

(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2017-534644

(P2017-534644A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D 4H045
A61P 27/02 (2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 27/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-525007 (P2017-525007)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日	平成27年11月6日 (2015.11.6)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月7日 (2017.7.7)	(72) 発明者	デングル, シュテファン ドイツ、80333 ミュンヘン、シュ ライスハイマー・シュトラーセ 44ア- (72) 発明者
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/075876		ヒュールスマント、ペーター・ミヒヤエル ドイツ、82392 ハーバッハ、イム ・ゾンネンタール 20
(87) 國際公開番号	W02016/075035		
(87) 國際公開日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		
(31) 優先権主張番号	14192524.8		
(32) 優先日	平成26年11月10日 (2014.11.10)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ANG2抗体及び使用方法

(57) 【要約】

抗ANG2抗体が本明細書で報告される。特定の抗ANG2抗体は、(a)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：32のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗体。

【請求項 2】

(a)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

(a)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号：19のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6又は配列番号：33のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、

i)配列番号：19と70%超の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6と70%超の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み、

i i)重鎖可変ドメインにおいて28位にアミノ酸残基アスパラギン(N)、30位にアミノ酸残基アラニン(A)、100b位にアミノ酸残基プロリン(P)、及び100j位にアミノ酸残基アラニン(A)を有し、軽鎖可変ドメインにおいて51位にアミノ酸残基トレオニン(T)を有し(ナンバリングは、Kabatに従う)、

i i i)ヒトTie2を安定発現するHEK293細胞を使用した細胞系アッセイにおいて、Tie2リン酸化ELISAを使用して決定した場合に、そのレセプターTie2に対するANG2の結合の阻害について、配列番号：19の配列を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6又は配列番号：33の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体と比較して低いEC₅₀値を有する、抗体。

【請求項 6】

二重特異性抗体である、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

二重特異性抗体がCrossMabである、請求項6に記載の抗体。

【請求項 8】

ヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4のものである、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

ヒトTie2レセプターに対するヒトANG2の結合を阻害することによって、ヒトANG2の生物学的活性を遮断する、請求項1～4及び6～8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体、及び場合により薬学的に許容し得る担体を含む、医薬製剤。

【請求項 11】

抗IL-1抗体又は抗PDGF-B抗体から選択されるさらなる治療剤をさらに含む、請求項10に記載の医薬製剤。

【請求項 12】

医薬として使用するための、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

医薬の製造における、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 1 4】

医薬が、眼血管疾患を処置するためのもの、好ましくは黄斑変性症を処置するためのものである、請求項 1 2 及び 1 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 5】

医薬が、ガンを処置するためのもの、好ましくは血管新生ガンを処置するためのものである、請求項 1 2 及び 1 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 6】

医薬が、A N G 2 と T i e 2 レセプターとの間の相互作用を阻害するためのものである、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、抗 A N G 2 抗体及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

ヒトアンジオポエチン - 2 (A N G - 2) (あるいは、A N G P T 2 又は A N G 2 と略記される) (配列番号 : 1 0 6) は、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 及び Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91 に記載されている。アンジオポエチン - 1 及び - 2 (A N G - 1 (配列番号 : 1 0 7) 及び A N G - 2 (配列番号 : 1 0 6)) は、T i e (血管内皮内で選択的に発現されるチロシンキナーゼのファミリー) のリガンドとして発見された。Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48。現在、アンジオポエチンファミリーの 4 つの確定メンバーが存在する。アンジオポエチン - 3 及び - 4 (A n g - 3 及び A n g - 4) は、マウス及びヒトにおける同じローカスで大きく異なるカウンターパートであり得る。Kim, I., et al., FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-26528 を参照のこと。当初、A N G - 1 及び A N G - 2 は、組織培養実験において、それぞれアゴニスト及びアンタゴニストとして同定された (A N G - 1 については、Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69 を参照のこと ; 及び A N G - 2 については、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 を参照のこと)。公知のアンジオポエチンは全て T i e 2 に主に結合し、A N G 1 及び A N G 2 は両方とも 3 nM (K d) の親和性で T i e 2 に結合する。Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60。A N G - 1 は、E C の生存を支援し、内皮細胞の完全性を促進することが示されているのに対して、(Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; Kwak, H.J., et al., FEBS Lett 448 (1999) 249-53 ; Suri, C., et al., Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G., et al., Science 286 (1999) 2511-2514; Thurston, G., et al., Nat. Med. 6 (2000) 460-63)、A N G - 2 は、逆の効果を有し、生存因子 V E G F 又は塩基性線維芽細胞成長因子の非存在下で血管の不安定化及び退行を促進した (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。しかしながら、A N G - 2 の機能に関する多くの研究により、より複雑な状況が示唆されている。A N G - 2 は、血管発芽及び血管退行の両方において役割を果たす血管リモデリングの複雑な調節因子であり得る。A N G - 2 のこのような役割を支援して、発現分析により、成人の血管新生発芽状況では、A N G - 2 は V E G F と共に迅速に誘導されるのに対して、血管退縮状況では、A N G - 2 は、V E G F の非存在下で誘導されることが明らかになった。Holash, J., et al., Science 284 (1999) 1994-98; Holash, J., et al., Oncogene 18 (1999) 5356-62。状況依存的役割と一致して、A N G - 2 は、同じ内皮特異的レセプター T i e - 2 (これは、A N G - 1 によって活性化されるが、その活性化に対して状況依存的効果を有する) に特異的に結合する。Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60。 20 30 40 50

【0003】

角膜血管新生アッセイにより、ANG-1 及び ANG-2 は両方とも、類似効果を有し、VEGF と相乗的に作用して新たな血管の成長を促進することが示された。Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40。in vitro では、ANG-2 は、高濃度で血管新生促進性であり得るという観察結果によって、用量依存的な内皮応答が起こったという可能性がある。Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52。高濃度では、ANG-2 は、血清欠乏アポトーシスの間、PI-3 キナーゼ及びAkt 経路を介した Tie2 の活性化によって、内皮細胞のアポトーシス生存因子として作用する。Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52。

【0004】

他の in vitro 実験により、持続的な曝露中、ANG-2 の効果は、Tie2 のアンタゴニストの効果からアゴニストの効果に徐々にシフトし得、その後、それは、血管形成及び新規血管安定化に直接寄与し得ることが示唆された。Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70。さらに、EC をフィブリングル上で培養した場合、ANG-2 による Tie2 の活性化も観察されたが、これはおそらく、ANG-2 の作用が EC の分化状態に依存し得ることを示唆している。Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovas. Res. 49 (2001) 659-70。三次元コラーゲンゲルで培養した微小血管 EC では、ANG-2 はまた、Tie2 の活性化を誘導し、毛細血管様構造の形成を促進し得る。Mochizuki, Y., et al., J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83。血管成熟の in-vitro モデルとして 3D 球状共培養を使用することにより、EC と間葉細胞との間の直接的な接触は、VEGF 対する応答を無効化するのに対して、VEGF 及び ANG-2 の存在は、発芽を誘導したことが実証された。Korff, T., et al., FASEB J. 15 (2001) 447-457。Etoh, T. は、VEGF の存在下では、Tie2 を構成的に発現する EC (MMP-1、MMP-9 及び u-PA の発現) が、ANG-2 によって強くアップリギュレーションされたことを実証した。Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53。in vivo 瞳孔膜モデルを用いて、Lobov, I.B. は、内因性 VEGF の存在下では、ANG-2 が、毛細血管直径の急速な増加、基底層のリモデリング、並びに内皮細胞の増殖及び遊走を促進し、新たな血管の発芽を刺激することを示した。Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10。対照的に、VEGF なしの場合、ANG-2 は、内皮細胞死及び血管退行を促進する。Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10。同様に、in vivo 腫瘍モデルを用いて、Vajkoczy, P. は、多細胞集合体が、宿主及び腫瘍内皮による VEGFR-2 及び ANG-2 の同時発現を介した血管新生発芽によって、血管成長を開始させることを実証した。Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85。このモデルにより、成長中の腫瘍の確立された微小血管系は、VEGF 及び ANG-2 の発現によって媒介されると推測される連続的リモデリングを特徴とすることが例証された (Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85)。

【0005】

Tie-2 及びアンジオポエチン-1 のノックアウトマウスの研究は、類似の表現型を示し、アンジオポエチン-1 によって刺激された Tie-2 リン酸化が、発達中の血管のリモデリング及び安定化を媒介し、血管新生中の血管成熟及び内皮細胞 - 支持体細胞接着を促進することを示唆されている (Dumont, D.J., et al., Genes & Development, 8 (1994) 1897-1909; Sato, T.N., Nature, 376 (1995) 70-74; (Thurston, G., et al., Nature Medicine 6 (2000) 460-463)。アンジオポエチン-1 が広く構成的に発現している成人では、アンジオポエチン-1 の役割は、保存されていると考えられている (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., Exp. Neurol. 159 (1999) 391-400)。対照的に、アンジオポエチン-2 の発現は、血管のリモデリングの部位 (この部位では、それは、アンジオポエチン-1 の構成的安定化又は成熟機能を遮断し、血管が、発芽シグナルに対してより応答性であり得る可塑的状態に復帰してその状態を維持することを可能にすると考えられている) に主に限定されている (Hanahan, D., 1997; Holash,

10

20

30

40

50

J., et al., Oncogene 18 (199) 5356-62; Maisonpierre, P.C., 1997)。病的な血管新生におけるアンジオポエチン - 2 発現の研究により、多くの腫瘍型が血管アンジオポエチン - 2 発現を示すことが見出された (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。機能研究は、アンジオポエチン - 2 が腫瘍血管新生に関与することを示唆しており、アンジオポエチン - 2 過剰発現を、マウス異種移植モデルにおける腫瘍成長の増加と関連付けている (Ahmad, S.A., et al., Cancer Res., 61 (2001) 1255-1259)。他の研究は、アンジオポエチン - 2 過剰発現を腫瘍血管過剰増生と関連付けている (Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129)。

【0006】

10

近年、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2 及び / 又は Tie - 2 は、抗ガン治療ターゲット候補として提案されている。例えば、米国特許第 6,166,185 号、米国特許第 5,650,490 号及び米国特許第 5,814,464 号にはそれぞれ、抗 Tie - 2 リガンド及びレセプター抗体が開示されている。可溶性 Tie - 2 を使用した研究では、齧歯類における腫瘍の数及びサイズの減少が報告された (Lin, 1997; Lin 1998)。Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91 では、Tie - 2 の細胞外ドメインを発現するヒト黒色腫細胞株を作製し、これらをヌードマウスに注射注入したところ、可溶性 Tie - 2 が腫瘍成長及び腫瘍血管新生の有意な阻害をもたらすと報告された。アンジオポエチン - 1 及びアンジオポエチン - 2 は両方とも Tie - 2 に結合することを考慮すると、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン - 2 又は Tie - 2 が抗ガン治療の魅力的なターゲットであるかについては、これらの研究から不明である。しかしながら、有効な抗アンジオポエチン - 2 治療は、プロセスの遮断が疾患進行の予防につながり得る異常な血管新生に進行が依存する疾患 (例えば、ガン) の処置に有益であると考えられている (Folkman, J., Nature Medicine. 1 (1995) 27-31)。

20

【0007】

加えて、いくつかのグループが、アンジオポエチン - 2 に結合する抗体及びペプチドの使用を報告している。例えば、米国特許第 6,166,185 号及び米国特許出願公開第 2003/10124129 号、国際公開公報第 03/030833 号、国際公開公報第 2006/068953 号、国際公開公報第 03/057134 号又は米国特許出願公開第 2006/0122370 号を参照のこと。

30

【0008】

アンジオポエチン - 2 の限局性発現の効果の研究により、アンジオポエチン - 1 / Tie - 2 シグナルのアンタゴナイズは、緊密な血管構造を緩めて、それにより、EC を血管新生誘導因子 (例えば、VEGF) 由来の活性化シグナルに曝露することが示されている (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50)。アンジオポエチン - 1 の阻害から生じるこの血管新生促進効果は、抗アンジオポエチン - 1 治療が有効な抗ガン処置ではないであろうことを示している。

【0009】

ANG - 2 は、発達中に、血管リモデリングが起こっている部位で発現される。Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60。成人個体では、ANG - 2 発現は、血管リモデリングの部位及び血管が豊富な腫瘍 (神経膠腫 (Osada, H., et al., Int. J. Oncol. 18 (2001) 305-09); Koga, K., et al., Cancer Res. 61 (2001) 6248-54)、肝細胞ガン (Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45)、胃ガン (Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H., et al., Int. J. Oncol. 18 (2001) 355-61)、甲状腺腫瘍 (Bunone, G., et al., Am J Pathol 155 (1999) 1967-76)、非小細胞肺ガン (Wong, M.P., et al., Lung Cancer 29 (2000) 11-22)、結腸 (Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43) 及び前立腺 (Wurmbach, J.H., et al., Anticancer Res. 20 (2000) 5217-20) のガンを含む) に限定される。いくつかの腫瘍細胞は、ANG - 2 を発現することが見出されている。例えば、Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45 では、ヒト肝細胞ガン (HCC) の 12 個の標本の 10

