

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-511430

(P2004-511430A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 07 K 16/28	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 9/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H O 4 5
A 6 1 P 43/00	C 1 2 P 21/02 C	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 106 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-587003 (P2001-587003)	(71) 出願人	500581021
(86) (22) 出願日	平成13年5月24日 (2001.5.24)		イムクロン システムズ インコーポレ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月25日 (2002.11.25)		イティド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/016924		アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 0 0 1
(87) 国際公開番号	W02001/090192		4, ニューヨーク, バリック ストリート
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		1 8 0
(31) 優先権主張番号	60/206, 749	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成12年5月24日 (2000.5.24)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性免疫グロブリン様抗原結合蛋白および製造方法

(57) 【要約】

本発明は、二重特異性抗原結合蛋白を目的とするものである。これらの二重特異性抗原結合蛋白は、抗原（群）に対するアビディティが最適化されており、それでいて、補体仲介細胞傷害および抗体依存性細胞毒性を活性化する能力を包含する、天然抗体として機能する能力を維持している。天然の I g G 免疫グロブリンは単一特異性且つ二価であり、同じエピトープに特異的な 2 個の結合ドメインを持っている。対照的に、本発明に係る I g G 型免疫グロブリンは二重特異性且つ二価であり、各軽鎖に 1 つのエピトープのための結合ドメインを、そして各重鎖に第二のエピトープに特異的な結合ドメインを持っている。本発明に係る抗原結合蛋白の設計は、産生される実質上全ての抗原結合蛋白が所望のコンフィギュレーションに組み立てられるような効率的な産生を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 個の第一ポリペプチドと 2 個の第二ポリペプチドの複合体を含む抗原結合蛋白であって、
第一ポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（ C_L ドメイン）の N 末端に位置する抗原結合部位を有し、ここでこの C_L ドメインは免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（ $C_H 1$ ドメイン）と安定に結合でき、そして
第二ポリペプチドが該 $C_H 1$ ドメインの N 末端に位置する抗原結合部位を有し、この $C_H 1$ ドメインの後には、安定な自己結合ができる 1 またはそれ以上の重鎖定常ドメインがある、
抗原結合蛋白。

10

【請求項 2】

1 またはそれ以上の前記抗原結合部位が一本鎖 F_v により提供される、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 3】

前記第一および第二ポリペプチドの前記抗原結合部位が異なる特異性を有する、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 4】

前記第一および第二ポリペプチドの前記抗原結合部位が同じ特異性を有する、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

20

【請求項 5】

前記特異性が異なる抗原上に存在するエピトープに対するものである、請求項 3 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6】

前記特異性が同じ抗原上に存在するエピトープに対するものである、請求項 3 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 7】

前記第一ポリペプチドと第二ポリペプチドが共有結合している、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 8】

前記 2 個の第二ポリペプチドが共有結合している、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

30

【請求項 9】

前記第二ポリペプチドがイソタイプ IgA 、 IgD または IgG の抗体の $C_H 1$ 、 $C_H 2$ および $C_H 3$ ドメインを有する、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 10】

前記第二ポリペプチドがイソタイプ IgE または IgM の抗体の $C_H 1$ 、 $C_H 2$ 、 $C_H 3$ および $C_H 4$ ドメインを有する、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 11】

前記定常ドメインが哺乳動物の定常ドメインである、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 12】

前記定常ドメインがヒト定常ドメインである、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

40

【請求項 13】

1 またはそれ以上の前記一本鎖 F_v がマウス一本鎖 F_v である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 14】

1 またはそれ以上の前記一本鎖 F_v が、ヒトフレームワーク領域を持つキメラ一本鎖 F_v である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 15】

前記一本鎖 F_v がヒト V_L および V_H ドメインである、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 16】

50

安定な自己結合ができる前記重鎖定常ドメインが、任意の免疫グロブリンイソタイプまたはサブタイプ由来の $C_H 2$ 、 $C_H 3$ 、および $C_H 4$ ドメインから成る群から選ばれる、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 17】

Fc レセプターと結合できる、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 18】

補体仲介細胞傷害 (CMC) を奏効することのできる、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 19】

抗体依存性細胞仲介細胞傷害 (ADCC) を奏効することのできる、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

10

【請求項 20】

抗腫瘍物質に連結している、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 21】

検出可能シグナル生成物質に連結している、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 22】

VEGF レセプターの活性化を中和する、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 23】

VEGF レセプターが哺乳動物のものである、請求項 22 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 24】

VEGF レセプターが人間のものである、請求項 22 に記載の抗原結合蛋白。

20

【請求項 25】

VEGF レセプターが *flt-1* または *flk-1* 遺伝子によりコードされている、請求項 24 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 26】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が KDR に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 27】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が FLT1 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 28】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が FLT4 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

30

【請求項 29】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が EGF-R に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 30】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が HER2 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 31】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が FGF-R に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

40

【請求項 32】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が PDGF-R に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 33】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個がレセプターチロシンキナーゼに特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 34】

抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が Tek に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

50

【請求項 35】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が T i e - 2 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 36】

前記抗原結合部位のうち一方が K D R に特異的であり、他方の前記結合部位が F L T 1 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 37】

前記抗原結合部位のうち一方が K D R に特異的であり、他方の抗原結合部位が F L T 4、E G F - R、H E R 2、F G F - R、P D G F - R、T e k および T i e 2 から成る群から選ばれる抗原に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

10

【請求項 38】

前記抗原結合部位のうち一方が E G F - R に特異的であり、他方の抗原結合部位が H E R 2 に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 39】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が免疫系エフェクター細胞の細胞表面抗原に特異的である、請求項 1 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 40】

免疫系エフェクター細胞が T 細胞、マクロファージ、好中球、または N K 細胞である、請求項 39 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 41】

前記細胞表面抗原が C D 3、C D 16、C D 28、C D 32、C D 64、F c レセプター、サイトカインレセプターまたはリンホカインレセプターである、請求項 39 に記載の抗原結合蛋白。

20

【請求項 42】

前記細胞表面抗原がサイトカインまたはリンホカインのレセプターであり、そして抗原結合部位がサイトカインもしくはリンホカインまたはそれらの一部のアミノ酸配列を含む、請求項 39 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 43】

レセプターが I L - 2、I L - 4、I L - 5、G M - C S F または G - C S F のレセプターである、請求項 42 に記載の抗原結合蛋白。

30

【請求項 44】

前記抗原結合部位のうち 1 個が免疫系エフェクター細胞の細胞表面抗原に特異的である、請求項 26、27、28、29、30、31、32、33、34 および 35 のいずれか 1 項に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 45】

前記免疫系エフェクター細胞が T 細胞、マクロファージ、好中球、または N K 細胞である、請求項 44 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 46】

前記細胞表面抗原が C D 3、C D 16、C D 28、C D 32、C D 64、F c レセプター、サイトカインレセプターまたはリンホカインレセプターである、請求項 44 に記載の抗原結合蛋白。

40

【請求項 47】

2 個の第一ポリペプチドと 2 個の第二ポリペプチドの複合体を含む抗原結合蛋白であって、
第一ポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (C_L ドメイン) の N 末端に位置する一本鎖 F_v を有し、ここでこの C_L ドメインは免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (C_H 1 ドメイン) と安定に結合でき、そして
第二ポリペプチドが該 C_H 1 ドメインの N 末端に位置する一本鎖 F_v を有し、ここでこの C_H 1 ドメインの後には、安定な自己結合ができる 1 またはそれ以上の重鎖定常ドメインがある、

50

抗原結合蛋白。

【請求項 48】

前記第一および第二ポリペプチドの抗原結合部位が異なる特異性を有する、請求項 47 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 49】

前記第一および第二ポリペプチドの抗原結合部位が同じ特異性を有する、請求項 47 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 50】

KDR の活性化を中和する、請求項 47 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 51】

前記一本鎖 Fv の一方または両方が一本鎖 Fv p1c11 である、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 52】

前記一本鎖 Fv の一方または両方が一本鎖 Fv p4G7 である、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 53】

FLT1 の活性化を中和する、請求項 47 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 54】

前記一本鎖 Fv の一方または両方が一本鎖 Fv 6.12 である、請求項 53 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 55】

前記一本鎖 Fv の一方または両方の相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列が、

CDRH1 では配列番号 1 ;

CDRH2 では配列番号 2 ;

CDRH3 では配列番号 3 ;

CDRL1 では配列番号 4 ;

CDRL2 では配列番号 5 ;そして、

CDRL3 では配列番号 6、

で示される、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 56】

前記一本鎖 Fv の一方または両方の相補性決定領域 (CDR) をコードしているヌクレオチド配列が、

CDRH1 については配列番号 9 ;

CDRH2 については配列番号 10 ;

CDRH3 については配列番号 11 ;

CDRL1 については配列番号 12 ;

CDRL2 については配列番号 13 ;そして、

CDRL3 については配列番号 14、

で示される、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 57】

前記一本鎖 Fv の一方または両方の可変ドメインのアミノ酸配列が、

重鎖可変ドメイン (V_H) については配列番号 7 ;そして、

軽鎖可変ドメイン (V_L) については配列番号 8、

で示される、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 58】

前記一本鎖 Fv の一方または両方の可変ドメインをコードしているヌクレオチド配列が、

重鎖可変ドメイン (V_H) については配列番号 15 ;そして、

軽鎖可変ドメイン (V_L) については配列番号 16、

で示される、請求項 50 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 59】

10

20

30

40

50

一本鎖 F_v の一方または両方の相補性決定領域 (C D R) のアミノ酸配列が、
C D R H 1 では配列番号 1 ;
C D R H 2 では配列番号 2 1 ;
C D R H 3 では配列番号 3 ;
C D R L 1 では配列番号 4 ;
C D R L 2 では配列番号 5 ;そして、
C D R L 3 では配列番号 6 、
で示される、請求項 5 0 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6 0】

前記一本鎖 F_v の一方または両方の相補性決定領域 (C D R) をコードしているヌクレオチド配列が、
C D R H 1 については配列番号 9 ;
C D R H 2 については配列番号 2 4 ;
C D R H 3 については配列番号 1 1 ;
C D R L 1 については配列番号 1 2 ;
C D R L 2 については配列番号 1 3 ;そして、
C D R L 3 については配列番号 1 4 、
で示される、請求項 5 0 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6 1】

前記一本鎖 F_v の一方または両方の可変ドメインのアミノ酸配列が、
重鎖可変ドメイン (V_H) については配列番号 2 2 ;そして、
軽鎖可変ドメイン (V_L) については配列番号 2 3 、
で示される、請求項 5 0 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6 2】

前記一本鎖 F_v の一方または両方の可変ドメインをコードしているヌクレオチド配列が、
重鎖可変ドメイン (V_H) については配列番号 2 5 ;そして、
軽鎖可変ドメイン (V_L) については配列番号 2 6 、
で示される、請求項 5 0 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6 3】

前記一本鎖 F_v の一方または両方が配列番号 2 7 または配列番号 2 8 で示されるヌクレオチド配列を有する、請求項 5 0 に記載の抗原結合蛋白。

【請求項 6 4】

(a) 宿主細胞において、
免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン (C_L ドメイン) の N 末端に位置する抗原結合部位を有する第一ポリペプチドをコードしている組換え D N A 組み立て物、ここでこの C_L ドメインは免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン (C_H 1 ドメイン) と安定に結合できる、および

該 C_H 1 ドメインの N 末端に位置する抗原結合部位を有する第二ポリペプチドをコードしている組換え D N A 組み立て物、ここでこの C_H 1 ドメインの後には、安定な自己結合ができる 1 またはそれ以上の重鎖定常ドメインがある、
を、該ポリペプチドの発現および該抗原結合蛋白の形成をさせるに十分な時間および方法で同時発現させ ;そして、

(b) 該抗原結合蛋白を回収する、
ことを含む、抗原結合蛋白を製造する方法。

【請求項 6 5】

前記組み立て物が同じ D N A 発現ベクター上にある、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記組み立て物が異なる D N A 発現ベクター上にある、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記宿主細胞が細菌細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞である、請求項 6 4 に記載の方法

。

【請求項 6 8】

前記抗原結合蛋白が宿主細胞から分泌される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞を、前記該レセプターの活性化を中和するに十分な量の請求項 1 に記載の抗原結合蛋白で処理することを含む、V E G F レセプターの活性化を中和する方法。

【請求項 7 0】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が K D R に特異的である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が F L T 1 に特異的である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

細胞を、腫瘍の増殖を低下させるに十分な量の請求項 1 に記載の抗原結合蛋白で処理することを含み、ここで前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個は V E G F レセプターに特異的である、腫瘍の増殖を低下させる方法。

【請求項 7 3】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が K D R に特異的である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が F L T 1 に特異的である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

細胞を、血管新生を阻害するに十分な量の請求項 1 に記載の抗原結合蛋白で処理することを含み、ここで抗原結合部位のうち少なくとも 1 個は V E G F レセプターに特異的である、血管新生を阻害する方法。

【請求項 7 6】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が K D R に特異的である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記抗原結合部位のうち少なくとも 1 個が F L T 1 に特異的である、請求項 7 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は免疫グロブリン (I g) 型抗原結合蛋白の製造を目的とするものである。より詳細には、本発明は、天然免疫グロブリンの特性を示すことのできる二重特異性抗原結合蛋白を提供する。天然 I g G 免疫グロブリンは単一特異性且つ二価であり、同じ抗原エピトープに特異的な 2 個の結合ドメインを持っている。これとは対照的に、本発明に係る I g G 型抗原結合蛋白は二重特異性且つ二価である。本発明に係る蛋白は、2 つの軽鎖の各々と 2 つの重鎖の各々に、4 個の抗原結合部位を持つ。軽鎖上にある抗原結合部位が重鎖上にある抗原結合部位と異なっている時、この蛋白は二重特異性且つ二価である。この抗原結合部位が同じである時、この I g G 型蛋白は単一特異性且つ四価である。本発明に係る抗原結合蛋白の設計は、望ましくない可変ドメインの対合を回避するやり方で、係る分子の効率的な製造を提供する。

【0 0 0 2】

発明の背景

抗体の特異性とは、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を意味する。例えば天然抗体は単一特異性である。二重特異性抗体 (B s A b) とは、2 個の異なる抗原結合特異性または部位を持つ抗体である。抗原結合蛋白が 1 以上の特異性を持つ場合、認識

10

20

30

40

50

されるエピトープは、単一の抗原と、または1以上の抗原と結合できる。

【0003】

抗体価とは、抗原結合蛋白が特定のエピトープに対して持つ結合部位の数を意味する。例えば、天然IgG抗体は単一特異性且つ二価である。抗原結合蛋白が1以上のエピトープに対して特異性を持つ場合、抗体価は各々のエピトープについて算出する。例えば、4個の結合部位を持ち単一のエピトープを認識する抗原結合蛋白は四価である。4個の結合部位と2個の異なるエピトープに対する特異性を持つ抗原結合蛋白は、二価であると考えられる。

【0004】

天然の抗体分子は、2つの同一の重鎖と二つの同一の軽鎖で構成されている。各々の軽鎖は鎖間ジスルフィド結合によって重鎖と共有結合している。2つの重鎖はさらに複数のジスルフィド結合によって相互に連結している。図1は、典型的なIgG抗体の構造を示している。個々の鎖は折り畳まれて、類似の大きさ(110-125アミノ酸)および構造を持ち異なる機能を有するドメインとなっている。軽鎖は1つの可変ドメイン(V_L)と1つの定常ドメイン(C_L)を含んでいる。重鎖は1つの可変ドメイン(V_H)と、抗体のクラスまたはイソタイプに応じて3または4個の定常ドメイン(C_H1 、 C_H2 、 C_H3 および C_H4)を含んでいる。マウスおよびヒトでは、イソタイプはIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMであり、IgAとIgGはさらにサブクラスまたはサブタイプに細分される。 V_L および V_H ドメインから成る抗体部分は「Fv」と呼ばれ、抗原結合部位を構成する。一本鎖Fv(scFv)は、1個のポリペプチド鎖上に V_L ドメインと V_H ドメインを含む改変された蛋白であり、ここで、一方のドメインのN末端と他方のドメインのC末端は可撓性のリンカーによって結合している。「Fab」とは、 V_L 、 V_H 、 C_L および C_H1 ドメインで構成される抗体の部分を目指す。

10

20

【0005】

可変ドメインは、抗体間で、特に抗原結合部位の位置でかなりのアミノ酸配列変化性を示す。各々の V_L および V_H には、「超可変」または「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる3個の領域が見出される。

【0006】

「Fc」は、対合した重鎖定常ドメインを含む抗体部分の呼称である。例えばIgG抗体では、Fcは C_H2 および C_H3 ドメインを含む。IgAまたはIgM抗体のFcはさらに C_H4 ドメインを含む。Fcは、Fcレセプター結合、補体仲介細胞傷害の活性化、および抗体依存性細胞性細胞傷害に関係している。複数のIgG様蛋白の複合体であるIgAおよびIgMのような天然抗体については、複合体の形成はFc定常ドメインを必要とする。

30

【0007】

最後に、「ヒンジ」領域が、2個の重鎖の共有結合のための抗体のFabおよびFc部分を分離し複数のジスルフィド結合を含むと共に、Fab相互の、そしてFcに対するFabの可動性を与えている。

【0008】

多特異性抗原結合蛋白は、癌の画像化および治療薬といった幾つかの小規模臨床試験に使用されてきたが、広範な臨床評価は、効率的な製造法の欠如によって阻まれている。これまでこのような蛋白の設計は、主として多特異性を提供することに関心が持たれていた。天然抗体分子の持つその他の有用な機能を与えることに注意が払われた例は殆ど無かった。

40

【0009】

近年、二重特異性および/または多価抗体フラグメントの製造のために、多岐にわたる化学的および組換え方法が開発されている。総説としては、Holliger, P. and Winter, G., Curr. Opin. Biotechnol. 4, 446-449 (1993); Carter, P. et al., J. Hematotherapy 4, 463-470 (1995); Pluckthun, A. and Pack,

50

P., Immunotechnology 3, 83-105 (1997) を参照されたい。二重特異性および/または二価性は、可撓性リンカー、ロイシンジッパーモチーフ、 $C_H C_L$ -ヘテロ二量体化による2個のscFv分子の融合、ならびに二価単一特異性diabodyおよび関連構造を形成するためのscFv分子の結合によって達成されてきた。多価性は、例えばp53、ストレプトアビジン、およびヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを使用することにより、scFvまたはFabフラグメントのカルボキシまたはアミノ末端に多量体化配列を付加することによって達成されてきた。例えば、(scFv1)-ヒンジ-ヘリックス-ターン-ヘリックス-(scFv2)という形のscFv融合蛋白のヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを介する二量体化により、2個の標的抗原の各々に対して2個のscFv結合部位を有する四価二重特異性ミニ抗体が生成する。 10

【0010】

多少なりとも完全なIgG定常ドメイン構造を持つという点でIgG抗体に似ている、IgG型二重特異性抗体の製造は、2個の異なるIgG分子の化学的架橋、または同じ細胞からの二種類の抗体の同時発現によって達成された。化学的架橋は効率が悪く、抗体活性の損失を招き得る。構成成分である重鎖および軽鎖の誤対合のため、いずれの方法も、かなりの量の望ましくない且つ非機能的な物質の生成を招く。誤対合を減少または排除するために用いる方法は、別の望ましくない効果を有する。

【0011】

望ましくない異種生成物の産生は、これまで用いられてきた方法の多くにとって著明な欠点となっている。例えば、二重特異性抗体(BsAb)の製造の際、様々なドメインの適切な結合を保証する方法が無いと、実際にはその生成物の一部だけが二重特異性であるに過ぎない。トランスフェクトされた細胞で同時発現されるIgG重鎖および軽鎖の、異なる二つの組の間に不要な対合が起こることを克服するために開発された1つの戦略は、同じ抗体重鎖間のホモ二量体化を減らすための、2個の重鎖の C_H3 ドメインの修飾である。Merchant, A.M., et al., (1998) Nat. Biotechnology 16, 677-681。その方法では、二重特異性抗体の各結合部位に同一の軽鎖の使用を要求することにより、軽鎖の誤対合が排除された。 20

【0012】

二重特異性分子の取得を目的とした殆どの仕事において、抗原特異性以外の機能的または構造的側面の維持には殆ど注意が払われてこなかった。例えば、Fc領域重鎖定常ドメインの存在および機能を必要とする、補体仲介細胞傷害(CMC)および抗体依存性細胞仲介細胞傷害(ADCC)は、殆どの二重特異性抗体において、いずれも失われている。ColomaおよびMorrisonは、scFvを完全な重鎖のC末端に融合させることにより、Fcドメインを有する二価BsAb分子の均質集団を作製した。この融合物と抗体軽鎖の同時発現は、一端で第一の抗原と、そして他端で第二の抗原と結合する、二価二重特異性分子の均質集団の生成を導いた(Coloma, M.J. and Morrison, S.L. (1997) Nat. Biotechnology 15, 159-163)。しかしながらこの分子は補体を活性化する能力が低下しており、CMCを奏効させることができなかった。さらに、この C_H3 ドメインは低い親和性で高親和性Fcレセプター(FcR1)に結合した。 30 40

【0013】

本発明は、(1) 二重特異性且つ二価であり得、(2) 抗原結合部位の選択に関する束縛が排除されており、(3) Fc定常ドメインおよびこれに付随する機能を有し、(4) 実質上均質であり、そして(5) さらなる加工を行わずに哺乳動物またはその他の細胞で製造できる、抗原結合蛋白を提供することにより、これらの不都合を克服する。

【0014】

発明の要約

本発明は、免疫グロブリン様複合体中で安定に結合している2個の第一ポリペプチドと2個の第二ポリペプチドの複合体を含む、抗原結合蛋白を目的とするものである。第一ポリ 50

ペプチドは、免疫グロブリン重鎖第一定常ドメイン（ C_H1 ドメイン）と安定に結合できる、免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（ C_L ドメイン）のN末端に位置する抗原結合部位を含む。第二ポリペプチドは、 C_H1 ドメインのN末端に位置する抗原結合部位とこれに続く1またはそれ以上の重鎖Fc領域定常ドメイン（ C_H ドメイン）を含む。このFc C_H ドメインは安定な自己結合ができ、即ち、各 C_H ドメインは自己の別のコピーと対合または結合することができる。したがって、本発明に係る抗原結合蛋白は一般に4個のポリペプチドおよび4個の抗原結合部位で構成される。抗原結合部位は抗原に結合できる任意のアミノ酸配列によっても提供され得るが、好ましい態様では、抗原結合部位は一本鎖Fvにより提供される。第一および第二ポリペプチドの結合部位が異なっている場合、この抗原結合蛋白は二重特異性である。それらが同じである場合、この抗原結合蛋白は単一特異性である。必ずという訳ではないが通常、これらのポリペプチドはジスルフィド橋によって共有結合している。好ましい態様では、本発明に係る抗原結合蛋白は二重特異性且つ二価である。即ち、これらは同じ抗原または異なる抗原上においてよい二つの異なるエピトープに結合する。

10

【0015】

ポリペプチド鎖の結合に備えることに加え、Fc定常ドメインは他の免疫グロブリン機能にも貢献する。その機能には、補体仲介細胞傷害の活性化、抗体依存性細胞仲介細胞傷害の活性化、およびFcレセプター結合が包含される。本発明に係る抗原結合蛋白を治療または診断目的で投与する場合、Fc定常ドメインはまた血清半減期にも寄与する。Fc定常ドメインはいかなる哺乳動物または鳥類の種に由来するものであってもよい。本発明に係る抗原結合蛋白を人間の治療に使用する場合、ヒト起源の定常ドメインが好ましいが、可変ドメインはヒト以外の起源であってもよい。ヒト可変ドメインが好ましい場合、キメラscFvを使用できる。

20

【0016】

抗原結合部位はいかなる抗原に特異的なものであってもよく、任意の手段で取得できる。例えば、scFvはモノクローナル抗体から、または、 V_L および V_H ドメインの無作為組み合わせライブラリーから取得できる。

【0017】

好ましい態様では、scFvはヒトキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター（KDR）に特異的に結合する。特に好ましいのは、KDRの細胞外ドメインに結合し、そのリガンドである血管内皮増殖因子（VEGF）による結合を遮断し、そして/またはVEGFが誘発するKDRの活性化を中和する、抗原結合蛋白である。別の好ましい態様では、scFvはFlt-1に特異的に結合する。Flt-1の細胞外ドメインに結合し、そのリガンドVEGFおよび胎盤成長因子（PIGF）の一方または両方による結合を遮断し、そして/またはVEGFが誘発するまたはPIGFが誘発するFlt-1の活性化を中和する、抗原結合蛋白もまた特に好ましい。

30

【0018】

二官能性抗原結合蛋白による二元的レセプター遮断は、VEGFにより刺激される血管新生の阻害において、より有効となり得る。好ましい態様では、組換え二重特異性二価抗原結合蛋白は、Flt-1およびKDRの両者を、VEGFおよび胎盤成長因子（PIGF）を包含するそれらのリガンドとの結合から遮断することができる。したがって、好ましい二重特異性二価抗原結合蛋白は、KDR/VEGF、Flt-1/VEGFおよび/またはFlt-1/PIGF相互作用を妨害する。このような抗原結合蛋白は、VEGFにより刺激されるヒト内皮細胞の分裂誘発の、そしてVEGFおよびPIGFにより誘発されるヒト白血病細胞の遊走の、親抗体よりも強力なインヒビターとなり得る。

40

【0019】

KDRおよび/またはFlt-1のリガンド結合を遮断し、またはその活性化を中和する本発明に係る抗原結合蛋白は、内皮細胞増殖、血管新生および腫瘍成長を低下させ、そしてVEGFおよびPIGFにより誘発されるヒト白血病細胞の遊走を阻害するのに有用である。

50

【0020】

本発明はさらに、本発明に係る第一および第二ポリペプチドをコードしている1またはそれ以上の組換えDNA組み立て物を、発現と複合体形成をさせるに十分な時間と方法で、哺乳動物細胞中で同時発現させ、その抗原結合蛋白を回収する、抗原結合蛋白を製造する方法を包含する。

【0021】

本発明の或る態様では、scFvドメイン(V_L および V_H)をコードしている遺伝子を、scFv発現およびスクリーニングを提供する細菌ベクター中でクローニングし組み立てる。所望のscFvをコードしているヌクレオチド配列を、哺乳動物細胞中で有効な発現を提供するよう設計したクローニングベクターの所望の重鎖または軽鎖定常ドメインをコードしている配列に、フレーム内で連結する。即ち、scFvと軽鎖定常ドメインをコードしている第一組み立て物と、scFvと重鎖定常ドメインをコードしている第二組み立て物とが同じまたは別個の発現ベクターにある、二つの組み立て物を、宿主細胞中にトランスフェクトし、同時発現させる。

10

【0022】

二価且つ二重特異性である本発明に係る抗原結合蛋白は、望ましい特徴の組み合わせを持っている。第一に、これらは均質である。設計により、抗体重鎖および軽鎖の誤対合は大幅に減少または排除される。例えば、典型的な二重特異性抗体は、二つの特異性を提供するために2個の異なる重鎖の使用を必要とする。重鎖がIgG型分子に配置される場合は4個の組み合わせが可能である。これらのうち2個は誤対合した重鎖で構成され、その結果この生成物は単一特異性である。逆に本発明に係る蛋白では、全ての重鎖が等価であり、誤対合は起こらない。各々の重鎖が第一の完全な結合部位を含み、各々の軽鎖が第二の異なる結合部位を含むため、二重特異性を提供するためにはただ一つの型の重鎖とただ一つの型の軽鎖を必要とするに過ぎない。

20

【0023】

本発明に係る二重特異性蛋白の第二の利点は、四量体型においてこれらが各結合特異性に関して二価であるという事である。二量体のBsAbを欠く天然抗体の特徴は、この天然抗体が、それが有する抗体結合部位に関して二価であるという事である。二量体のBsAbは、それが有する2個の結合部位のそれぞれに関して一価である。二価性は、結合の協同性と、1個の抗原結合部位を含む分子をはるかに凌駕するアビディティの増大を実現するため、この事は抗体機能にとって重要である。

30

【0024】

本発明に係る蛋白の第三の利点は、天然抗体のFc領域を構成し(例えば、IgG分子については C_H2 および C_H3)他の抗体機能を提供する重鎖定常ドメインが存在し得る事である。さらに、 C_L および C_H1 ドメインと共に複数の結合ドメインがFc領域と隔たっており、その結果、Fc領域により提供される機能が損なわれない。保持される機能はFcが或る種の補助分子に結合する能力に関連し(例えば、細胞表面および可溶性Fcレセプターへの結合、IgAおよびIgMについてはJ鎖の結合、IgAについてはS蛋白)、そして、補体経路の活性化(補体仲介細胞傷害、CMC)、幾つかの異なる白血球集団により標的細胞に結合した抗体の認識(抗体依存性細胞仲介細胞傷害、ADCC)およびオプソニン化(貪食作用の増強)を包含する。加えて、重鎖のカルボキシ末端への大ドメインの付加を回避することにより、立体障害が回避される。これは、上述の機能の多くにとって重要であり、より高次構造の抗体分子の組み立てにとっても重要である(例えば、IgAは2個のFcを介して結合した4個の重鎖で構成され; IgMは5個のFcにより結合した10個の重鎖で構成されている)。最後に、Fc重鎖定常ドメインは血清半減期の増大を付与する。

