な血管形成が関与する疾患、例えば眼疾患または癌、および/または血管透過性亢進によって引き起こされる疾患の診断および処置に有用でありうる。

【0142】

40

本発明をその特定の特徵に基づいて詳細に説明したが、そのような特定の技術は好ましい態様に過ぎず、本発明の範囲はそのような態様に限定されないことは当業者に明らかである。したがって、本発明の実質的な範囲は、特許請求の範囲およびその等価物によって規定される。

【0143】

[配列表フリーテキスト]

電子ファイルにおいて添付される。

【0144】

50



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)  
 34129 서울서초동 (서울시 서초구 서초동) 서울대학교 의과대학 생명과학부  
 TEL : +82-2-3458-2915 FAX : +82-2-345-0621, http://kcellbank.org or kclb.kcellb.or.kr  
 Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WHO  
 Korean Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 103 Daehak-ro, Chongno-gu, Seoul 150-749, KOREA


特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

規則 7.1 に従い発行される原寄託についての受託証

10

宛先：大韓民国 34141 テジョン、ユソング、テハクロ 291、アイビーエス・センター・  
 フォー・ヴァスキュラー・リサーチ  
 ペ・チョミル

I. 微生物の表示	
識別の表示：2C8	受託番号：KCLRF-BP-00417
II. 科学的性質及び／又は分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項が記載されていた： 化学的性質 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、2018年1月30日に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 国際寄託当局	
名称：コリアン・セル・ライン・リサーチ・ ファウンデーション ディレクター 住所：大韓民国 110-744 ソウル、チョンノグ、 ヨンゴンドン 28、 ソウル・ナショナル・ユニバーシティ・ カレッジ・オブ・メディシン、 キャンサー・リサーチ・インスティテュート	署名  発行日：2018年2月12日

20

30

【 0 1 4 5 】

40

50



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)  
 03129, 서울대 용인주 캠퍼스 103, 서울대학교 의학연구원 1층  
 TEL : +82-31-821-7315 FAX : +82-31-821-7321, Email: kclb@kclb.or.kr, kclb@kclb.co.kr  
 Korean Cell Line Bank, Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIPO  
 Daegu Academic Institute, Daegu Branch University College of Medicine, 103 Chak-dong, Cheongpae-gu, Seoul 150-750, Korea


特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

規則 7.1 に従い発行される原寄託についての受託証

10

宛先：大韓民国 34141 テジョン、ユソング、テハクロ 291、アイビーエス・センター・  
 フォー・ヴァスキュラー・リサーチ  
 ペ・チョミル

I. 微生物の表示	
識別の表示：4B9	受託番号：KCLRF-BP-00418
II. 科学的性質及び／又は分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項が記載されていた： 化学的性質 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、2018年1月30日に受領したI欄の微生物を受託する。	
IV. 国際寄託当局	
名称：コリアン・セル・ライン・リサーチ・ ファウンデーション ディレクター 住所：大韓民国 110-744 ソウル、チョンノグ、 ヨンゴンドン 28、 ソウル・ナショナル・ユニバーシティ・ カレッジ・オブ・メディシン、 キャンサー・リサーチ・インスティテュート	署名  発行日：2018年2月12日

20

30

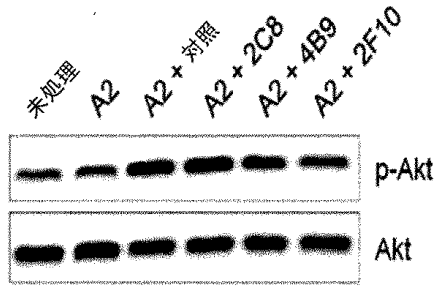
40

50

【 図面 】

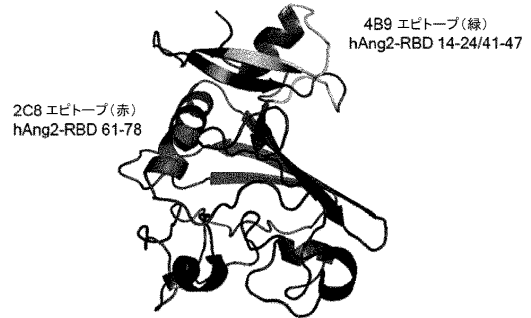
【 図 1 】

[Fig. 1]



【 図 2 】

[Fig. 2]

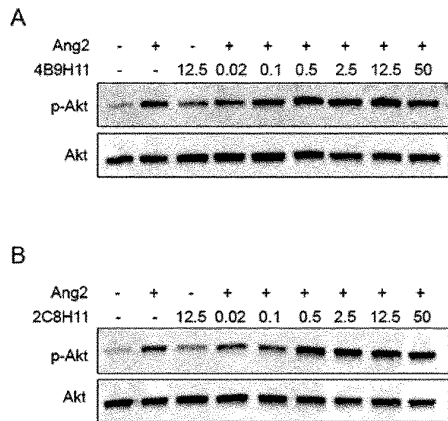


ヒトアンジオポエチン2 RBD の結晶構造 (PDB : 2GY7)