40

50

個において、ANG-2 mRNAが検出された。Ellisのグループは、ANG-2が上皮腫瘍において普遍的に発現されることを報告した。Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43。他の調査者らは、同様の知見を報告した。Chen, L., et al., J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-35。保存されているヒト乳ガン標本におけるANG-2 mRNAレベルを検出することによって、Sfiligoi, C., et al., Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74では、ANG-2 mRNAは、腋窩リンパ節浸潤、短い無病時間及び全生存不良に有意に関連することが報告された。Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29では、それぞれ病期I～病期IIIAの非小細胞肺ガン(NSCLC)の患者合計236人について概説されている。免疫組織化学を使用して、NSCLC患者の16.9%がANG-2陽性であったことが見出された。ANG-2陽性腫瘍の微小血管密度は、ANG-2陰性のものよりも有意に高い。ANG-2のこのような血管新生効果は、VEGF発現が高かった場合にのみ見られた。また、ANG-2の陽性発現は、術後不良を予測するための重要な因子であった。Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129。しかしながら、Ang-1発現と微小血管密度との間に有意な相関関係は見出されなかった。Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-7129。これらの結果は、ANG-2が、いくつかの種類のガンを有する患者の予後不良の指標であることを示唆している。

10

【0010】

最近、ANG-2ノックアウトマウスモデルを使用して、Yancopoulosのグループは、ANG-2が出生後血管新生に必要であることを報告した。Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23。眼における硝子体血管構造の発生的にプログラムされている退行は、ANG-2ノックアウトマウスでは起こらず、それらの網膜血管は、中心網膜動脈から発芽することができないことが示された。Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-423。ANG-2の欠失は、リンパ血管系のバターニング及び機能の著しい欠陥をもたらすことも見出された。Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-423。Ang-1による遺伝子レスキューは、リンパ血管系を修正するが、血管新生の欠陥を修正しない。Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-423。

20

【0011】

Peters及び彼の同僚らは、リコンビナントタンパク質として、又はウイルス発現ベクターで送達した場合に、可溶性Tie2が、マウスモデルにおけるマウス乳ガン腫及び黒色腫のin vivo成長を阻害したことを報告した。Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34; Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。このように処置した腫瘍組織における血管密度は、大きく減少した。加えて、可溶性Tie2は、腫瘍細胞で馴化した培地によって刺激したラット角膜における血管新生を遮断した。Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78。さらに、Isner及び彼のチームは、VEGFへのANG-2の追加が、VEGF単独よりも有意に長い及び多い周囲新生血管を促進したことを実証した。Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40。過剰な可溶性Tie2レセプターは、ANG-2によるVEGF誘導性新生血管のモデュレーションを妨害した。Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40。Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91では、ヌードマウス異種移植片を使用して、異種移植片におけるF1t-1又はTie2のいずれかの細胞外リガンド結合ドメインの過剰発現が、他方によって補われ得ない経路の有意な阻害をもたらすことが示されたが、これは、VEGFレセプター経路及びTie2経路が、in vivo血管新生のプロセスに必須の2つの独立したメディエーターとみなされるべきであることを示唆している。Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-3191。これは、White, R., R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33によるより最近の論文によって証明されている。この研究では、ANG-2に特異的に結合してそれを阻害するヌクレアーゼ耐性RNAアプタマーは、ラット角膜マイクロポケット血管新生モデルにおいて、bFGFによって誘導される新生血管を有意に阻害したことが実証された。

30

【0012】

40

50

加齢性黄斑変性症（A M D）及び糖尿病性網膜症（D R）などの眼血管疾患は、それぞれ異常脈絡膜又は網膜新生血管形成に起因する。先進国では、それらは、視力低下の主な原因である。網膜は、ニューロン、グリア及び血管要素の明確に定義された層からなるので、比較的小さな障害（例えば、血管増殖又は浮腫に見られるもの）が、視覚機能の有意な低下につながり得る。網膜色素変性症（R P）などの遺伝性網膜変性もまた、細動脈狭窄及び血管萎縮などの血管異常に関連する。それらに罹患する者は3,500人に1人であり、それらは、進行性夜盲、視野欠損、視神経萎縮、細動脈減弱及び視力の中心喪失を特徴とし、完全な失明に進行することが多い。

【0013】

虚血性網膜症は、血流の減少及び低酸素状態をもたらす網膜血管系の喪失又は機能不全を特徴とする。網膜は、新たな血管を成長させるためシグナルを生成することによって低酸素状態に応答するが、これらの新たな血管は、通常は脆弱で無秩序なものである。それは、これらの新たな異常血管の成長であり、漏出して出血につながり得るか、又は網膜剥離をもたらし得る瘢痕化につながり得るので、視力への脅威の大半を作り出す。虚血性網膜症の現在の処置は病的な血管の成長を停止させようとするものであるが、それらの成長を駆動する根本的な虚血に対処するものではない。さらに、糖尿病性網膜症（これは、何百万人が罹患している虚血性網膜症である）の標準的な処置は、新たな血管の成長を停止させて中心視力を保護するために、レーザーを用いて網膜の一部を破壊することを含む。血管内皮成長因子（V E G F）（これは、血管成長の主なプロモーターである）の機能を遮断する戦略が用いられている。短期的には、抗V E G F治療は視力を改善し得るが、根本的な虚血には対処するものではなく、有益な側副血管を含む全ての血管成長を阻害するので、実際にはこの症状を悪化させ得る。虚血性の脳、心臓又は四肢において新たな血管成長が必要であり得る高齢者及び／又は糖尿病患者では、これらの薬物の全身曝露に関する深刻な懸念もある。

10

20

30

40

【0014】

典型的には、眼疾患の場合、F a b又はF a b₂のような小さな抗体フラグメントは短い血清半減期を有し、全身毒性のリスクが低いので、硝子体内適用を介して使用されることが多い。しかしながら、典型的には、この小さなフラグメントは、（例えば、血清中の拡散が速いので）硝子体内半減期も短く、典型的にはより頻繁に投与されなければならない。

【0015】

国際公開公報第2009/080252号及びSchaefer, W. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191（これらは、参照により本明細書に組み入れられる）には、1つの結合アームにおいてドメイン置換／交換を有する多重特異性抗体（C r o s s M a b V H - V L）が詳細に記載されている。それらは、第1の抗原に対する軽鎖と、第2の抗原に対する誤った重鎖とのミスマッチによって引き起こされる副生成物を（このようなドメイン交換を用いないアプローチと比較して）明らかに減少させる。しかしながら、それらの調製は、副産物を完全に伴わないわけではない。主な副産物は、ベンス-ジヨーンズ型相互作用に基づくものである。Schaefer, W. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191;付録の図S1I)も参照のこと。

【0016】

国際公開公報第2010/040508号には、二重特異性抗V E G F／抗A N G - 2抗体が報告されている。国際公開公報第2014/177460号には、ヒトF c R n結合改变抗体及びその使用方法が報告されている。Thomas, Mらは、パン-アンジオポエチン-1/-2阻害剤と比較して強力な抗腫瘍及び抗血管新生効果並びに優れた副作用プロファイルを有する新規のアンジオポエチン-2選択的完全ヒト抗体を報告した（PLOS One 8 (2013) E54923）。Papadopoulos, K. Pらは、進行性固形腫瘍悪性度を有する患者におけるR E G N 9 1 0 (S A R 3 0 7 7 4 6)（完全ヒト選択的アンジオポエチン-2（A n g 2）モノクローナル抗体（M A b））の第I相ヒト初回投与試験を報告した（abstract 2517, ASCO Annual Meeting 2013）。

50

【発明の概要】

【0017】

概要

本発明は、抗ANG2抗体及びその使用方法を提供する。特定の実施態様では、抗体は、親和性成熟抗体である。

【0018】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体である。

10

【0019】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、(a)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3をさらに含む。

【0020】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：32のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体である。

20

【0021】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、(a)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3をさらに含む。

【0022】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：38のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体である。

【0023】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、(a)配列番号：43のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L3をさらに含む。

30

【0024】

一実施態様では、抗体は、配列番号：19のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6又は配列番号：33のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。

【0025】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、i)配列番号：19と70%超又は85%又は90%又は95%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6と70%超又は85%又は90%又は95%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み、

40

i)重鎖可変ドメインにおいて28位にアミノ酸残基アスパラギン(N)、30位にアミノ酸残基アラニン(A)、100b位にアミノ酸残基プロリン(P)、及び100j位にアミノ酸残基アラニン(A)を有し、軽鎖可変ドメインにおいて51位にアミノ酸残基トレオニン(T)を有し(ナンバリングは、Kabatに従う)、

ii)ヒトTie2を安定発現するHEK293細胞を使用した細胞系アッセイにおいて、Tie2リン酸化ELISAを使用して決定した場合に、そのレセプターTie2に対するANG2の結合の阻害について、配列番号：19の配列を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6又は配列番号：33の配列を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体と比較して低いEC₅₀値を有する抗体である。

【0026】

50

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、ヒトサブクラスIgG1又はヒトサブクラスIgG4のものである。

【0027】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、軽鎖を有するヒトサブクラスIgG1のものである。

【0028】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、軽鎖を有するヒトサブクラスIgG1のものである。

【0029】

本明細書で報告された全ての態様の一実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0030】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：19のVH配列及び配列番号：24のVL配列を含む抗体である。

【0031】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：28のVH配列及び配列番号：33のVL配列を含む抗体である。

【0032】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：37のVH配列及び配列番号：42のVL配列を含む抗体である。

【0033】

一実施態様では、抗体は、二重特異性抗体である。

【0034】

全ての態様の一実施態様では、ヒト化抗体は、Tie2レセプターに対するヒトANG2の結合を阻害することによって、ヒトANG2の生物学的活性を遮断する。

【0035】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体Fabフラグメントであって、(a)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体Fabフラグメントである。

【0036】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体Fabフラグメントは、(a)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3をさらに含む。

【0037】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体Fabフラグメントであって、(a)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：32のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体Fabフラグメントである。

【0038】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体Fabフラグメントは、(a)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3をさらに含む。

【0039】

本明細書で報告される一態様は、ヒトANG2に特異的に結合する抗体Fabフラグメントであって、(a)配列番号：38のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む抗体Fabフラグメントである。

10

20

30

40

50

【0040】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体 F_ab フラグメントは、(a)配列番号：43 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b)配列番号：44 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び(c)配列番号：45 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 をさらに含む。

【0041】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：19 の VH 配列及び配列番号：24 の VL 配列を含む抗体 F_ab フラグメントである。

【0042】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：28 の VH 配列及び配列番号：33 の VL 配列を含む抗体 F_ab フラグメントである。 10

【0043】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：37 の VH 配列及び配列番号：42 の VL 配列を含む抗体 F_ab フラグメントである。

【0044】

本明細書で報告される一態様は、ヒト ANG2 に特異的に結合する scFv 抗体フラグメントであって、(a)配列番号：20 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b)配列番号：21 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び(c)配列番号：23 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む scFv 抗体フラグメントである。 20

【0045】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、scFv 抗体フラグメントは、(a)配列番号：25 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b)配列番号：26 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び(c)配列番号：27 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 をさらに含む。 30

【0046】

本明細書で報告される一態様は、ヒト ANG2 に特異的に結合する scFv 抗体フラグメントであって、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b)配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び(c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む scFv 抗体フラグメントである。

【0047】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、scFv 抗体フラグメントは、(a)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び(c)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 をさらに含む。 30

【0048】

本明細書で報告される一態様は、ヒト ANG2 に特異的に結合する scFv 抗体フラグメントであって、(a)配列番号：38 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b)配列番号：39 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び(c)配列番号：41 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む scFv 抗体フラグメントである。 40

【0049】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、scFv 抗体フラグメントは、(a)配列番号：43 のアミノ酸配列を含む HVR-L1；(b)配列番号：44 のアミノ酸配列を含む HVR-L2；及び(c)配列番号：45 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 をさらに含む。

【0050】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：19 の VH 配列及び配列番号：24 の VL 配列を含む scFv 抗体フラグメントである。

【0051】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：28 の VH 配列及び配列番号：33 の VL 配列を含む scFv 抗体フラグメントである。 50

【 0 0 5 2 】

本明細書で報告される一態様は、配列番号：37のVH配列及び配列番号：42のVL配列を含むscFv抗体フラグメントである。

【 0 0 5 3 】

本明細書で報告される一態様は、X線結晶構造解析によって決定した場合に、本明細書で報告される抗体と少なくとも90%同じANG2の残基と相互作用する抗ANG2抗体である。

【 0 0 5 4 】

本明細書で報告される一態様は、X線結晶構造解析によって決定した場合に、本明細書で報告される抗体と少なくとも同じANG2の残基と相互作用する抗ANG2抗体である。

【 0 0 5 5 】

本明細書で報告される一態様は、X線結晶構造解析によって決定した場合に、本明細書で報告される抗体と少なくとも90%同じANG2の残基と相互作用する抗ANG2抗体であって、そのレセプターに対するANG2の結合を阻害する抗ANG2抗体である。

【 0 0 5 6 】

本明細書で報告される一態様は、X線結晶構造解析によって決定した場合に、本明細書で報告される抗体と少なくとも同じANG2の残基と相互作用する抗ANG2抗体であって、そのレセプターに対するANG2の結合を阻害する抗ANG2抗体である。

【 0 0 5 7 】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体をコードする（単離された）核酸である。

【 0 0 5 8 】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される核酸を含む宿主細胞である。

【 0 0 5 9 】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体を生産する方法であって、本明細書で報告される宿主細胞を培養して該抗体を生産すること、及び該宿主細胞又は培養培地から該抗体を回収することを含む方法である。

【 0 0 6 0 】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体及び薬学的に許容し得る担体を含む医薬製剤である。