40

【0025】

本発明に係る蛋白の第四の利点は、完全な生成物の取得にインビトロでの加工を必要としないことである。人工的な方法で再編成されてはいるものの、各々のドメインは生態系での発現を可能にする本来の性質を持っている。

50

【0026】

本発明はまた、単一特異性四価抗原結合蛋白の産生にも適用できる。このような蛋白では、4個の結合部位は全て同じ特異性を持っている。さらに、本発明は一価二重特異性抗原結合蛋白および二価単一特異性抗原結合蛋白の製造方法を提供する。例えば、Fab型蛋白を製造できるが、これは、2個の異なる結合部位または2個の等価な結合部位を含み、第一結合部位はC_Lドメインに連結し、第二結合部位はC_H1ドメインに連結している。

【0027】

好ましい態様では、第一および第二結合部位はそれぞれ一本鎖F_v(scF_v)によって与えられる。第一の結合特異性を持つscF_vはC_Lドメインと融合してscF_v-C_Lポリペプチドを形成し、第二の結合特異性を持つscF_vはC_Hと融合してscF_v-C_Hポリペプチドを形成する。本明細書で言及するように、2またはそれ以上のC_Hドメインがあり、そのドメインのうち1個がC_H1である限り、scF_v-C_Hポリペプチドは、抗体重鎖の任意の部分と融合したscF_vとして定義される。scF_v-C_L-scF_v-C_Hヘテロ二量体はC_LおよびC_H1定常ドメインの天然の結合により形成される。少なくとも1個のC_H2、C_H3、またはC_H4定常ドメインの存在は、一方のポリペプチド上のC_H2、C_H3、またはC_H4ドメインと、別のポリペプチド上にあるそれ自身のコピーとの天然の結合によって、4個の結合部位を持つ抗原結合蛋白に2個のscF_v-C_L-scF_v-C_Hヘテロ二量体を対合させる事を可能にする。

10

【0028】

正確な重鎖定常ドメイン構造は所望の機能的特性によって決定する。抗原結合蛋白が特定のイソタイプを持つことを望むのであれば、そのイソタイプの免疫グロブリン由来のC_Hドメインが選択されるであろう。例えば、所望のイソタイプがIgG1である場合、そのドメイン構造は(scF_v)₂-C_H1-C_H2-C_H3であり、定常ドメインはIgG1抗体由来のものである。

20

【0029】

このアプローチを使用して、4個の抗原結合部位を持つIgG様抗原結合蛋白の均質集団を得る。各々のヘテロ二量体が2個の異なる結合部位を含む場合、そのようにして形成される抗原結合蛋白は二重特異性且つ二価である。ヘテロ二量体が2個の等価な結合部位を含む場合、形成される抗原結合蛋白は単一特異性且つ四価である。ここに詳細を述べる態様では、抗原結合部位は抗体可変ドメインに含まれている。しかしながら、本発明はさらに、1またはそれ以上の結合機能が、目的とする特定の蛋白または抗原との既知の結合相互作用に基づいて選ばれた構造によって与えられる、二重特異性分子をも意図している。例えば、HIV-1のgp120の一部を、CD4に結合する能力に基づいて選択することができる。これに代わり、或る結合部位は、同種のレセプター蛋白に結合する能力に基づき選択したホルモンまたはサイトカインに対応するアミノ酸配列を含むかも知れない。

30

【0030】

本発明に係る或る抗原結合蛋白は、抗原に結合させるため、または蛋白とそのリガンドの相互作用を遮断するために使用する。本発明に係る別の抗原結合蛋白は、免疫細胞と標的細胞の間の相互作用を促進するために使用する。最後に、本発明に係る抗原結合蛋白は、抗腫瘍物質、標的部分、リポーター分子、または目的抗原に対する検出可能シグナル産生物質を局在化させるために使用する。

40

【0031】

本発明はさらに、KDRおよびその類似体に結合する、または血管新生もしくは腫瘍形成に関与するその他のレセプター分子に結合する抗原結合蛋白を提供する。

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は、均質であり、そして、結合の協同性(アビディティ)といった天然抗体の機能的特性、ならびに補体仲介細胞傷害および抗体依存性細胞毒性を活性化する能力を保持できる、抗原結合蛋白を提供するものである。一般に、本発明に係る抗原結合蛋白は、各々の抗体可変ドメインの代わりに完全な抗原結合部位を有する、天然に存在する抗体の定常

50

ドメイン構造を持つ。即ち、天然に存在する抗体においては、軽鎖可変ドメイン (V_L) と重鎖可変ドメイン (V_H) の組み合わせにより単一の結合部位が提供され、その結果、例えば Ig G 型抗体の 4 個の可変ドメインは 2 個の完全な結合部位を提供する。対照的に、本発明に係る Ig G 型抗原結合蛋白は 4 個の完全な結合部位を持つが、それは、完全な抗原結合部位を含む構造が天然に存在する抗体の各々の V_L および V_H 可変ドメインに取って代わるためである。

【0033】

別途記載の無い限り、または文脈から明白でない限り、本明細書中使用する抗体ドメイン、領域およびフラグメントは、当分野で周知の容認された標準的定義である。例えば、Abbas, A. K., et al., (1991) Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA を参照されたい。

【0034】

典型的な Fv の抗原結合部位は、抗原に対する結合部位の親和性に様々な度合いで寄与する 6 個の相補性決定領域 (CDR) を含んでいる。より少ない CDR (例えば 3、4 または 5 個) を含む抗原結合部位もまた機能的であり、本発明の範囲内に包含される。CDR およびフレームワーク領域 (FR) の範囲は、集められたアミノ酸配列のデータベースとの比較によって決定し、ここではそれらの領域が配列間の変異性に従って定義されている。3 個の重鎖可変ドメイン CDR (CDRH1、CDRH2 および CDRH3) および 3 個の軽鎖可変ドメイン CDR (CDRL1、CDRL2 および CDRL3) がある。

【0035】

アビディティは免疫グロブリンとその抗原の間の結合の強さの尺度である。各結合部位における結合の強さを評価する親和性とは異なり、アビディティは免疫グロブリン分子の親和性と価数の両者に関係する。

【0036】

本発明に係る蛋白は、1 またはそれ以上の免疫グロブリンクラスの抗体の一部から誘導され、またはそれを取り込んでいる。免疫グロブリンのクラスは Ig G、Ig M、Ig A、Ig D および Ig E イソタイプを包含し、Ig G および Ig A の場合それらのサブタイプを包含する。

【0037】

本発明に係る抗原結合蛋白は、2 個の軽鎖と 2 個の重鎖を含むヘテロ四量体であるという点で Ig G タイプの抗体に似ている。しかしながら Ig G タイプの抗体とは異なり、これらは 4 個の抗原結合部位を持ち、少なくとも C_H1 およびもう 1 個別の C_H ドメインが存在する場合には、より少ない定常ドメインを持っているかも知れない。4 個の抗原結合部位はそれぞれ 2 個の結合特異性のための 2 個の結合部位、または 1 個の結合特異性のための 4 個の結合部位を含み得る。

【0038】

好ましい態様では、この形を持つ二重特異性蛋白は、天然に存在する Ig G 型抗体のようなアビディティ特性を示すことができる。天然に存在する Ig G 分子の場合そうであるように、各々の結合特異性について、2 個の等価な抗原結合部位の存在が抗原との結合の協同性を実現する。当業者にとっては周知であるが、重鎖定常領域の適切な選択によって、他のクラスの抗体、例えば Ig A、Ig M、およびその他の型の抗体に似た二重特異性抗体を作製できる事は明白である。

【0039】

本発明は、重鎖が軽鎖と対合する時に 1 個のヘテロ二量体分子内で異なる結合特異性が結び付けられるよう、異なる特異性の結合ドメインを重鎖および軽鎖定常ドメインと連結することを意図している。このような分子の集団は、実際において全二量体が第一の特異性を持つ 1 個の結合ドメインと、第二の特異性を持つ 1 個の結合ドメインを含むという点で、実質上均質である。 C_L および C_H1 ドメインの結合を介する重鎖と軽鎖の優先的な自然の対合に依存することにより、同じ特異性を持つ 2 個の結合ドメインを含む二量体の形

成が低下しまたは排除される。同様に、重鎖の優先的結合がFc領域を介して起こり、本発明に係る抗原結合蛋白を形成する。

【0040】

一般に、本発明に係る抗原結合蛋白は完全なC_LおよびC_H1ドメインを含んでおり、これらは鎖間ジスルフィド結合により共有結合している。しかしながら本発明はまた、アミノ酸が除去または挿入されており、そして該ドメインが安定な複合体として結合できる限り、共に鎖間ジスルフィド結合を持っているかも知れないし持っていないかも知れない修飾C_LおよびC_H1ドメインの使用をも意図している。

【0041】

安定な結合、または複合体とは、生理的条件下で抗原結合蛋白のポリペプチドが複合体として存在することを意味する。例えば、非還元条件下の天然ゲル上で、該ポリペプチドは複合体として移動する。全ての抗体軽鎖が与えられた任意の重鎖と有効に結合する訳ではなく、逆もまた同様であるという事が理解できるであろう。しかしながら、有効に対合するC_LおよびC_H1定常ドメインの組み合わせは当分野で周知であり、それが好ましい。

10

【0042】

天然抗体がそうであるように、重鎖-軽鎖ヘテロ二量体は特定の重鎖定常ドメインの結合を介して結合し、より高次の構造を形成する。例えば、IgG型抗体は、四量体構造において、共有結合により結びついた2個の重鎖-軽鎖ヘテロ二量体を含んでいる。別の或る抗体型は類似の四量体構造を含んでいるが、この四量体構造は例えば2個の四量体(IgA)または10個の四量体(IgM)を含む、より高次の構造に組み込まれる。

20

【0043】

天然抗体と同様に、本発明に係る二価二重特異性抗原結合蛋白は、重鎖の適切な結合をFc定常ドメインとヒンジ領域に頼っている。一般に本発明に係る抗原結合蛋白は、ヒンジ領域と1またはそれ以上のFc定常ドメインまたはその一部を含んでいる。付随する全ての機能を保持するためには、通常、全てのFc定常ドメインを取り込んでいるのが望ましい。しかし、本発明はさらに、少なくともそのような1個のドメインが存在するならば、或る定常ドメインのみを含んでいることをも意図している。様々なFc機能がFcの異なる部分に依存しているので、全ての機能を所望する訳でないのならば、より少ないC_Hドメインを重鎖に取り込むだけでよい。例えば、補体の著しい活性化はIgGのC_H2またはIgMのC_H3を必要とする。本発明はさらに、重鎖が安定な複合体として結びつくことができる限り、アミノ酸が置換、除去、挿入または修飾された、修飾ヒンジおよびFc重鎖ドメインの使用をも意図している。

30

【0044】

好ましい抗原結合蛋白の抗原結合部位は、任意の所望特異性を持つFv領域で構成される。このFvは一本鎖Fv(scFv)であり、ドメインを結合させて機能的抗原結合部位を形成させるペプチドリンカーによって連結したV_HドメインとV_Lドメイン(いずれの順序でもよい)で構成されている(例えば、米国特許第4946778号、Ladner et al., (Genex); WO88/09344, Creative Biomolecules, Inc., Uhston et al.を参照されたい)。WO92/01047, Cambridge Antibody Technology/McCafferty et al., は、可溶性組換え遺伝子ディスプレイパッケージの表面のscFvフラグメントのディスプレイを記載している。

40

【0045】

scFvの製造に用いるペプチドリンカーは、V_LおよびV_Hドメインの適切な三次元折り畳みと結合、ならびに標的分子結合特異性の維持を保証するよう選択された可撓性ペプチドである。一般に、V_LまたはV_H配列のカルボキシ末端は、このようなペプチドリンカーによって、相補的V_HまたはV_L配列のアミノ末端に共有結合する。リンカーは一般に10ないし50アミノ酸残基であるが、抗原結合部位を形成させるに十分な可撓性を持つ任意の長さが考えられる。好ましくはリンカーは10ないし30アミノ酸残基である。より好ましくはリンカーは12ないし30アミノ酸残基である。最も好ましくはリンカー

50

は15ないし25アミノ酸残基である。このようなリンカーペプチドの例は(G l y - G l y - G l y - S e r)₃を包含する。

【0046】

本発明における使用のため、任意の起源のV_LおよびV_Hドメインをs c F v中に取り込むことができる。例えば、V_LおよびV_Hドメインは所望の結合特性を持つモノクローナル抗体から直接取得できる。別法として、V_LおよびV_Hドメインは、選択した哺乳動物由来のV遺伝子配列のライブラリーからのものであってもよい。このようなライブラリーの要素はV_LおよびV_Hドメインの無作為の組み合わせを発現し、所望の結合特性を持つ要素を同定するため、任意の所望抗原を用いてスクリーニングする。特に好ましいのはヒトV遺伝子ライブラリーである。このようなスクリーニングのための方法は当分野で既知である。選択した非ヒト起源のV_LおよびV_Hドメインは、例えばC D RループをヒトV_LおよびV_Hドメインに置換することにより「ヒト化」し、または、当分野で既知のその他の手段によって修飾して、人間に投与した時の免疫原性を低下させることができる。

10

【0047】

生理的免疫反応において、発現される抗体遺伝子の突然変異および選択は、標的抗原について高い親和性を有する抗体の産生につながる。s c F vで発現されるV_LおよびV_Hドメインを同様にインビトロ突然変異およびスクリーニング法に付して、高親和性変異体を取得することができる。

【0048】

細菌分泌シグナル配列および簡便な制限クローニング部位を含む、s c F vの組み立てと発現のためのベクターが入手できる。特定の抗原に特異的な結合部位をコードしているV_LおよびV_H遺伝子の組み合わせをB細胞ハイブリドーマのc D N Aから単離する。別法として、V_LおよびV_H遺伝子の無作為組み合わせをゲノムD N Aから取得し、次いでその生成物を目的抗原との結合についてスクリーニングする。典型的には、クローニングのために、クローニングベクター中の制限部位と両立し得るプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を使用する。例えば、D r e h e r , M . L . e t a l . (1 9 9 1) J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 3 9 : 1 9 7 - 2 0 5 ; W a r d , E . S . (1 9 9 3) A d v . P h a r m a c o l . 2 4 : 1 - 2 0 ; C h o w d h u r y , P . S . a n d P a s t a n , I . (1 9 9 9) N a t . B i o t e c h n o l . 1 7 : 5 6 8 - 5 7 2を参照されたい。

20

30

【0049】

V_LおよびV_Hドメインの、選択したまたは無作為の組み合わせを持つs c F vを発現させるために、これらのドメインをコードしているV遺伝子を細菌の発現ベクター中に組み込む。例えば、細菌分泌シグナル配列およびペプチドリナーをコードしている配列を持ち、そしてV_LおよびV_H遺伝子の挿入のために都合のよい制限部位を有するベクターを使用することができる。別法として、最初に、例えば部分重複プライマーを用いるP C R増幅により、必要な全コード化配列(例えば、分泌シグナル、V_L、V_Hおよびリンカーペプチド)を単一の配列中に組み込み、その後プラスミドまたはその他のベクター中にライゲーションすることが望ましいかも知れない。V_LおよびV_Hドメインの特別な組み合わせの取得を望む場合には、それらのドメインをコードしている配列に特異的なP C Rプライマーを使用する。多数のV_LおよびV_Hドメインの多様な組み合わせの作製を望む場合には、複数の配列を増幅するプライマーの混合物を使用する。

40

【0050】

好ましい細菌ベクターは線維状ファージのコート蛋白に結合するs c F vの発現をさせることができる。最も普通に用いられるファージのコート蛋白はファージM 1 3の遺伝子I I I蛋白である。線維状ファージ上のs c F vのディスプレイは、s c F vの大集団を所望の結合特性についてスクリーニングすることを望む場合には特に有用である。s c F v - g I I I蛋白融合物を発現する細菌細胞をM 1 3変異体に感染させるが、この変異体は、s c F v - g I I I融合物遺伝子を持つベクターD N Aをファージ粒子の中に優先的にパッケージングさせることができ、その中にs c F v - g I I Iコート蛋白融合物が組み

50

込まれる。得られるファージ粒子の各々は特定の s c F v をディスプレイし、s c F v をコードしているベクターを含んでいる。次いで s c F v の多様な集まりをディスプレイしているこのようなファージ粒子の集団を、パンニング法により所望の結合特性について濃縮する。典型的には、所望の粒子を、所望のファージ粒子が結合することのできる抗原で被覆した固体表面に固定化する。結合した粒子を集め、細菌細胞を感染させるためにさらに使用する。パンニング法を反復して所望の結合特性をさらに濃縮する。

【0051】

s c F v - g I I I 融合物をコードしているベクターは s c F v および g I I I コード化領域の結合点に翻訳停止コドンを含むことができる。対応する翻訳停止サプレッサーを持つ細菌細胞中で発現される時、この融合蛋白が産生される。対応するサプレッサーを持たない細菌細胞で発現される場合には、遊離の s c F v が産生する。

10

【0052】

血管内皮増殖因子 (V E G F) は、胚の発生中の血管形成、および成人の血管新生プロセス、例えば創傷治癒、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、炎症性疾患、腫瘍の増殖および転移の、重要な調節物質である。V E G F は、血管透過性の強力な誘導物質であり、内皮細胞の遊走および増殖の刺激物質であり、そしてその活性を主として2種類のチロシンキナーゼレセプター、V E G F レセプター1 (V E G F R - 1)、または f m s 様チロシンレセプター1 (F l t - 1)、および V E G F レセプター2 (V E G F R - 2)、またはキナーゼ挿入ドメイン含有レセプター (K D R、およびマウスの F l k - 1) によって仲介する。Ferrara, N., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 237, 1-30 (1999); Klagsbrum, M., et al., Cytokine Growth Factor Rev., 7, 259-270 (1996); Neufeld, G., et al., FASEB J., 13, 9-22 (1999)。多くの研究が、V E G F とそのレセプターの過剰発現は腫瘍に関連する血管新生において、そしてそれ故腫瘍の増殖および転移において重要な役割を果たしていることを示している。

20

【0053】

F l t - 1 および K D R は胚の血管の発生において別個の機能を持っている。マウスにおいていずれかのレセプターをコードしている遺伝子の選択的除去は胚にとって致命的であり、胚の発生における V E G F 経路の生理的重要性を立証している。K D R 欠損マウスは血島形成が損なわれ且つ成熟した内皮細胞を欠失しており、一方無 F l t - 1 胚は内皮細胞が潤沢であるにもかかわらず、不完全な血管形成のため、正常な血管系を発達させることができない。Shalaby, F., et al., Nature 376, 62-66 (1995); Fong, G. H., et al., Nature 376, 66-70 (1995)。これに対し、チロシンキナーゼドメインの末端切除による F l t - 1 シグナル伝達の不活性化はマウス胚の血管新生および胚の発生を損なうことがなく、F l t - 1 レセプターによるシグナル伝達が胚の血管系の発生にとって必須でないことを示唆している。Hiratsuka, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9349-9354 (1998)。成人における V E G F に対する F l t - 1 および K D R の生物学的応答もまた異なっているように見受けられる。一般的に K D R は、内皮細胞増殖、遊走、分化、管形成、血管透過性増大、および血管の完全性の維持をもたらす主たる V E G F シグナルトランスデューサーであると考えられている。F l t - 1 ははるかに弱いキナーゼ活性を持ち、V E G F により刺激された場合に分裂応答を誘発できない (これは K D R のおよそ10倍の親和性で V E G F に結合するのであるが)。F l t - 1 はさらに、V E G F および胎盤増殖因子 (P I G F) により誘発される単球 / マクロファージの遊走と組織因子の産生にも関連している。Barleon, B., et al., Blood 87, 3336-3343 (1996); Clauss, M., et al., J. Biol. Chem. 271, 17629-17634 (1996)。

30

40

【0054】

50

好ましい態様では、本発明に係る抗原結合蛋白は、K D Rに結合しK D RへのV E G Fの結合を遮断するs c F vを含んでいる。s c F v p 1 C 1 1 (配列番号27、28)はマウスs c F v ファージディスプレイライブラリーから製造する(Z h u e t a l . , 1998)。p 1 C 1 1はV E G F - K D R相互作用を遮断し、V E G Fにより刺激されるレセプター磷酸化とヒト血管内皮細胞(H U V E C)の分裂誘発を阻害する。このs c F vは、例えばH U V E C上の可溶性K D Rおよび細胞表面発現されるK D Rの両者と、高い親和性($K_d = 2.1 \text{ nM}$)で結合する。

【0055】

第二の好ましい態様では、本発明に係る抗原結合蛋白は、F l t - 1に結合しそしてF l t - 1へのV E G Fの結合および/またはP I G Fの結合を遮断する、s c F vを含んでいる。M a b 6.12は可溶性および細胞表面発現されるF l t - 1に結合する。s c F v 6.12はマウスモノクローナル抗体M a b 6.12のV_LおよびV_Hドメインを含んでいる。M a b 6.12を産生するハイブリドーマセルラインはA T C C番号P T A - 3344として寄託されている。この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約およびその規則(ブダペスト条約)の規定の下になされた。これは、生きている培養を寄託日から30年間維持することを保証するものである。この微生物はブダペスト条約の条件の下でA T C Cによって入手可能とされ、関連する米国特許の登録時に無制限の入手可能性を保証する、出願者とA T C Cとの合意の下にある。寄託された菌株の入手可能性は、任意の政府当局の下でその特許法に従って付与された権利に違反してその発明を実施する許可と解釈してはならない。

【0056】

本発明に係る抗原結合蛋白は任意のエピトープ、抗原部位または蛋白に対する結合部位を持ち得る。好ましい抗原結合蛋白はレセプター蛋白の活性化を中和する。V E G Fレセプターおよび血管新生に関するその他のレセプターが特に興味深い。V E G FレセプターはK D R、F l k - 1、F l t - 1を包含する。インビボ血管新生の可能性ある調節物質として関与しているその他の因子は、線維芽細胞増殖因子(F G F)、血小板由来増殖因子(P D G F)、上皮増殖因子(E G F)を包含する。対応するレセプターは、線維芽細胞増殖因子(F G F - R)、血小板由来増殖因子レセプター(P D G F - R)、上皮増殖因子レセプター(E G F - R)である。血管新生および/または腫瘍形成に関するレセプターチロシンキナーゼもまた興味深い。このようなレセプターチロシンキナーゼは、F L T 4、H E R 2 / n e u、T e kおよびT i e 2を包含する。興味深いレセプターは、ヒト蛋白およびその他の哺乳動物由来の類似体を包含する。上に列挙したレセプターとして抗体が知られており、それらは本発明に係る抗原結合蛋白に使用するためのs c F v V_LおよびV_Hドメインの供給源である。列挙したレセプターのいずれかに特異的な本発明に係る抗原結合蛋白は単一特異性または二重特異性であってよい。本発明に係る或る二重特異性抗原結合蛋白は、上記レセプターのうち2種類に結合する。一つの好ましい態様では、係る二重特異性抗原結合蛋白はH E R 2およびE G F - Rに結合する。第二の好ましい態様では、本発明に係る抗原結合蛋白はK D RおよびF L T - 1に結合する。

【0057】

本発明に係る二重特異性抗原結合蛋白は、標的細胞上の抗原と免疫系エフェクター細胞上の抗原を架橋させることができる。これは、例えば細胞表面に目的とする特定の抗原を持つ細胞に対する免疫反応を促進させるために有用となり得る。本発明によれば、免疫系エフェクター細胞は、抗原特異的細胞、例えば細胞性免疫反応を活性化するT細胞、ならびに非特異的細胞、例えば細胞性免疫反応を仲介するマクロファージ、好中球およびナチュラルキラー(N K)細胞を包含する。

【0058】

本発明に係る抗原結合蛋白は、免疫系エフェクター細胞の任意の細胞表面抗原のための結合部位を持ち得る。このような細胞表面抗原は、例えばサイトカインおよびリンホカインレセプター、F cレセプター、C D 3、C D 16、C D 28、C D 32およびC D 64を包含する。一般に、抗原結合部位はs c F vによって提供され、これは前記の抗原に対す

る抗体から誘導され、当分野で周知である。サイトカインおよびリンホカインレセプターに特異的な本発明に係る抗原結合部位はまた、該レセプターのための天然リガンドの全体または一部に対応するアミノ酸配列であってもよい。例えば、細胞表面抗原がIL-2レセプターである時、本発明に係る抗原結合蛋白は、対応するアミノ酸またはIL-2の配列を含む抗原結合部位を持ち得る。その他のサイトカインおよびリンホカインは、例えばインターロイキン-4(IL-4)およびインターロイキン-5(IL-5)のようなインターロイキン、ならびに顆粒球-マクロファージCSF(GM-CSF)、および顆粒球CSF(G-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)を包含する。

【0059】

本発明に係る好ましい抗原結合蛋白は、C_L軽鎖定常ドメインに連結したscFvを有する第一ポリペプチド、ならびにC_H1、C_H2およびC_H3重鎖定常ドメインに連結したscFvを有する第二ポリペプチドを発現させることによって作製する。scFvをコードしているDNAフラグメントは、例えば、哺乳動物細胞中でヒト重鎖のいずれかのヒト軽鎖を発現するよう設計したHCMVベクター中にクローニングできる(例えば、Bendig, et al., 米国特許5840299; Maeda, et al. (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2, 124-134を参照されたい)。このようなベクターは、軽鎖および重鎖組み立て物の高レベル転写のためのヒトサイトメガロウイルス(HCMV)プロモーターおよびエンハンサーを含んでいる。好ましい態様では、軽鎖発現ベクターは、ヒト軽鎖をコードしているpKN100(Dr. S. Tannan Jones, MRC Collaborative Center, London, Englandより寄贈)であり、重鎖発現ベクターは、ヒト-1重鎖をコードしているpG1D105(Dr. S. Tannan Jonesより寄贈)である。いずれのベクターも、哺乳動物細胞およびE. coli中で機能するHCMVプロモーターおよびエンハンサー、複製起点ならびに選択マーカを含んでいる。

【0060】

選択マーカは、形質転換された宿主細胞が選択培養基中で生存または増殖するのに必要な蛋白をコードしている遺伝子である。典型的な選択マーカは、(a) 抗生物質またはその他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メソトレキサート、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠陥を補完する、または(c) 複合培地から得られない重要な栄養素、例えばBacilliのためのD-アラニンラセマーゼをコードしている遺伝子、を供給する、蛋白をコードしている。特に有用な選択マーカはメソトレキサートに対する耐性を付与する。例えば、DHFRの競合的アンタゴニストであるメソトレキサート(Mtx)を含有する培養基で全形質転換体を培養することにより、DHFR選択遺伝子で形質転換した細胞をまず同定する。野生型DHFRを使用する場合の適当な宿主細胞は、UrlaubおよびChasin(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216の記載のように調製し増殖させた、DHFR活性を欠失するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)セルラインである。次に、形質転換した細胞を増加レベルのメソトレキサートに暴露する。このことにより多コピーのDHFR遺伝子の合成が導かれ、同時にこの発現ベクターを含む多コピーの他のDNA、例えば抗体または抗体フラグメントをコードしているDNAの合成が導かれる。

【0061】

酵母中で遺伝子組み立て物を発現させることが望ましい場合、酵母での使用に好適な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である。Stinchcomb et al. (1979) Nature, 282, 39; Kingsman et al. (1979) Gene 7, 141。このtrp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株、例えばATCC No. 44076またはPEP4-1のための選択マーカを提供する。Jones(1977) Genetics 85, 12。次いでこの酵母宿主細胞ゲノム中のtrp1損傷の存在が、トリプトファン不在下での増殖により形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Le

10

20

30

40

50

u 2 欠失酵母菌株 (A T C C 2 0 6 2 2 または 3 8 6 2 6) は、 L e u 2 遺伝子を持つ既知のプラスミドによって補完される。

【 0 0 6 2 】

ベクターの形質転換および本発明に係る抗原結合蛋白の発現のために好ましい宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えば C O S - 7 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、およびリンパ球起源のセルライン、例えばリンパ腫、骨髄腫、またはハイブリドーマ細胞である。その他の真核生物宿主、例えば酵母がこれらに代わって使用できる。形質転換した宿主細胞は、当分野で既知の方法により、同化可能な炭素源、例えばグルコースまたは乳糖のような炭水化物、窒素、例えばアミノ酸、ペプチド、蛋白またはそれらの分解産物、例えばペプトン、アンモニウム塩など、および無機塩類、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウムおよびカルシウムの硫酸塩、磷酸塩および/または炭酸塩を含有する液体培地で培養する。培地はさらに、例えば微量元素、例えば鉄、亜鉛、マンガンなどの増殖促進物質を含有する。