10

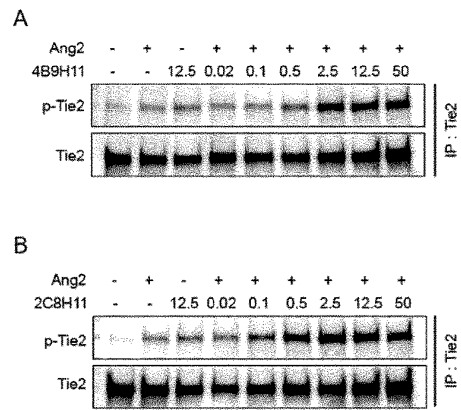
【 図 3 】

[Fig. 3]



【 図 4 】

[Fig. 4]



20

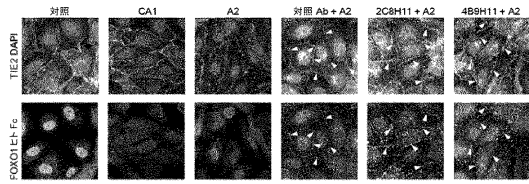
30

40

50

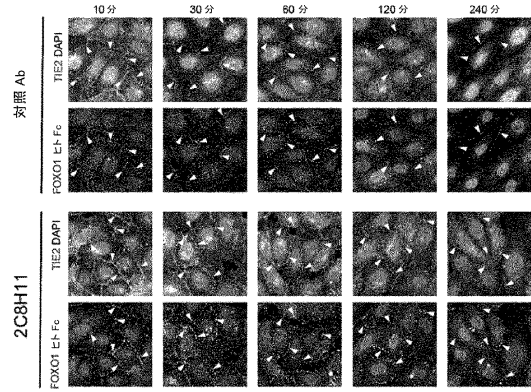
【 5 】

[Fig. 5]



【 6 】

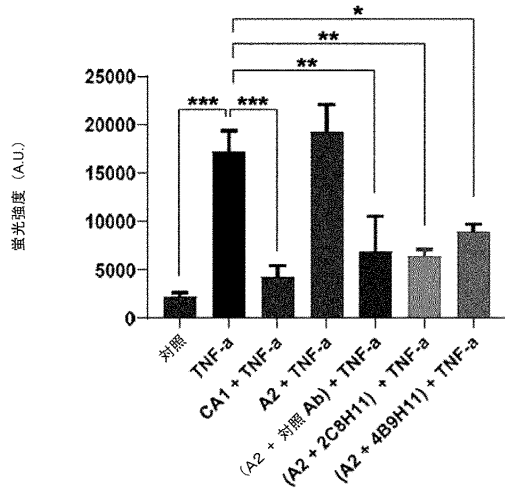
[Fig. 6]



10

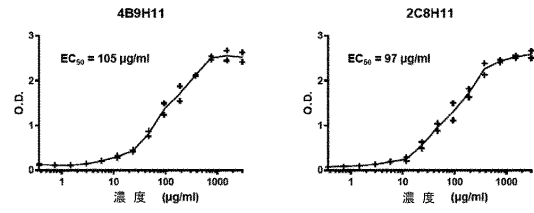
【 7 】

[Fig. 7]



【 8 】

[Fig. 8]



20

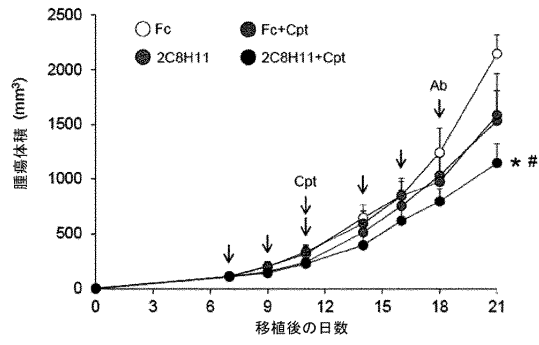
30

40

50

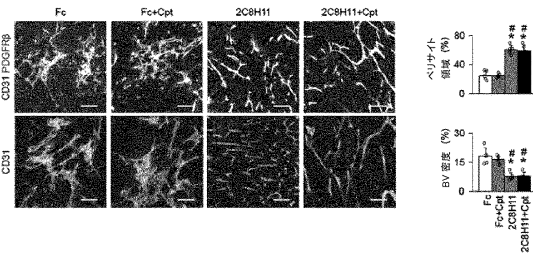
【 図 9 】

[Fig. 9]



【 図 10 】

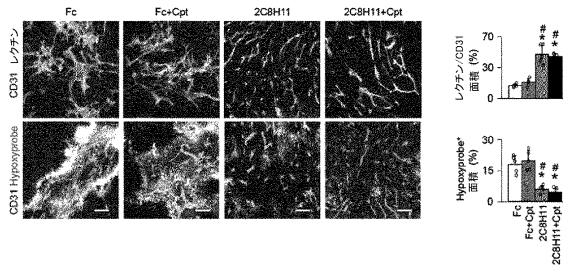
[Fig. 10]