【 0 0 6 1 】

一実施態様では、医薬製剤は、さらなる治療剤をさらに含む。一実施態様では、さらなる治療剤は、抗VEGF抗体、抗IL-1抗体又は抗PDGF-B抗体である。

【 0 0 6 2 】

本明細書で報告される一態様は、医薬として使用するための本明細書で報告される抗体である。

【 0 0 6 3 】

本明細書で報告される一態様は、血管疾患を処置するための本明細書で報告される抗体である。

【 0 0 6 4 】

本明細書で報告される一態様は、血管疾患を処置するための医薬組成物である。

【 0 0 6 5 】

本明細書で報告される一態様は、血管疾患を処置するための医薬を製造するための本明細書で報告される抗体の使用である。

【 0 0 6 6 】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、血管疾患を患っている患者を処置する方法である。

【 0 0 6 7 】

本明細書で報告される一態様は、血管疾患の処置に使用するための、好ましくはガンの

10

20

30

40

50

処置に使用するための本明細書で報告される抗体である。

【0068】

本発明の一実施態様は、ガンを処置するための本明細書で報告される抗体である。

【0069】

本明細書で報告される一態様は、ガンの処置に使用するための医薬として使用するためのものである。

【0070】

本明細書で報告される一態様は、ガンを処置するための医薬を製造するための本明細書で報告される抗体の使用である。

【0071】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体をこのような処置を必要とする患者に投与することによって、ガンを患っている患者を処置する方法である。

【0072】

本明細書で報告される一態様は、転移を予防するための医薬として使用するためのものである。

【0073】

本明細書で報告される一態様は、転移を予防するための医薬を製造するための本明細書で報告される抗体の使用である。

【0074】

本明細書で報告される一態様は、本明細書で報告される抗体をこののような処置を必要とする患者に投与することによって、原発性ガンを患っている患者における転移を予防する方法である。

【0075】

本明細書で報告される一態様は、眼血管疾患の処置に使用するための、好ましくは黄斑変性症の処置に使用するための本明細書で報告される抗体である。

【0076】

ANG2とTie2レセプターとの間の相互作用の阻害に使用するための本明細書で報告される抗体。

【0077】

本明細書で報告される一態様は、医薬の製造における本明細書で報告される抗体の使用である。

【0078】

一実施態様では、医薬は、眼血管疾患を処置するため、好ましくは黄斑変性症を処置するためのものである。

【0079】

一実施態様では、医薬は、ANG2とTie2レセプターとの間の相互作用を阻害するためのものである。

【0080】

本明細書で報告される一態様は、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を有する個体を処置する方法であって、有効量の本明細書で報告される抗体を該個体に投与することを含む方法である。

【0081】

本明細書で報告される一態様は、個体におけるANG2とTie2レセプターとの間の相互作用を阻害する方法であって、有効量の本明細書で報告される抗体を該個体に投与して、ANG2とTie2レセプターとの間の相互作用を阻害することを含む方法である。

【発明を実施するための形態】

【0082】

発明の実施態様の詳細な説明

I. 定義

本明細書の目的のために、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される

10

20

30

40

50

ように、ヒト免役グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（V L）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（V H）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免役グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、又はアミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。いくつかの実施態様では、V Lアクセプターヒトフレームワークは、配列において、V Lヒト免役グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0083】

10

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の单一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の合計強度を指す。特に指示がない限り、本明細書で使用される「結合親和性」は、結合ペア（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の一対一相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般的に、解離定数（ k_d ）により表現され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む当技術分野で公知の一般的な方法により測定され得る。結合親和性を測定するための特定の具体的及び例示的な実施態様は、以下に記載されている。

【0084】

20

「親和性成熟」抗体は、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（H V R）において1つ以上の変化を有する抗体を指す。

【0085】

30

「抗ANG2抗体」及び「ANG2に結合する抗体」という用語は、抗体がANG2のターゲティングにおける診断剤及び/又は治療剤として有用であるような十分な親和性で、ANG2に結合することができる抗体を指す。一実施態様では、無関係の非ANG2タンパク質に対する抗ANG2抗体の結合の程度は、例えば、ELISA又は表面プラズモン共鳴によって測定した場合には、ANG2に対する該抗体の結合の約10%未満である。特定の実施態様では、ANG2に結合する抗体は、1 μM以下、100 nM以下又は10 nM以下（例えば、 10^{-8} M以下）の解離定数（K D）を有する。特定の実施態様では、抗ANG2抗体は、異なる種由来のANG2間で保存されているANG2のエピトープに結合する。

【0086】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）及び抗体フラグメントを含む様々な抗体構造を包含する。

【0087】

40

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；及び抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。

【0088】

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

【0089】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種に由来するが、重鎖及び/又は軽鎖の残りの部分が異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。

【0090】

50

本明細書で使用される「ガン」という用語は、増殖性疾患、例えばリンパ腫、リンパ性白血病、肺ガン、非小細胞肺（N S C L）ガン、細気管支肺胞細胞肺ガン、骨ガン、膵臓ガン、皮膚ガン、頭部又は頸部のガン、皮膚又は眼内黒色腫、子宮ガン、卵巣ガン、直腸ガン、肛門部のガン、胃ガン（stomach cancer）、胃ガン（gastric cancer）、結腸ガン、乳ガン、子宮ガン、卵管のガン腫、子宮内膜のガン腫、子宮頸部のガン腫、膀胱のガン腫、外陰部のガン腫、ホジキン病、食道のガン、小腸のガン、内分泌系のガン、甲状腺のガン、副甲状腺のガン、副腎のガン、軟組織の肉腫、尿道のガン、陰茎のガン、前立腺ガン、膀胱のガン、腎臓又は尿道のガン、腎細胞ガン腫、腎盂のガン腫、中皮腫、肝細胞ガン、胆道ガン、中枢神経系（C N S）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣腫、髓芽腫、髓膜腫、扁平上皮ガン、下垂体腺腫及びユーリング肉腫（上記ガンのいずれか難治性型、又は上記ガンの1つ以上の組み合わせを含む）を指す。

10

【0091】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体には5つの主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂にさらに分類され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、γ、δ、ε及びμと称される。

20

【0092】

「イムノコンジュゲート」という用語は、抗体と非抗体部分との間の共有結合的コンジュゲートを表す。このような非抗体部分は、検出可能な標識、エフェクター分子又は細胞傷害剤であり得る。

【0093】

本明細書で使用される「細胞傷害剤」という用語は、細胞機能を阻害若しくは抑制し、及び/又は細胞死若しくは破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害剤としては、限定されないが、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体）；化学療法剤又は化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシン又は他のインターラークニン；成長阻害剤；酵素及びそのフラグメント、例えば核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば小分子毒素又は細菌、真菌、植物若しくは動物由来の酵素的に活性な毒素（そのフラグメント及び/又は変異体を含む）；並びに以下で考察される様々な抗腫瘍剤又は抗ガン剤が挙げられる。

30

【0094】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因する生物学的活性であって、抗体クラスにより異なる生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；ファゴサイトーシス；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンリギュレーション；並びにB細胞活性化が挙げられる。

40

【0095】

薬剤（例えば、医薬製剤）の「有効量」は、必要な投与量及び期間で、所望の治療的結果又は予防的結果を達成するために有効な量を指す。

【0096】

本明細書では、「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、ネイティブな配列のFc領域及び変異体のFc領域を含む。一実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リシン（Lys447）又はC末端グリシル-リシンジペプチド（Gly446Lys447）は存在してもよいし、又は存在しなくてもよい。本明細書で特に指

50

定がない限り、F c 領域又は定常領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されているE Uナンバリングシステム（E Uインデックスとも称される）に従う。

【0097】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に、4つのFRドメインFR1、FR2、FR3及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般的に、VH（又はVL）において以下の配列で現れる：FR1 - H1（L1） - FR2 - H2（L2） - FR3 - H3（L3） - FR4。

10

【0098】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」という用語は、本明細書では、ネイティブな抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、又は本明細書で定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すために互換的に使用される。

【0099】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外来性核酸が導入された細胞（このような細胞の子孫を含む）を指す。宿主細胞は、継代数にかかわらず、初代トランスフォーメーション細胞及びそれに由来する子孫を含む「トランスフォーマント」及び「トランスフォーメーション細胞」を含む。子孫は、核酸含量が親細胞と完全に同一ではなくてもよいが、突然変異を含有し得る。最初にトランスフォーメーションされた細胞においてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異体子孫は、本明細書に含まれる。

20

【0100】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された抗体、又はヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。

【0101】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免役グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も多く存在するアミノ酸残基に相当するフレームワークである。一般的に、ヒト免役グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループから行われる。一般的に、配列のサブグループは、Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3のサブグループである。一実施態様では、VLの場合、サブグループは、Kabat et al（前掲）のサブグループカッパIである。一実施態様では、VHの場合、サブグループは、Kabat et al（前掲）のサブグループIIである。

30

【0102】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRに由来するアミノ酸残基と、ヒトFRに由来するアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、HVR（例えば、CDR）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに対応する少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を場合により含み得る。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

40

【0103】

本明細書で使用される「超可変領域」又は「HVR」という用語は、配列が超可変性であり（「相補性決定領域」又は「CDR」）、及び／又は構造的に定義されたループ（超可変ループ）を形成し、及び／又は抗原接觸残基（「抗原接觸点」）を含有する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、抗体は、6つのHVR（VHにおいて3つ（H1、

50

H 2、H 3) 及びVLにおいて3つ(L 1、L 2、L 3))を含む。

【0104】

本明細書におけるHVRは、

(a) アミノ酸残基26～32(L 1)、50～52(L 2)、91～96(L 3)、26～32(H 1)、53～55(H 2)及び96～101(H 3)において存在する超可変ループ(Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917)；

(b) アミノ酸残基24～34(L 1)、50～56(L 2)、89～97(L 3)、31～35b(H 1)、50～65(H 2)及び95～102(H 3)において存在するCDR(Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.)；

(c) アミノ酸残基27c～36(L 1)、46～55(L 2)、89～96(L 3)、30～35b(H 1)、47～58(H 2)及び93～101(H 3)において存在する抗原接觸点(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；並びに

(d) HVRアミノ酸残基46～56(L 2)、47～56(L 2)、48～56(L 2)、49～56(L 2)、26～35(H 1)、26～35b(H 1)、49～65(H 2)、93～102(H 3)及び94～102(H 3)を含む(a)、(b)及び/又は(c)の組み合わせ

を含む。

【0105】

特に指示がない限り、可変ドメイン中のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書では、Kabat et al(前掲)にしたがってナンバリングされる。

【0106】

「イムノコンジュゲート」は、1つ以上の異種分子にコンジュゲートされている抗体である。

【0107】

「個体」又は「被験体」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、限定されないが、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ)、靈長類(例えば、ヒト及び非ヒト靈長類、例えばサル)、ウサギ及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)が挙げられる。特定の実施態様では、個体又は被験体は、ヒトである。

【0108】

「単離された」抗体は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施態様では、抗体は、例えば、電気泳動法(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)又はクロマトグラフ法(例えば、イオン交換又は逆相HPLC)によって決定した場合に、95%超又は99%超の純度まで精製される。抗体の純度の評価方法の概説については、例えば、Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照のこと。

【0109】

「単離された」核酸は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含有する細胞内に含まれる核酸分子を含むが、該核酸分子は、染色体外に、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0110】

「抗ANG2抗体をコードする単離された核酸」は、抗体重鎖及び軽鎖(又はそれらのフラグメント)をコードする1つ以上の核酸分子(单一のベクター又は別個のベクター中のこのような核酸分子、及び宿主細胞内の1つ以上の位置に存在するこのような核酸分子を含む)を指す。

【0111】

本発明による「転移」という用語は、ガン性細胞が原発性腫瘍から患者の1つ以上の他の部位に伝播し、次いで二次腫瘍が発達することを指す。ガンが転移したかを決定するための手段は当技術分野で公知であり、骨スキャン、胸部X線、CATスキャン、MRIス

10

20

30

40

50

キャン及び腫瘍マーカー試験が挙げられる。

【0112】

本明細書で使用される「転移の予防」又は「二次腫瘍の予防」という用語は同じ意味を有し、ガン性細胞が原発性腫瘍から患者の1つ以上の他の部位にさらに伝播するのを阻害又は軽減するような、ガンを患っている患者における転移に対する予防手段を指す。これは、原発性腫瘍又はガンの転移が予防、遅延又は軽減され、したがって二次腫瘍の発達が予防、遅延又は軽減されることを意味する。好ましくは、転移（すなわち、肺の二次腫瘍）は予防又は軽減され、これは、ガン性細胞が原発性腫瘍から肺に転移伝播するのが予防又は軽減されることを意味する。

【0113】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を指す。すなわち、例えば、天然に存在する突然変異を含有するか、又はモノクローナル抗体調製物の生産中に生じる可能な変異体抗体であって、一般に微量で存在する変異体抗体を除いて、集団を含む個々の抗体は同一であり、及び／又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）を対象とする異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、1つの抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られたものであるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明にしたがって使用すべきモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、リコンビナントDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリンローラスの全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作製され得、このような方法、及びモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