10

【 0 0 6 3 】

本発明に係る抗原結合蛋白の各可変ドメインは完全な免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖可変ドメインであるか、または天然に存在するドメインの機能的等価物もしくは突然変異体もしくは誘導体であるか、または例えば W O 9 3 / 1 1 2 3 6 (M e d i c a l R e s e a r c h C o m n c i l e t a l . / G r i f f i t h s e t a l .) に記載のような技術を用いてインビトロで組み立てられた合成ドメインとすることができる。例えば、少なくとも 1 個のアミノ酸を欠失する抗体可変ドメインに対応するドメインを結合させることが可能である。重要な特徴的性質は、相補的可変ドメインと結合して抗原結合部位を形成する、各可変ドメインの能力である。

20

【 0 0 6 4 】

同様に、定常ドメインの重要な特徴は、安定な複合体を形成する能力である。本発明に係る抗原結合蛋白は完全な C_L および C_H 1 ドメインを含むが、本発明は、該ドメインが安定な複合体として結合できる限り、アミノ酸が除去または挿入されているかも知れない、そして鎖間ジスルフィド結合を持っているかも知れないし持っていないかも知れない、修飾された C_L および C_H 1 ドメインの使用をも意図している。

【 0 0 6 5 】

F c 定常ドメインの重要な特徴的性質は、自己結合し、F c レセプターに結合し、C M C を開始させ、そして A D C C を開始させる自己結合の能力を包含する。先に述べたように、本発明に係る抗原結合蛋白は、あらゆる定常ドメイン構造または機能が存在している必要はない。したがって、重鎖可変ドメイン、軽鎖可変ドメイン、定常ドメイン、s c F v および F c という語は、機能的に等価である全ての変異体を包含すると解すべきである。

30

【 0 0 6 6 】

本発明の好ましい態様では、二重特異性抗体の抗原結合部位は 2 種類の異なる結合特異性を持つ s c F v ドメインを含む。例えば、I g G 分子の V_L および V_H ドメインを異なる特異性を持つ s c F v ドメインに置換し、その結果、本明細書中で B s (s c F v) 4 - I g G と称する得られた分子はその標的抗原の各々について二価となる。B s (s c F v) 4 - I g G は、様々な発現系、とりわけ哺乳動物細胞中で機能的に発現され且つ組み立てられ、2 個の異なるエピトープに同時に結合できる。

40

【 0 0 6 7 】

本明細書で先に記したように、s c F v は軽鎖および重鎖定常ドメインとの結合にとって好ましい。しかしながら、それが望ましいまたは都合のよい場合は、本発明に係る二重特異性抗原結合蛋白の抗原結合部位を含む構造は、F v 以上または以下を包含する。例えば、これはさらに定常領域部分 (例えば、軽鎖または重鎖ドメインへの F a b の連結) または F v の一部のみ (例えば、抗原結合が 1 個の可変ドメインにより前もって決定されており、第二の可変ドメインが親和性または特異性に殆ど寄与しない場合) を包含する。したがって、抗原結合部位は、さらに軽鎖または重鎖定常領域に連結した単一のポリペプチド

50

鎖を含み、それが、該抗原結合蛋白中のドメインの配置を前もって明確に決定し、少なくとも2個の定常ドメインを有するIg型構造全体を形成することを可能にする。

【0068】

所望の結合特性を持つ抗原結合蛋白に包含させるための抗原結合部位は様々な方法で取得できる。選ばれた結合ドメインの V_L および V_H 部分のアミノ酸配列は、天然に存在する抗体に対応しているか、または所望の免疫原性もしくは結合特性を得られるよう選択または修飾する。例えば、非ヒト供給源から誘導した抗原結合部位をヒト可変ドメインに置換した、キメラ可変ドメインが組み立てられる。キメラ組み立て物は、例えば非ヒト起源の抗原結合ドメインを人間の治療に使用することを望む場合、有害な免疫原性性質の排除にとって特に貴重である。好ましいキメラドメインは、ヒトフレームワーク領域(FR)に導入した1またはそれ以上の非ヒト起源相補性決定領域(CDR)を含むアミノ酸配列を有するドメインである。係るキメラの例については、Jones, P. T. et al., (1996) Nature 321, 522-525; Riechman, L. et al., (1988) Nature 332, 323-327; 米国特許第5530101号(Queen et al.)を参照されたい。可変ドメインは高度の構造的相同性を持っており、CDRおよびFRに対応する可変ドメイン内のアミノ酸残基が容易に同定できる。例えば、Kabatt, E. A., et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. National Center for Biotechnology Information, 米国国立衛生研究所, Bethesda, MDを参照されたい。したがって、抗原結合に参加するアミノ酸は容易に同定できる。加えて、導入されたCDRを含むキメラ結合ドメインの、抗原に対する親和性を保持または増強する方法が開発された。1つの方法は、CDR領域のコンホメーションに影響を及ぼす外来フレームワーク残基をこのキメラドメインに包含させることである。第二の方法は、この外来可変領域に最も近い相同性を持つヒト可変ドメイン上に、外来CDRを導入することである。Queen, C. et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033。まず、所望のCDR配列を含む部分重複プライマーを用いて個々のFR配列を増幅し、得られた遺伝子セグメントを次の増幅反応に加えることにより、CDRを最も容易に異なるFR上に導入できる。異なる可変ドメイン上へのCDRの導入は、このアミノ酸配列のCDRに隣接し、またはCDRのコンホメーションに影響を及ぼす折り畳まれた可変ドメイン構造中のCDRにパッキングされた、アミノ酸残基の置換を含むことができる。故に、本発明に係るヒト化ドメインは、1またはそれ以上の非ヒトCDRと共に、結合特性を保持または増強するためにさらなる置換または置き換えを施した係るドメインを含むヒト抗体を包含する。

【0069】

本発明に係るキメラ結合ドメインはさらに、scFvを免疫系に対して自己として出現させるため表面露出残基を置き換えることによってヒト化させた抗体をも包含する(Padlan, E. A. (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498)。抗体はこの方法によって親和性を失うことなくヒト化する(Roguska et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973)。抗原結合部位近傍におけるアミノ酸残基のパッキングが不変であるため、親和性は保持される。ヒト化目的のための本発明に係るscFvの表面露出残基の置換は、結合特性に影響するCDR残基または隣接残基の置換を意味しない。

【0070】

本発明は、本質的に人間のものである結合ドメインを意図するものである。ヒト結合ドメインは、ヒト重鎖および軽鎖可変ドメインの組み合わせが線維状ファージの表面にディスプレイされているファージディスプレイライブラリーから取得する(例えば、McCafferty et al. (1990) Nature 348, 552-554; Ajame et al. (1997) Human Antibodies 8, 155-168)。可変ドメインの組み合わせは典型的にはFabまたはscFvの形で線維状ファ

10

20

30

40

50

ジ上にディスプレイされる。このライブラリーを、所望の抗原結合特性を持つ可変ドメインの組み合わせを有するファージについてスクリーニングする。好ましい可変ドメインの組み合わせは、選ばれた抗原に対して高い親和性を示し、他の関連抗原に対する交差反応性を殆ど示さない。極めて大レパートリーの抗体フラグメントをスクリーニングすることにより（例えば、Griffiths et al. (1994) EMBO J. 13, 3245-3260）、十分な多様性を持つ高親和性 Mab が単離でき、多くは所望抗原についてナノモル以下の親和性を有すると予想される。

【0071】

別法として、ヒト結合ドメインは、再編成されていないヒト Ig 遺伝子セグメントをその中に導入し、そして内因性マウス Ig 遺伝子を失活させたトランスジェニック動物から取得することができる (Bruggemann and Tauszig (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 455-458)。好ましいトランスジェニック動物は、1 Mb を超えるサイズの極めて大きな隣接 Ig 遺伝子フラグメントを含んでいる (Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15, 146-156) が、中等度の親和性のヒト Mab は、より小さな遺伝子座を含むトランスジェニック動物から生成することができる（例えば、Wagner et al. (1994) Eur. J. Immunol. 42, 2672-2681; Green et al. (1994) Nature Genet. 7, 13-21）。

【0072】

本発明に係る結合ドメインは結合特性を直接突然変異または親和性成熟の方法によって改善させたものを包含する。親和性と特異性は、CDR を突然変異させ、所望の特性を有する抗原結合部位についてスクリーニングすることによって修飾または改善できる（例えば、Yang et al. (1995) J. Mol. Bio. 254, 392-403）。CDR は様々な方法で突然変異させる。1つの方法は、個々の残基または残基の組み合わせを無作為化する事であり、その結果、他の点では同一の抗原結合部位の集団において、20の全アミノ酸が特定の位置に見出される。別法として、誤りがちなPCR法により、CDR 残基の範囲に突然変異を誘発する（例えば、Hawkins et al. (1992) J. Mol. Bio. 226, 889-896を参照されたい）。重鎖および軽鎖可変領域遺伝子を含むファージディスプレイベクターをE. coli の突然変異菌株で増殖させる（例えば、Low et al. (1996) J. Mol. Bio. 250, 359-368を参照されたい）。これらの突然変異誘発方法は当業者の知悉する多くの方法の実例である。

【0073】

本発明の別の態様では、抗原結合蛋白を抗腫瘍物質または検出可能シグナル生成物質に、化学的または生合成的に連結させることができる。抗体に連結させる抗腫瘍物質は、該抗体が結合した腫瘍を、または該抗体が結合した細胞の環境において腫瘍を破壊または損傷する任意の物質を包含する。例えば、抗腫瘍物質は化学療法剤またはラジオアイソトープのような毒性物質である。好適な化学療法剤は当業者に知られており、アントラサイクリン類（例えばダウノマイシンおよびドキソルビシン）、メソトレキサート、ビンデシン、ネオカルジノスタチン、シスプラチン、クロラムブシル、シトシンアラビノシド、5-フルオロウリジン、メルファラン、リシンおよびカリケアミシンを包含する。化学療法剤は常法を用いて抗体とコンジュゲートさせる（例えば、Hermentin and Seiler (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 197-215を参照されたい）。

【0074】

検出可能シグナル生成物質は、診断目的のためにインビボおよびインビトロで有用である。シグナル生成物質は、外的手段、通常電磁気放射の測定により検出し得る測定可能なシグナルを生成する。大抵は、シグナル生成物質は酵素または発色団であるか、または蛍光、燐光または化学ルミネセンスにより光を発する。発色団は、紫外または可視領域で光を吸収する色素を包含し、酵素触媒反応の基質または分解産物であってよい。

10

20

30

40

50

【0075】

本発明はさらに、標的またはリポーター部分が連結した本発明に係る抗原結合蛋白を意図している。標的部分が結合対の第一の成員である。抗腫瘍物質は、例えば係る対の第二の成員とコンジュゲートさせ、それにより抗原結合蛋白が結合する部位へと導かれる。このような結合対の一般的な例はアビジンとビオチンである。好ましい態様では、ビオチンを本発明に係る抗原結合蛋白にコンジュゲートさせ、それによりアビジンまたはストレプトアビジンにコンジュゲートした抗腫瘍物質またはその他の部分のための標的を提供する。別法として、ビオチンまたはもう一つのこのような部分を本発明に係る抗原結合蛋白に連結させ、例えば検出可能なシグナル生成物質がアビジンまたはストレプトアビジンにコンジュゲートしている診断系において、リポーターとして使用する。

10

【0076】

抗腫瘍物質として使用するための好適なラジオアイソトープもまた当業者に知られている。例えば、 ^{131}I または ^{211}At を使用する。これらのアイソトープを常套技術を用いて抗体に結合させる（例えば、Pedley et al. (1993) Br. J. Cancer 68, 69-73を参照されたい）。別法として、抗体に結合させる抗腫瘍物質は、プロドラッグを活性化する酵素である。このようにして、腫瘍部位に到達するまでは不活性型のままでいるプロドラッグを投与するが、いったん抗体複合体が投与されたならば、その腫瘍部位においてプロドラッグは細胞毒型に変換される。実際には、抗体-酵素コンジュゲートを患者に投与し、治療されるべき組織の領域に局在化させる。次いでプロドラッグをこの患者に投与し、その結果細胞毒性薬物への変換が、治療すべき組織の領域で起こる。別法として、抗体にコンジュゲートさせる抗腫瘍物質はサイトカイン、例えばインターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4) または腫瘍壊死因子 (TNF-) である。抗体が腫瘍をサイトカインの標的とさせ、その結果、サイトカインは他の組織に影響を及ぼすことなく腫瘍の損傷または破壊を仲介する。サイトカインは常套的組換えDNA技術を用いてDNAレベルで抗体と融合させる。

20

【0077】

本発明に係る蛋白は、さらなるアミノ酸残基、例えば、単離または精製を容易にするためのペプチドタグ、または該蛋白が発現される任意の特定宿主における分泌または膜輸送を促進するためのシグナル配列、と融合させることができる。

【0078】

KDRの2個の異なるエピトープに特異的な結合ドメインを持つ二重特異性蛋白に関連し、そして本発明に係る抗原結合蛋白の有利な機能的側面を立証する、本発明の具体例をここに提供する。使用する結合ドメインは、KDRで免疫したマウスから組み立てたファージディスプレイライブラリーから単離するscFv p1C11およびscFv p4G7から誘導する (Zhu et al., 1998; Lu et al., 1999)。

30

【0079】

scFv p4G7は、KDRおよびマウス相同体Flk-1の両者に共通するエピトープに結合し、いずれのレセプターに対するVEGFの結合も妨害しない。scFv p1C11はKDRの異なるエピトープに結合し、VEGFの結合を遮断できるが、Flk-1には結合しない。したがって、各結合ドメインのうち2つをディスプレイする二重特異性二価免疫グロブリン様分子はKDRへの結合について四価であり、Flk-1への結合については二価である。

40

【0080】

Flk-1に対して二価であるBs (scFv) 4-IgGは、Flk-1に対する二価diabodyであるDAB p4G7と類似のアビディティを持っている。Bs (scFv) 4-IgGおよびDAB p4G7のアビディティはそれら各々の一価対応物であるBs (scFv) 2-FabおよびscFv p4Gのおよそ10ないし23倍高く、この事は、二価性に起因する増強された結合を立証している。Bs (scFv) 4-IgGはその構成成分の結合部位の両方の生物学的機能を保持しており、KDRおよびFlk-1の両者に対し、親抗体と同じ位有効に結合する (図4)。Bs (scFv) 4-Ig

50

Gは、ヒト内皮細胞上の表面発現KDRに結合し、KDR/VEGF相互作用を遮断し、そしてVEGFにより誘発されるKDRレセプター磷酸化を用量依存的に中和する(図5および6)。とりわけBs(scFv)4-IgGは、c-p1C11よりも低い親和性でKDRに結合し、そしてKDR/VEGF相互作用の遮断においてELISA検定で4倍有効性が低いという事実にも拘わらず、VEGFにより誘発されるレセプター磷酸化の中和においてc-p1C11と同じ位強力である。Bs(scFv)4-IgGの生物活性の増強は、KDRに関して四価であることに由来する増強した結合に帰することができる。Bs(scFv)4-IgGは、分子内架橋(即ち、同じKDR分子内部で2個のエピトープを架橋する)および/または細胞表面で多分子複合体を形成するための分子間架橋の能力を持っている。

10

【0081】

本発明に係る抗原結合蛋白は人間およびその他の哺乳動物の疾病の治療に有用である。この抗原結合蛋白は、天然および改変抗体についてこれまで知られているのと同じ目的および同じ方法で使用する。したがってこの抗原結合蛋白は、当分野で周知の研究、診断または治療方法のためにインビボおよびインビトロで利用できる。

【0082】

診断または治療目的で人間の身体に使用する場合、本発明に係る抗原結合蛋白は、薬学上許容し得る担体をさらに含む組成物の形で投与するという事が理解できる。好適な薬学上許容し得る担体は、例えば水、食塩水、磷酸緩衝化食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどのうち1またはそれ以上、ならびにこれらの組み合わせを包含する。薬学上許容し得る担体はさらに、湿潤もしくは乳化剤、保存料または緩衝剤といった補助物質を少量含み、これらは該結合蛋白の貯蔵期間または有効性を増大させる。本発明に係る組成物は様々な形態であってよい。これらは、例えば固体、半固体および液体投与型、例えば錠剤、丸剤、散剤、液体、分散剤または懸濁剤、リボソーム、坐剤、注射溶液および注入溶液を包含する。好ましい形態は意図する投与方式および治療適応に依存する。好ましい組成物は注射溶液または注入溶液の形態である。

20

【0083】

本発明に係る好ましい薬用組成物は、他の抗体による人間の受動免疫に用いられるものに類似している。好ましい投与方式は非経口的である。

【0084】

本明細書に開示する本発明の原則に当業者が変化を施すことができるという事が理解および予想でき、また、係る修飾は本発明の範囲内に包含される事を意図している。

30

【0085】

以下の実施例は本発明をさらに例示するものであるが、いかなる方法によっても本発明の範囲を限定するものと解してはならない。例えばベクターおよびプラスミドの組み立て、係るベクターおよびプラスミドへのポリペプチドをコードしている遺伝子の挿入、宿主細胞へのプラスミドの導入、ならびに遺伝子および遺伝子産物の発現およびその測定といった常法の詳細な説明は、Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Pressを包含する多数の刊行物から得ることができる。本明細書に記載する全ての参考文献は引用によりその全体を本明細書の一部とする。

40

【0086】

実施例1：材料および方法

蛋白および抗体

完全なKDRコード化配列血管内皮増殖因子(VEGF)、キナーゼ挿入ドメイン含有レセプター-アルカリホスファターゼ融合蛋白(KDR-AP)およびそのマウス相同体、胎児肝キナーゼ1(Flk-1)-APをそれぞれバキュロウイルスおよびNIH3T3細胞で発現させ、記載の方法に従い精製する(Zhu et al., 1998)。

【0087】

50

ヒトKDRコード化配列は公表されている (GenBank Accession No. AF035121)。KDR細胞外ドメイン (ECD) 免疫グロブリン (Ig) ドメイン除去突然変異体をPCRクローニングにより組み立て、NIH 3T3細胞で発現させ、記載のように精製する (Luet al., (2000) J. Biol. Chem. 275, 14321-14330)。このKDR ECD Igドメイン除去突然変異体は以下の構造を有する：

KDR (Ig1-7)：レセプターの7個のIgドメイン全てを含む完全長KDR ECD (アミノ酸Met¹ からVal⁷⁴² まで)；

KDR (Ig1-3)：3個のN末端ECD Igドメインを含む突然変異体 (アミノ酸Met¹ からLys³²⁷ まで)；および、

KDR (Ig3-7)：KDR ECD Igドメイン3ないし7を含む突然変異体 (アミノ酸Asp²²⁵ からVal⁷⁴² まで)。

10

【0088】

抗KDR一本鎖Fv (scFv) p1C11およびscFv p4G7を、Zhu et al. (1998) Cancer Res., 58, 3209-3214およびLuet al. (1999) J. Immunol. Methods, 230, 159-171に報告されたように、KDRで免疫したマウスから組み立てたファージディスプレイライブラリーから単離する。

【0089】

二価scFvフラグメントの形態であるdiabody DAB p4G7 (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448; Zhu et al. (1996) Bio/Technology, 14, 192-196)を、前にZhu et al. (1996)およびLuet al. (1999)に記載されたようにscFv p4G7から組み立てる。scFv p1C11から組み立てたマウス/ヒトキメラIgG1抗体であるc-p1C11、および表皮増殖因子 (EGF) レセプターに対するキメラIgG1抗体であるC225は、いずれもImClone Systems Incorporated (New York, NY)で製造されている。Zhu, et al. (1999)。

20

【0090】

抗Flt-1抗体Mab6.12 (IgG1,)を産生するハイブリドーマセルライン (ATCC No. PTA-334)は、ImClone Systems Incorporated (New York, NY)において該レセプターの組換え型で免疫したマウスから確立した。

30

【0091】

マウスの免疫および一本鎖抗体ファージディスプレイライブラリーの組み立て 雌性BALB/Cマウスに、Ribi Adjuvant System 200μl中のKDR-AP 10μgを2回腹腔内 (i.p.)注射し、続いて2ヶ月の間にRIBIアジュバント無しで1回i.p.注射する。このマウスはまた、最初の免疫の時点で、RIBI 200μlに入れたKDR-AP 10μgの皮下 (s.c.)注射を受ける。このマウスは安楽死の3日前にKDR-AP 20μgでi.p.ブースティングする。ドナーマウスの脾臓を摘出し、細胞を単離する。RNAを抽出し、mRNAを脾臓細胞の全RNAから精製する。逆転写の後、発現されたV_LおよびV_H遺伝子に対応するcDNAを個別に増幅する。増幅した生成物を、各遺伝子を受容するよう設計したベクター中に別々に挿入するか、または、分泌シグナル配列およびポリペプチドリンカーをコードしているヌクレオチドに連結し (例えばPCR増幅により)、融合した生成物を所望ベクター中に挿入することができる。例えば、Zhu et al., 1998を参照されたい。

40

【0092】

マウスscFvを線維状ファージ上にディスプレイするための材料と方法は市販品が入手できる (Recombinant Phage Antibody System, Amersham Pharmacia Biotech)。簡潔に述べると、scFvを線維状

50

ファージ表面にディスプレイするには、抗体 V_H および V_L ドメインを15アミノ酸リンカー($GGGGS$)₃によって結合させる。この組み立て物のC末端を、15アミノ酸Eタグを持ちアンバーコドン(TAG)で終わっているファージ蛋白IIIのN末端に連結する。Eタグと蛋白IIIの間に位置するアンバーコドンは、非サプレッサー宿主(例えばHB2151細胞)中に導入された場合はscFvを可溶性型で産生させ、サプレッサー宿主(例えばTG1細胞)中に導入された場合は蛋白IIIを介してファージをディスプレイさせる。

【0093】

このscFv-遺伝子III組み立て物をpCANTAB 5Eベクターにライゲーションする。形質転換したTG1細胞を2YTAGプレート(17g/lトリプトン、10g/l酵母抽出物、5g/l NaCl、20g/lグルコース、100μg/mlアンピシリン、15g/l Bacto-agar)に蒔き、インキュベートする。コロニーを削り取って2YT培地(17g/lトリプトン、10g/l酵母抽出物、5g/l NaCl)10mlに入れ、50%グリセロール5mlと混合し、ライブラリストックとして-70℃で保存する。

【0094】

生物学的パンニング

ライブラリストックを対数期まで増殖させ、M13K07ヘルパーファージで救済し、2YTAK培地(アンピシリン100μg/mlおよびカナマイシン50μg/mlを含有する2YT)で一夜30℃で増幅する。このファージ調製物を4%PEG/0.5M NaClで沈殿させ、アルカリホスファターゼ(AP)500μg/mlを含有する3%脱脂乳/PBSに再懸濁し、37℃で1時間インキュベートして、AP-scFvに対する特異性を持つファージ-scFvを遮断し且つ他の非特異結合を遮断する。

【0095】

KDR-AP(10μg/ml)被覆Maxisorp Star管(Nunc, Denmark)を、まず3%牛乳/PBSを用いて37℃で1時間遮断し、次にファージ調製物と共に室温で1時間インキュベートする。この管をPBST(0.1%Tween20を含有するPBS)で10回洗浄し、その後PBSで10回洗浄する。結合したファージを、新たに調製した100mMトリエチルアミン溶液1mlで10分間室温で溶離する。溶出したファージを対数期なか頃のTG1細胞10mlと共に37℃で静止させて30分間、振盪しつつ30分間インキュベートする。次いで、感染したTG1細胞を2YTAGプレートに蒔き、ファージストックの作製で上に示したように一夜30℃でインキュベートする。

【0096】

スクリーニング操作(パンニング)を連続回実施して、所望の結合特異性を持つディスプレイされたscFvをさらに濃縮する。2または3回パンニングを実施した後、個々の細菌コロニーを別々にスクリーニングして所望のKDR結合特性を持つクローンを同定する。同定したクローンはVEGF結合の遮断についてさらに試験することができる。クローンのDNAフィンガープリンティングを用いてユニークなクローンを識別する。各消化パターンの代表的クローンを選び、DNA配列決定に付す。

【0097】

ファージELISA

個々のTG1クローンを96ウェルプレートで37℃で増殖させ、上記のようにM13K07ヘルパーファージで救済する。増幅したファージ調製物を1/6容量の18%牛乳/PBSの添加によりRTで1時間遮断し、KDR-APまたはAPで被覆したMaxisorp 96ウェル微量定量プレート(Nunc)に加える。室温で1時間のインキュベートの後、プレートをPBSTで3回洗浄し、ウサギ抗M13ファージAb-HRPコンジュゲートと共にインキュベートする。プレートを5回洗浄し、TMBペルオキシダーゼ基質を加え、450nmのODをマイクロプレート読み取り機を用いて読み取る。

【0098】

10

20

30

40

50

可溶性 s c F v の調製

個々のクローンのファージを用いて非サプレッサー E . c o l i 宿主 H B 2 1 5 1 を感染させ、感染させたものを 2 Y T A G - N (2 Y T A G ; 1 0 0 μ g / m l ナリジキシン酸) プレート上で選択する。この細胞を 1 m M イソプロピル - 1 - チオ - B - D - ガラクトピラノシドを含有する 2 Y T A 培地で 3 0 で培養することにより、H B 2 1 5 1 における s c F v の発現を誘導する。2 0 % (w / v) 蔗糖、2 0 0 m M N a C l 、1 m M E D T A および 0 . 1 m M P M S F を含有する 2 5 m M T r i s (p H 7 . 5) に細胞ペレットを再懸濁し、続いて穏やかに振盪しながら 4 で 1 時間インキュベートすることにより、この細胞のペリプラズム抽出物を調製する。1 5 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離した後、R P A S 精製モジュール (P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いる親和クロマトグラフィーによって可溶性 s c F v を上清から精製する。

10

【 0 0 9 9 】

M a b 6 . 1 2 からの s c F v の調製

M a b 6 . 1 2 の V_H および V_L 遺伝子を、B e n d i g e t a l . (1 9 9 6) A n t i b o d y E n g i n e e r i n g : A P r a c t i c a l A p p r o a c h , M c C a f f e r t y , J . , H o o g e n b o o m , H . R . , C h i s w e l l , D . J . , e d s . , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , I n c o r p o r a t e d ; p 1 4 7 - 1 6 8 の方法に従い、ハイブリドーマ細胞から単離した m R N A から R T - P C R によってクローニングする。マウス抗体軽鎖リーダー配列の 5 ' 末端とハイブリダイズするよう特異的に設計した 1 1 個の 5 ' プライマー、および、マウス 軽鎖定常領域の 5 ' 末端とハイブリダイズする 1 個の 3 ' プライマーを使用して、V_L 遺伝子をクローニングする。マウス抗体重鎖リーダー配列の 5 ' 末端とハイブリダイズするよう特異的に設計した 1 2 個の 5 ' プライマー、および、マウス I g G 1 重鎖定常領域の 5 ' 末端とハイブリダイズする 1 個の 3 ' プライマーを使用して、V_H 遺伝子をクローニングする。抗体の各々について合計 2 3 の P C R 反応 (V_L 遺伝子について 1 1 および V_H 遺伝子について 1 2) を実施する。P C R により生成した 4 0 0 ないし 5 0 0 塩基対の間のサイズの全フラグメントを製造者の説明書に記載のようにして p C R (登録商標) 2 . 1 ベクター中にクローニングし (T A C l o n i n g (登録商標) キット、I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、その後 E . c o l i 菌株 X L - 1 の形質転換を行う。

20

30

【 0 1 0 0 】

部分重複 P C R を用いて s c F v 6 . 1 2 を組み立てるため、M A B 6 . 1 2 の V_L および V_H 遺伝子をコードしている P C R フラグメントを使用する。この s c F v では、1 5 アミノ酸リンカー (グリシン - グリシン - グリシン - グリシン - セリン)₃ 、または (G G G G S)₃ を介して M a b 6 . 1 2 V_H の C 末端を M a b 6 . 1 2 V_L の N 末端に連結する (図 1 A) 。次いで s c F v 6 . 1 2 コード化遺伝子を、可溶性 s c F v 蛋白の発現のため、ベクター p C A N T A B 5 E (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h , P i s c a t a w a y , N J) 中にクローニングする。

【 0 1 0 1 】

B s A b - I g G [B s (s c F v) 4 - I g G] および B s A b - F a b [B s (s v F v) 2 - F a b] のための発現ベクターの組み立て
プライマー J Z Z - 2 (配列番号 2 9) および J Z Z - 3 (配列番号 3 0) を用いる P C R によって、s c F v p 4 G 7 をコードしている遺伝子を s c F v 発現ベクターから増幅する。次に、プライマー J Z Z - 1 2 (配列番号 3 1) および J Z Z - 3 (配列番号 3 0) を用いる P C R によって、哺乳動物細胞における蛋白分泌のためのリーダーペプチド配列を s c F v コード化配列の 5 ' 末端に加える。