10

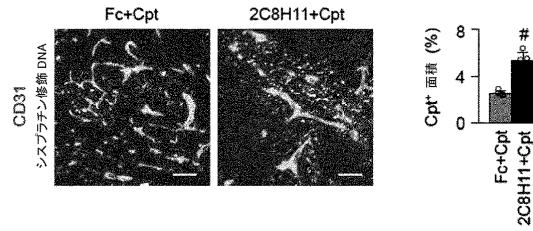
【 図 11 】

[Fig. 11]



【 図 12 】

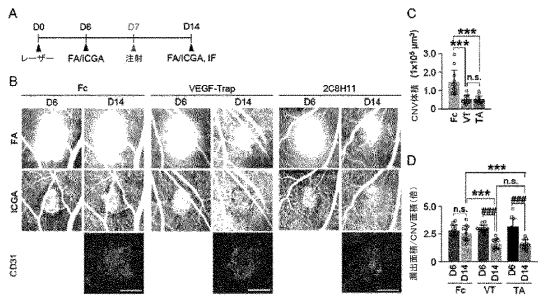
[Fig. 12]



20

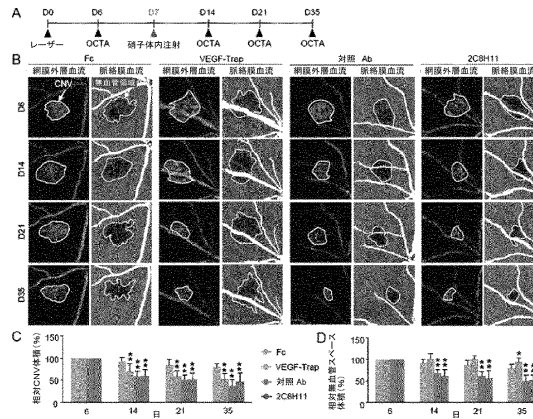
【 図 13 】

[Fig. 13]



【 図 14 】

[Fig. 14]



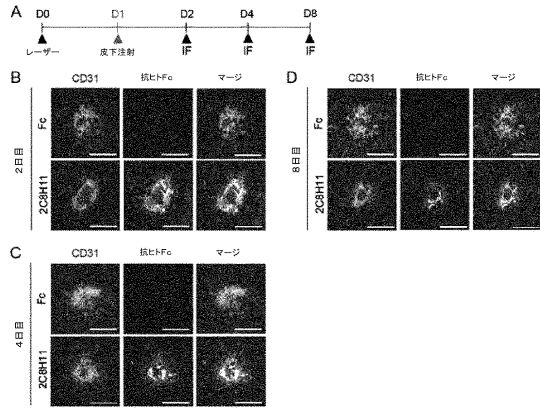
30

40

50

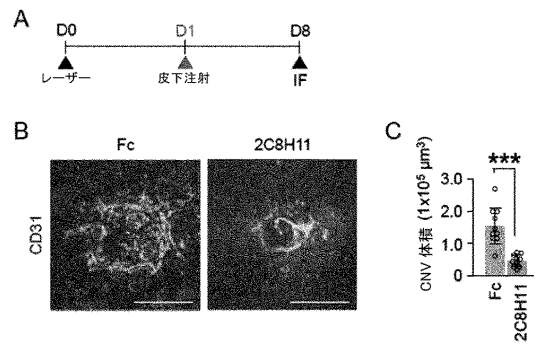
【 15 】

[Fig. 15]



【 16 】

[Fig. 16]



10

【 配列表 】

0007366068000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/22 (2006.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/02 (2006.01)

## F I

C 1 2 N 5/10  
 C 0 7 K 16/22  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 P 43/00 1 2 1  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 K 39/395 E  
 A 6 1 K 39/395 T  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 38/02  
 A 6 1 P 43/00 1 1 1

## (33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

微生物の受託番号 KCLRF KCLRF-BP-00417

KCLRF KCLRF-BP-00418

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100165892

弁理士 坂田 啓司

(72)発明者 コ・グヨン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 ペ・チョミル

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 キム・ミジョン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 バク・ジンソン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 ソ・スジン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 キム・ジェリョン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 バク・チャンリョル

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 キム・ピハン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

(72)発明者 オ・ワンユル

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン、ユソング、テハク口 2 9 1

審査官 松井 一泰

(56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 2 8 3 2 7 4 6 ( E P , A 1 )

PARK, Jin-Sung et al. , Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment , Cancer Cell , 2016年12月12日 , Vol. 30, No. 6 , pp. 953-967

SAHARINEN, Pipsa et al. , Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway , NATURE REVIEWS , 2017年05月19日 , vol. 16, no. 9 , pp. 635-661

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

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

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T

N )