10

20

30

40

50

【0114】

「ネイキッドな抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッドな抗体は、医薬製剤中に存在し得る。

【0115】

「ネイティブな抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、ネイティブなIgG抗体は、ジスルフィド結合されている2本の同一の軽鎖及び2本の同一の重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも称される可変領域（VH）とそれに続く3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）とを有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも称される可変領域（VL）とそれに続く軽鎖定常（CL）ドメインとを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と称される2種類の1つに割り当てられ得る。

【0116】

「添付文書」という用語は、このような治療製品の適応症、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌についての情報及び／又はその使用に関する警告を含有する治療製品の市販パッケージに通常含まれる説明書を指すために使用される。

【0117】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（%）」は、配列をアライメントし、必要な場合にはギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを実現した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義され、いかなる保存的置換も配列同一性の部分とみなさない。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当業者の範囲内である様々な方法において、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなど公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアラ

イメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列アライメントするための適切なパラメータを決定し得る。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用して生成される。配列比較コンピュータープログラムALIGN-2は、Genentech, Inc.の著作物であり、ソースコードは、ユーザーマニュアルと共にU.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559に提出され、米国著作権登録番号T X U 5 1 0 0 8 7として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手可能であり、又はソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V 4 . 0 Dを含むUNIX(登録商標)オペレーティングシステムで使用するためにコンパイルされるべきである。配列比較パラメータは全て、ALIGN-2プログラムによって設定され、変化しない。

10

【0118】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較のために用いられる状況では、所定のアミノ酸配列Bに対する所定のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(あるいは、所定のアミノ酸配列Bに対する特定のアミノ酸配列同一性%を有するか、又は含む所定のアミノ酸配列Aと表現され得る)は、以下のように計算される。

$$100 \times \text{分数} X / Y$$

(式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムによるA及びBのアライメントにおいて同一のマッチとしてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくないと認識されよう。特に明記されない限り、本明細書で使用されるアミノ酸配列同一性%の値は全て、直前の段落に記載されているように、ALIGN-2コンピュータープログラムを使用して得られる。

20

【0119】

「医薬製剤」という用語は、その中に含まれる有効成分の生物学的活性が有効になるのを可能にするような形態の調製物であって、該製剤が投与される被験体に対して許容し得ないほど毒性のさらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0120】

「薬学的に許容し得る担体」は、医薬製剤中の有効成分以外の成分であって、被験体に対して非毒性の成分を指す。薬学的に許容し得る担体としては、限定されないが、バッファー、賦形剤、安定化剤又は保存剤が挙げられる。

30

【0121】

本明細書で使用される「ANG2」という用語は、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60及びCheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91に記載されているヒトアンジオポエチン-2(ANG-2)(あるいは、ANGPT2又はANG2と略記される)(配列番号:54)を指す。アンジオポエチン-1及び-2は、Tie(血管内皮内で選択的に発現されるチロシンキナーゼのファミリー)のリガンドとして発見された(Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-248)。現在、アンジオポエチンファミリーの4つの確定メンバーが存在する。アンジオポエチン-3及び-4(ANG3及びANG4)は、マウス及びヒトにおける同じローカスで大きく異なるカウンターパートであり得る(例えば、Kim, I., et al., FEBS Lett., 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 26523-26528を参照のこと)。当初、ANG1及びANG2は、組織培養実験において、それぞれアゴニスト及びアンタゴニストとして同定された(ANG1については、Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69を参照のこと; ANG2については、Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60を参照のこと)。公知のアンジオポエチンは全てTie2に主に結合し、ANG1及びANG2は両方とも3nM(Kd)の親和性でTie2に結合する(Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60)。

40

【0122】

50

本明細書で使用される「処置」（及びその文法的变化形、例えば「処置する」又は「処置すること」）は、処置される個体の自然経過を变化させようとする臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床的病状の経過中に実施され得る。処置の望ましい効果としては、限定されないが、疾患の発生又は再発の予防、症候の軽減、疾患の直接的又は間接的な任意の病理学的転帰の減少、転移の予防、疾患の進行速度の減少、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後改善が挙げられる。いくつかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるために、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0123】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖又は抗体軽鎖のドメインを指す。一般的に、ネイティブな抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれVH及びVL）の可変ドメインは類似構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91を参照のこと）。1つのVHドメイン又はVLドメインは、抗原結合特異性を与えるのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体に由来するVHドメイン又はVLドメインを使用して単離して、それぞれ相補的VLドメイン又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングし得る。例えば、Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照のこと）。

10

【0124】

「血管疾患」という用語は、ガン、炎症性疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血、外傷、敗血症、COPD、喘息、糖尿病、AMD、網膜症、脳卒中、脂肪症、急性肺損傷、出血、血液漏出（例えば、サイトカインによって誘導されるもの）、アレルギー、グレーブス病、橋本自己免疫甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、巨細胞性動脈炎、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、クローン病、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、特に固形腫瘍、眼内新生血管症候群、例えば増殖性網膜症又は加齢性黄斑変性症（AMD）、関節リウマチ及び乾癬を含む（Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; 及びGarner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710）。

20

30

【0125】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結された核酸の発現を指令することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。

【0126】

I I . 組成物及び方法

改善された親和性を有する抗ANG2抗体が本明細書で報告される。

40

【0127】

本発明の抗体は、例えば、血管疾患、例えば眼血管疾患、例えば黄斑変性症又はガンなどの処置に有用である。

【0128】

本発明の抗体は、このような疾患を患っている（特に、ガン又は黄斑変性症を患っている）患者に利益をもたらす非常に有益な特性を有する。本明細書で報告される抗体は、血管新生又は血管疾患の阻害に非常に有効である。

【0129】

本発明の抗体は、

a) 肿瘍成長の阻害、及び／若しくは

50

- b) 腫瘍血管新生若しくは血管疾患の阻害、並びに / 又は
 c) 黄斑変性症の阻害に有効であろう。

【 0 1 3 0 】

A . 本明細書で報告される例示的な抗 A N G 2 抗体

改善された結合特性を有する抗 A N G 2 抗体及びそのフラグメントが本明細書で報告される。

【 0 1 3 1 】

【表 1 】

ヒト A N G 2 結合動態 :

10

分子	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)*	$t_{1/2}$ (s)
0009	1.92E+06	0.07565	39	9
0041	3.85E+06	3.17E-03	1	219
0075	2.22E+06	3.10E-02	14	22
0090	2.16E+06	2.53E-03	1	274
0098	1.56E+07	1.58E-04	10*	
0099	2.61E+07	1.10E-04	4*	
0100	2.06E+07	1.67E-04	8*	
0101	1.83E+07	1.20E-04	7*	

*アビディティ。

20

【 0 1 3 2 】

【表 2 】

カニクイザル A N G 2 結合動態 :

30

分子	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)*	$t_{1/2}$ (s)
0009	1.45E+06	8.81E-02	61	8
0041	2.14E+06	3.60E-03	2	193
0075	1.34E+06	3.25E-02	24	21
0090	2.02E+06	3.08E-03	2	225

【 0 1 3 3 】

本明細書で報告される抗体の実施例 6 のアッセイで決定した相対的生物学的活性を以下の表に示す。

【表 3 】

40

分子	相対的生物学的活性 [%]
0009	72
0041	838
0075	128
0090	706
0098	100

【 0 1 3 4 】

凝集開始温度 (T a g g) 及び融解温度 (T m) を決定することによって、異なる抗体の熱安定性を評価した (以下の表を参照のこと) 。

50

【表4】

分子	T _{agg} [°C]	T _m [°C]
0009	62.2	65.9
0041	63.1	66.0
0075	63.6	67.0
0090	64.0	67.4

【0135】

加えて、抗体は、ストレス試験において優れた安定性を示す。表面プラズモン共鳴を使用して、結合活性を決定した（以下の表を参照のこと）。 10

【表5】

分子	相対的結合活性	
	37 °C pH 7.4 で 2 週間	40 °C pH 6.0 で 2 週間
0009	99 %	91 %
0041	100 %	101 %
0075	101 %	105 %
0090	112 %	100 %

100% = -80 °C で保存したサンプル

20

【0136】

C E - S D S 分析では、同じ安定性が見られ得る（以下の表を参照のこと）。

【表6】

分子	相対面積%		
	開始	37 °C pH 7.4 で 2 週間	40 °C pH 6.0 で 2 週間
0009	98.9	98.5	98.8
0041	98.9	98.6	98.6
0090	99.2	98.5	98.2

30

【0137】

以下の表は、本明細書で報告される抗体の特性を要約したものである。

【表7】

分子	0009	0015	0016	0017	0021	0025	0026
フォーマット	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2 のための値数	1	1	1	1	1	1	1
差異	参考分子	VH: S100dP VL: wt	VH: S100dP Y100fP VL: wt	VH: S54C D100bC VL: wt	VH: G100jA VL: wt	VH: T28N T30V VL: wt	VH: T28N T30A VL: wt
配列番号	HC: 46 LC: 49	HC: 57 LC: 49	HC: 58 LC: 49	HC: 59 LC: 49	HC: 60 LC: 49	HC: 61 LC: 49	HC: 62 LC: 49
ka [1/Ms]	2.15E+06	1.87E+06	2.28E+06	3.03E+06	3.35E+06	1.87E+06	2.03E+06
kd [1/s]	7.23E-02	1.49E-02	2.21E-01	3.57E-02	3.00E-02	7.02E-02	3.71E-02
KD [nM]	34	8	97	12	9	38	18
t _{1/2} (s)	10	46	3	19	23	10	19
第1の精製工程	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select
スケール[I]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
収量[mg/l 上清]	123	153	153	136	103	30	77
モノマー (SEC) [%]	78	76	72	72	74	82	87
モノマー (CE-SDS) [%]	80	66	64	92	77	82	89
さらなる 精製工程	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
収量[mg/l 上清]	80	77	75	60	60	22.8	54
モノマー (SEC) [%]	> 99	98	99	96	> 99	>99	>99
モノマー (CE-SDS) [%]	> 99	99	99	99	99	98	98
ANG2 tie2 レセプタ一結合阻害 EC50 [nM]	69						
T _{agg} [°C]	62						
T _m [°C]	66						
pH 6.0 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失	9						
pH 7.4 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失	1						

10

20

30

40

50

【表8】

分子	0027	0028	0029	0031	0032	0033	0039
フォーマット	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2 のための値数	1	1	1	1	1	1	1
差異	VH: T28N T30K VL: wt	VH: T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA VL: wt	VH: wt VL: Y48W	VH: wt VL: D49S	VH: T28N S100dP G100jA VL: wt	VH: D100bT VL: D50T
配列番号	HC: 63 LC: 49	HC: 64 LC: 49	HC: 65 LC: 49	HC: 46 LC: 66	HC: 46 LC: 67	HC: 68 LC: 49	HC: 69 LC: 50
ka [1/Ms]	2.40E+06	1.81E+06	2.41E+06	1.15E+06	8.90E+05	7.53E+05	1.14E+06
kd [1/s]	1.65E-01	2.59E-01	4.24E-03	4.48E-01	1.38E-01	2.25E-03	0.1848
KD [nM]	69	143	2	391	154	3	162
t _{1/2} (s)	4	3	164	2	5	308	4
第1の精製工程	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select
スケール[l]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
収量[mg/l 上清]	150	155	136	140	47.6		163.8
モノマー (SEC) [%]	80	84	80	93	89	48	86
モノマー (CE-SDS) [%]	80	85	76	92	92	16+41	92
さらなる精製工程	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
収量[mg/l 上清]	109.6	116.5	89	118.5	38.5	54	115
モノマー (SEC) [%]	>99	>99	>99	>99	>99	>99	>95
モノマー (CE-SDS) [%]	98	99	98	98	99	27+72	98
ANG2 tie2 レセプタ一結合阻害 EC50 [nM]							
T _{agg} [°C]							
T _m [°C]							
pH 6.0 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失							
pH 7.4 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失							

10

20

30

40

50

【表9】

分子	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
フォーマット	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2 のための値数	1	1	1	1	1	1	1
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30V VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30K VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bT VL: D50T
配列番号	HC: 70 LC: 49	HC: 47 LC: 49	HC: 71 LC: 49	HC: 72 LC: 49	HC: 73 LC: 49	HC: 72 LC: 50	HC: 73 LC: 50
ka [1/Ms]	2.59E+06	3.85E+06	3.22E+06	3.28E+06	1.80E+06	3.72E+06	1.80E+06
kd [1/s]	5.92E-03	3.17E-03	1.28E-02	0.09483	0.03832	0.0786	0.03145
KD [nM]	23	1	4	29	21	21	18
t _{1/2} (s)	117	219	54	7	18	9	22
第1の精製工程	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select
スケール [l]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
収量[mg/l 上清]				118.3	114.3	144.9	176.6
モノマー (SEC) [%]				67	77	70	75
モノマー (CE-SDS) [%]				72	77	76	82
さらなる 精製工程	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
収量[mg/l 上清]	28.5	34.8	30.2	56	54	76	116.6
モノマー (SEC) [%]	99	98	99	>95	>95	>95	>95
モノマー (CE-SDS) [%]	99	99	99	98	98	98	96
ANG2 tie2 レセプタ ー結合阻害 EC50 [nM]		5.4					
T _{agg} [°C]		63				64	64
T _m [°C]		67				67	67
pH 6.0 で 2 週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失		0			0		3

10

20

30

40

分子	0040	0041	0042	0057	0058	0060	0061
pH 7.4 で 2 週間イン キュベー ションし た後の ANG2 結合 の損失		0				1	3