40

【 0 1 0 2 】

同様に、プライマー J Z Z - 2 (配列番号 2 9) および p 1 C 1 1 V L 3 - 2 (配列番号 3 2) を用いる P C R によって、s c F v p 1 C 1 1 をコードしている遺伝子を s c F v 発現ベクターから増幅し、続いて、プライマー J Z Z - 1 2 (配列番号 3 1) および p

50

1 C 1 1 V L 3 - 2 (配列番号 3 2) を用いる P C R によってリーダーペプチド配列を加える。

【0 1 0 3】

軽鎖および重鎖両方の分泌のため、19 アミノ酸より成る同じリーダーペプチド M G W S C I I L F L V A T A T G V H S (配列番号 3 3) を使用する。

【0 1 0 4】

B s (s c F v) 4 - I g G の軽鎖および重鎖のため、別々の発現ベクターを組み立てる。クローニングした s c F v p 4 G 7 遺伝子を H i n d I I I および B a m H I で消化し、ヒト 軽鎖定常領域 (C _L) を含むベクター p K N 1 0 0 (D r . S . T . J o n e s , M R C C o l l a b o r a i v e C e n t e r , L o n d o n , E n g l a n d、より寄贈) 中にライゲーションして B s A b - I g G 軽鎖 B s I g G - L のための発現ベクターを作り出す。クローニングした s c F v p 1 C 1 1 遺伝子を H i n d I I I および B a m H I で消化し、ヒト I g G 1 重鎖定常領域 (C _H) を含むベクター p G 1 D 1 0 5 (D r . S . T . J o n e s より寄贈) 中にライゲーションして B s A b - I g G 重鎖 B s I g G - H のための発現ベクターを作り出す。これらのベクターは、メソトレキサートに対する耐性を付与しベクター配列の増幅を提供する D H F R 遺伝子の存在を除いて米国特許 5 8 4 0 2 9 9 に記載の軽鎖 (H C M V - V _L - H C _K) および重鎖 (H C M V - V _H - H C ₁) ベクターに類似している。

10

【0 1 0 5】

B s (s c F v) 2 - F a b のための発現ベクターを製造するため、プライマー J Z Z - 1 2 (配列番号 3 1) および J Z Z - 1 8 (配列番号 3 4) を用いる P C R によって、蛋白翻訳を停止するための停止コドン、ベクター B s I g G - H の第一定常ドメイン (C _H 1) の直後に導入する。この遺伝子フラグメントを H i n d I I I および N a e I で消化し、ベクター p G 1 D 1 0 5 に挿入してベクター B s F a b - H を作り出す。全ての組み立て物を制限酵素消化により調査し、D N A 配列決定により確認する。

20

【0 1 0 6】

この実施例で使用したプライマー配列を下記および配列表に記す。

【0 1 0 7】

J Z Z - 2 配列 (配列番号 2 9) :

5' - C T A G T A G C A A C T G C C A C C G G C G T A C A T T C A C A G G T C A A G C T G C - 3'

30

J Z Z - 3 配列 (配列番号 3 0) :

5' - T C G A A G G A T C A C T C A C C T T T T A T T T C C A G C - 3'

J Z Z - 1 2 配列 (配列番号 3 1) :

5' - G G T C A A A A G C T T A T G G G A T G G T C A T G T A T C A T C C T T T T C T A G T A G C A A C T - 3'

p 1 C 1 1 V L 3 - 2 配列 (配列番号 3 2) :

5' - T C G A T C T A G A A G G A T C C A C T C A C G T T T T A T T T C C A G - 3'

リーダーペプチド (配列番号 3 3) :

M G W S C I I L F L V A T A T G V H S

40

J Z Z - 1 8 (配列番号 3 4) :

5' - T C T C G G C C G G C T T A A G C T G C G C A T G T G T G A G T - 3'

抗体の発現および精製

Z h u e t a l . (1 9 9 9) C a n c e r L e t t . 1 3 6 , 2 0 3 - 2 1 3 に記載の方法に従い、B s (s c F v) 4 - I g G および B s (s c F v) 2 - F a b それぞれの一過性発現のため、ベクター B s I g G - L および B s I g G - H、または B s I g G - L および B s F a b - H 由来の同量の D N A を用いて C O S 細胞を同時トランスフェクトする。トランスフェクションの 2 4 時間後、この細胞を無血清培地に交換する。条件付けた上清をトランスフェクションの 4 8 時間および 1 2 0 時間後に集める。製造者 (

50

Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) の記載したプロトコルに従い、Bs (scFv) 4 - IgG および Bs (scFv) 2 - Fab を、プールした上清から、プロテイン G カラムを用いる親和クロマトグラフィーによって精製する。抗体を含有する画分をプールし、緩衝液を PBS に交換し、Centricon 10 濃縮機 (Amicon Corp., Beverly, MA) を用いて濃縮する。抗体の純度を SDS - PAGE により分析する。精製した抗体の濃度を、捕捉剤として山羊抗ヒト IgG Fc 特異抗体を、そして検出剤として HRP - コンジュゲートした山羊抗ヒト 鎖抗体を使用して、ELISA により測定する。標準曲線を臨床等級の抗体 C 2 2 5 または c - p 1 C 1 1 を用いて検定する。

【0108】

10

KDR に対する二重特異性抗体の結合検定

上に記載の Bs Ab の二重特異性を立証するため 2 種類の異なる検定を実施する。

【0109】

直接結合検定では、まず、96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) を、捕捉剤としてウサギ抗 AP 抗体 (DAKO - Immunoglobulin S A / S, Denmark) を使用して、KDR (Ig 1 - 7) - AP、KDR (Ig 1 - 3) - AP または KDR (Ig 3 - 7) - AP 融合蛋白 (ウェルあたり $1.0 \mu\text{g} / \text{ml} \times 100 \mu\text{l}$) で被覆する。次いでこのプレートを Bs Ab、c - p 1 C 1 1 または DAB p 4 G 7 と共に室温で 1 時間インキュベートし、その後 Bs Ab および c - p 1 C 1 1 のためにはウサギ抗ヒト IgG Fc 特異抗体 - HRP コンジュゲート (Cappel, Organon Teknika Corp. West Chester, PA) と共に、または DAB p 4 G 7 のためにはマウス抗 E タグ抗体 - HRP コンジュゲート (Pharmacia Biotech) と共にインキュベートする。このプレートを 5 回洗浄し、TMB ペルオキシダーゼ基質 (KPL, Gaithersburg, MD) を加え、450 nm の OD をマイクロプレート読み取り機 (Molecular Device, Sunnyvale, CA) を用いて読み取る (Zhu et al., 1998)。

20

【0110】

架橋検定では、最初にこの抗体を KDR (Ig 1 - 7) - AP、KDR (Ig 1 - 3) - AP または KDR (Ig 3 - 7) - AP と共に溶液中でインキュベートする。混合物を KDR (Ig 1 - 3) (タグ無し) で被覆した 96 ウェルプレートに移し、室温で 2 時間インキュベートする。プレートを洗浄し、KDR (Ig 1 - 3) (タグ無し) に結合した AP 活性を AP 基質 p - ニトロフェノールホスファート (Sigma) の添加によって測定し、405 nm の OD を読み取る (Zhu et al., 1998)。

30

【0111】

KDR および Flk - 1 に対する Bs (scFv) 4 - IgG および Bs (scFv) 2 - Fab の定量的結合検定 KDR - AP または Flk - 1 - AP (100 ng 蛋白 / ウェル) のいずれかで被覆した 96 ウェル Maxi - sorp 微量定量プレート (Nunc) に、種々の量の Bs (scFv) 4 - IgG、Bs (scFv) 2 - Fab、c - p 1 C 1 1 または scFv p 4 G 7 を加え、室温で 1 時間インキュベートし、その後、二重特異性抗体および c - p 1 C 1 1 のためにはウサギ抗ヒト IgG Fc 特異抗体 - HRP コンジュゲートと共に、または scFv p 4 G 7 のためにはマウス抗 E タグ抗体 - HRP コンジュゲートと共に、室温で 1 時間インキュベートする。プレートを洗浄し上記のように発色させる。

40

【0112】

フローサイトメトリー (FACS) 分析

初期継代 HUVEC 細胞を増殖因子枯渴 EBM - 2 培地で一夜増殖させて KDR レセプターの発現を誘導する。細胞を収穫し、PBS で 3 回洗浄し、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の Bs (scFv) 4 - IgG または c - p 1 C 1 1 と共に 4 で 1 時間インキュベートし、続いて FITC 標識したウサギ抗ヒト Fc 抗体 (Cappel, Organon Teknika

50

C o r p .) と共にさらに1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーにより分析する (Z h u e t a l . , 1999)。

【0113】

結合速度の分析

B s A b および親 s c F v の結合速度を、B I A c o r e バイオセンサー (P h a r m a c i a B i o s e n s o r) を使用し表面プラスモン共鳴により測定する。K D R - A P、F l k - 1 - A P、または F l t - 1 - F c 融合蛋白をセンサーチップ上に固定化し、様々な抗体を 1 . 5 n M ないし 200 n M の範囲の濃度で注入する。各濃度におけるセンサーグラムを得、速度定数 k_{on} および k_{off} を決定するため、プログラム B I A E v a l u a t i o n 2 . 0 を用いて評価する。速度定数の比 k_{off} / k_{on} として K d を算出する。 10

【0114】

V E G F / K D R、V E G F / F l t - 1、および P I G F / F l t - 1 リガンド遮断検定

遮断検定では、種々の量の B s A b、s c F v または c - p 1 C 1 1 を、固定量の K D R - A P、F l k - 1 - A P または F l t - 1 - F c (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) と混合し、室温で1時間インキュベートする。次いでこの混合物を V E G F 165 または P I G F で被覆した 96 ウェルプレートに移し、R T でさらに2時間インキュベートし、その後このプレートを5回洗浄する。V E G F 165 および P I G F は典型的には 200 n g / ウェルで被覆する。V E G F 165 は V E G F の 165 アミノ酸型である。K D R - A P または F l k - 1 - A P については V E G F に結合した A P 活性を記載のように定量する (Z h u , e t a l . , 1998 ; 1999)。V E G F または P I G F に結合した F l t - 1 - F c を測定するため、プレートをマウス抗ヒト F c - H R P コンジュゲートと共にインキュベートする。 20

【0115】

磷酸化阻害検定

完全長 K D R (I m C l o n e S y s t e m s) でトランスフェクトした安定な 293 セルラインを使用し、かつて記載された方法 (Z h u e t a l . , 1998 ; 1999) に従い、K D R 磷酸化検定を実施する。簡潔に述べると、トランスフェクトした 293 細胞 (プレートあたり $\sim 3 \times 10^6$ 細胞) を抗体の存在下または不在下で 15 分間インキュベートし、その後 20 n g / m l の V E G F 165 により室温でさらに 15 分間刺激する。次いでこの細胞を溶解し、細胞溶解液を K D R 磷酸化検定に使用する。K D R レセプターを、抗 K D R 抗体 M a b 4 . 13 (I m C l o n e S y s t e m s) に結合させたプロテイン A セファロースビーズ (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , I n c . , C A) を用いて細胞溶解液から免疫沈降させる。蛋白を S D S - P A G E で分離しウェスタンブロット分析に付す。K D R 磷酸化を検出するため、ブロットを抗ホスホチロシン M a b、P Y 20 (I C N B i o m e d i c a l s , I n c . A u r o r a , O H) でプロービングする。このシグナルを、増強した化学ルミネセンスを用いて検出する (A m e r s h a m , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L)。このブロットをポリクローナル抗 K D R 抗体 (I m C l o n e S y s t e m s) で再プロービングして、S D S - ポリアクリルアミドゲルの各列に同量の蛋白がロードされていることを確実とする。 30 40

【0116】

抗マイトジェン検定

H U V E C (5×10^3 細胞 / ウェル) を、V E G F、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、または上皮細胞増殖因子 (E G F) を除いた E B M - 2 培地 (C l o n e t i c s , W a l k e r s v i l l e , M D) 200 μ l を入れた 96 ウェル組織培養プレート (W a l l a c h , I n c . , G a i t h e r s b u r g , M D) に蒔き、37 で 72 時間インキュベートする。様々な量の抗体を2個ずつのウェルに加え、37 で1時間ブレインキュベートし、その後 V E G F 165 を最終濃度 16 n g / m l となるように 50

加える。18時間のインキュベーションの後、 $[^3\text{H}]$ -チミジン ($[^3\text{H}]$ -TdR) (Amersham) 0.25 μCi を各ウェルに加え、さらに4時間インキュベートする。細胞を氷上に置き、血清含有培地で2回洗浄し、引き続き10% TCAと共に4で10分間インキュベートする。次にこの細胞を水で1回洗浄し、2% SDS 25 μl に可溶化する。シンチレーション液 (150 μl /ウェル) を加え、DNAの取り込んだ放射性をシンチレーションカウンター (Wallach, Model 1450 Microbeta Scintillation Counter) で測定する。

【0117】

白血病遊走検定

HL60およびHEL細胞を無血清単純RPMI 1640培地で3回洗浄し、この培地に 1×10^6 /mlで懸濁する。細胞懸濁液のアリコート100 μl を3 μm 孔 transwell insert (HL60細胞用) または8 μm 孔 transwell insert (HEL細胞用) (Costar (登録商標), Corning Incorporated, Corning, NY) のいずれかに加え、抗原結合蛋白と共に37で30分間インキュベートする。次にこのinsertを、VEGF165を加えたまたは加えていない無血清RPMI 1640 0.5 mlを入れた24ウェルプレートのウェルに入れる。37、5% CO_2 でHL60細胞については16-18時間、HEL細胞については4時間遊走を実施する。遊走した細胞を下室から集め、コールターカウンター (Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, England) で計数する。

【0118】

実施例2：二重特異性抗体の製造

Bs (scFv) 4-IgGおよびBs (scFv) 2-Fabの組み立て
2種類の抗KDR scFv抗体、scFv p1C11およびp4G7を、Bs (scFv) 4-IgGおよびBs (scFv) 2-Fabの組み立てに使用する (図2A)。scFv p1C11はKDRに特異的に結合しKDR/VEGF相互作用を遮断し、一方scFv p4G7はKDRとそのマウス同族体Flk-1の両者に結合するがKDR/VEGFまたはFlk-1/VEGF相互作用のいずれをも遮断しない (Zhu et al., 1998, Lu et al., 1999)。p1C11はKDR ECD Igドメイン1ないし3内部に位置するエピトープに結合し、一方p4G7のためのエピトープはIgドメイン6および7内部に位置するということ、エピトープマッピング研究で明らかとなっている (Lu et al., 2000)。scFv p1C11およびp4G7をコードしている遺伝子セグメントを、ヒトIgG1分子の C_H および C_L をコードしている遺伝子セグメントにそれぞれ結合させ、その結果scFv配列はそれぞれ C_H 1および C_L のN末端に融合して、発現ベクターBs IgG-HおよびBs IgG-Lが作られる (図2A)。この配置はIgGの元の V_H および V_L ドメインを、各々独立した抗原結合ユニットを構成する2個のscFv分子に置換する (図1)。Bs IgG-HおよびBs IgG-Lの同時発現は、IgG様二価二重特異性分子Bs (scFv) 4-IgGを生成する (図1)。一価二重特異性Fab様分子 (図1)、Bs (scFv) 2-Fabもまた、Bs IgG-LおよびBs Fab-Hの同時発現によって生成する。停止コドン C_H 1ドメインの末端に導入することにより、Bs IgG-HからベクターBs Fab-Hを組み立てる (図2A)。

【0119】

Bs (scFv) 4-IgGおよびBs (scFv) 2-Fabの発現と精製
Bs (scFv) 4-IgGとBs (scFv) 2-FabをCOS細胞で一過性発現させ、プロテインGカラムを用いる親和クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製する。精製したBs AbをSDS-PAGEにより分析する (図2B)。非還元条件下で、Bs (scFv) 4-IgGは分子量およそ200 kDaの単一のバンドを生じ、一方Bs (scFv) 2-Fabは~75 kDaの主たるバンドを生ずる (図2B、2および3列)。還元条件下では、Bs (scFv) 4-IgGは、それぞれscFv- C_H 1-C

10

20

30

40

50

H₂ - C_H3 融合物 (~ 63 kDa) および s c F v - C_L 融合物 (~ 37 kDa) に対する予想移動度を持つ2個の主たるバンドを生成する (図2B、5列)。これに対し、B s (s c F v) 2 - F a b は、s c F v - C_H1 および s c F v - C_L 融合物をそれぞれ示す、~ 38 kDa および 37 kDa の分子量を持つ2個の主たるバンドを生ずる (図2B、6列)。対照として、c - p 1 C 1 1、キメラ I g G 1 抗体は、非還元条件下で ~ 150 kDa の1個のバンドを (図2B、1列)、そして還元条件下で ~ 50 kDa (重鎖、V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 融合物) および ~ 25 kDa (軽鎖、V_L - C_L 融合物) という2個のバンドを生ずる (図2B、5列)。

【0120】

実施例3：B s A b は同時に2個のエピトープに結合する

10

B s A b の二重特異性

B s A b の二重の特異性を、完全長 K D R E C D およびその I g ドメイン除去突然変異体のうちの2個を用いて検定する (図3A)。かつて観察されたように p 1 C 1 1 は I g ドメイン1ないし3を含む K D R 突然変異体とのみ結合し (Z h u e t a l . , 1999)、一方 p 4 G 7 は I g ドメイン6および7を含む突然変異体とのみ結合する (L u e t a l . , 1999)。対照的に、B s (s c F v) 4 - I g G および B s (s c F v) 2 - F a b はいずれも3種類の K D R 変異体の全てに結合し、この事は、B s A b は、一方は I g ドメイン1ないし3上のエピトープに、そして他方は I g ドメイン6および7上のエピトープに結合する2個の結合部位を有することを示すものである。

【0121】

20

B s A b が両方のエピトープに同時に結合できるか否かを調べるため、A P で標識したまたはしていない幾つかの K D R E C D I g ドメイン除去突然変異体を使用して架橋検定を実施する。この検定では、B s A b をまず K D R (I g 1 - 7) - A P、K D R (I g 1 - 3) - A P または K D R (I g 3 - 7) - A P とインキュベートする。混合物を K D R (I g 1 - 3) (タグ無し) で被覆した微量定量プレートに移し、その後 K D R (I g 1 - 3) (タグ無し) に結合した A P 活性を測定する (図3B)。プレートに結合した A P 活性により立証されるように、B s (s c F v) 4 - I g G および B s (s c F v) 2 - F a b はいずれも3種類全ての K D R - A P 変異体と溶液中で有効に結合し、固定化 K D R (I g 1 - 3) (タグ無し) と架橋複合体を形成する (図3B)。対照的に、c - p 1 C 1 1 は、K D R (I g 1 - 3) (タグ無し) を、I g ドメイン1 - 3 を含む K D R 変異体、即ち K D R (I g 1 - 7) - A P および K D R (I g 1 - 3) - A P とのみ架橋させ、K D R (I g 3 - 7) - A P とは架橋させない。予想されたように、p 4 G 7 は、いずれの K D R 変異体をも固定化 K D R (I g 1 - 3) (タグ無し) と架橋させることができないが、これは p 4 G 7 が K D R (I g 1 - 3) 突然変異体と結合しないためである。

30

【0122】

B s A b による抗原結合

B s A b の抗原結合効率を固定化 K D R (図4A) および F l k - 1 (図4B) に関して測定する。図4Aは、K D R に対する B s (s c F v) 4 - I g G および B s (s c F v) 2 - F a b の用量依存的結合を示している。B s (s c F v) 4 - I g G と B s (s c F v) 2 - F a b の両者は、それが誘導された p 1 C 1 1 の8ないし10倍の親和性を持つキメラ抗 K D R 抗体である c - p 1 C 1 1 と同じ位有効に K D R に結合する。B s (s c F v) 4 - I g G および B s (s c F v) 2 - F a b もまた s c F v p 4 G 7 と同様、用量依存的に F l k - 1 に結合するが、c - p 1 C 1 1 は結合しない。予想されたように、ヒト E G F R に対するキメラ抗体 C 2 2 5 はいずれの抗原とも結合しない。

40

【0123】

細胞表面発現レセプターに対する B s A b の結合を F A C S 分析によって検定する。かつて c - p 1 C 1 1 で観察されたように (Z h u e t a l . , 1999)、B s (s c F v) 4 - I g G は初期継代 H U V E C 上で発現された K D R に有効に結合する。

【0124】

K D R および F l k - 1 に対する B s A b の結合速度を B I A c o r e 装置を用いる表面

50

プラスモン共鳴によって測定する(第1表)。KDRに対するBs(scfv)4-IgGおよびBs(scfv)2-Fabの全体的親和性(Kd)またはアビディティはそれぞれ1.4 nMおよび1.1 nMであり、これは一価scfv p1C11およびp4G7のそれと似通っているが、二価c-p1C11またはDAB p4G7のそれの4ないし10倍弱い。これに対して、Flk-1に対して二価であるBs(scfv)4-IgGは、二価DAB p4G7(Kd、0.18 nM)と類似のアビディティ(Kd、0.33 nM)を示す。Flk-1に対していずれも一価であるBs(scfv)2-Fabおよびscfv p4G7は類似の親和性(Kd、それぞれ1.7 nMおよび4.2 nM)でFlk-1に結合し、この親和性はそれらの二価対応物より5ないし20倍弱い。

【0125】

10

Bs(scfv)4-IgGによるVEGF遮断

図5は、Bs(scfv)4-IgGが、KDR-APが固定化VEGFに結合するのを有効に遮断することを示している。KDR結合を50%遮断するのに要する抗体濃度である、Bs(scfv)4-IgGおよびc-p1C11のIC50は、それぞれ4 nMおよび1 nMである。scfv p4G7で観察されるように、Bs(scfv)4-IgGは、VEGFに対するKDRマウス同族体Flk-1の結合を遮断しない(示していない)。Bs(scfv)4-IgGは、VEGF/Flk-1結合に影響を及ぼさないscfv p4G7に対応するFlk-1エピトープに結合する。scfv p1c11が特異的であるKDRエピトープはFlk-1には無い。したがってFlk-1に対するVEGF結合は遮断されない。抗EGFR抗体C225は、VEGFに対するKDRの結合に

20

【0126】

BsAbによるKDR磷酸化阻害

VEGFにより誘導されるレセプター磷酸化に及ぼすBs(scfv)4-IgGの生物学的効果を、KDRトランスフェクト293細胞を用いて測定する。図6に示すように、VEGF処理はKDRレセプターの強力な磷酸化を誘導する。Bs(scfv)4-IgGによる前処理はVEGFで誘導されるレセプター磷酸化を用量依存的に阻害する(図6)。さらに、Bs(scfv)4-IgGは、検定した各々の抗体濃度においてc-p1C11と等しく強力である。

【0127】

30

分裂誘発の阻害

VEGFにより刺激されるヒト内皮細胞の分裂誘発に及ぼす抗KDR抗体の効果を、HUVECを用いる[³H]-TdR DNA取り込み検定によって測定する。VEGF、bFGFまたはEGFを含まないEBM-2培地200 μlを入れた96ウェル組織培養プレートにHUVEC(5×10³細胞/ウェル)を蒔き、37℃で72時間インキュベートする。様々な量の抗体を2個ずつのウェルに加え、37℃で1時間プレインキュベートし、その後最終濃度16 ng/mlとなるようにVEGF165を加える。18時間インキュベーションした後、0.25 μCiの[³H]-TdRを各ウェルに加え、さらに4時間インキュベートする。DNAの取り込んだ放射性をシンチレーションカウンターで測定する。

40

【0128】

scfv p1C11およびBs(scfv)4-IgGの両者はVEGFで刺激されたHUVECの分裂誘発を有効に阻害する。Bs(scfv)4-IgGは、親scfvよりも強力な、HUVECのVEGF誘導性分裂誘発のインヒビターである。予想されたように、KDRと結合しないscfv p2A6、およびKDR/VEGF結合を遮断しないscfv p4G7は、VEGF刺激性内皮細胞増殖に何ら阻害効果を示さない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

Bs(scfv)4-IgGおよびBs(scfv)2-Fab分子の模式図である。Bs(scfv)4-IgGでは、ヒトIgG1分子のV_HおよびV_Lドメインが2個の異

50

なる特異性の s c F v 抗体に置換されている。哺乳動物細胞における s c F v - 軽鎖および s c F v - 重鎖融合ポリペプチドの同時発現は、二価の I g G 様二重特異性分子の形成をもたらす。B s (s c F v)₂ - F a b において、重鎖 C_H 1 ドメインの C 末端に停止コドンが導入されており、これが二価の F a b 様二重特異性分子の発現をもたらす (図 2 A をも参照されたい)。

【 図 2 】

発現組み立て物と、精製した B s (s c F v)₄ - I g G および B s (s c F v)₂ - F a b 抗体の例を示す (ドメインは一定の拡大率ではない)。図 A : 個々の s c F v 組み立て物を、5' 末端で哺乳動物細胞での分泌のためのリーダー配列に、そして 3' 末端でヒト I g G 分子の C_L または C_H 1 ドメインに融合させる。図 B : プロテイン G 精製した B s (s c F v)₄ - I g G および B s (s c F v)₂ - F a b 抗体の S D S - P A G E 分析。1 - 3 列は非還元条件でのランである。1 列、c - p 1 C 1 1、キメラ I g G 1 ; 2 列、B s (s c F v)₄ - I g G ; 3 列、B s (s c F v)₂ - F a b。4 - 6 列は還元条件でのランである。4 列、c - p 1 C 1 1 ; 5 列、B s (s c F v)₄ - I g G ; 6 列、B s (s c F v)₂ - F a b。分子量標準の位置もまた示す。

10

【 図 3 】

B s (s c F v)₄ - I g G および B s (s c F v)₂ F a b 抗体の二重特異性についての E L I S A 検定の結果を示す。図 A は、K D R E C D I g ドメイン除去突然変異体 - A P 融合蛋白への、B s (s c F v)₄ - I g G、B s (s c F v)₂ - F a b およびその親抗体の結合を示す。図 B は、異なる K D R E C D I g ドメイン除去突然変異体 K D R (I g 1 - 3) および K D R (I g 3 - 7) - A P 上に位置する二つの異なるエピトープへの、B s (s c F v)₄ - I g G および B s (s c F v)₂ - F a b による同時結合の検出のための、架橋 E L I S A を示す。B s A b を、K D R (I g 1 - 7) - A P、K D R (I g 1 - 3) - A P または K D R (I g 3 - 7) - A P と共に溶液中でインキュベートし、タグ無しの K D R (I g 1 - 3) で被覆したプレートに移す。可溶相抗体 / K D R 変異体 - A P 複合体と固定化 K D R (I g 1 - 3) との間で形成した架橋複合体を、プレートに結合した A P 活性を測定することにより検出する。示したデータは三重の測定値の平均値 ± S D である。

20

【 図 4 】

固定化した完全長 K D R - A P (図 A) および F l k - 1 - A P (図 B) への、B s (s c F v)₄ - I g G、B s (s c F v)₂ - F a b およびその親抗体の用量依存的結合を示す。示したデータは三重の測定値の平均値 ± S D である。

30

【 図 5 】

B s (s c F v)₄ - I g G および c - p 1 C 1 1 による、固定化 V E G F への K D R の結合の障害を証明している。示したデータは三重の測定値の平均値 ± S D である。

【 図 6 】

B s (s c F v)₄ - I g G および c - p 1 C 1 1 による、K D R レセプターの、V E G F により刺激された磷酸化の用量依存的障害を証明している。K D R によりトランスフェクトさせた 2 9 3 細胞を種々の量の抗体により R T で 1 5 分間処理し、その後 V E G F 2 0 n g / m l と共に (対照群を除く) R T でさらに 1 5 分間インキュベートした。K D R の磷酸化をかつて記載されたプロトコルに従い分析する (Z h u e t a l . (1 9 9 8) C a n c e r R e s . 5 8 , 3 2 0 9 - 3 2 1 4 ; Z h u e t a l (1 9 9 9) C a n c e r L e t t . 1 3 6 , 2 0 3 - 2 1 3)。