【表10】

分子	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
フォーマット	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	MAb	CrossMab CL-CH1
ANG2 のための値数	1	1	1	1	1	2	2
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: D50T	VH: D100bS VL: wt	VH: D100bS VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	参照分子	VH: wt VL: wt
配列番号	HC: 48 LC: 49	HC: 48 LC: 50	HC: 74 LC: 49	HC: 74 LC: 50	HC: 47 LC: 50	HC: 75 LC: 76	HC: 51 LC: 49
ka [1/Ms]	2.27E+06	2.22E+06	1.06E+06	1.05E+06	2.16E+06		1.56E+07
kd [1/s]	3.66E-02	3.10E-02	2.60E-01	2.58E-01	2.53E-03		1.58E-04
KD [nM]	16	14	247	247	1		0.01
t _{1/2} (s)	19	22	3	3	274		4381
第1の精製工程	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select	kappa select		MabSelect SuRe
スケール [l]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5		1
収量[mg/l 上清]	164	157	153.4	172.5	92		302
モノマー (SEC) [%]	67	70	72	79	80		
モノマー (CE-SDS) [%]	68	77	76	83	95		
さらなる 精製工程	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC		HIC+ SEC
収量[mg/l 上清]	86.6	95	99	132	69		42
モノマー (SEC) [%]	>98	>98	>98	>98	>98		>98
モノマー (CE-SDS) [%]	>99	>99	>99	>99	99		99
ANG2 tie2 レセプター結合阻害 EC50 [nM]		39			7	3.9	3.1
T _{agg} [°C]		64			64		
T _m [°C]		67			67		
pH 6.0 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失		0			0		

10

20

30

40

分子	0074	0075	0076	0077	0090	IgG	0098
pH 7.4 で 2 週間イン キュベー ションし た後の ANG2 結合 の損失		0			0		

【表11】

分子	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
フォーマット	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1	CrossFab CL-CH1
ANG2 のための値数	2	2	2	1	1	1	1
差異	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bE VL: D50T	VH: wt VL: wt	VH: S100dP G100jA T28N T30A VL: D50T	VH: S100dP G100jA T28N T30A D100bS VL: D50T	VH: wt VL: D50T
配列番号	HC: 52 LC: 49	HC: 52 LC: 50	HC: 53 LC: 50	HC: 46 LC: 77	HC: 47 LC: 78	HC: 48 LC: 78	HC: 46 LC: 50
ka [1/Ms]	2.61E+07	2.06E+07	1.83E+07	8.48E+05	7.46E+05	6.75E+05	5.80E+05
kd [1/s]	1.10E-04	1.67E-04	1.20E-04	3.77E-02	3.19E-02	3.10E-03	2.32E-02
KD [nM]	0.004	0.008	0.007	44	43	5	40
t _{1/2} (s)	6284	4156	5771	18	22	224	30
第1の精製工程	MabSelectSuRe	MabSelectSuRe	MabSelectSuRe	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1
スケール [l]	1	1	1	0.3	0.3	0.3	0.3
収量[mg/l 上清]	270	221	153	73.3	77.3	56.6	55.5
モノマー (SEC) [%]	33	34		68	64	77	64
モノマー (CE-SDS) [%]			83	96	97	97	98
さらなる 精製工程	HIC+ SEC	HIC+ SEC	HIC+ SEC	SEC	SEC	SEC	SEC
収量[mg/l 上清]	52	78	74	33.8	36.1	28.2	31.7
モノマー (SEC) [%]	>98	>98	>99	96	95	96	96
モノマー (CE-SDS) [%]	99	99	95	96	99	99.7	>99
ANG2 tie2 レセプター結合阻害 EC50 [nM]	3.2	3.2	3				
T _{agg} [°C]				61	61	61	61
T _m [°C]				63	64	64	64
pH 6.0 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失							

10

20

30

40

分子	0099	0100	0101	0154	0155	0156	0157
pH 7.4 で 2 週間イン キュベー ションし た後の ANG2 結合 の損失							

【表12】

分子	0162	0163	0164	0165	0166	0167
フォーマット	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1	CrossMab CL-CH1
ANG2 のための値数	1	1	1	1	1	1
差異	参照分子 ANG2: wt1 VEGF: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N VL: D50T VEGF: VH: wt1 VL: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N D100bS VL: D50T VEGF: VH: wt1 VL: wt1	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N D100bS VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	ANG2: VH: S100dP G100jA T30A T28N D100bS VL: D50T VEGF: VH: wt2 VL: wt2	参照分子 ANG2: wt2 VEGF: wt2
配列番号	ANG2: HC: 79 LC: 80 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 83 LC: 84 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 85 LC: 86 VEGF: LC: 81 HC: 82	ANG2: HC: 89 LC: 90 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 91 LC: 92 VEGF: HC: 87 LC: 88	ANG2: HC: 93 LC: 94 VEGF: HC: 87 LC: 88
ka [1/Ms]	3.65E+05	3.14E+05	2.76E+05	3.02E+05	2.75E+05	4.11E+05
kd [1/s]	1.56E-02	1.11E-03	1.08E-02	1.12E-03	1.35E-02	4.09E-02
KD [nM]	43	4	39	4	49	99
t _{1/2} (s)	44	623	64	619	51	17
第1の精製工程	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1	Capture select IgG-CH1
スケール[I]	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
収量[mg/l 上清]	59.4	31.3	28.1	25	31.3	25
モノマー (SEC) [%]	53	47	49	54	61	70
モノマー (CE-SDS) [%]	65	58	57	59	63	62
さらなる精製工程	SEC+HIC + CEX	HIC+ CEX	IEX	HIC+ CEX	IEX	IEX
収量[mg/l 上清]	15.6	9.1	4.65	2.8	4.1	3.5
モノマー (SEC) [%]	99	99	97	97	94	97
モノマー (CE-SDS) [%]	98	99	96	96	93	97
ANG2 tie2 レセプター結合阻害 EC50 [nM]						
T _{agg} [°C]	60	60	60	60	60	60
T _m [°C]	64	65	65	66	66	66
pH 6.0 で 2週間インキュベーションした後の ANG2 結合の損失						

10

20

30

40

分子	0162	0163	0164	0165	0166	0167
pH 7.4 で 2 週間インキ ュベーショ ンした後の ANG2 結合 の損失						

【 0 1 3 8 】

本明細書で報告される態様は、上記表に示されている重鎖及び軽鎖の個々の組み合わせの全てである。 10

【 0 1 3 9 】

本明細書で報告される一態様は、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b)配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; 及び (c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含むヒト化抗ヒト ANG2 抗体である。一実施態様では、抗体は、(d)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (e)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (f)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 をさらに含む。

【 0 1 4 0 】

本明細書で報告される一態様は、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b)配列番号：31 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; 及び (c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含むヒト化抗ヒト ANG2 抗体である。一実施態様では、抗体は、(d)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (e)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (f)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 をさらに含む。 20

【 0 1 4 1 】

一態様では、本発明は、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b)配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; (c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 ; (d)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (e)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (f)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1 つ、 2 つ、 3 つ、 4 つ、 5 つ又は 6 つの HVR を含む抗 ANG2 抗体を提供する。 30

【 0 1 4 2 】

一態様では、本発明は、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b)配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; 及び (c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つ全ての VH HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 、及び配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 、配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 、及び配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号：29 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b)配列番号：30 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; 及び (c)配列番号：32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。 40

【 0 1 4 3 】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (b)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (c)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つ全ての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号：34 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (b)配列番号：35 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (c)配列番号：36 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。 50

含む HVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0144】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii)配列番号：32から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つ全てのVH HVR配列を含むVHDメイン；並びに(b)(i)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。10

【0145】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号：31のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号：32のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号：36から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0146】

別の態様では、抗ANG2抗体は、配列番号：28のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比べて置換(例えば、保存的置換)、挿入又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ANG2抗体は、ANG2に結合する能力を保持する。特定の実施態様では、配列番号：28において、合計1～10アミノ酸が置換、挿入及び/又は欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域において(すなわち、FRにおいて)起こる。場合により、抗ANG2抗体は、配列番号：28のVH配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。特定の実施態様では、VHは、(a)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：32のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つ全てのHVRを含む。20

【0147】

別の態様では、配列番号：33のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗ANG2抗体が提供される。特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比べて置換(例えば、保存的置換)、挿入又は欠失を含有するが、その配列を含む抗ANG2抗体は、ANG2に結合する能力を保持する。特定の実施態様では、配列番号：33において、合計1～10アミノ酸が置換、挿入及び/又は欠失されている。特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域において(すなわち、FRにおいて)起こる。場合により、抗ANG2抗体は、配列番号：33のVL配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1つ、2つ又は3つ全てのHVRを含む。30

【0148】

別の態様では、上記で提供される実施態様のいずれかにおけるVH、及び上記で提供される実施態様のいずれかにおけるVLを含む抗ANG2抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、それぞれ配列番号：28及び配列番号：33のVH及びVL配列(これらの配列の翻訳後修飾を含む)を含む。40

50

【0149】

本発明のさらなる態様では、上記実施態様のいずれかの抗ANG2抗体は、モノクローナル抗体である。一実施態様では、抗ANG2抗体は、抗体フラグメント、例えばFv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ又はF(ab')₂フラグメントである。別の実施態様では、抗体は、全長抗体、例えばインタクトなIgG1抗体又は本明細書で定義される他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

【0150】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗ANG2抗体は、エフェクターサイレント抗ANG2抗体である。本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗ANG2抗体は、エフェクターサイレント抗ANG2抗体であり、ヒトFcRnに結合しない。本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗ANG2抗体は、ヒトサブクラスIgG1のものであり、両重鎖において突然変異L234A、L235A、P329G、I253A、H310A及びH434Aを有する（ナンバリングは、Kabatのインデックスに従う）。

10

【0151】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗ANG2抗体は、二重特異性抗体である。

【0152】

本明細書で報告される一態様は、二価二重特異性抗体であって、
a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに
b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖

20

を含み、

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二価二重特異性抗体である。

【0153】

a) の抗体は、b) で報告される改変を含有せず、a) の重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【0154】

b) の抗体では、
軽鎖内において、
可変軽鎖ドメインVLは、前記抗体の可変重鎖ドメインHVで交換されており、
及び
重鎖内において、
可変重鎖ドメインVHは、前記抗体の可変軽鎖ドメインVLで交換されている。

30

【0155】

一実施態様では、
i) a) の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸（ナンバリングは、Kabatに従う）は、正電荷アミノ酸で置換されており、a) の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）は、負電荷アミノ酸で置換されており、
又は、
ii) b) の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸（ナンバリングは、Kabatに従う）は、正電荷アミノ酸で置換されており、b) の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）は、負電荷アミノ酸で置換されている。

40

【0156】

好みしい一実施態様では、
i) a) の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸は、リシン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）（ナンバリングは、Kabatに従う）で独立し

50

て（好ましい一実施態様では、リシン（K）又はアルギニン（R）で独立して）置換されており、a)の第1の重鎖の定常ドメインC H 1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）で独立して置換されており、

又は

i i) b)の第2の軽鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位のアミノ酸は、リシン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）（ナンバリングは、Kabatに従う）で独立して（好ましい一実施態様では、リシン（K）又はアルギニン（R）で独立して）置換されており、b)の第2の重鎖の定常ドメインC H 1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）で独立して置換されている。
10

【0157】

一実施態様では、第2の重鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位及び123位のアミノ酸は、Kで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

【0158】

一実施態様では、第2の軽鎖の定常ドメインC H 1において、147位及び213位のアミノ酸は、Eで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

【0159】

好ましい一実施態様では、第1の軽鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位及び123位のアミノ酸は、Kで置換されており、第1の重鎖の定常ドメインC H 1において、147位及び213位のアミノ酸は、Eで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。
20

【0160】

一実施態様では、第2の重鎖の定常ドメインC Lにおいて、124位及び123位のアミノ酸は、Kで置換されており、第2の軽鎖の定常ドメインC H 1において、147位及び213位のアミノ酸は、Eで置換されており、第1の軽鎖の可変ドメインV Lにおいて、38位のアミノ酸は、Kで置換されており、第1の重鎖の可変ドメインV Hにおいて、39位のアミノ酸は、Eで置換されており、第2の重鎖の可変ドメインV Lにおいて、38位のアミノ酸は、Kで置換されており、第2の軽鎖の可変ドメインV Hにおいて、39位のアミノ酸は、Eで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。
30

【0161】

本明細書で報告される一態様は、二価二重特異性抗体であって、
a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに
b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖
を含み、
40

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG 2である二価二重特異性抗体である。

【0162】

a)の抗体は、b)で報告される改変を含有せず、a)の重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【0163】

b)の抗体では、
軽鎖内において、

可変軽鎖ドメインV Lは、前記抗体の可変重鎖ドメインH Vで交換されており、定常軽鎖ドメインC Lは、前記抗体の定常重鎖ドメインC H 1で交換されており、

並びに

10

20

30

40

50

重鎖内において、

可変重鎖ドメインVHは、前記抗体の可変軽鎖ドメインVLで交換されており、定常重鎖ドメインCH1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインCLで交換されている。

【0164】

本明細書で報告される一態様は、二価二重特異性抗体であって、

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、及び

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインCL及びCH1が互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖

を含み、

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二価二重特異性抗体である。

【0165】

a) の抗体は、b) で報告される改変を含有せず、a) の重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【0166】

b) の抗体では、

軽鎖内において、

定常軽鎖ドメインCLは、前記抗体の定常重鎖ドメインCH1で交換されており、
及び

重鎖内において、

定常重鎖ドメインCH1は、前記抗体の定常軽鎖ドメインCLで交換されている。

【0167】

本明細書で報告される一態様は、多重特異性抗体であって、

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2本の抗体重鎖及び2本の抗体軽鎖からなる全長抗体、並びに

b) 1~4つのさらなる抗原に特異的に結合する（すなわち、第2の及び/又は第3の及び/又は第4の及び/又は第5の抗原、好ましくは1つのさらなる抗原、すなわち第2の抗原に特異的に結合する）1つ、2つ、3つ又は4つの一本鎖Fabフラグメントを含み、

前記b) の一本鎖Fabフラグメントが、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端において、ペプチドリンカーを介して、前記a) の全長抗体に融合されており、
第1の抗原又はさらなる抗原の1つがヒトANG2である多重特異性抗体である。

【0168】

一実施態様では、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0169】

一実施態様では、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前記全長抗体の重鎖のC末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0170】

一実施態様では、第2の抗原に結合する1つ又は2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前記全長抗体の軽鎖のC末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0171】

一実施態様では、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前記全長抗体の各重鎖又は軽鎖のC末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0172】

一実施態様では、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前

10

20

30

40

50

記全長抗体の各重鎖のC末端において、ペプチドリンクを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0173】

一実施態様では、第2の抗原に結合する2つの同一の一本鎖Fabフラグメントは、前記全長抗体の各軽鎖のC末端において、ペプチドリンクを介して、前記全長抗体に融合されている。

【0174】

本明細書で報告される一態様は、三価二重特異性抗体であって、
a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2本の抗体重鎖及び2本の抗体軽鎖からなる全長抗体、

b)

b a) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)、

又は

b b) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体定常ドメイン1(CH1)
からなる第1のポリペプチドであって、

そのVHドメインのN末端において、ペプチドリンクを介して、前記全長抗体の2本の重鎖の一方のC末端に融合されている第1のポリペプチド、

c)

c a) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、

又は

c b) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体軽鎖定常ドメイン(CL)
からなる第2のポリペプチドであって、

VLドメインのN末端において、ペプチドリンクを介して、前記全長抗体の2本の重鎖の他方のC末端に融合されている第2のポリペプチド、

を含み、

並びに

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)が一緒になって、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、

並びに

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である三価二重特異性抗体である。

【0175】

一実施態様では、b)のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)及びc)のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)は、以下の位置間:

i) 重鎖可変ドメインの44位～軽鎖可変ドメインの100位、又は

i i) 重鎖可変ドメインの105位～軽鎖可変ドメインの43位、又は

i i i) 重鎖可変ドメインの101位～軽鎖可変ドメインの100位(ナンバリングは常に、KabatのEUインデックスに従う)

へのジスルフィド結合の導入による鎖間ジスルフィド架橋を介して連結及び安定化されている。

【0176】

安定化のための非天然ジスルフィド架橋を導入する技術は、例えば、国際公開公報第94/029350号、Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; 又はSchmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721に記載されている。一実施態様では、b)及びc)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意選択のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの44位と軽鎖可変ドメインの100位との間にある。一実施態様では、b)及びc)のポリペプチドの可変ドメイン間の任意選択のジスルフィド結合は、重鎖可変ドメインの105位と軽鎖可変ドメインの43位との間にある(ナンバリングは常に、KabatのEUインデックスに従う)。一実施態様では、一本鎖Fabフラグメントにおける可変ドメイ

10

20

30

40

50

ン V H と V L との間の前記任意選択のジスルフィド安定化を有しない三価二重特異性抗体が好ましい。

【 0 1 7 7 】

本明細書で報告される一態様は、三重特異性又は四重特異性抗体であって、
 a) 第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の第 1 の軽鎖及び第 1 の重鎖、並びに
 b) 第 2 の抗原に特異的に結合する全長抗体の第 2 の(改変)軽鎖及び第 2 の(改変)重鎖であって、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されている第 2 の(改変)軽鎖及び第 2 の(改変)重鎖、並びに
 を含み、

c) 1 つ又は 2 つのさらなる抗原(すなわち、第 3 の及び / 又は第 4 の抗原)に特異的に結合する 1 ~ 4 つの抗原結合ペプチドが、ペプチドリンカーを介して、a) 及び / 又は b) の軽鎖又は重鎖の C 末端又は N 末端に融合されており、
 第 1 の抗原又は第 2 の抗原又はさらなる抗原の 1 つがヒト A N G 2 である三重特異性又は四重特異性抗体である。

10

【 0 1 7 8 】

a) の抗体は、b) で報告される改変を含有せず、a) の重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【 0 1 7 9 】

一実施態様では、三重特異性又は四重特異性抗体は、c) において、1 つ又は 2 つのさらなる抗原に特異的に結合する 1 つ又は 2 つの抗原結合ペプチドを含む。

20

【 0 1 8 0 】

一実施態様では、抗原結合ペプチドは、s c F v フラグメント及び s c F a b フラグメントからなる群より選択される。

【 0 1 8 1 】

一実施態様では、抗原結合ペプチドは、s c F v フラグメントである。

【 0 1 8 2 】

一実施態様では、抗原結合ペプチドは、s c F a b フラグメントである。

【 0 1 8 3 】

一実施態様では、抗原結合ペプチドは、a) 及び / 又は b) の重鎖の C 末端に融合されている。

30

【 0 1 8 4 】

一実施態様では、三重特異性又は四重特異性抗体は、c) において、1 つのさらなる抗原に特異的に結合する 1 つ又は 2 つの抗原結合ペプチドを含む。

【 0 1 8 5 】

一実施態様では、三重特異性又は四重特異性抗体は、c) において、第 3 の抗原に特異的に結合する 2 つの同一の抗原結合ペプチドを含む。好ましい一実施態様では、このような 2 つの同一の抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドリンカーを介して、a) 及び b) の重鎖の C 末端に融合されている。好ましい一実施態様では、2 つの同一の抗原結合ペプチドは、s c F v フラグメント又は s c F a b フラグメントのいずれかである。

40

【 0 1 8 6 】

一実施態様では、三重特異性又は四重特異性抗体は、c) において、第 3 の及び第 4 の抗原に特異的に結合する 2 つの抗原結合ペプチドを含む。一実施態様では、前記 2 つの抗原結合ペプチドは両方とも、同じペプチドコネクターを介して、a) 及び b) の重鎖の C 末端に融合されている。好ましい一実施態様では、前記 2 つの抗原結合ペプチドは、s c F v フラグメント又は s c F a b フラグメントのいずれかである。

【 0 1 8 7 】

本明細書で報告される一態様は、二重特異性四価抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する(及び 2 つの F a b フラグメントを含む)抗体の 2 本の軽鎖及び 2 本の重鎖、

50

b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の2つのさらなるF a bフラグメントであって、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はN末端のいずれかに両方とも融合されている2つのさらなるF a bフラグメント

を含み、

並びに

該F a bフラグメントにおいて、以下の改変

i)

a)の両F a bフラグメントにおいて、又はb)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、並びに／又は定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

又は

i i) a)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、並びに定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

並びに

b)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、又は定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

又は

i i i) a)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、又は定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

並びに

b)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、並びに定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

又は

i v) a)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、並びにb)の両F a bフラグメントにおいて、定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、

又は

v) a)の両F a bフラグメントにおいて、定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されており、並びにb)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されている

が実施された二重特異性四価抗体である。

【0188】

一実施態様では、前記さらなるF a bフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端又はa)の重鎖のN末端のいずれかに融合されている。

【0189】

一実施態様では、前記さらなるF a bフラグメントは両方とも、ペプチドリンカーを介して、a)の重鎖のC末端のいずれかに融合されている。

【0190】

一実施態様では、前記さらなるF a bフラグメントは両方とも、ペプチドコネクターを介して、a)の重鎖のN末端に融合されている。

【0191】

一実施態様では、F a bフラグメントにおいて、以下の改変が実施されている：
i) a)の両F a bフラグメントにおいて、又はb)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、
並びに／又は

定常ドメインC L及びC H 1が互いに交換されている。

【0192】

一実施態様では、F a bフラグメントにおいて、以下の改変が実施されている：
i) a)の両F a bフラグメントにおいて、可変ドメインV L及びV Hが互いに交換されており、

10

20

30

40

50

並びに / 又は

定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されている。

【 0 1 9 3 】

一実施態様では、 F a b フラグメントにおいて、以下の改変が実施されている：

i)

a) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されている。

【 0 1 9 4 】

一実施態様では、 F a b フラグメントにおいて、以下の改変が実施されている：

i) b) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換され 10 てあり、

並びに / 又は

定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されている。

【 0 1 9 5 】

一実施態様では、 F a b フラグメントにおいて、以下の改変が実施されている：

i) b) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換さ 10 れている。

【 0 1 9 6 】

本明細書で報告される一態様は、二重特異性四価抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の抗体の（改変）重鎖であって、第 1 の V H - C H 1 ドメインペアを含み、前記第 1 の抗体の第 2 の V H - C H 1 ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して、前記重鎖の C 末端に融合されている（改変）重鎖、

b) 前記 a) の第 1 の抗体の 2 本の軽鎖、

c) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗体の（改変）重鎖であって、第 1 の V H - C L ドメインペアを含み、前記第 2 の抗体の第 2 の V H - C L ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して、前記重鎖の C 末端に融合されている（改変）重鎖、及び

d) 前記 c) の第 2 の抗体の 2 本の（改変）軽鎖であって、それぞれが C L - C H 1 ドメイ 20 インペアを含む 2 本の（改変）軽鎖

を含み、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原がヒト A N G 2 である二重特異性四価抗体である。

20

【 0 1 9 7 】

本明細書で報告される一態様は、二重特異性抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の全長抗体の重鎖及び軽鎖、並びに

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の全長抗体の重鎖及び軽鎖であって、該重鎖の N 末端が、ペプチドリンカーを介して、該軽鎖の C 末端に接続されている重鎖及び軽鎖、を含み、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原がヒト A N G 2 である二重特異性抗体である。

【 0 1 9 8 】

a) の抗体は、 b) で報告される改変を含有せず、重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

40

【 0 1 9 9 】

本明細書で報告される一態様は、二重特異性抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2 本の抗体重鎖及び 2 本の抗体軽鎖からなる全長抗体、並びに

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する F v フラグメントであって、V H ² ドメイン及び V L ² ドメインを含み、両ドメインが、ジスルフィド架橋を介して、互いに接続されている F v フラグメント

を含み、

該 V H ² ドメイン又は該 V L ² ドメインのいずれかのみが、ペプチドリンカーを介して、第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合されており、

50

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二重特異性抗体である。

【0200】

二重特異性抗体では、a)の重鎖及び軽鎖は、独立した鎖である。

【0201】

一実施態様では、VH²ドメイン及びVL²ドメインの他方は、ペプチドリンカーを介して、第1の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合されていない。

【0202】

本明細書で報告される全ての態様では、第1の軽鎖は、VLドメイン及びCLドメインを含み、第1の重鎖は、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。

10

【0203】

全ての態様の一実施態様では、本明細書で報告される抗体は、少なくとも2つの重鎖ポリペプチドのヘテロ多量体化を必要とする多重特異性抗体であって、ヒトANG2及び第2の非ヒトANG2抗原に特異的に結合する多重特異性抗体である。

【0204】

ヘテロ二量体化を支援するためのCH3改变のための複数アプローチは、例えば、国際公開公報第96/27011号、国際公開公報第98/050431号、欧州特許出願公開第1870459号、国際公開公報第2007/110205号、国際公開公報第2007/147901号、国際公開公報第2009/089004号、国際公開公報第2010/129304号、国際公開公報第2011/90754号、国際公開公報第2011/143545号、国際公開公報第2012/058768号、国際公開公報第2013/157954号、国際公開公報第2013/096291号（これらは、参照により本明細書に組み入れられる）に記載されている。典型的には、当技術分野で公知のアプローチでは、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインは両方とも、1つの操作CH3ドメインを含む重鎖が同じ構造の別の重鎖ともはやホモ二量体化し得ない（例えば、第1のCH3操作重鎖が、別の第1のCH3操作重鎖ともはやホモ二量体化し得ず、第2のCH3操作重鎖が別の第2のCH3操作重鎖ともはやホモ二量体化し得ない）ように相補的に操作されている。それにより、1つの操作CH3ドメインを含む重鎖は、相補的に操作されているCH3ドメインを含む別の重鎖と強制的にヘテロ二量体化される。本発明のこの実施態様では、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインは、第1の重鎖及び第2の重鎖が強制的にヘテロ二量体化されるのに対して、第1の重鎖及び第2の重鎖が（例えば、立体的な理由により）もはやホモ二量体化し得ないように、アミノ酸置換によって相補的に操作される。

20

【0205】

上記で引用されており、上記に挙げられている当技術分野で公知の重鎖ヘテロ二量体化を支援するための様々なアプローチは、本発明について上記されている特定のアミノ酸置換と組み合わせて、第1の抗原に特異的に結合する第1の抗体由来の「非交差Fab領域」と、第2の抗原に特異的に結合する第2の抗体由来の「交差Fab領域」とを含む本発明の多重特異性抗体に使用される異なる代替手段として企図される。