40

【図 1】

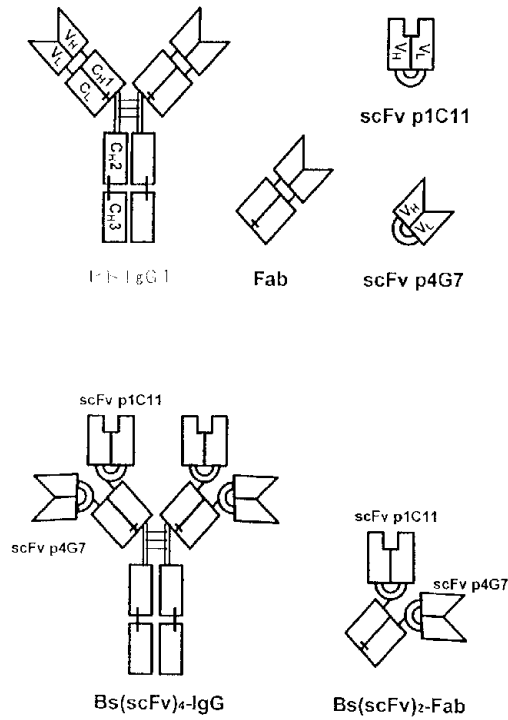


FIG. 1

【図 3】

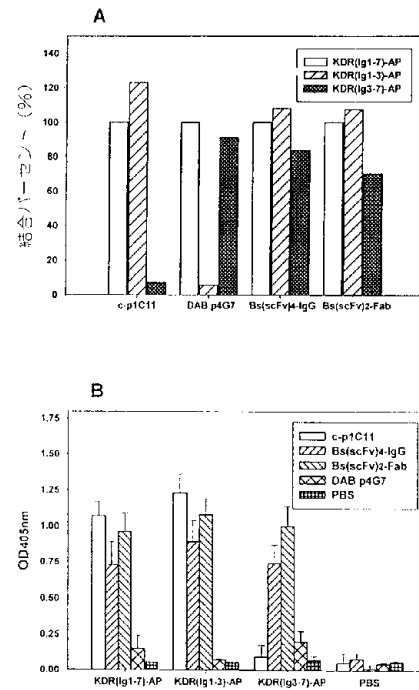


FIG. 3

【図 4】

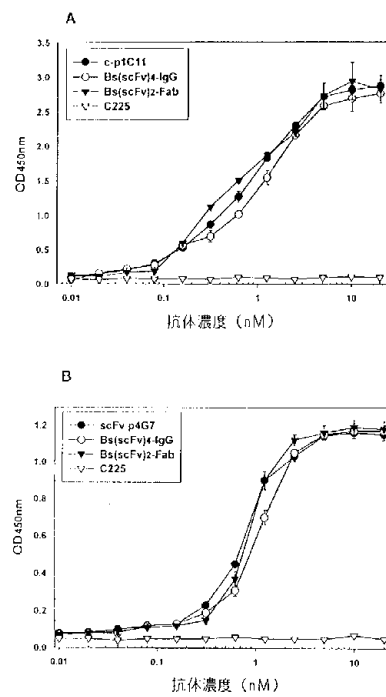


FIG. 4

【図 5】

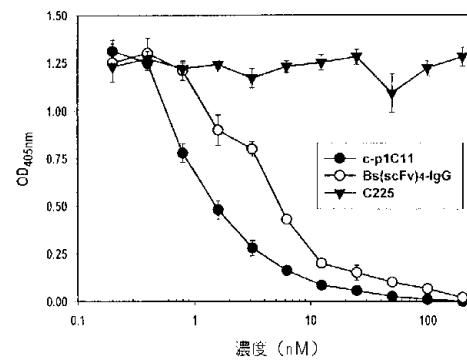


FIG. 5

【 図 6 】

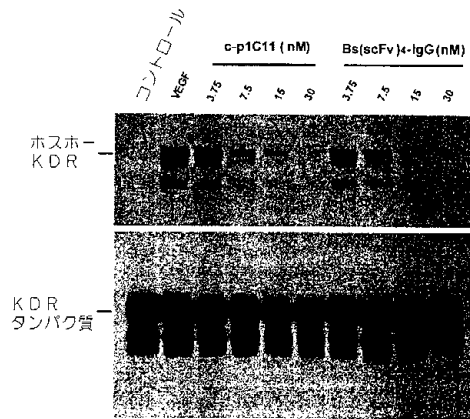


FIG. 6

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90192 A2(51) International Patent Classification: C07K 16/00.
1646, 19/00, 16/28, 16/30, 16/32, 16/40, A61K 39/395,
A61P 35/00, 9/00

(21) International Application Number: PCT/US01/16924

(22) International Filing Date: 24 May 2001 (24.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/206,749 24 May 2000 (24.05.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IM-
CLONE SYSTEMS INCORPORATED [US/US], 180
Vineck Street, New York, NY 10014 (US).(81) Designated States (national): AB, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ZHU, Zhenping
[CN/US], 49 Farmigan Avenue, Saddle Brook, NJ 07663
(US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(74) Agents: SOMERVILLE, Deborah, A. et al.; Kenyon &
Kenyon, One Broadway, New York, NY 10004 (US).

WO 01/90192 A2

(54) Title: BISPECIFIC IMMUNOGLOBULIN-LIKE ANTIGEN BINDING PROTEINS AND METHOD OF PRODUCTION

(57) Abstract: The present invention is directed to bispecific antigen-binding protein. These bispecific antigen-binding proteins are optimized in their avidity for antigen(s) but maintain their ability to function as a natural antibody, including the ability to activate complement mediated cytotoxicity and antibody dependent cellular toxicity. Natural IgG immunoglobulins are monospecific and bivalent, having two binding domains which are specific for the same epitope. By contrast, and IgG type immunoglobulin of the invention is bispecific and bivalent, having a binding domain on each light chain for one epitope and a binding domain on each heavy chain specific for a second epitope. The design of the present antigen-binding proteins provides for efficient production such that substantially all of the antigen binding proteins produced are assembled in the desired configuration.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

BISPECIFIC IMMUNOGLOBULIN-LIKE ANTIGEN BINDING PROTEINS
AND METHOD OF PRODUCTION

5 The subject invention claims benefit of U.S. Provisional Application 60/206,749, filed
May 24, 2000, the contents of which are incorporated by reference in their entirety.

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention is directed to production of immunoglobulin (Ig) type antigen-
binding proteins. More particularly, the invention provides bispecific antigen-binding
proteins which can exhibit properties of natural immunoglobulins. Natural IgG
immunoglobulins are monospecific and bivalent, having two binding domains which are
specific for the same antigen epitope. By contrast, an IgG type antigen-binding protein of the
present invention can be bispecific and bivalent. The proteins of this invention have four
antigen-binding sites, one on each of two light chains and one on each of two heavy chains.
15 When the antigen binding sites on the light chain differ from those on the heavy chain, the
protein is bispecific and bivalent. When the antigen binding sites are the same, the IgG type
protein is monospecific and tetravalent. The design of the present antigen-binding proteins
provides for efficient production of such molecules in a manner avoiding undesirable variable
domain pairings.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 Antibody specificity refers to selective recognition of the antibody for a particular
epitope of an antigen. Natural antibodies, for example, are monospecific. Bispecific
antibodies (BsAbs) are antibodies which have two different antigen-binding specificities or
sites. Where an antigen-binding protein has more than one specificity, the recognized
25 epitopes may be associated with a single antigen or with more than one antigen.

Valency refers to the number of binding sites which an antigen-binding protein has for
a particular epitope. For example, a natural IgG antibody is monospecific and bivalent.
Where an antigen-binding protein has specificity for more than one epitope, valency is
30 calculated for each epitope. For example, an antigen-binding protein which has four binding
sites and recognizes a single epitope is tetravalent. An antigen-binding protein with four
binding sites, and specificities for two different epitopes is considered bivalent.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

A natural antibody molecule is composed of two identical heavy chains and two identical light chains. Each light chain is covalently linked to a heavy chain by an interchain disulfide bond. The two heavy chains are further linked to one another by multiple disulfide bonds. Fig. 1 represents the structure of a typical IgG antibody. The individual chains fold into domains having similar sizes (110-125 amino acids) and structures, but different functions. The light chain comprises one variable domain (V_L) and one constant domain (C_L). The heavy chain comprises one variable domain (V_H) and, depending on the class or isotype of antibody, three or four constant domains (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} and C_{H4}). In mice and humans, the isotypes are IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, with IgA and IgG further subdivided into subclasses or subtypes. The portion of an antibody consisting of V_L and V_H domains is designated "Fv" and constitutes the antigen-binding site. A single chain Fv (scFv) is an engineered protein containing a V_L domain and a V_H domain on one polypeptide chain, wherein the N terminus of one domain and the C terminus of the other domain are joined by a flexible linker. "Fab" refers to the portion of the antibody consisting of V_L , V_H , C_L and C_{H1} domains.

The variable domains show considerable amino acid sequence variability from one antibody to the next, particularly at the location of the antigen binding site. Three regions, called "hypervariable" or "complementarity-determining regions" (CDR's) are found in each of V_L and V_H .

"Fc" is the designation for the portion of an antibody which comprises paired heavy chain constant domains. In an IgG antibody, for example, the Fc comprises C_{H2} and C_{H3} domains. The Fc of an IgA or an IgM antibody further comprises a C_{H4} domain. The Fc is associated with Fc receptor binding, activation of complement-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cellular-cytotoxicity. For natural antibodies such as IgA and IgM, which are complexes of multiple IgG like proteins, complex formation requires Fc constant domains.

Finally, the "hinge" region separates the Fab and Fc portions of the antibody, providing for mobility of Fabs relative to each other and relative to Fc, as well as including multiple disulfide bonds for covalent linkage of the two heavy chains.

Multispecific antigen-binding proteins have been used in several small-scale clinical trials as cancer imaging and therapy agents, but broad clinical evaluation has been hampered by the lack of efficient production methods. The design of such proteins thus far has been

WO 01/90192

PCT/US01/16924

concerned primarily with providing multispecificity. In few cases has any attention been devoted to providing other useful functions associated with natural antibody molecules.

In recent years, a variety of chemical and recombinant methods have been developed for the production of bispecific and/or multivalent antibody fragments. For review, see: Holliger, P. and Winter, G., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4, 446-449 (1993); Carter, P. *et al.*, *J. Hematotherapy* 4, 463-470 (1995); Plückthun, A. and Pack, P., *Immunotechnology* 3, 83-105 (1997). Bispecificity and/or bivalency has been accomplished by fusing two scFv molecules via flexible linkers, leucine zipper motifs, C_HC_L-heterodimerization, and by association of scFv molecules to form bivalent monospecific diabodies and related structures. Multivalency has been achieved by the addition of multimerization sequences at the carboxy or amino terminus of the scFv or Fab fragments, by using for example, p53, streptavidin and helix-turn-helix motifs. For example, by dimerization via the helix-turn-helix motif of an scFv fusion protein of the form (scFv1)-hinge-helix-turn-helix-(scFv2), a tetravalent bispecific miniantibody is produced having two scFv binding sites for each of two target antigens.

Production of IgG type bispecific antibodies, which resemble IgG antibodies in that they possess a more or less complete IgG constant domain structure, has been achieved by chemical cross-linking of two different IgG molecules or by co-expression of two antibodies from the same cell. Chemical cross-linking is inefficient and can result in loss of antibody activity. Both methods result in production of significant amounts of undesired and non-functional species due to mispairing among the component heavy and light chains. Methods which have been employed to reduce or eliminate mispairing have other undesirable effects.

The production of undesired heterogeneous products has been a significant drawback to many of the methods employed so far. For example, in preparation of bispecific antibodies (BsAbs), in the absence of a method for insuring the proper association of the various domains, only a portion of the product is actually bispecific. One strategy developed to overcome unwanted pairings between two different sets of IgG heavy and light chains co-expressed in transfected cells is modification of the C_H3 domains of two heavy chains to reduce homodimerization between like antibody heavy chains. Merchant, A. M., *et al.*, (1998) *Nat. Biotechnology* 16, 677-681. In that method, light chain mispairing was eliminated by requiring the use of identical light chains for each binding site of those bispecific antibodies.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

In most work directed toward obtaining bispecific molecules, little attention has been paid to the maintenance of functional or structural aspects other than antigen specificity. For example, both complement-mediated cytotoxicity (CMC) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), which require the presence and function of Fc region heavy chain constant domains, are lost in most bispecific antibodies. Coloma and Morrison created a homogeneous population of bivalent BsAb molecules with an Fc domain by fusing a scFv to the C-terminus of a complete heavy chain. Co-expression of the fusion with an antibody light chain resulted in the production of a homogeneous population of bivalent, bispecific molecules that bind to one antigen at one end and to a second antigen at the other end (Coloma, M. J. and Morrison, S. L. (1997) *Nat. Biotechnology* 15, 159-163). However, this molecule had a reduced ability to activate complement and was incapable of effecting CMC. Furthermore, the C₁3 domain bound to high affinity Fc receptor (FcγR1) with reduced affinity.

The present invention overcomes these disadvantages by providing antigen-binding proteins (1) which can be bispecific and bivalent, (2) in which constraints regarding selection of antigen-binding sites can be eliminated, (3) which have Fc constant domains and associated functions, (4) which are substantially homogeneous, and (5) which can be produced in mammalian or other cells without further processing.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to an antigen-binding protein comprising a complex of two first polypeptides and two second polypeptides which are stably associated in an immunoglobulin-like complex. The first polypeptide comprises an antigen-binding site located to the N terminus of an immunoglobulin light chain constant domain (C_L domain) capable of stable association with an immunoglobulin heavy chain first constant domain (C_H1 domain). The second polypeptide comprises an antigen-binding site located to the N terminus of a C_H1 domain followed by one or more heavy chain Fc region constant domains (C_H domains). The Fc C_H domains are capable of stable self association, *i.e.* each C_H domain can pair or bind to another copy of itself. Thus, antigen-binding proteins of the invention generally consist of four polypeptides and four antigen binding sites. In preferred embodiments, antigen-binding sites are provided by single chain Fvs although the antigen-binding site can also be provided by any sequence of amino acids capable of binding to an

WO 01/90192

PCT/US01/16924

antigen. When the binding sites of the first and second polypeptides are different, the antigen-binding protein is bispecific. When they are the same, the antigen-binding protein is monospecific. Usually, though not necessarily, the polypeptides are covalently joined by disulfide bridges. In a preferred configuration, the antigen-binding proteins of the invention are bispecific and bivalent. That is, they bind to two different epitopes which may be carried on the same antigen or on different antigens.

In addition to providing for association of the polypeptide chains, Fc constant domains contribute other immunoglobulin functions. The functions include activation of complement mediated cytotoxicity, activation of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and Fc receptor binding. When antigen-binding proteins of the invention are administered for treatment or diagnostic purposes, the Fc constant domains can also contribute to serum half-life. The Fc constant domains can be from any mammalian or avian species. When antigen-binding proteins of the invention are used for treatment of humans, constant domains of human origin are preferred, although the variable domains can be non-human. In cases where human variable domains are preferred, chimeric scFvs can be used.

The antigen-binding sites can be specific for any antigen and can be obtained by any means. For example, a scFv can be obtained from a monoclonal antibody, or from a library of random combinations of V_L and V_H domains.

In a preferred embodiment, the scFv binds specifically to human kinase insert domain-containing receptor (KDR). Particularly preferred are antigen-binding proteins that bind to the extracellular domain of KDR and block binding by its ligand vascular endothelial growth factor (VEGF) and/or neutralize VEGF induced activation of KDR. In another preferred embodiment, the scFv binds specifically to Flt-1. Also particularly preferred are antigen-binding proteins that bind to the extracellular domain of Flt-1 and block binding by one or both of its ligands VEGF and placental growth factor (PlGF) and/or neutralize VEGF induced or PlGF induced activation of Flt-1.

Dual receptor blockade with the bifunctional antigen-binding protein can be more effective in inhibiting VEGF-stimulated angiogenesis. In a preferred embodiment, a recombinant bispecific bivalent antigen-binding protein is capable of blocking ligand binding for both Flt-1 and KDR from binding to their ligands, including VEGF and placenta growth factor (PlGF). Thus, a preferred bispecific bivalent antigen-binding protein interferes with KDR/VEGF, Flt-1/VEGF and/or Flt-1/PlGF interaction. Such an antigen-binding protein can

WO 01/90192

PCT/US01/16924

be a stronger inhibitor of VEGF-stimulated mitogenesis of human endothelial cells, and of VEGF and PlGF-induced migration of human leukemia cells than its parent antibodies.

Antigen-binding proteins of the invention that block ligand binding of neutralize activation of KDR and/or Flt-1 are useful to reduce endothelial cell proliferation,
5 angiogenesis and tumor growth and to inhibit VEGF- and PlGF-induced migration of human leukemia cells.

The present invention further includes methods for making antigen binding proteins whereby one or more recombinant DNA constructs encoding the first and second polypeptides of the invention are coexpressed in mammalian cells for a time and in a manner
10 sufficient to allow expression and complexation and the antigen-binding protein is recovered.

In certain embodiments of the present invention, genes encoding scFv domains (V_L and V_H) are cloned and assembled into a bacterial vector which provides for scFv expression and screening. Nucleotide sequences encoding desired scFvs are linked, in frame, to sequences encoding desired heavy or light chain constant domains in a cloning vector
15 designed to provide efficient expression in mammalian cells. Thus, two constructs, the first encoding a scFv and light chain constant domain and the second encoding a scFv and heavy chain constant domains, and which may be in the same or separate expression vectors, are transfected into a host cell and coexpressed.

The antigen-binding proteins of the invention which are bivalent and bispecific have a
20 combination of desirable features. First, they are homogeneous. By design, mispairing of antibody heavy and light chains is greatly reduced or eliminated. For example, a typical bispecific antibody requires the use of two different heavy chains to provide two specificities. Four combinations are possible when the heavy chains are arranged into an IgG type molecule. Two of those consist of mispaired heavy chains such that the product is
25 monospecific. Contrarywise, in proteins of the invention, all heavy chains are equivalent and mispairing does not occur. Because each heavy chain comprises a first complete binding site, and each light chain comprises a second different binding site, only one type of heavy chain and one type of light chain is required to provide bispecificity.

A second advantage of bispecific proteins of the invention is that in tetrameric form,
30 they are bivalent for each binding specificity. A feature of a natural antibody which is missing from a dimeric BsAb is that the natural antibody is bivalent for the antibody binding site that it comprises. A dimeric BsAb is monovalent for each of the two binding sites that it

WO 01/90192

PCT/US01/16924

comprises. This is significant for antibody function because bivalency allows for cooperativity of binding and a significant increase in binding avidity over a molecule comprising a single antigen-binding site.

5 A third advantage of proteins of the invention is that heavy chain constant domains which constitute the Fc region (e.g., C_H2 and C_H3 for an IgG molecule) of a natural antibody and which provide other antibody functions can be present. Furthermore, the multiple binding domains, along with the C_L and C_H1 domains, are separated from the Fc region such that functions provided by the Fc region are not impaired. Retained functions relate to the ability of the Fc to bind to certain accessory molecules (e.g., binding to cell surface and
10 soluble Fc receptors, J chain association for IgA and IgM, S protein for IgA) and include activation of the complement pathway (complement mediated cytotoxicity, CMC), recognition of antibody bound to target cells by several different leukocyte populations (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) and opsonization (enhancement of phagocytosis). In addition, by avoiding the addition of large domains to the carboxy terminus of heavy
15 chains, steric hindrance is avoided. This is significant for many of the above-mentioned functions, as well as for assembly of antibody molecules of higher order structure (e.g., IgA consists of four heavy chains, associated through two Fcs; IgM consists of ten heavy chains associated by five Fcs). Finally, the Fc heavy chain constant domains confer increased serum half-life.

20 A fourth advantage of proteins of the invention is that there is no requirement for processing *in vitro* to obtain the complete product. Though rearranged in an artificial manner, each of the domains has a natural character which allows expression in a biological system.

The present invention is also applicable to production of monospecific tetravalent antigen-binding proteins. In such proteins, all four binding sites have the same specificity.
25 Furthermore, the invention provides a method of making contemplated monovalent bispecific antigen-binding proteins and bivalent monospecific antigen-binding proteins. For example, Fab type proteins can be made which comprise two different binding sites or two equivalent binding sites, the first binding site linked to a C_L domain and the second binding site linked to a C_H1 domain.

30 In a preferred embodiment, the first and second binding sites are each contributed by a single chain Fv (scFv). A scFv having a first binding specificity is fused to a C_L domain to form a scFv-C_L polypeptide, and a scFv having a second binding specificity is fused to C_H1 to

WO 01/90192

PCT/US01/16924

form a scFv-C_H polypeptide. As referred to herein, a scFv-C_H polypeptide is defined as a scFv fused to any portion of an antibody heavy chain so long as there are two or more C_H domains with one of the domains being C_H1. A scFv-C_L - scFv-C_H heterodimer is formed by natural association of the C_L and C_H1 constant domains. The presence of at least one C_H2, C_H3, or C_H4 constant domain allows pairing of two scFv-C_L - scFv-C_H heterodimers into an antigen-binding protein having four binding sites by natural association of a C_H2, C_H3, or C_H4 domain on one polypeptide with a copy of itself on another polypeptide.

The precise heavy chain constant domain structure is determined by desired functional characteristics. If it is desired that an antigen-binding protein have a particular isotype, C_H domains from an immunoglobulin of that isotype will be selected. For example, where the desired isotype is IgG1, the domain structure is (scFv)₂-C_H1-C_H2-C_H3, where the constant domains are from an IgG1 antibody.

This approach is employed to provide a homogenous population of IgG-like antigen-binding proteins having four antigen binding sites. Where each heterodimer comprises two different binding sites, the antigen-binding protein thus formed is bispecific and bivalent. Where the heterodimer comprises two equivalent binding sites, the antigen-binding protein formed is monospecific and tetravalent. In embodiments detailed herein, the antigen binding sites are comprised of antibody variable domains. However, the invention further contemplates bispecific molecules wherein one or more binding functions are contributed by structures chosen on the basis of known binding interactions with a particular protein or antigen of interest. For example, a portion of gp120 of HIV-1 may be selected on the basis of its ability to bind to CD4. Alternatively, a binding site may comprise an amino acid sequence corresponding to a hormone or cytokine selected on the basis of its ability to bind to its cognate receptor protein.

Certain antigen-binding proteins of the present invention are used for binding to antigen or to block interaction of a protein and its ligand. Other antigen-binding proteins of the present invention are used to promote interactions between immune cells and target cells. Finally, antigen-binding proteins of the invention are used to localize anti-tumor agents, target moieties, reporter molecules or detectable signal producing agents to an antigen of interest.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

The present invention further provides antigen-binding proteins which bind to KDR and its analogs, or to other receptor molecules which are involved in angiogenesis or tumorigenesis.

5

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a schematic diagram of Bs(scFv)₄-IgG and Bs(scFv)₂-Fab molecules. In Bs(scFv)₄-IgG, the V_H and V_L domains of a human IgG1 molecule are replaced by two scFv antibodies of different specificity. Co-expression of the scFv-light and scFv-heavy chain fusion polypeptides in mammalian cells results in the formation of a bivalent, IgG-like bispecific molecule. In Bs(scFv)₂-Fab, a stop codon is introduced at the C-terminal end of the heavy chain C_H1 domain, which results in the expression of a bivalent, Fab-like bispecific molecule (also see Fig. 2A).

Figure 2 shows examples of expression constructs and purified Bs(scFv)₄-IgG and Bs(scFv)₂-Fab antibodies (the domains are not to scale). Panel A: Individual scFv constructs are fused at their 5' ends to a leader sequence for secretion in mammalian cells, and at their 3' ends to the C_L or C_H1 domains of a human IgG molecule. Panel B: SDS-PAGE analysis of protein-G purified Bs(scFv)₄-IgG and Bs(scFv)₂-Fab antibodies. Lanes 1-3 are run under non-reducing conditions. Lane 1, c-p1C11, a chimeric IgG1; Lane 2, Bs(scFv)₄-IgG; Lane 3, Bs(scFv)₂-Fab. Lanes 4-6 are run under reducing conditions. Lane 4, c-p1C11; Lane 5, Bs(scFv)₄-IgG; Lane 6, Bs(scFv)₂-Fab. Also shown are the positions of molecular weight standards.

Figure 3 shows the results of ELISA assays for the bispecificity of Bs(scFv)₄-IgG and Bs(scFv)₂-Fab antibodies. Panel A shows binding of Bs(scFv)₄-IgG, Bs(scFv)₂-Fab and its parent antibodies to KDR ECD Ig domain deletion mutant-AP fusion proteins. Panel B shows cross-linking ELISA for detection of simultaneous binding by Bs(scFv)₄-IgG and Bs(scFv)₂-Fab to the two different epitopes that are located on separate KDR ECD Ig domain deletion mutants, KDR(Ig1-3) and KDR(Ig3-7)-AP. The BsAb are incubated in solution with KDR(Ig1-7)-AP, KDR(Ig1-3)-AP or KDR(Ig3-7)-AP, and transferred to a plate coated with untagged KDR(Ig1-3). The cross-linking complexes formed between the soluble phase antibody/KDR variant-AP complex and the immobilized KDR(Ig1-3) are detected by measuring the plate-bound AP activity. Data shown are mean ± SD of triplicate determinations.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Figure 4 shows dose-dependent binding of Bs(scFv)4-IgG, Bs(scFv)2-Fab and its parent antibodies to immobilized full length KDR-AP (Panel A) and Flk-1-AP (Panel B). Data shown are mean \pm SD of triplicate determinations.

Figure 5 demonstrates inhibition of binding of KDR to immobilized VEGF by Bs(scFv)4-IgG and c-p1C11. Data shown are mean \pm SD of triplicate determinations.

Figure 6 demonstrates dose-dependent inhibition of VEGF-stimulated phosphorylation of KDR receptor by Bs(scFv)4-IgG and c-p1C11. The KDR-transfected 293 cells were treated with various amounts of antibodies at RT for 15 min, followed by incubation with 20 ng/ml of VEGF (except the control group) at RT for additional 15 min. Phosphorylation of KDR is analyzed following the protocol previously described (Zhu *et al.* (1998) *Cancer Res.*, 58, 3209-3214; Zhu *et al.* (1999) *Cancer Lett.* 136, 203-213).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides antigen-binding proteins which are homogeneous and which can retain the functional characteristics of natural antibodies such as cooperativity of binding (avidity), and the ability to activate complement mediated cytotoxicity and antibody dependent cellular toxicity. In general, antigen-binding proteins of the invention have the constant domain structure of naturally-occurring antibodies, with complete antigen binding sites substituted for each antibody variable domain. Thus, in a naturally-occurring antibody, a single binding site is provided by a combination of a light chain variable domain (V_L) and a heavy chain variable domain (V_H), so that, for example, the four variable domains of an IgG type antibody provide two complete binding sites. In contrast, the IgG type antigen-binding proteins of the present invention have four complete binding sites, because a structure comprising a complete antigen binding site is substituted for each V_L and V_H variable domain of the naturally occurring antibody.

As used herein, unless otherwise indicated or clear from the context, antibody domains, regions and fragments are accorded standard definitions as are well known in the art. See, *e.g.*, Abbas, A. K., *et al.*, (1991) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.

The antigen binding site of a typical Fv contains six complementarity determining regions (CDRs) which contribute in varying degrees to the affinity of the binding site for antigen. Antigen binding sites comprised of fewer CDRs (*e.g.*, three, four or five) are also

WO 01/90192

PCT/US01/16924

functional and included within the scope of the invention. The extent of CDR and framework regions (FRs) is determined by comparison to a compiled database of amino acid sequences in which those regions have been defined according to variability among the sequences.

There are three heavy chain variable domain CDRs (CDRH1, CDRH2 and CDRH3) and three
5 light chain variable domain CDRs (CDRL1, CDRL2 and CDRL3).

Avidity is a measure of the strength of binding between an immunoglobulin and its antigen. Unlike affinity, which measures the strength of binding at each binding site, avidity is related to both the affinity and the valency of an immunoglobulin molecule.

The proteins of the invention are derived from, or incorporate portions of antibodies
10 of one or more immunoglobulin classes. Immunoglobulin classes include IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE isotypes and, in the case of IgG and IgA, their subtypes.

The antigen-binding proteins of the invention resemble IgG type antibodies, in that they are heterotetramers comprising two light chains and two heavy chains. However, unlike IgG type antibodies, they have four antigen binding sites, and may have fewer constant
15 domains provided at least C_H1 and one other C_H domain are present. The four antigen-binding sites may comprise two binding sites for each of two binding specificities, or four binding sites for one binding specificity.

In a preferred embodiment, a bispecific protein having this form may display avidity characteristics like those of naturally-occurring IgG type antibodies. For each binding
20 specificity, the presence of two equivalent antigen binding sites allows for cooperativity of binding to antigen, as is the case for the naturally occurring IgG molecule. It will be apparent that by proper choice of heavy chain constant region, as well known to one of skill in the art, bispecific antibodies resembling antibodies of other classes, for example, IgA, IgM, and other types of antibodies can be produced.

The invention contemplates the linkage of binding domains of different specificity to heavy and light chain constant domains, such that upon pairing of heavy chains with light
25 chains, different binding specificities become associated in single heterodimeric molecules. A population of such molecules is substantially homogeneous, in that practically all dimers comprise one binding domain having a first specificity and one binding domain having a second specificity. Dependence on the preferential natural pairing of heavy and light chains
30 via association of C_L and C_H1 domains reduces or eliminates formation of dimers which comprise two binding domains having the same specificity. Likewise, preferential

WO 01/90192

PCT/US01/16924

association of the heavy chains occurs via the Fc region to form the antigen-binding proteins of the invention.

In general, antigen binding proteins of the invention comprise complete C_L and C_H1 domains, which are covalently linked by an interchain disulfide bond. However, the invention also contemplates the use of modified C_L and C_H1 domains which may have amino acids deleted or inserted, and which, together, may or may not have an interchain disulfide bond, so long as the domains can associate in a stable complex.

By stable association, or complex, it is meant the under physiological conditions, the polypeptides of the antigen binding protein exist as a complex. For example, on a native gel under non-reducing conditions, the polypeptides migrate as a complex. It will be appreciated that not all antibody light chains effectively associate with any given heavy chain and vice versa. However, combinations of C_L and C_H1 constant domains which pair effectively are well known in the art and are preferred.

As with natural antibodies, the heavy chain - light chain heterodimers associate, via association of particular heavy chain constant domains, to form structures of higher order. For example, IgG type antibodies comprise two heavy chain - light chain heterodimers joined by covalent linkage in a tetrameric structure. Certain other antibody types comprise similar tetrameric structures which are incorporated into a higher order structure comprising, for example, two tetramers (IgA) or ten tetramers (IgM).

Like natural antibodies, bivalent bispecific antigen binding proteins of the invention rely on Fc constant domains and hinge regions for proper association of heavy chains. In general, the antigen-binding proteins of the invention comprise a hinge region and one or more Fc constant domains or portions thereof. It is usually desired to incorporate all Fc constant domains to retain all the associated functions. However, the invention further contemplates the inclusion of only certain constant domains, provided at least one such domain is present. As various Fc functions depend on different portions of the Fc, fewer C_H domains can be incorporated in the heavy chain if less than full functionality is desired. For example, significant activation of complement requires C_H2 of IgG or C_H3 of IgM. The invention also contemplates the use of modified hinge and Fc heavy chain domains which may have amino acids substituted, deleted, inserted or modified, so long as the heavy chains can associate in a stable complex.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

The antigen binding sites of preferred antigen binding proteins consist of Fv regions of any desired specificity. The Fv is a single chain Fv (scFv) and consists of a V_H domain and a V_L domain, in either order, linked by a peptide linker, which allows the domains to associate to form a functional antigen binding site. (see, for example, U.S. Pat. No.

5 4,946,778, Ladner et al., (Genex); WO 88/09344, Creative Biomolecules, Inc., Uhston et al.) WO 92/01047, Cambridge Antibody Technology/McCafferty et al., describes the display of scFv fragments on the surface of soluble recombinant genetic display packages.

Peptide linkers used to produce scFvs are flexible peptides selected to assure proper three-dimensional folding and association of the V_L and V_H domains and maintenance of target molecule binding-specificity. Generally, the carboxy terminus of the V_L or V_H sequence is covalently linked by such a peptide linker to the amino terminus of a complementary V_H or V_L sequence. The linker is generally 10 to 50 amino acid residues, but any length of sufficient flexibility to allow formation of the antigen binding site is contemplated. Preferably, the linker is 10 to 30 amino acid residues. More preferably the linker is 12 to 30 amino acid residues. Most preferably is a linker of 15 to 25 amino acid residues. Example of such linker peptides include (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃.

V_L and V_H domains from any source can be incorporated into a scFv for use in the present invention. For example, V_L and V_H domains can be obtained directly from a monoclonal antibody which has the desired binding characteristics. Alternatively, V_L and V_H domains can be from libraries of V gene sequences from a mammal of choice. Elements of such libraries express random combinations of V_L and V_H domains and are screened with any desired antigen to identify those elements which have desired binding characteristics. Particularly preferred is a human V gene library. Methods for such screening are known in the art. V_L and V_H domains from a selected non-human source may be "humanized," for example by substitution of CDR loops into human V_L and V_H domains, or modified by other means well known in the art to reduce immunogenicity when administered to a human.

In a physiological immune response, mutation and selection of expressed antibody genes leads to the production of antibodies having high affinity for their target antigen. The V_L and V_H domains expressed in a scFv can similarly be subject to *in vitro* mutation and screening procedures to obtain high affinity variants.

Vectors for construction and expression of scFvs are available which contain bacterial secretion signal sequences and convenient restriction cloning sites. V_L and V_H gene

WO 01/90192

PCT/US01/16924

combinations encoding binding sites specific for a particular antigen are isolated from cDNA of B cell hybridomas. Alternatively, random combinations of V_L and V_H genes are obtained from genomic DNA and the products then screened for binding to an antigen of interest.

Typically, the polymerase chain reaction (PCR) is employed for cloning, using primers which are compatible with restriction sites in the cloning vector. See, e.g., Dreher, M.L. *et al.* (1991) *J. Immunol. Methods* 139:197-205; Ward, E.S. (1993) *Adv. Pharmacol.* 24:1-20; Chowdhury, P.S. and Pastan, I. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:568-572.

To express scFvs with selected or random combinations of V_L and V_H domains, V genes encoding those domains are assembled into a bacterial expression vector. For example, a vector can be used which has sequences encoding a bacterial secretion signal sequence and a peptide linker and which has convenient restriction sites for insertion of V_L and V_H genes. Alternatively, it might be desired to first assemble all necessary coding sequences (e.g., secretion signal, V_L , V_H and linker peptide) into a single sequence, for example by PCR amplification using overlapping primers, followed by ligation into a plasmid or other vector. Where it is desired to provide a specific combination of V_L and V_H domains, PCR primers specific to the sequences encoding those domains are used. Where it is desired to create a diverse combinations of a large number of V_L and V_H domain, mixtures of primers are used which amplify multiple sequences.

Preferred bacterial vectors allow for expression of scFv linked to a coat protein of a filamentous phage. The phage coat protein most commonly used is the gene III protein of phage M13. The display of scFv on filamentous phage is particularly useful where it is desired to screen a large population of scFv for desired binding characteristics. Bacterial cells expressing the scFv-gIII protein fusion are infected with an M13 variant which allows for preferential packaging of vector DNA carrying the scFv-gIII fusion gene into phage particles into which the scFv-gIII coat protein fusion is incorporated. Each resulting phage particle displays a particular scFv and contains a vector which encodes the scFv. A population of such phage particles displaying a diverse collection of scFvs is then enriched for desired binding characteristics by a panning procedure. Typically, desired particles are immobilized on a solid surface coated with an antigen to which the desired phage particles can bind. The bound particles are collected and used to further infect bacterial cells. The panning procedure is repeated to further enrich for desired binding characteristics.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

The vector encoding the scFv-gIII fusion may include a translational termination codon at the junction of the scFv and gIII coding regions. When expressed in a bacterial cell carrying a corresponding translation termination suppressor, the fusion protein is produced. When expressed in a bacterial cell without the corresponding suppressor, free scFv is produced.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key regulator of vasculogenesis during embryonic development and angiogenic processes during adult life such as wound healing, diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, psoriasis, inflammatory disorders, tumor growth and metastasis. VEGF is a strong inducer of vascular permeability, stimulator of endothelial cell migration and proliferation, and mediates its activity mainly through two tyrosine kinase receptors, VEGF receptor 1 (VEGFR-1), or fms-like tyrosine receptor 1 (Flt-1), and VEGF receptor 2 (VEGFR-2), or kinase insert domain-containing receptor (KDR, and Flk-1 in mice) Ferrara, N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237, 1-30 (1999); Klagsbrum, M., *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 259-270 (1996); Neufeld, G., *et al.*, *FASEB J.* 13, 9-22 (1999). Numerous studies have shown that over-expression of VEGF and its receptor play an important role in tumor-associated angiogenesis, and hence in both tumor growth and metastasis.

Flt-1 and KDR have distinct functions in vascular development in embryos. Targeted deletion of genes encoding either receptor in mice is lethal to the embryo, demonstrating the physiological importance of the VEGF pathway in embryonic development. KDR-deficient mice have impaired blood island formation and lack mature endothelial cells, whereas Flt-1 null embryos fail to develop normal vasculature due to defective formation of vascular tubes, albeit with abundant endothelial cells. Shalaby, F., *et al.*, *Nature* 376, 62-66 (1995); Fong, G.H., *et al.*, *Nature* 376, 66-70 (1995). On the other hand, inactivation of Flt-1 signal transduction by truncation of the tyrosine kinase domain does not impair mouse embryonic angiogenesis and embryo development, suggesting that signaling through the Flt-1 receptor is not essential for vasculature development in the embryo. Hiratsuka, S., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 9349-9354 (1998). The biological responses of Flt-1 and KDR to VEGF in the adult also appear to be different. It is generally believed that KDR is the main VEGF signal transducer that results in endothelial cell proliferation, migration, differentiation, tube formation, increase of vascular permeability, and maintenance of vascular integrity. Flt-1 possesses a much weaker kinase activity, and is unable to generate a mitogenic response

WO 01/90192

PCT/US01/16924

when stimulated by VEGF - although it binds to VEGF with an affinity that is approximately 10-fold higher than KDR. Flt-1 is also been implicated in VEGF and placenta growth factor (PlGF)-induced migration of monocytes/macrophage and production of tissue factor.

Barleon, B., *et al.*, *Blood* 87, 3336-3343 (1996); Clauss, M., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 17629-17634 (1996).

In a preferred embodiment, an antigen binding protein of the present invention comprises a scFv that binds to KDR and blocks VEGF binding to KDR. scFv p1C11 (SEQ ID NOS: 27, 28) is produced from a mouse scFv phage display library. (Zhu *et al.*, 1998). p1C11 blocks VEGF-KDR interaction and inhibits VEGF-stimulated receptor phosphorylation and mitogenesis of human vascular endothelial cells (HUVEC). This scFv binds both soluble KDR and cell surface-expressed KDR on, e.g., HUVEC with high affinity ($K_d=2.1\text{nM}$).

In a second preferred embodiment, an antigen binding protein of the present invention comprises a scFv that binds to Flt-1 and blocks VEGF binding and/or PlGF binding to Flt-1. Mab 6.12 binds to soluble and cell surface-expressed Flt-1. scFv 6.12 comprises the V_L and V_H domains of mouse monoclonal antibody Mab 6.12. A hybridoma cell line producing Mab 6.12, has been deposited as ATCC number P1A-3344. The deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure and the regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture for 30 years from date of deposit. The organisms will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Applicants and ATCC which assures unrestricted availability upon issuance of the pertinent U.S. patent. Availability of the deposited strains is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

Antigen-binding proteins of the invention can have binding sites for any epitope, antigenic site or protein. Preferred antigen-binding proteins neutralize activation of receptor proteins. Of particular interest are VEGF receptors and other receptors which are involved in angiogenesis. VEGF receptors include KDR, Flk-1, Flt-1. Other factors implicated as possible regulators of angiogenesis *in vivo* include fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF). The corresponding receptors

WO 01/90192

PCT/US01/16924

are fibroblast growth factor (FGF-R) and platelet derived growth factor receptor (PDGF-R), epidermal growth factor receptor (EGF-R). Also of interest are receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis and/or oncogenesis. Such receptor tyrosine kinases include FLT4, HER2/neu, Tek and Tie2. Receptors of interest include human proteins and homologues from other mammals. Antibodies are known for the above listed receptors and are sources of scFv V_L and V_H domains for use in antigen binding proteins of the present invention. Antigen binding proteins of the invention which are specific for any of the listed receptors can be monospecific or bispecific. Certain bispecific antigen-binding proteins of the invention bind to two of the above listed receptors. In one preferred embodiment, such a bispecific antigen-binding protein binds to HER2 and EGF-R. In a second preferred embodiment, an antigen-binding protein of the invention binds to KDR and FLT-1.

Bispecific antigen-binding proteins of the invention can cross-link antigens on target cells with antigens on immune system effector cells. This can be useful, for example, for promoting immune responses directed against cells which have a particular antigens of interest on the cell surface. According to the invention, immune system effector cells include antigen specific cells such as T cells which activate cellular immune responses and nonspecific cells such as macrophages, neutrophils and natural killer (NK) cells which mediate cellular immune responses.

Antigen-binding proteins of the invention can have a binding site for any cell surface antigen of an immune system effector cell. Such cell surface antigens include, for example, cytokine and lymphokine receptors, Fc receptors, CD3, CD16, CD28, CD32 and CD64. In general, antigen binding sites are provided by scFvs which are derived from antibodies to the aforementioned antigens and which are well known in the art. Antigen-binding sites of the invention which are specific for cytokine and lymphokine receptors can also be sequences of amino acids which correspond to all or part of the natural ligand for the receptor. For example, where the cell-surface antigen is an IL-2 receptor, an antigen-binding protein of the invention can have an antigen-binding site which comprises a sequence of amino acids corresponding to IL-2. Other cytokines and lymphokines include, for example, interleukins such as interleukin-4 (IL-4) and interleukin-5 (IL-5), and colony-stimulating factors (CSFs) such as granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), and granulocyte CSF (G-CSF).

Preferred antigen-binding proteins of the invention are made by expressing a first polypeptide having a scFv linked to a C_L light chain constant domain and a second

WO 01/90192

PCT/US01/16924

polypeptide having a scFv linked to a C_H1, C_H2 and C_H3 heavy chain constant domains. The DNA fragments coding for the scFvs can be cloned, *e.g.*, into HCMV vectors designed to express either human light chains or human heavy chains in mammalian cells. (*See, e.g.*, Bendig, *et al.*, U.S. Patent 5,840,299; Maceda, *et al.* (1991) *Hum. Antibod. Hybridomas* 2, 124-134). Such vectors contain the human cytomegalovirus (HCMV) promoter and enhancer for high level transcription of the light chain and heavy chain constructs. In a preferred embodiment, the light chain expression vector is pKN100 (gift of Dr. S. Tannan Jones, MRC Collaborative Center, London, England), which encodes a human kappa light chain, and the heavy chain expression vector is pG1D105 (gift of Dr. S. Tannan Jones), which encodes a human gamma-1 heavy chain. Both vectors contain HCMV promoters and enhancers, replication origins and selectable markers functional in mammalian cells and *E. coli*.

A selectable marker is a gene which encodes a protein necessary for the survival or growth of transformed host cells grown in a selective culture medium. Typical selectable markers encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, *e.g.* the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*. A particularly useful selectable marker confers resistance to methotrexate. For example, cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub and Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216. The transformed cells are then exposed to increased levels of methotrexate. This leads to the synthesis of multiple copies of the DHFR gene, and, concomitantly, multiple copies of other DNA comprising the expression vectors, such as the DNA encoding the antibody or antibody fragment.

Where it is desired to express a gene construct in yeast, a suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7. Stinchcomb *et al.* (1979) *Nature*, 282, 39; Kingsman *et al.* (1979) *Gene* 7, 141. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1. Jones (1977) *Genetics* 85, 12. The presence of the *trp1* lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting

WO 01/90192

PCT/US01/16924

transformation by growth in the absence of tryptophan. Similarly, Leu2-deficient yeast strains (ATCC 20,622 or 38,626) are complemented by known plasmids bearing the Leu2 gene.

Preferred host cells for transformation of vectors and expression of antigen-binding proteins of the present invention are mammalian cells, e.g., COS-7 cells, chinese hamster ovary (CHO) cells, and cell lines of lymphoid origin such as lymphoma, myeloma, or hybridoma cells. Other eukaryotic host, such as yeasts are alternatively used. The transformed host cells are cultured by methods known in the art in a liquid medium containing assimilable sources of carbon, e.g. carbohydrates such as glucose or lactose, nitrogen, e.g. amino acids, peptides, proteins or their degradation products such as peptones, ammonium salts or the like, and inorganic salts, e.g. sulfates, phosphates and/or carbonates of sodium, potassium, magnesium and calcium. The medium furthermore contains, for example, growth-promoting substances, such as trace elements, for example iron, zinc, manganese and the like.

Each variable domain of the antigen-binding proteins of the present invention may be a complete immunoglobulin heavy or light chain variable domain, or it may be a functional equivalent or a mutant or derivative of a naturally occurring domain, or a synthetic domain constructed, for example, *in vitro* using a technique such as one described in WO 93/11236 (Medical Research Council et al./Griffiths et al.). For instance, it is possible to join together domains corresponding to antibody variable domains which are missing at least one amino acid. The important characterizing feature is the ability of each variable domain to associate with a complementary variable domain to form an antigen binding site.

Similarly, an important feature of constant domains is the ability to form a stable complex. Although antigen binding proteins of the invention comprise complete C_L and C_{H1} domains, the invention also contemplates the use of modified C_L and C_{H1} domains which may have amino acids deleted or inserted, and which may or may not have an interchain disulfide bond, so long as the domains can associate in a stable complex.

Important characterizing features of Fc constant domains include the ability to self-associate, to bind to an Fc receptor, to initiate CMC and to initiate ADCC. As previously noted, antigen-binding protein of the invention do not require that every constant domain structure or function be present. Accordingly, the terms heavy chain variable domain, light

WO 01/90192

PCT/US01/16924

chain variable domain, constant domain, scFv and Fc should be construed to include all variants which are functionally equivalent.

In a preferred embodiment of the invention, the antigen binding sites of a bispecific antibody comprise scFv domains having two different binding specificities. For example, substituted for the V_L and V_H domains of an IgG molecule are scFv domains of different specificity such that the resulting molecule, herein designated Bs(scFv)4-IgG, is bivalent for each of its target antigens. Bs(scFv)4-IgG is functionally expressed and assembled in a variety of expression systems, and particularly in mammalian cells, and is capable of binding to two different epitopes simultaneously.

As provided previously herein, a scFv is preferred for linkage to light chain and heavy chain constant domains. However, where desired or convenient the structure comprising the antigen binding site of a bispecific antigen binding protein of the invention includes more or less than an Fv. For example, it further includes constant region portions (e.g., linkage of an Fab to a light chain or heavy chain domain) or only a portion of an Fv (e.g., where antigen binding is determined predominantly by one variable domain and the second variable domain contributes little to affinity or specificity). Thus, an antigen binding site comprises of a single polypeptide chain which is further linked to a light chain or heavy chain constant region, allowing the arrangement of domains in the antigen-binding protein to be unambiguously predetermined, and to form an overall Ig-form structure with at least two constant domains.

An antigen binding site for inclusion in an antigen-binding protein having desired binding characteristics is obtained by a variety of methods. The amino acid sequences of the V_L and V_H portions of a selected binding domain correspond to a naturally-occurring antibody or are chosen or modified to obtain desired immunogenic or binding characteristics. For example, chimeric variable domains are constructed in which antigen binding site derived from a non-human source are substituted into human variable domains. A chimeric construct is particularly valuable for elimination of adverse immunogenic characteristics, for example, where an antigen binding domain from a non-human source is desired to be used for treatment in a human. A preferred chimeric domain is one which has amino acid sequences which comprise one or more complementarity determining regions (CDRs) of a non-human origin grafted to human framework regions (FRs). For examples of such chimeras, see: Jones, P. T. *et al.*, (1996) *Nature* 321, 522-525; Riechman, L. *et al.*, (1988) *Nature* 332, 323-327; U.S. Patent No. 5,530,101 to Queen *et al.* Variable domains have a high degree of

WO 01/90192

PCT/US01/16924

structural homology, allowing easy identification of amino acid residues within variable domains which corresponding to CDRs and FRs. See, e.g., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th ed. National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD. Thus, amino acids which participate in antigen binding are easily identified. In addition, methods have been developed to preserve or to enhance affinity for antigen of chimeric binding domains comprising grafted CDRs. One way is to include in the chimeric domain the foreign framework residues which influence the conformation of the CDR regions. A second way is to graft the foreign CDRs onto human variable domains with the closest homology to the foreign variable region. Queen, C. *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033. CDRs are most easily grafted onto different FRs by first amplifying individual FR sequences using overlapping primers which include desired CDR sequences, and joining the resulting gene segments in subsequent amplification reactions. Grafting of a CDR onto a different variable domain can further involve the substitution of amino acid residues which are adjacent to the CDR in the amino acid sequence or packed against the CDR in the folded variable domain structure which affect the conformation of the CDR. Humanized domains of the invention therefore include human antibodies which comprise one or more non-human CDRs as well as such domains in which additional substitutions or replacements have been made to preserve or enhance binding characteristics.

Chimeric binding domains of the invention also include antibodies which have been humanized by replacing surface-exposed residues to make the scFv appear as self to the immune system (Padlan, E.A. (1991) *Mol. Immunol.* 28, 489-498). Antibodies have been humanized by this process with no loss of affinity (Roguska *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 969-973). Because the internal packing of amino acid residues in the vicinity of the antigen binding site remains unchanged, affinity is preserved. Substitution of surface-exposed residues of a scFv according to the invention for the purpose of humanization does not mean substitution of CDR residues or adjacent residues which influence binding characteristics.

The invention contemplates binding domains which are essentially human. Human binding domains are obtained from phage display libraries wherein combinations of human heavy and light chain variable domains are displayed on the surface of filamentous phage (See, e.g., McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348, 552-554; Aujame *et al.* (1997) *Human*

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Antibodies 8, 155-168). Combinations of variable domains are typically displayed on filamentous phage in the form of Fabs or scFvs. The library is screened for phage bearing combinations of variable domains having desired antigen binding characteristics. Preferred variable domain combinations display high affinity for a selected antigen and little cross-reactivity to other related antigens. By screening very large repertoires of antibody fragments, (see e.g., Griffiths *et al.* (1994) *EMBO J.* 13, 3245-3260) a good diversity of high affinity Mabs are isolated, with many expected to have sub-nanomolar affinities for the desired antigen.

Alternatively, human binding domains can be obtained from transgenic animals into which unrearranged human Ig gene segments have been introduced and in which the endogenous mouse Ig genes have been inactivated (reviewed in Brüggemann and Taussig (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 455-458). Preferred transgenic animals contain very large contiguous Ig gene fragments that are over 1 Mb in size (Mendez *et al.* (1997) *Nature Genet.* 15, 146-156) but human Mabs of moderate affinity can be raised from transgenic animals containing smaller gene loci (See, e.g., Wagner *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 42, 2672-2681; Green *et al.* (1994) *Nature Genet.* 7, 13-21).

Binding domains of the invention include those for which binding characteristics have been improved by direct mutation or by methods of affinity maturation. Affinity and specificity may be modified or improved by mutating CDRs and screening for antigen binding sites having the desired characteristics (See, e.g., Yang *et al.* (1995) *J. Mol. Bio.* 254, 392-403). CDRs are mutated in a variety of ways. One way is to randomize individual residues or combinations of residues so that in a population of otherwise identical antigen binding sites, all twenty amino acids are found at particular positions. Alternatively, mutations are induced over a range of CDR residues by error prone PCR methods (See, e.g., Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Bio.* 226, 889-896). Phage display vectors containing heavy and light chain variable region genes are propagated in mutator strains of *E. coli* (See, e.g., Low *et al.* (1996) *J. Mol. Bio.* 250, 359-368). These methods of mutagenesis are illustrative of the many methods known to one of skill in the art.

In another aspect of the invention, the antigen-binding proteins can be chemically or biosynthetically linked to anti-tumor agents or detectable signal-producing agents. Anti-tumor agents linked to an antibody include any agents which destroy or damage a tumor to which the antibody has bound or in the environment of the cell to which the antibody has

WO 01/90192

PCT/US01/16924

bound. For example, an anti-tumor agent is a toxic agent such as a chemotherapeutic agent or a radioisotope. Suitable chemotherapeutic agents are known to those skilled in the art and include anthracyclines (e.g. daunomycin and doxorubicin), methotrexate, vindesine, neocarzinostatin, cis-platinum, chlorambucil, cytosine arabinoside, 5-fluorouridine, melphalan, ricin and calicheamicin. The chemotherapeutic agents are conjugated to the antibody using conventional methods (See, e.g., Hermentin and Seiler (1988) *Behring Inst. Mitt.* 82, 197-215).

Detectable signal-producing agents are useful in vivo and in vitro for diagnostic purposes. The signal producing agent produces a measurable signal which is detectable by external means, usually the measurement of electromagnetic radiation. For the most part, the signal producing agent is an enzyme or chromophore, or emits light by fluorescence, phosphorescence or chemiluminescence. Chromophores include dyes which absorb light in the ultraviolet or visible region, and can be substrates or degradation products of enzyme catalyzed reactions.

The invention further contemplates antigen-binding proteins of the invention to which target or reporter moieties are linked. Target moieties are first members of binding pairs. Anti-tumor agents, for example, are conjugated to second members of such pairs and are thereby directed to the site where the antigen-binding protein is bound. A common example of such a binding pair is avidin and biotin. In a preferred embodiment, biotin is conjugated to an antigen-binding protein of the invention, and thereby provides a target for an anti-tumor agent or other moiety which is conjugated to avidin or streptavidin. Alternatively, biotin or another such moiety is linked to an antigen-binding protein of the invention and used as a reporter, for example in a diagnostic system where a detectable signal-producing agent is conjugated to avidin or streptavidin.

Suitable radioisotopes for use as anti-tumor agents are also known to those skilled in the art. For example, ^{131}I or ^{211}At is used. These isotopes are attached to the antibody using conventional techniques (See, e.g., Pedley *et al.* (1993) *Br. J. Cancer* 68, 69-73). Alternatively, the anti-tumor agent which is attached to the antibody is an enzyme which activates a prodrug. In this way, a prodrug is administered which remains in its inactive form until it reaches the tumor site where it is converted to its cytotoxic form once the antibody complex is administered. In practice, the antibody-enzyme conjugate is administered to the patient and allowed to localize in the region of the tissue to be treated. The prodrug is then

WO 01/90192

PCT/US01/16924

administered to the patient so that conversion to the cytotoxic drug occurs in the region of the tissue to be treated. Alternatively, the anti-tumor agent conjugated to the antibody is a cytokine such as interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The antibody targets the cytokine to the tumor so that the cytokine mediates damage to or destruction of the tumor without affecting other tissues. The cytokine is fused to the antibody at the DNA level using conventional recombinant DNA techniques.

The proteins of the invention can be fused to additional amino acid residues such as a peptide tag to facilitate isolation or purification, or a signal sequence to promote secretion or membrane transport in any particular host in which the protein is expressed.

Specific examples of the invention are provided herein which relate to bispecific proteins having binding domains specific for two different epitopes of KDR and demonstrate the advantageous functional aspects of antigen-binding proteins of the invention. The employed binding domains are derived from scFv p1C11 and scFv p4G7, which are isolated from a phage display library constructed from a mouse immunized with KDR. (Zhu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999).

scFv p4G7 binds to an epitope common to both KDR and the mouse homolog Flk-1 and does not interfere with the binding of VEGF to either receptor. scFv p1C11 binds to a separate epitope of KDR and is capable of blocking binding of VEGF, but does not bind to Flk-1. Thus, a bispecific bivalent immunoglobulin-like molecule displaying two of each binding domain is tetravalent for binding to KDR and bivalent for binding to Flk-1.

Bs(scFv)4-IgG, which is bivalent to Flk-1, has an avidity similar to DAB p4G7, a bivalent diabody to Flk-1. The avidities of Bs(scFv)4-IgG and DAB p4G7 are approximately 10 to 23-fold higher than their respective monovalent counterparts, Bs(scFv)2-Fab and scFv p4G, demonstrating the enhanced binding which results from bivalency. Bs(scFv)4-IgG retains the biological functions of both of its component binding sites, binding as efficiently as the parent antibodies to both KDR and Flk-1 (Fig. 4). Bs(scFv)4-IgG binds to surface-expressed KDR on human endothelial cells, blocks KDR/VEGF interaction, and efficiently neutralizes VEGF-induced KDR receptor phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig. 5 and 6). Notably, Bs(scFv)4-IgG is as potent as c-p1C11 in neutralizing VEGF-induced receptor phosphorylation despite the fact that Bs(scFv)4-IgG binds to KDR with a lower affinity than c-p1C11, and is 4-fold less effective in blocking KDR/VEGF interaction in an ELISA assay. The enhanced biological activity of Bs(scFv)4-IgG is attributable to the

WO 01/90192

PCT/US01/16924

enhanced binding which results from being tetravalent with respect to KDR. Bs(scFv)4-IgG has the capacity for intra-molecular cross-linking (i.e., cross-linking two epitopes within the same KDR molecule) and/or inter-molecular cross-linking to form a multimolecular complexes on the cell surface.

5 The antigen-binding proteins of the present invention are useful for treating diseases in humans and other mammals. The antigen-binding proteins are used for the same purposes and in the same manner as heretofore known for natural and engineered antibodies. The present antigen-binding proteins thus can be used *in vivo* and *in vitro* for investigative, diagnostic or treatment methods which are well known in the art.