30

【0206】

本明細書で報告される多重特異性抗体のCH3ドメインは、例えば、国際公開公報第96/027011号、Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; 及びMerchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681に複数の例を用いてより詳細に記載されている「ノブ・イントゥ・ホール」技術により変化され得る。この方法では、2つのCH3ドメインの相互作用表面は、これら2つのCH3ドメインを含有する両重鎖のヘテロ二量体化を増加させるように変化される。（2本の重鎖の）2つの各CH3ドメインは「ノブ」であり得る一方、他のものは「ホール」である。ジスルフィド架橋の導入は、ヘテロ二量体をさらに安定化し(Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)、収量を増加させる。

40

50

【0207】

好みの一実施態様では、本明細書で報告される多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のC H 3ドメインにおいてT 3 6 6 W突然変異を含み、「ホール鎖」のC H 3ドメインにおいてT 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V突然変異を含む（ナンバリングは、KabatのE Uインデックスに従う）。例えば、Y 3 4 9 C突然変異を「ノブ鎖」のC H 3ドメインに導入し、E 3 5 6 C突然変異又はS 3 5 4 C突然変異を「ホール鎖」のC H 3ドメインに導入することによって、C H 3ドメイン間のさらなる鎖間ジスルフィド架橋も使用され得る（Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681）。したがって、別の好みの一実施態様では、本明細書で報告される多重特異性抗体は、2つのC H 3ドメインの一方においてY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を含み、2つのC H 3ドメインの他方においてE 3 5 6 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V突然変異を含み、又は本明細書で報告される多重特異性抗体は、2つのC H 3ドメインの一方においてY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を含み、2つのC H 3ドメインの他方においてS 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V突然変異を含む（一方のC H 3ドメインにおける、さらなるY 3 4 9 C突然変異、及び他方のC H 3ドメインにおけるさらなるE 3 5 6 C又はS 3 5 4 C突然変異は、鎖間ジスルフィド架橋を形成する）（ナンバリングは、KabatのE Uインデックスに従う）。

10

【0208】

しかし、あるいは又は加えて、欧州特許出願公開第1 8 7 0 4 5 9号に記載されている他のノブ・イン・ホール技術も使用され得る。一実施態様では、本明細書で報告される多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のC H 3ドメインにおいてR 4 0 9 D及びK 3 7 0 E突然変異を含み、「ホール鎖」のC H 3ドメインにおいてD 3 9 9 K及びE 3 5 7 K突然変異を含む（ナンバリングは、KabatのE Uインデックスに従う）。

20

【0209】

一実施態様では、本明細書で報告される多重特異性抗体は、「ノブ鎖」のC H 3ドメインにおいてT 3 6 6 W突然変異を含み、「ホール鎖」のC H 3ドメインにおいてT 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V突然変異を含み、加えて「ノブ鎖」のC H 3ドメインにおいてR 4 0 9 D及びK 3 7 0 E突然変異を含み、「ホール鎖」のC H 3ドメインにおいてD 3 9 9 K及びE 3 5 7 K突然変異を含む（ナンバリングは、KabatのE Uインデックスに従う）。

30

【0210】

一実施態様では、本明細書で報告される多重特異性抗体は、2つのC H 3ドメインの一方においてY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を含み、2つのC H 3ドメインの他方においてS 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V突然変異を含み、又は本明細書で報告される多重特異性抗体は、2つのC H 3ドメインの一方においてY 3 4 9 C及びT 3 6 6 W突然変異を含み、2つのC H 3ドメインの他方においてS 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 V突然変異を含み、加えて「ノブ鎖」のC H 3ドメインにおいてR 4 0 9 D及びK 3 7 0 E突然変異を含み、「ホール鎖」のC H 3ドメインにおいてD 3 9 9 K及びE 3 5 7 K突然変異を含む（ナンバリングは、KabatのE Uインデックスに従う）。

40

【0211】

「ノブ・イントゥ・ホール技術」とは別に、ヘテロ二量体化を強制するよう多重特異性抗体の重鎖のC H 3ドメインを改変するための他の技術は、当技術分野で公知である。これらの技術、特に、国際公開公報第9 6 / 2 7 0 1 1号、国際公開公報第9 8 / 0 5 0 4 3 1号、欧州特許出願公開第1 8 7 0 4 5 9号、国際公開公報第2 0 0 7 / 1 1 0 2 0 5号、国際公開公報第2 0 0 7 / 1 4 7 9 0 1号、国際公開公報第2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4号、国際公開公報第2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4号、国際公開公報第2 0 1 1 / 9 0 7 5 4号、国際公開公報第2 0 1 1 / 1 4 3 5 4 5号、国際公開公報第2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8号、国際公開公報第2 0 1 3 / 1 5 7 9 5 4号及び国際公開公報第2 0 1 3 / 0 9 6 2 9 1号に記載されているものは、本明細書で報告される多重特異性抗体と組み合わせて「ノ

50

ブ・イントウ・ホール技術」の代替手段として本明細書で企図される。

【0212】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、欧州特許出願公開第1870459号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。このアプローチは、逆電荷を有する電荷アミノ酸を、第1の及び第2の重鎖の両方の間のCH3/CH3ドメインインターフェイスの特定のアミノ酸位置に導入することに基づくものである。

【0213】

したがって、この実施態様は、本明細書で報告される多重特異性抗体であって、抗体の三次構造において、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインが、各抗体CH3ドメイン間に位置するインターフェイスを形成し、第1の重鎖のCH3ドメイン及び第2の重鎖のCH3ドメインの各アミノ酸配列がそれぞれ、抗体の三次構造において前記インターフェイス内に位置するアミノ酸のセットを含み、一方の重鎖のCH3ドメイン中のインターフェイスに位置するアミノ酸のセットから、第1のアミノ酸が正電荷アミノ酸で置換されており、他方の重鎖のCH3ドメイン中のインターフェイスに位置するアミノ酸のセットから、第2のアミノ酸が負電荷アミノ酸で置換されている多重特異性抗体に関する。この実施態様の多重特異性抗体は、本明細書では「CH3(+/-)操作多重特異性抗体」とも称される(「+/-」という略語は、各CH3ドメインに導入された逆電荷アミノ酸を表す)。

10

【0214】

本明細書で報告される前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正電荷アミノ酸は、K、R及びHから選択され、負電荷アミノ酸は、E又はDから選択される。

20

【0215】

本明細書で報告される前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正電荷アミノ酸は、K及びRから選択され、負電荷アミノ酸は、E又はDから選択される。

【0216】

本明細書で報告される前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、正電荷アミノ酸はKであり、負電荷アミノ酸はEである。

30

【0217】

本明細書で報告される前記CH3(+/-)操作多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、409位のアミノ酸Rは、Dで置換されており、位のアミノ酸Kは、Eで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、399位のアミノ酸Dは、Kで置換されており、357位のアミノ酸Eは、Kで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)。

【0218】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2013/157953号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Kで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸Lは、Dで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Kで置換されており、351位のアミノ酸Lは、Kで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸Lは、Dで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)。

40

【0219】

本明細書で報告される前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Kで置換されており、351位のアミノ酸Lは、Kで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸L

50

は、Dで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。加えて、以下の置換の少なくとも1つは、他方の重鎖のCH3ドメインに含まれる：349位のアミノ酸Yは、Eで置換されており、349位のアミノ酸Yは、Dで置換されており、368位のアミノ酸Lは、Eで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。一実施態様では、368位のアミノ酸Lは、Eで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

【0220】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2012/058768号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸Lは、Yで置換されており、407位のアミノ酸Yは、Aで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Aで置換されており、409位のアミノ酸Kは、Fで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

別の実施態様では、上記置換に加えて、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、411位（元々はT）、399位（元々はD）、400位（元々はS）、405位（元々はF）、390位（元々はN）及び392位（元々はK）のアミノ酸の少なくとも1つは、置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。好ましい置換は、

- N、R、Q、K、D、E及びWから選択されるアミノ酸による、411位のアミノ酸Tの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）、

- R、W、Y及びKから選択されるアミノ酸による、399位のアミノ酸Dの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）、

- E、D、R及びKから選択されるアミノ酸による、400位のアミノ酸Sの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）、

- I、M、T、S、V及びWから選択されるアミノ酸による、405位のアミノ酸Fの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）、

- R、K及びDから選択されるアミノ酸による、390位のアミノ酸Nの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）、並びに

- V、M、R、L、F及びEから選択されるアミノ酸による、392位のアミノ酸Kの置換（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）

である。

【0221】

（国際公開公報第2012/058768号にしたがって操作された）本明細書で報告される前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、351位のアミノ酸Lは、Yで置換されており、407位のアミノ酸Yは、Aで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Vで置換されており、409位のアミノ酸Kは、Fで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸Yは、Aで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Aで置換されており、409位のアミノ酸Kは、Fで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。前記の最後の上記実施態様では、前記他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、392位のアミノ酸Kは、Eで置換されており、411位のアミノ酸Tは、Eで置換されており、399位のアミノ酸Dは、Rで置換されており、400位のアミノ酸Sは、Rで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

【0222】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2011/143545号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の一実施態様では、両重鎖のCH3ドメイン中のアミノ酸改変は、368位及び/又

10

20

30

40

50

は409位に導入される（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

【0223】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2011/090762号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。国際公開公報第2011/090762号は、「ノブ・イントゥ・ホール」技術によるアミノ酸改変に関する。本明細書で報告される前記CH3（KiH）操作多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Wで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸Yは、Aで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。本明細書で報告される前記CH3（KiH）操作多重特異性抗体の別の実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、366位のアミノ酸Tは、Yで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、407位のアミノ酸Yは、Tで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

10

【0224】

IgG2アイソタイプである本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2011/090762号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。

【0225】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2009/089004号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、392位のアミノ酸K又はNは、負電荷アミノ酸で（好ましい一実施態様ではE又はDで、好ましい一実施態様ではDで）置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、399位のアミノ酸D、356位のアミノ酸E若しくはD、又は357位のアミノ酸Eは、正電荷アミノ酸（好ましい一実施態様ではK又はR、好ましい一実施態様ではKで、好ましい一実施態様では399位又は356位のアミノ酸は、Kで置換されている）で置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。さらなる一実施態様では、上記置換に加えて、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、409位のアミノ酸K又はRは、負電荷アミノ酸で（好ましい一実施態様ではE又はDで、好ましい一実施態様ではDで）置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。特にさらなる一実施態様では、上記置換に加えて、又は上記置換に代えて、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、439位のアミノ酸K及び/又は370位のアミノ酸Kは、負電荷アミノ酸で（好ましい一実施態様ではE又はDで、好ましい一実施態様ではDで）互いに独立して置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

20

【0226】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2007/147901号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。本明細書で報告される前記多重特異性抗体の一実施態様では、一方の重鎖のCH3ドメインにおいて、253位のアミノ酸Kは、Eで置換されており、282位のアミノ酸Dは、Kで置換されており、322位のアミノ酸Kは、Dで置換されており、他方の重鎖のCH3ドメインにおいて、239位のアミノ酸Dは、Kで置換されており、240位のアミノ酸Eは、Kで置換されており、292位のアミノ酸Kは、Dで置換されている（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

30

【0227】

本明細書で報告される多重特異性抗体の一実施態様では、国際公開公報第2007/110205号に記載されているアプローチは、多重特異性抗体の第1の重鎖及び第2の重鎖のヘテロ二量体化を支援するために使用される。

40

【0228】

50

本明細書で報告される全ての態様及び実施態様の一実施態様では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体又は三重特異性抗体である。本発明の好ましい一実施態様では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。

【0229】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、抗体は、二価又は三価抗体である。一実施態様では、抗体は、二価抗体である。

【0230】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、多重特異性抗体は、IgG型抗体の定常ドメイン構造を有する。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG1のものであるか、又は突然変異L234A及びL235Aを有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG2のものであることを特徴とする。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG3のものであることを特徴とする。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体がヒトサブクラスIgG4のものであるか、又はさらなる突然変異S228Pを有するヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異L234A及びL235Aを有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異L234A、L235A及びP329Gを有するヒトサブクラスIgG1のものであることを特徴とする（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異S228P及びL235Eを有するヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。本明細書で報告される全ての態様のさらなる一実施態様では、多重特異性抗体は、前記多重特異性抗体が、突然変異S228P、L235E及びP329Gを有するヒトサブクラスIgG4のものであることを特徴とする（ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う）。

10

20

30

40

【0231】

本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、本明細書で特定されるCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、さらなるC末端グリシン-リシンジペプチド(G446及びK447、ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)を含む。本明細書で報告される全ての態様の一実施態様では、本明細書で特定されるCH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、さらなるC末端グリシン残基(G446、ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)を含む。

【0232】

さらなる態様では、上記実施態様のいずれかの抗ANG2抗体は、以下のセクション1～5に記載されている特徴のいずれかを単独で又は組み合わせて取り込み得る。

【0233】

1. 抗体親和性

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、1μM以下、100nM以下又は10nM以下（例えば、 10^{-8} M以下）の解離定数（KD）を有する。