10 It is understood that antigen binding proteins of the invention, where used in the human body for the purpose of diagnosis or treatment, will be administered in the form of a composition additionally comprising a pharmaceutically-acceptable carrier. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include, for example, one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the binding proteins. The compositions of this invention may be in a variety of forms. These include, for example, solid, semi-solid and liquid dosage forms, such as tablets, pills, powders, liquid solutions, dispersions or suspensions, liposomes, suppositories, injectable and infusible solutions. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. The preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions.

20 The preferred pharmaceutical compositions of this invention are similar to those used for passive immunization of humans with other antibodies. The preferred mode of administration is parenteral.

25 It is to be understood and expected that variations in the principles of invention herein disclosed may be made by one skilled in the art and it is intended that such modifications are to be included within the scope of the present invention.

30 The examples which follow further illustrate the invention, but should not be construed to limit the scope of the invention in any way. Detailed descriptions of conventional methods, such as those employed in the construction of vectors and plasmids, the insertion of genes encoding polypeptides into such vectors and plasmids, the introduction

WO 01/90192

PCT/US01/16924

of plasmids into host cells, and the expression and determination thereof of genes and gene products can be obtained from numerous publication, including Sambrook, J. *et al.*, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. All references mentioned herein are incorporated in their entirety.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

EXAMPLE I: Materials and Methods**Proteins and antibodies**

The complete KDR coding sequence Vascular endothelial growth factor (VEGF), kinase insert domain-containing receptor-alkaline phosphatase fusion protein (KDR-AP) and its mouse homolog, fetal liver kinase 1 (Flk-1)-AP, are expressed in baculovirus and NIH 3T3 cells, respectively, and purified following the procedures described (Zhu *et al.*, 1998).

The human KDR coding sequence is published (GenBank Accession No. AF035121). KDR extracellular domain (ECD) immunoglobulin (Ig) domain deletion mutants are constructed by PCR cloning, expressed in NIH 3T3 cells and purified as described (Lu *et al.*, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 14321-14330). The KDR ECD Ig domain deletion mutants have the following structures:

KDR(Ig1-7): the full length KDR ECD containing all seven Ig domains of the receptor (from amino acid Met¹ to Val⁷⁴²);

KDR(Ig1-3): the mutant containing the three N-terminal ECD Ig domains (from amino acid Met¹ to Lys³²⁷); and

KDR(Ig3-7): the mutant containing KDR ECD Ig domain 3 through 7 (from amino acid Asp²²⁵ to Val⁷⁴²).

Anti-KDR single chain Fv (scFv) p1C11 and scFv p4G7 are isolated from a phage display library constructed from a mouse immunized with KDR, as reported in Zhu *et al.* (1998) *Cancer Res.*, 58, 3209-3214 and Lu *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods*, 230, 159-171.

Diabody DAB p4G7, a form of bivalent scFv fragment (Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448; Zhu *et al.* (1996) *Bio/Technology*, 14, 192-196) is constructed from scFv p4G7 as previously described in Zhu *et al.* (1996) and Lu *et al.* (1999). c-p1C11, a mouse/human chimeric IgG1 antibody constructed from scFv p1C11, and C225, a chimeric IgG1 antibody directed against epidermal growth factor (EGF) receptor, are both produced at ImClone Systems Incorporated (New York, NY). Zhu, *et al.* (1999).

The hybridoma cell line (ATCC No. PTA-334) producing the anti-Fit-1 antibody, Mab6.12 (IgG1, κ), was established at ImClone Systems Incorporated (New York, NY) from a mouse immunized with a recombinant form of the receptor.

Immunization of mice and construction of single chain antibody phage display library

Female BALB/C mice are given two intraperitoneal (i.p.) injections of 10 μg KDR-AP in 200 μl of Ribi Adjuvant System followed by one i.p. injection without RIBI

WO 01/90192

PCT/US01/16924

adjuvant over a period of two months. The mice are also given a subcutaneous (s.c.) injection of 10 μ g KDR-AP in 200 μ l of RIBI at the time of the first immunization. The mice are boosted i.p. with 20 μ g of KDR-AP three days before euthanasia. Spleens from donor mice are removed and the cells are isolated. RNA is extracted and mRNA is purified from total

5 RNA of splenocytes. Following reverse transcription, cDNAs corresponding to expressed V_L and V_H genes are separately amplified. The amplified products can be inserted into a vector designed to accept each gene separately or linked to nucleotides encoding a secretion signal sequence and polypeptide linker (e.g., by PCR amplification) and the fused product inserted into a desired vector. See, e.g., Zhu *et al.*, 1998.

10 Materials and procedures for displaying mouse scFv on filamentous phage are commercially available (Recombinant Phage Antibody System, Amersham Pharmacia Biotech). Briefly, to display the scFv on filamentous phage surface, antibody V_H and V_L domains are joined together by a 15 amino acid linker (GGGGS)₃. The C terminus of this construct is joined to the N terminus of phage protein III with a 15 amino-acid E tag, ending

15 with an amber codon (TAG). The amber codon positioned between the E tag and protein III allows production of scFv in soluble form when transformed into a nonsuppressor host (e.g., HB2151 cells), and phage display via protein III when transformed into a suppressor host (e.g., TG1 cells).

The scFv-gene III construct is ligated into the pCANTAB 5E vector. Transformed

20 TG1 cells are plated onto 2YTAG plates (17 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 20 g/l glucose, 100 μ g/ml ampicillin, 15 g/l Bacto-agar) and incubated. The colonies are scraped into 10 ml of 2YT medium (17 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl), mixed with 5 ml 50% glycerol and stored at -70°C as the library stock.

Biopanning

25 The library stock is grown to log phase, rescued with M13K07 helper phage and amplified overnight in 2YTAK medium (2YT containing 100 μ g/ml of ampicillin and 50 μ g/ml of kanamycin) at 30°C. The phage preparation is precipitated in 4% PEG/0.5M NaCl, resuspended in 3% fat-free milk/PBS containing 500 μ g/ml of alkaline phosphatase (AP) and incubated at 37°C for 1 h to block phage-scd'v having specificity for AP scd'v and to block

30 other nonspecific binding.

KDR-AP (10 μ g/ml) coated Maxisorp Star tubes (Nunc, Denmark) are first blocked with 3% milk/PBS at 37°C for 1 h, and then incubated with the phage preparation at room

WO 01/90192

PCT/US01/16924

temperature for 1 h. The tubes are washed 10 times with PBST (PBS containing 0.1% Tween 20), followed by 10 times with PBS. The bound phage is eluted at room temperature for 10 min. with 1 ml of a freshly prepared solution of 100 mM triethylamine. The eluted phage are incubated with 10 ml of mid-log phase TG1 cells at 37°C for 30 min. stationary and 30 min. shaking. The infected TG1 cells are then plated onto 2YTAG plates and incubated overnight at 30°C as provided above for making of the phage stock.

Successive rounds of the screening procedure (panning) are employed to further enrich for displayed scFv having the desired binding specificity. After two or three rounds of panning, individual bacterial colonies are screened individually to identify clones having desired KDR binding characteristics. Identified clones can be further tested for blocking of VEGF binding. DNA fingerprinting of clones is used to differentiate unique clones. Representative clones of each digestion pattern are picked and subject to DNA sequencing.

Phage ELISA

Individual TG1 clones are grown at 37°C in 96 well plates and rescued with M13K07 helper phage as described above. The amplified phage preparation is blocked by addition of 1/6 volume of 18% milk/PBS at RT for 1 h and added to Maxi-sorp 96-well microtiter plates (Nunc) which have been coated with KDR-AP or AP (1 µg/ml x 100 µl). After incubation at room temperature for 1 h, the plates are washed 3 times with PBST and incubated with a rabbit anti-M13 phage Ab-HRP conjugate. The plates are washed 5 times, TMB peroxidase substrate added, and the OD at 450 nm read using a microplate reader.

Preparation of soluble scFv

Phage of individual clones are used to infect a nonsuppressor *E.coli* host HB2151 and the infectant selected on 2YTAG-N (2YTAG; 100 µg/ml nalidixic acid) plates. Expression of scFv in HB2151 cells is induced by culturing the cells in 2YTA medium containing 1 mM isopropyl-1-thio-B-D-galactopyranoside at 30°C. A periplasmic extract of the cells is prepared by resuspending the cell pellet in 25 mM Tris (pH 7.5) containing 20% (w/v) sucrose, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.1 mM PMSF, followed by incubation at 4°C with gentle shaking for 1 h. After centrifugation at 15,000 rpm for 15 min., the soluble scFv is purified from the supernatant by affinity chromatography using the RPAS Purification Module (Pharmacia Biotech).

Preparation of scFv from Mab6.12

WO 01/90192

PCT/US01/16924

The V_H and V_L genes of Mab 6.12 are cloned by RT-PCR from mRNA isolated from the hybridoma cells, following the procedures of Bendig et al. (1996) In: *Antibody Engineering: A Practical Approach*, McCafferty, J., Hoogenboom, H.R., Chiswell, D.J., eds., Oxford University Press, Incorporated; p147-168. Eleven 5' primers, specifically designed to hybridize to the 5' ends of mouse antibody light chain leader sequences, and one 3' primer that hybridizes to the 5' end of mouse κ light chain constant region, are used to clone the V_L gene. Twelve 5' primers, specifically designed to hybridize to the 5' ends of mouse antibody heavy chain leader sequences, and one 3' primer that hybridizes to the 5' end of mouse IgG1 heavy chain constant region are used to clone the V_H gene. In total, twenty-three PCR reactions, eleven for the V_L gene and twelve for the V_H gene, are carried out for each of the antibodies. All PCR-generated fragments with size between 400 to 500 base pairs are cloned into the pCR® 2.1 vector as described in the manufacturer's instruction (TA Cloning® Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA), followed by transformation of E.coli strain, XL-1.

PCR fragments encoding the V_L and the V_H genes of MAB 6.12 are used to assemble scFv 6.12, using overlapping PCR. In this scFv, the C-terminal of Mab 6.12 V_H is linked to the N-terminal of Mab 6.12 V_L via a 15 amino acid linker, (Glycine-Glycine-Glycine-Glycine-Serine)₃, or (GGGGS)₃ (Fig. 1A). The scFv 6.12-encoding gene is then cloned into vector pCANTAB 5E (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) for the expression of the soluble scFv protein.

Construction of expression vectors for BsAb-IgG [Bs(scFv)4-IgG] and BsAb-Fab[Bs(svFv)2-Fab]

A gene encoding scFv p4G7 is amplified from the scFv expression vector by PCR using primers JZZ-2 (SEQ ID NO: 29) and JZZ-3 (SEQ ID NO: 30). A leader peptide sequence for protein secretion in mammalian cells is then added to the 5' end of the scFv coding sequence by PCR using primers JZZ-12 (SEQ ID NO: 31) and JZZ-3 (SEQ ID NO: 30).

Similarly, the gene encoding scFv p1C11 is amplified from the scFv expression vector by PCR using primers JZZ-2 (SEQ ID NO: 29) and p1C11VL3-2 (SEQ ID NO: 32), followed by PCR with primers JZZ-12 (SEQ ID NO: 31) and p1C11VL3-2 (SEQ ID NO: 32) to add the leader peptide sequence.

The same leader peptide consisting of 19 amino acids, MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 33), is used for secretion of both the light and the heavy chains.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Separate expression vectors for the light and heavy chains of Bs(scFv)4-IgG are constructed. The cloned scFv p4G7 gene is digested with *Hind* III and *Bam*HI and ligated into the vector pKN100 (a gift from Dr. S. T. Jones, MRC Collaborative Center, London, England) containing the human κ light chain constant region (C_L) to create the expression vector for the BsAb-IgG light chain, BslgG-L. The cloned scFv p1C11 gene is digested with *Hind* III and *Bam*HI and ligated into the vector pG1D105 (a gift from Dr. S. T. Jones) containing the human IgG1 heavy chain constant domain (C_H) to create the expression vector for the BsAb-IgG heavy chain, BslgG-H. These vectors are similar to the light chain (HCMV- V_L -HC $_L$) and heavy chain (HCMV- V_H -HC $_H$) vectors described in U.S. Patent 5,840,299 except for the presence of a DHFR gene which confers resistance to methotrexate and provides amplification of vector sequences.

To prepare the expression vector for Bs(scFv)2-Fab, a stop codon is introduced into vector BslgG-H immediately after the first constant domain (C_{H1}) to terminate the protein translation, by PCR using primers JZZ-12 (SEQ ID NO: 31) and JZZ-18 (SEQ ID NO: 34). The gene fragment is digested with *Hind* III and *Nae* I and inserted into vector pG1D105 to create vector BsFab-H. All constructs are examined by restriction enzyme digestion and verified by DNA sequencing.

The primer sequences used in this example are provided below and in the Sequence Listing.

JZZ-2 Sequence (SEQ ID NO: 29):
5'-CTAGTAGCAACTGCCACCGCGTACATTACAGGTCAAGCTGC-3'

JZZ-3 Sequence (SEQ ID NO: 30):
5'-TCGAAGGATCACTCACCTTTTATTCCAGC-3'

JZZ-12 Sequence (SEQ ID NO: 31):
5'-GGTCAAAAGCTTATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCT
AGTAGCAACT- 3'

p1C11VL3-2 Sequence (SEQ ID NO: 32):
5'-TCGATCTAGAAGGATCCACTCACGTTTATTCCAG-3'

Leader Peptide (SEQ ID NO: 33):
MGWSCILLFLVATATGVHS

JZZ-18 (SEQ ID NO: 34):
5'-TCTCGGCCGGCTTAAGCTGCGCATGTGTGAGT-3'

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Antibody expression and purification

COS cells are co-transfected with equal amounts of DNA from vector BslgG-L and BslgG-H, or BslgG-L and BsFab-H, for transient expression of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab, respectively, following the procedure described in Zhu *et al.* (1999) *Cancer Lett.* 136, 203-213. The cells are switched to serum-free medium 24 h after transfection. The conditioned supernatant is collected at 48 h and 120 h after transfection. The Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab are purified from the pooled supernatant by affinity chromatography using Protein G column following the protocol described by the manufacturer (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The antibody-containing fractions are pooled, buffer exchanged into PBS and concentrated using Centricon 10 concentrators (Amicon Corp., Beverly, MA). The purity of the antibodies is analyzed by SDS-PAGE. The concentration of purified antibody is determined by ELISA using goat anti-human IgG Fc specific antibody as the capture agent and HRP-conjugated goat anti-human κ chain antibody as the detection agent. A standard curve is calibrated using clinical grade antibodies, C225 or c-p1C11.

Binding Assays for Bispecific Antibodies to KDR

Two different assays are carried out to demonstrate the dual specificity of the BsAb described hereinabove.

In the direct binding assay, a 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark) is first coated with KDR(Ig1-7)-AP, KDR(Ig1-3)-AP or KDR(Ig3-7)-AP fusion proteins (1.0 μ g/ml \times 100 μ l per well) using a rabbit anti-AP antibody (DAKO-Immunoglobulins A/S, Denmark) as the capturing agent. The plate is then incubated with the BsAb, c-p1C11 or DAB p4G7 at room temperature for 1 h, followed by incubation with rabbit anti-human IgG Fc specific antibody-HRP conjugate (Cappel, Organon Teknika Corp. West Chester, PA) for the BsAb and c-p1C11 or mouse anti-Fc tag antibody-HRP conjugate (Pharmacia Biotech) for DAB p4G7. The plates are washed five times, TMB peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, MD) is added and the OD at 450nm read using a microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA) (Zhu *et al.*, 1998).

In the cross-linking assay, the antibodies are first incubated in solution with KDR(Ig1-7)-AP, KDR(Ig1-3)-AP or KDR(Ig3-7)-AP. The mixtures are transferred to a 96-well plate coated with KDR(Ig1-3) (untagged) and incubated at room temperature for 2 h. The plate is washed and the KDR(Ig1-3) (untagged)-bound AP activity is measured by the addition of AP substrate, *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) and read OD at 405nm (Zhu *et al.*, 1998).

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Quantitative Binding Assay for Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab to KDR and Flk-1

Various amounts of Bs(scFv)4-IgG, Bs(scFv)2-Fab, c-p1C11 or scFv p4G7 are added to 96-well Maxi-sorp microtiter plates (Nunc) coated with either KDR-AP or Flk-1-AP (100 ng protein/well) and incubated at room temperature for 1 h, followed by incubation at room temperature for 1 h with rabbit anti-human IgG Fc specific antibody-HRP conjugate for bispecific antibodies and c-p1C11 or mouse anti-E tag antibody-HRP conjugate for scFv p4G7. The plates are washed and developed as described above.

Flow Cytometry (FACS) Analysis

Early passage HUVEC cells are grown in growth factor-depleted EBM-2 medium overnight to induce the expression of KDR receptor. The cells are harvested and washed three times with PBS, incubated with 5 μ g/ml Bs(scFv)4-IgG or c-p1C11 for 1 h at 4°C, followed by incubation with a FITC-labeled rabbit anti-human Fc antibody (Cappel, Organon Teknika Corp.) for an additional 1 h. The cells are washed and analyzed by a flow cytometer (Zhu *et al.*, 1999).

Analysis of Binding Kinetics

The binding kinetics of the BsAb and parent scFv are measured by surface plasmon resonance, using a BLAcore biosensor (Pharmacia Biosensor). KDR-AP, Flk-1-AP, or Flt-1-Fc fusion proteins are immobilized onto a sensor chip, and various antibodies are injected at concentrations ranging from 1.5 nM to 200 nM. Sensorgrams are obtained at each concentration and are evaluated using a program, BLA Evaluation 2.0, to determine the rate constants k_{on} and k_{off} . K_d is calculated as the ratio of rate constants k_{off}/k_{on} .

VEGF/KDR, VEGF/Flt-1, and PlGF/Flt-1 Ligand Blocking Assays

In the blocking assay, various amounts of BsAb, scFv or c-p1C11 are mixed with a fixed amount of KDR-AP, Flk-1-AP or Flt-1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) and incubated at room temperature for 1 h. The mixtures are then transferred to VEGF₁₆₅- or PlGF-coated 96-well plates and incubated at RT for an additional 2 h after which the plates are washed 5 times. VEGF₁₆₅ and PlGF are typically coated at 200 ng/well. VEGF₁₆₅ is the 165 amino acid form of VEGF. For KDR-AP or Flk-1-AP, the VEGF-bound AP activity is quantified as described (Zhu, *et al.*, 1998; 1999). To determine VEGF- or PlGF-bound Flt-1-Fc, the plate is incubated with a mouse anti-human Fc-HRP conjugate.

Phosphorylation Inhibition Assay

WO 01/90192

PCT/US01/16924

The KDR phosphorylation assay is carried out following the procedure previously described (Zhu *et al.*, 1998; 1999), using a stable 293 cell line transfected with the full length KDR (ImClone Systems). Briefly, the transfected 293 cells ($\sim 3 \times 10^6$ cells per plate) are incubated in the presence or absence of antibodies for 15 min, followed by stimulation with 20 ng/ml of VEGF₁₆₅ at room temperature for an additional 15 min. The cells are then lysed and the cell lysate used for KDR phosphorylation assays. The KDR receptor is immunoprecipitated from the cell lysates with Protein A Sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA) coupled to an anti-KDR antibody, Mab 4.13 (ImClone Systems). Proteins are resolved with SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis. To detect KDR phosphorylation, blots are probed with an anti-phosphotyrosine Mab, PY20 (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH). The signals are detected using enhanced chemi-luminescence (Amersham, Arlington Heights, IL). The blots are reprobed with a polyclonal anti-KDR antibody (ImClone Systems) to assure that an equal amount of protein is loaded in each lane of the SDS-polyacrylamide gels.

Anti-mitogenic assay

HUVEC (5×10^3 cells/well) are plated onto 96-well tissue culture plates (Wallach, Inc., Gaithersburg, MD) in 200 μ l of EBM-2 medium (Clonetics, Walkersville, MD) without VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) or epidermal growth factor (EGF) and incubated at 37°C for 72 h. Various amounts of antibodies are added to duplicate wells and pre-incubated at 37°C for 1 h, after which VEGF₁₆₅ is added to a final concentration of 16 ng/ml. After 18 h of incubation, 0.25 μ Ci of [³H]-thymidine ([³H]-TdR) (Amersham) is added to each well and incubated for an additional 4 h. The cells are placed on ice, washed twice with serum-containing medium, followed by a 10 minute incubation at 4°C with 10% TCA. The cells are then washed once with water and solubilized in 25 μ l of 2% SDS. Scintillation fluid (150 μ l/well) is added and DNA incorporated radioactivity is determined with a scintillation counter (Wallach, Model 1450 Microbeta Scintillation Counter).

Leukemia migration assay

HL60 and HEL cells are washed three times with serum-free plain RPMI 1640 medium and suspended in the medium at 1×10^6 /ml. Aliquots of 100 μ l cell suspension are added to either 3- μ m-pore transwell inserts (for HL60 cells), or 8- μ m-pore transwell inserts (for HEL cells) (Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY) and incubated with the antigen binding proteins for 30 min at 37°C. The inserts are then placed into the wells of

WO 01/90192

PCT/US01/16924

24-well plates containing 0.5 ml of serum-free RPMI 1640 with or without VEGF165. The migration is carried out at 37°C, 5% CO₂ for 16-18 h for HL60 cells, or for 4 h for HEL cells. Migrated cells are collected from the lower compartments and counted with a Coulter counter (Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, England).

5

EXAMPLE 2: Production of Bispecific Antibodies

Construction of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab

Two anti-KDR scFv antibodies, scFv p1C11 and p4G7, are used for the construction of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab (Fig. 2A). ScFv p1C11 binds specifically to KDR and blocks KDR/VEGF interaction, whereas scFv p4G7 binds to both KDR and its mouse homolog, Flk-1, but does not block either KDR/VEGF or Flk-1/VEGF interaction (Zhu *et al.*, 1998, Lu *et al.*, 1999). Epitope mapping studies reveal that p1C11 binds to epitope(s) located within KDR ECD Ig domain 1 to 3, whereas the epitope(s) for p4G7 are located within Ig domain 6 and 7 (Lu *et al.*, 2000). Gene segments encoding scFv p1C11 and p4G7 are joined to gene segments encoding C_{H1} and C_L of a human IgG1 molecule, respectively, so that the scFv sequences are fused to the N-terminal end of C_{H1} and C_L, respectively, to create expression vectors BslgG-H and BslgG-L (Fig. 2A). This arrangement replaces the original V_H and V_L domains of an IgG with two scFv molecules, each constituting an independent antigen-binding unit (Fig. 1). Co-expression of BslgG-H and BslgG-L yields an IgG-like bivalent, bispecific molecule, Bs(scFv)4-IgG (Fig. 1). A monovalent, bispecific Fab-like molecule (Fig. 1), Bs(scFv)2-Fab, is also produced by co-expression of BslgG-L and BsFab-H. Vector BsFab-H is constructed from BslgG-H by introducing a stop codon at the end of C_{H1} domain (Fig. 2A).

Expression and purification of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab

The Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab are transiently expressed in COS cells and purified from the cell culture supernatant by an affinity chromatography using a Protein G column. The purified BsAb is analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2B). Under non-reducing condition, Bs(scFv)4-IgG gives rise to a single band with a molecular mass of approximately 200 kDa, whereas Bs(scFv)2-Fab gives a major band of ~ 75 kDa (Fig. 2B, lanes 2 and 3). Under reducing conditions, Bs(scFv)4-IgG yields two major bands with the expected mobility for scFv-CH1-CH2-CH3 fusion (~63 kDa) and scFv-CL fusion (~37 kDa), respectively (Fig. 2B, lane 5). On the other hand, Bs(scFv)2-Fab gives rise to two major bands with molecular

25

30

WO 01/90192

PCT/US01/16924

mass of ~38 kDa and 37 kDa, representing the scFv-C_H1 and scFv-C_L fusions, respectively (Fig. 2B, lane 6). As a control, c-p1C11, a chimeric IgG1 antibody, gives rise to one band of ~150 kDa under non-reducing conditions (Fig. 2B, lane 1) and two bands of ~50 kDa (the heavy chain, V_H-C_H1-C_H2-C_H3 fusion) and ~25 kDa (the light chain, V_L-C_L fusion) under reducing conditions (Fig. 2B, lane 5).

EXAMPLE 3: BsAb Simultaneously Bind to Two Epitopes

Dual specificity of the BsAb

Dual specificity of the BsAb is assayed using the full length KDR ECD and two of its Ig domain-deletion mutants (Fig. 3A). As previously seen, p1C11 only binds to KDR mutants containing Ig domain 1 to 3 (Zhu *et al.*, 1999), whereas p4G7 only binds to mutants containing Ig domain 6 and 7 (Lu *et al.*, 1999). In contrast, both Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab bind to all three KDR variants, indicating that the BsAbs possess two binding sites: one to the epitope on Ig domain 1 to 3 and the other to the epitope on Ig domain 6 and 7.

To investigate whether the BsAb are capable of simultaneous binding to both epitopes, a cross-linking assay is carried out using several KDR ECD Ig domain-deletion mutants that are either untagged or tagged with AP. In this assay, the BsAb are first incubated with KDR(Ig1-7)-AP, KDR(Ig1-3)-AP or KDR(Ig3-7)-AP. The mixtures are transferred to a microtiter plate coated with KDR(Ig1-3) (untagged), followed by measuring KDR(Ig1-3) (untagged)-bound AP activity (Fig. 3B). Both Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab bind effectively to all three KDR-AP variants in solution and form cross-linking complexes with the immobilized KDR(Ig1-3) (untagged), as demonstrated by plate-bound AP activity (Fig. 3B). In contrast, c-p1C11 only cross-links KDR(Ig1-3) (untagged) with KDR variants containing Ig domain 1 to 3, *i.e.*, KDR(Ig1-7)-AP and KDR(Ig1-3)-AP, but not KDR(Ig3-7)-AP. As expected, p4G7 fails to cross-link any KDR variants to the immobilized KDR(Ig1-3) (untagged), since p4G7 does not bind to the KDR(Ig1-3) mutant.

Antigen binding by BsAb

The antigen binding efficiency of the BsAb is determined on immobilized KDR (Fig. 4A) and Flk-1 (Fig. 4B). Fig. 4A shows the dose-dependent binding of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab to KDR. Both Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab bind KDR as efficiently as c-p1C11, a chimeric anti-KDR antibody with an affinity 8 to 10 fold greater than p1C11 from

WO 01/90192

PCT/US01/16924

which it is derived. Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab, but not c-p1C11, also bind to Flk-1 in a dose-dependent manner similar to scFv p4G7 (Fig. 4B). As expected, C225, a chimeric antibody directed against human EGFR, does not bind to either of the antigens.

Binding of the BsAb to cell surface-expressed receptor is assayed by FACS analysis.

5 As previously seen with c-p1C11 (Zhu *et al.*, 1999), Bs(scFv)4-IgG binds efficiently to KDR expressed on early passage HUVEC.

The binding kinetics of the BsAb to KDR and Flk-1 are determined by surface plasmon resonance using a BIAcore instrument (Table 1). The overall affinities (K_d), or avidities, of Bs(scFv)4-IgG and Bs(scFv)2-Fab to KDR are 1.4 nM and 1.1 nM, respectively, 10 which are similar to those of the monovalent scFv p1C11 and p4G7, but are 4- to 10-fold weaker than those of the bivalent c-p1C11 or DAB p4G7. On the other hand, Bs(scFv)4-IgG, which is bivalent to Flk-1, shows an avidity (K_d , 0.33 nM) that is similar to that of the bivalent DAB p4G7 (K_d , 0.18 nM). Bs(scFv)2-Fab and scFv p4G7, both monovalent to Flk-1, bind to Flk-1 with similar affinity (K_d , 1.7 nM and 4.2 nM, respectively), which are 5 to 15 20-fold weaker than those of their bivalent counterparts.

VEGF blocking by Bs(scFv)4-IgG

Fig. 5 shows that Bs(scFv)4-IgG effectively block KDR-AP from binding to immobilized VEGF. The IC₅₀, the antibody concentrations required to block 50% of KDR binding, of Bs(scFv)4-IgG and c-p1C11 are 4 nM, and 1 nM, respectively. As seen with scFv 20 p4G7, Bs(scFv)4-IgG does not block binding of the KDR mouse homolog Flk-1 to VEGF (not shown). Bs(scFv)4-IgG binds to the Flk-1 epitope corresponding to scFv p4G7 which does not affect VEGF/Flk-1 binding. The KDR epitope for which scFv p1C11 is specific is absent from Flk-1. Thus, VEGF binding to Flk-1 is not blocked. C225, an anti-EGFR antibody, showed no effect on KDR binding to VEGF.

KDR phosphorylation inhibition by the BsAb

The biological effect of Bs(scFv)4-IgG on VEGF-induced receptor phosphorylation is determined using KDR-transfected 293 cells. As shown in Fig. 6, VEGF treatment induces strong phosphorylation of KDR receptor. Pre-treatment with Bs(scFv)4-IgG inhibits VEGF-induced receptor phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig. 6). Further, Bs(scFv)4-IgG is equally potent as c-p1C11 at each antibody concentration assayed. 30

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Inhibition of mitogenesis

- The effect of anti-KDR antibodies on VEGF-stimulated mitogenesis of human endothelial cells is determined with a [³H]-TdR DNA incorporation assay using HUVEC. HUVEC (5 x 10³ cells/well) are plated into 96-well tissue culture plates in 200 μ l of EBM-2 medium without VEGF, bFGF or EGF and incubated at 37°C for 72 h. Various amounts of antibodies are added to duplicate wells and pre-incubated at 37°C for 1 hour, after which VEGF165 is added to a final concentration of 16 ng/ml. After 18 hours of incubation, 0.25 μ Ci of [³H]-TdR is added to each well and incubated for an additional 4 hours. DNA incorporated radioactivity is determined with a scintillation counter.
- Both scFv p1C11 and Bs(scFv)4-IgG effectively inhibit mitogenesis of HUVEC stimulated by VEGF. Bs(scFv)4-IgG is a stronger inhibitor of VEGF-induced mitogenesis of HUVEC than the parent scFv. As expected, scFv p2A6, which does not bind KDR, and scFv p4G7, which does not block KDR/VEGF binding, do not show any inhibitory effect on VEGF-stimulated endothelial cell proliferation.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

WE CLAIM:

1. An antigen-binding protein comprising a complex of two first polypeptides and two second polypeptides,
said first polypeptide having an antigen-binding site located to the N terminus of an immunoglobulin light chain constant domain (C_L domain), said C_L domain capable of stable association with an immunoglobulin heavy chain first constant domain (C_H1 domain), and
said second polypeptide having an antigen-binding site located to the N terminus of said C_H1 domain, said C_H1 domain followed by one or more heavy chain constant domains capable of stable self-association.
2. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one or more of said antigen-binding sites are provided by a single chain Fv.
3. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said antigen-binding sites of said first and second polypeptides have different specificities.
4. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said antigen-binding sites of said first and second polypeptides have the same specificity.
5. The antigen-binding protein of Claim 3 wherein said specificities are for epitopes which reside on different antigens.
6. The antigen-binding protein of Claim 3 wherein said specificities are for epitopes which reside on the same antigen.
7. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said first polypeptide and said second polypeptide are covalently bound together.
8. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said two second polypeptides are covalently bound together.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

9. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said second polypeptide has C_H1, C_H2 and C_H3 domains of an antibody of isotype IgA, IgD or IgG.
10. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said second polypeptide has C_H1, C_H2, C_H3 and C_H4 domains of an antibody of isotype IgE or IgM.
11. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said constant domains are mammalian constant domains.
12. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said constant domains are human constant domains.
13. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one or more of said single chain Fvs are mouse single chain Fvs.
14. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one or more of said single chain Fvs are chimeric single chain Fvs having human framework regions.
15. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein said single chain Fv has human V_L and V_H domains.
16. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein the heavy chain constant domains capable of stable self association are selected from the group consisting of C_H2, C_H3, and C_H4 domains from any immunoglobulin isotype or subtype.
17. The antigen-binding protein of Claim 1 which is capable of binding to an Fc receptor.
18. The antigen-binding protein of Claim 1 which is capable of effecting complement mediated cytotoxicity (CMC).

WO 01/90192

PCT/US01/16924

19. The antigen-binding protein of Claim 1 which is capable of effecting antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).
20. The antigen-binding protein of Claim 1 which is linked to an anti-tumor agent.
21. The antigen-binding protein of Claim 1 which is linked to a detectable signal producing agent.
22. The antigen-binding protein of Claim 1 which neutralizes activation of a VEGF receptor.
23. The antigen-binding protein of Claim 22 wherein the VEGF receptor is mammalian.
24. The antigen-binding protein of Claim 22 wherein the VEGF receptor is human.
25. The antigen-binding protein of Claim 24 wherein the VEGF receptor is encoded by the *flt-1* or *flk-1* gene.
26. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for KDR.
27. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for FLT1.
28. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for FLT4.
29. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for EGF-R.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

30. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for HER2.
31. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for FGF-R.
32. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for PDGF-R.
33. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for a receptor tyrosine kinase.
34. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for Tek.
35. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for Tie-2.
36. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one of the antigen-binding sites is specific for KDR and the other antigen-binding site is specific for FLT1.
37. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one of the antigen-binding sites is specific for KDR and the other antigen-binding site is specific for an antigen selected from the group consisting of FLT4, EGF-R, HER2, FGF-R, PDGF-R, Tek and Tie2.
38. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein one of the antigen-binding sites is specific for EGF-R and the other antigen-binding site is specific for HER2.
39. The antigen-binding protein of Claim 1 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for a cell-surface antigen of an immune system effector cell.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

40. The antigen-binding protein of Claim 39 wherein the immune system effector cell is a T cell, a macrophage, a neutrophil, or an NK cell.

41. The antigen-binding protein of Claim 39 wherein the cell-surface antigen is CD3, CD16, CD28, CD32, CD64, an Fc receptor, a cytokine receptor or a lymphokine receptor.

42. The antigen-binding protein of Claim 39 wherein the cell-surface antigen is a receptor for a cytokine or lymphokine and wherein an antigen-binding site comprises the amino acid sequence of the cytokine or lymphokine or a portion thereof.

43. The antigen-binding protein of Claim 42 wherein the receptor is for IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF or G-CSF.

44. The antigen-binding protein of any one of Claims 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 and 35 wherein one of the one of the antigen-binding sites is specific for a cell-surface antigen of an immune system effector cell.

45. The antigen-binding protein of Claim 44 wherein the immune system effector cell is a T cell, a macrophage, a neutrophil, or an NK cell.

46. The antigen-binding protein of Claim 44 wherein the cell-surface antigen is CD3, CD16, CD28, CD32, CD64, an Fc receptor, a cytokine receptor or a lymphokine receptor.

47. An antigen-binding protein comprising a complex of two first polypeptides and two second polypeptides,

said first polypeptide having a single chain Fv located to the N terminus of an immunoglobulin light chain constant domain (C_L domain), said C_L domain capable of stable association with an immunoglobulin heavy chain first constant domain (C_{H1} domain), and

WO 01/90192

PCT/US01/16924

said second polypeptide having a single chain Fv located to the N terminus of said C_H1 domain, said C_H1 domain followed by one or more heavy chain constant domains capable of stable self-association.

48. The antigen-binding protein of Claim 47 wherein said antigen-binding sites of said first and second polypeptides have different specificities.

49. The antigen-binding protein of Claim 47 wherein said antigen-binding sites of said first and second polypeptides have the same specificity.

50. The antigen-binding protein of Claim 47 which neutralizes activation of KDR.

51. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein one or both of said single chain Fvs is single chain Fv p1c11.

52. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein one or both of said single chain Fvs is single chain Fv p4G7.

53. The antigen-binding protein of Claim 47 which neutralizes activation of FLT1.

54. The antigen-binding protein of Claim 53 wherein one or both of said single chain Fvs is single chain Fv 6.12.

55. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the amino acid sequence of the complementarity determining regions (CDRs) of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 1 at CDRH1;

SEQ ID NO: 2 at CDRH2;

SEQ ID NO: 3 at CDRH3;

SEQ ID NO: 4 at CDRL1;

SEQ ID NO: 5 at CDRL2; and

SEQ ID NO: 6 at CDRL3.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

56. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the nucleotide sequence encoding the complementarity determining regions (CDRs) of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 9 for CDRH1;
SEQ ID NO: 10 for CDRH2;
SEQ ID NO: 11 for CDRH3;
SEQ ID NO: 12 for CDRL1;
SEQ ID NO: 13 for CDRL2; and
SEQ ID NO: 14 for CDRL3.

57. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the amino acid sequence of the variable domains of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 7 for the heavy-chain variable domain (V_H); and
SEQ ID NO: 8 for the light-chain variable domain (V_L).

58. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the nucleotide sequence encoding the variable domains of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 15 for the heavy-chain variable domain (V_H); and
SEQ ID NO: 16 for the light-chain variable domain (V_L).

59. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the amino acid sequence of the complementarity determining regions (CDRs) of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 1 at CDRH1;
SEQ ID NO: 21 at CDRH2;
SEQ ID NO: 3 at CDRH3;
SEQ ID NO: 4 at CDRL1;
SEQ ID NO: 5 at CDRL2; and
SEQ ID NO: 6 at CDRL3.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

60. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the nucleotide sequence encoding the complementarity determining regions (CDRs) of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 9 for CDRH1;
SEQ ID NO: 24 for CDRH2;
SEQ ID NO: 11 for CDRH3;
SEQ ID NO: 12 for CDRL1;
SEQ ID NO: 13 for CDRL2; and
SEQ ID NO: 14 for CDRL3.

61. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the amino acid sequence of the variable domains of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 22 for the heavy-chain variable domain (V_H); and
SEQ ID NO: 23 for the light-chain variable domain (V_L).

62. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein the nucleotide sequence encoding the variable domains of one or both of said single chain Fv is represented by:

SEQ ID NO: 25 for the heavy-chain variable domain (V_H); and
SEQ ID NO: 26 for the light-chain variable domain (V_L).

63. The antigen-binding protein of Claim 50 wherein one or both of said single chain Fv has a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 27 or SEQ ID NO: 28.

64. A method for making an antigen-binding protein, which comprises

(a) coexpressing in a host cell

a recombinant DNA construct encoding a first polypeptide having an antigen-binding site located to the N terminus of an immunoglobulin light chain constant domain (C_L domain), said C_L domain capable of stable association with an immunoglobulin heavy chain first constant domain (C_{H1} domain), and

a recombinant DNA construct encoding a second polypeptide having an antigen-binding site located to the N terminus of said C_{H1} domain, said C_{H1} domain

WO 01/90192

PCT/US01/16924

followed by one or more heavy chain constant domains capable of stable self-association,
for a time and in a manner sufficient to allow expression of said polypeptides
and formation of said antigen binding protein; and
(b) recovering said antigen binding protein.

65. The method of Claim 64 wherein said constructs are on the same DNA
expression vector.

66. The method of Claim 64 wherein said constructs are on different DNA
expression vectors.

67. The method of Claim 64 wherein said host cell is a bacterial cell, a yeast cell
or a mammalian cell.

68. The method of Claim 64 wherein said antigen-binding protein is secreted from
the host cell.

69. A method of neutralizing the activation of a VEGF receptor, which comprises
treating a cell with an antigen-binding protein of Claim 1 in an amount sufficient to neutralize
activation of said receptor.

70. The method of Claim 69 wherein at least one of the antigen-binding sites is
specific for KDR.

71. The method of Claim 69 wherein at least one of the antigen-binding sites is
specific for FLT1.

72. A method of reducing tumor growth which comprises treating a cell with an
antigen-binding protein of Claim 1, wherein at least one of the antigen binding sites is
specific for a VEGF receptor, in an amount sufficient to reduce tumor growth.

WO 01/90192

PCT/US01/16924

73. The method of Claim 72 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for KDR.

74. The method of Claim 72 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for FLT1.

75. A method of inhibiting angiogenesis which comprises treating a cell with an antigen-binding protein of Claim 1, wherein at least one of the antigen binding sites is specific for a VEGF receptor, in an amount sufficient to inhibit angiogenesis.

76. The method of Claim 75 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for KDR.

77. The method of Claim 75 wherein at least one of the antigen-binding sites is specific for FLT1.

WO 01/90192

1/6

PCT/US01/16924

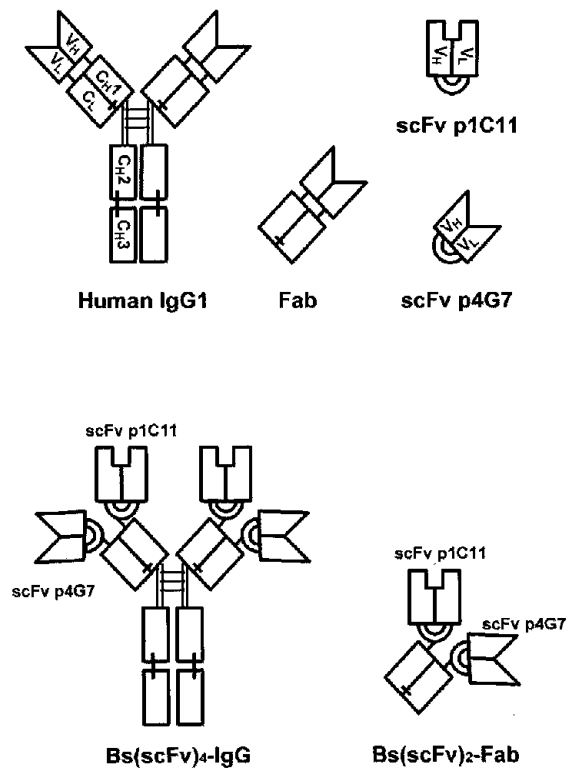


FIG. 1

WO 01/90192

2/6

PCT/US01/16924

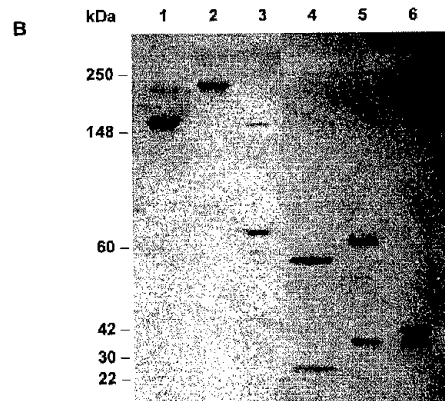
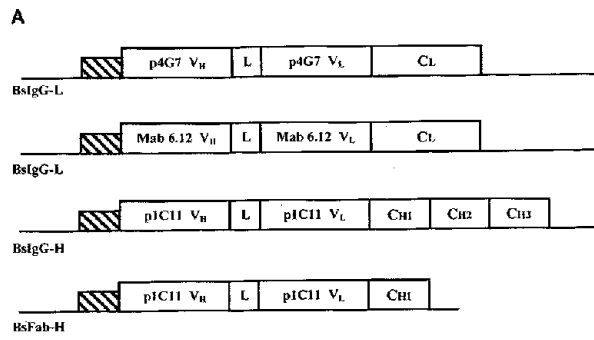


FIG. 2

WO 01/90192

3/6

PCT/US01/16924

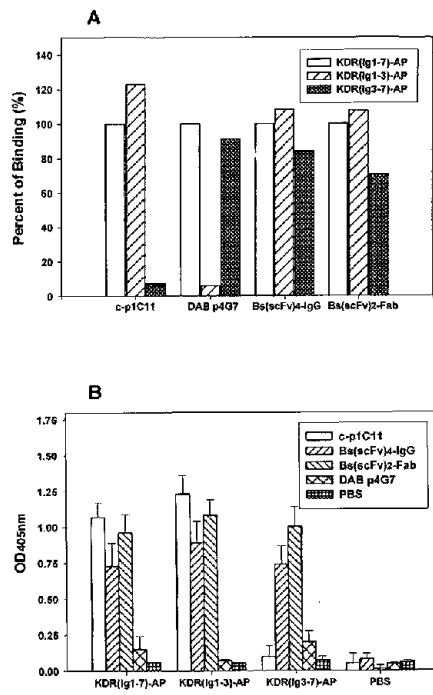


FIG. 3

WO 01/90192

4/6

PCT/US01/16924

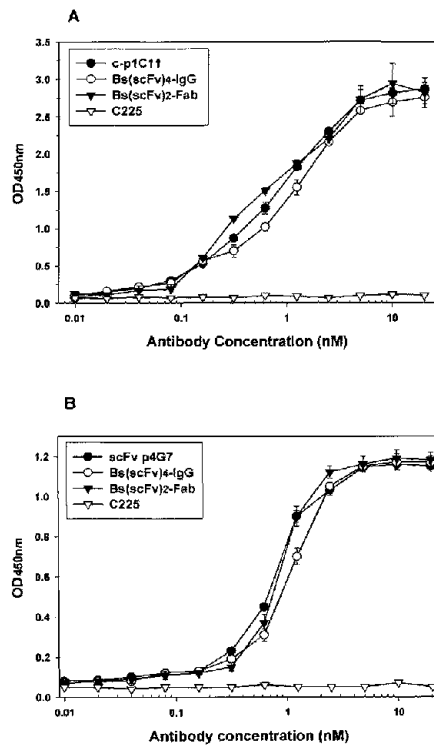


FIG. 4

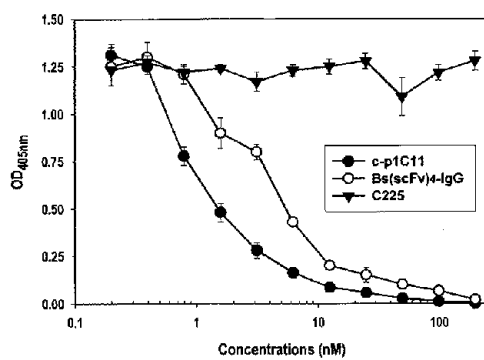


FIG. 5

WO 01/90192

6/6

PCT/US01/16924

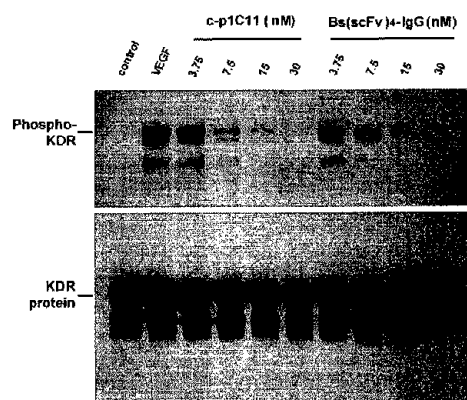


FIG. 6

WO 01/90192

PCT/US01/16924

SEQUENCE LISTING

<110> Zhu, Zhenping
 <120> Bispecific Immunoglobulin-Like Antigen Binding Proteins and Method of Production
 <130> 11245/47176
 <140> filed concurrently herewith
 <141> 2001-05-24
 <150> US 60/206,749
 <151> 2000-05-24
 <160> 34
 <170> WordPerfect 8.0 for Windows

 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 1
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe Tyr Met His
 1 5 10

 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 2
 Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 17

 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 3
 Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr
 1 5

 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 4
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

 <210> 5

WO 01/90192

PCT/US01/16924

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 5

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 7

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 8

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

WO 01/90192

PCT/US01/16924

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 9

ggcttcaaca ttaaagactt ctatatgcac

30

<210> 10
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 10

tggattgac ctgagaatgg tgattctggg tatgccccga agttccaggg c

51

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 11

tactatggtg actacgaagg ctac

24

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 12

agtgccagct caagtgaag ttacatgcac

30

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 13

agcacatcca acctggcttc t

21

WO 01/90192

PCT/US01/16924

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 14

cagcaaaagga gtagttaccc attcaag

27

<210> 15
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 15

caggtcaagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgggt caggggcctc agtcaaatg 60
 tccgacacaa cttctggctt caacattaaa gactttata tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctgacacag gctggagtg gattggatgg attgacctg agaatggta ttctggttat 180
 gcccggaagt tccagggcaa ggcacactg actgcagact cactctccaa cacagctac 240
 ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgacgtct attactgtaa tgcatactat 300
 ggtgactacg aaggctactg gggcacaagg accacggtca cgtctcttc a 351

<210> 16
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 16

gaactcgagc tcaactagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 ataactcgca ggcacagctc aagtgttaag tacatgcact ggttcacga gaagccaggg 120
 acctctccca aactctggat ttatagcaaa tccacactgg cttctggagt cctgtctcgc 180
 ttccagtggc gtggatctgg gacctcttac tctctcaca tccagccgaat ggaggtcgaa 240
 gntgtcgcca ctattactg ccagcaaaag agtagttacc cattcaagtt cggctcgggg 300
 accaagctgg aataaaaacg ggcg 324

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 18

ggtggaggcg gttcaggcgg aagtggtctt ggcggggcg gatcg

45

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT

WO 01/90192

PCT/US01/16924

<213> Mouse

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 20

<211> 15

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

ggtaggagcg gttca

15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 21

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 17

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 22

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23

5

WO 01/90192

PCT/US01/16924

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 23

```

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1           5           10          15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met
      20           25           30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
      35           40           45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50           55           60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
      65           70           75           80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
      85           90           95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100          105

```

<210> 24
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 24

```

tggattgac ctgagaatgg tgattctgat tatgcccca agttccaggg c          51

```

<210> 25
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 25

```

caggtcaagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggggt caggggcctc agtcaaatgg 60
tcttgcaaaa cttctggctt caacattaaa gacttctata tgcactgggt gaagcagagg 120
cctgaacagg gcttggaagt gattggaatg attgatcctg agaatgggtg ttctgattat 180
gcccgaaggt tccaggggaa ggccaccatg actgcagact catctcccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgcccgtc attactgtaa tgcatactat 300
ggtagactacg aaggctactg gggccaaggg accacgggtc cegtctcctc a          351

```

<210> 26
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 26

```

gacatcagac tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcac ctccaggggg gaaggtcacc 60
ataacctgca gtgccagctc aggtgtaagt tacatgcact ggttccagca gaagccaggc 120
acttctccca aactctggat ttatagcaca tcccaacctg cttctggagt ccttgctcgc 180
ttcagtgcca gtggatctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240
gatgctgcga ctattactg ccagcaaaag agtagttacc cattcacgtt cggctcgggg 300

```


WO 01/90192

PCT/US01/16924

accaagctgg aaataaaa

318

<210> 27
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 27

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 130 135 140
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 165 170 175
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 195 200 205
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser
 210 215 220
 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 225 230 235 240

<210> 28
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 28

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Ser Gly Ala
 1 5 10 15

WO 01/90192

PCT/US01/16924

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Asn Ala Tyr Tyr Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
 130 135 140
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 165 170 175
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 180 185 190
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 195 200 205
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser
 210 215 220
 Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235

<210> 29

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 29

ctagtagcaa ctgccacgg cgtacattca caggtaaacg tgc

43

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

WO 01/90192 PCT/US01/16924

<400> 30
 tccaaggatc actcaccttt tatttccagc 30

<210> 31
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 31
 ggtaaaagc ttatggggat ggtcatgtat catccttttt ctagtagcaa ct 52

<210> 32
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Signal

<400> 32
 tcgatctaga aggatccact caggttttat ttccag 36

<210> 33
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> leader peptide

<400> 33
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 5 10 15
 Val His Ser
 19

<210> 34
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic primer

<400> 34
 tctcgccgg ctttaagctgc gcattgtgta gt 32

【国際公開パンフレット（コレクション）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/090192 A3(51) International Patent Classification: C07K 16/00,
16/46, 19/00, 16/28, 16/30, 16/32, 16/40, A61K 39/395,
A61P 35/00, 9/00

(21) International Application Number: PCT/US01/16924

(22) International Filing Date: 24 May 2001 (24.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/206,749 24 May 2000 (24.05.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IM-
CLONE SYSTEMS INCORPORATED [US/US], 180
Verick Street, New York, NY 10014 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LT, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ZHU, Zhenping
[CN/US], 49 Finnigan Avenue, Saddle Brook, NJ 07663
(US).(88) Date of publication of the international search report:
16 January 2003(74) Agents: SOMERVILLE, Deborah, A. et al.: Kenyon &
Kenyon, One Broadway, New York, NY 10004 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/090192 A3

(54) Title: BISPECIFIC IMMUNOGLOBULIN-LIKE ANTIGEN BINDING PROTEINS AND METHOD OF PRODUCTION

(57) Abstract: The present invention is directed to bispecific antigen-binding protein. These bispecific antigen-binding proteins are optimized in their avidity for antigen(s) but maintain their ability to function as a natural antibody including the ability to activate complement mediated cytotoxicity and antibody dependent cellular toxicity. Natural IgG immunoglobulins are monospecific and bivalent, having two binding domains which are specific for the same epitope. By contrast, and IgG type immunoglobulin of the invention is bispecific and bivalent, having a binding domain on each light chain for one epitope and a binding domain on each heavy chain specific for a second epitope. The design of the present antigen-binding proteins provides for efficient production such that substantially all of the antigen binding proteins produced are assembled in the desired configuration.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int. Application No. PCT/US 01/16924
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C07K16/00	C07K16/46	C07K19/00	C07K16/28
	C07K16/32	C07K16/40	A61K39/395	A61P35/00
			A61P35/00	A61P9/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation required (classification system followed by classification symbols)				
IPC 7 C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim(s)
X	ZUO ZHUANG ET AL: "An efficient route to the production of an IgG-like bispecific antibody." PROTEIN ENGINEERING, vol. 13, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 361-367, XP002206534 ISSN: 0269-2139 the whole document			1-77
X	US 5 863 538 A (BURROWS FRANCIS J ET AL) 26 January 1999 (1999-01-26)			1,3-12, 16-46, 64-77
A	columns 11-12, 23, 61, example V; columns 20-21 and 71-72; claims			2,13-15, 47-63
--- /---				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "I" prior document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (see specification) "O" document relevant to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document, number of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report		
30 July 2002		12/08/2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818, Postfach 2 NL-2200 LB Rijswijk Tel: (+31-70) 310-2040, Tx: 31 651 600 01, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Renggli, J		

Form PCT/IB/410 (second sheet) (Rev. 002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor: Application No. PCT/US 01/16924
C.2 (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLUECKTHUN A ET AL: "New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 3, no. 2, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 83-105, XP004126672 ISSN: 1380-2933 the whole document	1, 3-12, 16-46, 64-77
A	----- the whole document	2, 13-15, 47-63
X	DIAS S ET AL: "NEUTRALIZING MOAB TO VEGF RECEPTORS INHIBIT PROLIFERATION AND MIGRATION OF A SUBSET OF HUMAN LEUKEMIAS THROUGH INTERACTION WITH VEGFR-2(KDR) AND VEGFR-1(FLT-1)" BLOOD, W.B. SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 94, no. 10, SUPPL 01PT01, 15 November 1999 (1999-11-15), page 620A XP001021704 ISSN: 0006-4971 abstract	22-27, 36, 69-77
X	ZHU Z ET AL: "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 58, no. 15, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 3209-3214, XP002141908 ISSN: 0008-5472 the whole document	22-26, 36, 70, 73, 76
X	MÜLLER K ET AL: "The first constant domain (CH1 and CL) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 422, no. 2, 30 January 1998 (1998-01-30), pages 259-264, XP002135067 ISSN: 0014-5793 the whole document	29, 37, 40, 44, 45
P, X	WO 00 44777 A (IMCLONE SYSTEMS INC ; WITTE LARRY (US); ZHU ZHENPING (US)) 3 August 2000 (2000-08-03) page 3, lines 15-25; page 9, line 20-page 11, line 20; claims. ----- -/-	1, 4, 6-12, 16-27, 33, 64-77

Form PCT/ISA/210 (second edition of annex to WIPO) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int I Application No PCT/US 01/16924
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 54723 A (KERBEL ROBERT ;SUNNYBROOK HEALTH SCIENCE CT (CA); INCLONE SYSTEMS) 2 August 2001 (2001-08-02) page 4, lines 5-30; page 7, lines 6-11; claims, figure 1	1, 4, 6-12, 16-27, 33, 64-77
E	WO 02 08293 A (LEUNG SHUI ON ;IMMUNOMEDICS INC (US)) 31 January 2002 (2002-01-31) claims; figures 1 and 2	64-68

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/16924**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 69-77 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 Int. Application No.
 PCT/US 01/16924

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5863538	A	26-01-1999	US 5965132 A	12-10-1999
			US 5855866 A	05-01-1999
			US 6261535 B1	17-07-2001
			US 5776427 A	07-07-1998
			US 5660827 A	26-08-1997
			US 6051230 A	18-04-2000
			US 2002037289 A1	28-03-2002
			US 6036955 A	14-03-2000
			US 5877289 A	02-03-1999
			US 6093399 A	25-07-2000
			US 6004555 A	21-12-1999
			AU 3737893 A	05-10-1993
			CA 2131528 A1	16-09-1993
			EP 0627940 A1	14-12-1994
			WO 9317715 A1	16-09-1993
			US 6004554 A	21-12-1999
WO 0044777	A	03-08-2000	AU 3475100 A	18-08-2000
			CN 1345334 T	17-04-2002
			EP 1151002 A1	07-11-2001
			WO 0044777 A1	03-08-2000
WO 0154723	A	02-08-2001	AU 3122301 A	07-08-2001
			WO 0154723 A1	02-08-2001
WO 0208293	A	31-01-2002	AU 8349501 A	05-02-2002
			WO 0208293 A2	31-01-2002
			US 2002076406 A1	20-06-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 チュ , チェンピン

アメリカ合衆国 , ニュージャージー 0 7 6 6 3 , サドル ブルック , フィニガン アベニュー 4
9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA04 CA07 DA02 DA06 EA04 GA11 HA08
4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01
4C084 AA02 AA07 BA44 CA53 NA14 ZA362 ZB262 ZC022 ZC612
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 FA74