【0234】

KD値の決定方法は、以下の実施例に概説されている。

【0235】

BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用する場合、KD値は、以下の

50

ように代替的に測定され得る：ヒトANG2-RBD-Fc領域融合物に対する抗体又は抗体フラグメントの結合は、BIACORE T200 instrument (GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴によって調査され得る。GE Healthcareが供給するアミンカップリングキットを使用することによって、約4000RUの抗ヒト抗体(10μg/ml抗ヒトIgG(Fc)抗体；注文コードBR-1008-39; GE Healthcare)をSeries S CM5 chip (GE Healthcare BR-1005-30)上にpH5.0でカップリングする。固定化手順中のランニングバッファーとして、HBS-N(10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、GE Healthcare)を使用する。その後の動態特性評価では、サンプル及びランニングバッファーは、HBS-P(10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、0.05%界面活性剤P20; GE Healthcare)である。フローセルを25に設定し、サンプルブロックを12に設定し、動態特性評価前にランニングバッファーで2回プライミングする。
10

【0236】

1μg/ml溶液を流速5μl/分で30秒間注入することによって、ANG2-RBD-Fc領域融合物を捕捉する。300nMから開始して連続1:3希釈で、様々な濃度のCross-Fab溶液を流速90μl/分で90秒間注入することによって、会合を測定する。解離相を最大600秒モニタリングし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによってトリガーする。3M MgCl₂溶液を用いて流速5μl/分で洗浄して、全ての表面を60秒間再生する。抗ヒトIgG抗体(Fc)表面から得られた反応を減算することによって、バルク屈折率差を補正する。プランク注入も減算した(=二重参照)。KD及び他の動態パラメータの計算のために、ラングミュア1:1モデルを使用する。
20

【0237】

2. 抗体フラグメント

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体フラグメントである。抗体フラグメントとしては、限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及びscFvフラグメント並びに以下に記載される他のフラグメントが挙げられる。特定の抗体フラグメントの概説については、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照のこと。scFvフラグメントの概説については、例えば、Plueckthun, A., In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315を参照のこと。国際公開公報第93/16185号；米国特許第5,571,894号及び米国特許第5,587,458号も参照のこと。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含み、増加したin vivo半減期を有するFab及びF(ab')₂の考察については、米国特許第5,869,046号を参照のこと。
30

【0238】

ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えば、欧州特許出願公開第0404097号；国際公開公報第1993/011161号；Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134；及びHolliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照のこと。トリボディ及びテトラボディもまた、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134に記載されている。
40

【0239】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部又は軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む抗体フラグメントである。特定の実施態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516号を参照のこと)。

【0240】

抗体フラグメントは、限定されないが、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解消化及びリコンビナント宿主細胞(例えば、E. coli又はファージ)による産生を含む様々な技術によって作製され得る。
50

【0241】

3. キメラ及びヒト化抗体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号；及びMorrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ又は非ヒト靈長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

【0242】

特定の実施態様では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体をヒト化して、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を減少させる。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（又はその部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（又はその部分）がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、ヒト定常領域の少なくとも一部を場合により含むであろう。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）に由来する対応する残基で置換されている。

【0243】

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

【0244】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、限定されないが、「ベストフィット」法（例えば、Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308を参照のこと）を使用して選択されたフレームワーク領域；特定のサブグループの軽鎖可変領域又は重鎖可変領域のヒト抗体コンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及びPresta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632を参照のこと）；ヒト成熟（体細胞突然変異）フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域（例えば、Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633を参照のこと）；及びFRライブラリーのスクリーニングから得られたフレームワーク領域（例えば、Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及びRosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618を参照のこと）が挙げられる。

【0245】

4. 多重特異性抗体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、結合特異性の一方はANG2に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。特定の実施態様では、二重特異性抗体は、ANG2の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体はまた、ANG2を発現する細胞に細胞傷害剤を局限するために使用され得る。二重特異性抗体

10

20

30

40

50

は、全長抗体又は抗体フラグメントとして調製され得る。

【0246】

多重特異性抗体を作製するための技術としては、限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖・軽鎖ペアのリコンビナント同時発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540、国際公開公報第93/08829号及びTrauneker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659を参照のこと) 及び「ノブ・イン・ホール」操作(例えば、米国特許第5,731,168号を参照のこと)が挙げられる。多重特異性抗体はまた、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電気的ステアリング効果を操作すること(国際公開公報第2009/089004号)；2つ以上の抗体又はフラグメントを架橋すること(例えば、米国特許第4,676,980号及びBrennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83を参照のこと)；二重特異性抗体を生産するためのロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelnik, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553を参照のこと)；二重特異性抗体フラグメントを生産するための「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照のこと)；及び単鎖Fv(sFv)二量体を使用すること(例えば、Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374を参照のこと)；並びに例えばTutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作製され得る。

10

【0247】

「オクトパス抗体」を含む3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作抗体もまた、本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号を参照のこと)。

20

【0248】

本明細書における抗体又はフラグメントはまた、ANG2及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」又は「DAF」を含む(例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号を参照のこと)。

【0249】

本明細書における抗体又はフラグメントはまた、国際公開公報第2009/080251号、国際公開公報第2009/080252号、国際公開公報第2009/080253号、国際公開公報第2009/080254号、国際公開公報第2010/112193号、国際公開公報第2010/115589号、国際公開公報第2010/136172号、国際公開公報第2010/145792号及び国際公開公報第2010/145793号に記載されている多重特異性抗体を含む。

30

【0250】

5. 抗体変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。このような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、該残基中への挿入及び/又は該残基の置換が挙げられる。最終構築物が所望の特徴、例えば、抗原結合を示すことを条件として、最終構築物を得るために欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせを行い得る。

40

【0251】

a) 置換変異体、挿入変異体及び欠失変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。目的の置換突然変異誘発部位としては、HVR及びFRが挙げられる。保存的置換は、表の「好ましい置換」という項目に示されている。アミノ酸側鎖クラスについて以下にさらに記載されているように、より実質的な変更は、表1の「例示的な置換」という項目に提供されている。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、所望の活性、例えば、保持/改善された抗原結合、減少した免疫原性、又は改善されたADC若しくはCDCについて生成物を

50

スクリーニングし得る。

【表13】

表

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

10

20

20

30

【0252】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に基づいて分類され得る：

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

【0253】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うであろう。

【0254】

置換変異体の一種は、親抗体（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる研究のために選択される得られた変異体は、親抗体を基準として特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、増加した親和性、減少した免疫原性）を有し、及び／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換変異体は、例えば、ファージディスプレイに基づく親和性成熟技術、例えば本明細書に記載されるものを使用して簡便に作製され得る親和性成熟抗体である。簡潔に言えば、1つ以上のHVR残基を突然変異させ、変異体抗体をファージ上に提示させ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

40

【0255】

50

例えば、抗体親和性を改善するために、HVR中に変化（例えば、置換）を行い得る。HVR「ホットスポット」（すなわち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196を参照のこと）及び／又は抗原と接触する残基）において、このような変化を行い得、得られた変異体VH又は変異体VLを結合親和性について試験する。二次ライブラリーを構築し、それから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom, H.R. et al. in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施態様では、様々な方法（例えば、エラーブローンPCR、チーンシャッフリング又はオリゴスクレオチド指定突然変異誘発）のいずれかによつて、成熟のために選択された可変遺伝子に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを作製する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、同時に4～6個の残基）をランダム化するHVR特異的アプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に同定され得る。特に、CDR-H3及びCDR-L3がターゲティングされることが多い。

10

【0256】

特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、このような変化によって、抗体が抗原に結合する能力が実質的に減少しない限り、1つ以上のHVR内に存在し得る。例えば、結合親和性を実質的に減少させない保存的変化（例えば、本明細書で提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われ得る。このような変化は、例えば、HVR中の抗原接觸残基の外側にあり得る。上記で提供される変異体VH配列及び変異体VL配列の特定の実施態様では、各HVRは変化されないか、又は1個、2個、若しくは3個以下のアミノ酸置換を含有する。

20

【0257】

突然変異誘発のためにターゲティングされ得る抗体の残基又は領域を同定するために有用な方法は、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と称され、Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085に記載されている。この方法では、ターゲット残基の一残基又は一群（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの電荷残基）を同定し、中性又は負電荷アミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）で置換して、抗体と抗原の相互作用が影響を受けるかを決定する。さらなる置換は、最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入され得る。あるいは又は加えて、抗体と抗原の接觸点を特定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。このような接觸残基及び隣接残基は、置換の候補としてターゲティング又は排除され得る。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかを決定し得る。

30

【0258】

アミノ酸配列挿入としては、長さが1残基から100残基以上を含有するポリペプチドに及ぶアミノ末端融合及び／又はカルボキシル末端融合、並びに单一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、（例えば、ADEPTの）酵素又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの抗体のN末端又はC末端の融合が挙げられる。

40

【0259】

b) グリコシリ化変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシリ化される程度を増加又は減少させるように変化される。抗体へのグリコシリ化部位の付加又は欠失は、1つ以上のグリコシリ化部位が作製又は排除されるようにアミノ酸配列を変化させることによって、簡便に達成され得る。

【0260】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合している炭水化物が変化され得る。典型的には

50

、哺乳動物細胞によって產生されるネイティブな抗体は、F c 領域のC H 2 ドメインのA s n 2 9 7 にN 結合によって一般的に結合している分枝状の二分岐オリゴ糖を含む（例えば、Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32を参照のこと）。オリゴ糖としては、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) 、ガラクトース及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」中のG l c N A c に結合しているフコースが挙げられ得る。いくつかの実施態様では、特定の改善された特性を有する抗体変異体を作製するために、本発明の抗体中のオリゴ糖の改変が行われ得る。

【 0 2 6 1 】

一実施態様では、F c 領域に（直接的に又は間接的に）結合しているフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、このような抗体中のフコースの量は、1 % ~ 8 0 % 、1 % ~ 6 5 % 、5 % ~ 6 5 % 又は2 0 % ~ 4 0 % であり得る。フコースの量は、例えば国際公開公報第2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6号に記載されているように、M A L D I - T O F 質量分析法によって測定した場合に、A s n 2 9 7 に結合している全ての糖構造（例えば、複合体構造、ハイブリッド構造及び高マンノース構造）の合計に対するA s n 2 9 7 の糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。A s n 2 9 7 は、F c 領域における約2 9 7位（F c 領域残基のE U ナンバリング）に位置するアスパラギン残基を指す；しかしながら、A s n 2 9 7 はまた、抗体のわずかな配列変異により、2 9 7位からアミノ酸±約3 個上流又は下流に（すなわち、2 9 4位～3 0 0位）位置し得る。このようなフコシル化変異体は、改善されたA D C C 機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号を参照のこと。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例としては、米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号；国際公開公報第2 0 0 0 / 6 1 7 3 9号；国際公開公報第2 0 0 1 / 2 9 2 4 6号；米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4号；米国特許出願公開第2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2号；米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5号；国際公開公報第2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9号；国際公開公報第2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0号；国際公開公報第2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6号；国際公開公報第2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8号；国際公開公報第2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2号；国際公開公報第2 0 0 2 / 0 3 1 1 4 0号；Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622が挙げられる。脱フコシル化抗体を產生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化に欠陥があるL e c 1 3 C H O 細胞 (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545；米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号；及び国際公開公報第2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2号、特に実施例1 1) 及びノックアウト細胞株、例えば、- 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子F U T 8 ノックアウトC H O 細胞（例えば、Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688；及び国際公開公報第2 0 0 3 / 0 8 5 1 0 7号を参照のこと）が挙げられる。

【 0 2 6 2 】

分岐オリゴ糖を有する抗体変異体であって、例えば、抗体のF c 領域に結合している二分岐オリゴ糖がG l c N A c によって分岐されている抗体変異体が提供される。このような抗体変異体は、減少したフコシル化及び/又は改善されたA D C C 機能を有し得る。このような抗体変異体の例は、例えば、国際公開公報第2 0 0 3 / 0 1 1 8 7 8号；米国特許第6 , 6 0 2 , 6 8 4；及び米国特許出願公開第2 0 0 5 / 0 1 2 3 5 4 6号に記載されている。F c 領域に結合しているオリゴ糖において少なくとも1 つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善されたC D C 機能を有し得る。このような抗体変異体は、例えば、国際公開公報第1 9 9 7 / 3 0 0 8 7号；国際公開公報第1 9 9 8 / 5 8 9 6 4；及び国際公開公報第1 9 9 9 / 2 2 7 6 4号に記載

10

20

30

40

50

されている。

【0263】

c) Fc領域変異体

特定の実施態様では、1つ以上のアミノ酸改変を本明細書で提供される抗体のFc領域中に導入し、それによりFc領域変異体を作製し得る。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置においてアミノ酸改変（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域）を含み得る。

【0264】

特定の実施態様では、本発明は、全てではないが一部のエフェクター機能を有する（このことは、抗体のin vivo半減期が重要だが、特定のエフェクター機能（例えば、補体及びADCC）が不要又は有害な用途の望ましい候補にする）抗体変異体を企図する。CDC活性及び/又はADCC活性の減少/消失を確認するために、in vitro及び/又はin vivo細胞傷害性アッセイが行われ得る。例えば、抗体がFcRn結合を欠く（したがって、ADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRn結合能を保持することを保証するために、Fcレセプター（FcR）結合アッセイが行われ得る。ADCCを媒介する主な細胞であるNK細胞は、FcRIIAのみを発現するのに対して、単球は、FcRI、FcRIIA及びFcRIIAを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのin vitroアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; and Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502）を参照のこと；米国特許第5,821,337号（Buggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361を参照のこと）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法が用いられ得る（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（CellTechnology, Inc. Mountain View, CA；及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照のこと）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは又は加えて、目的の分子のADCC活性は、in vivoで、例えば、Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656に開示されている動物モデルにおいて評価され得る。抗体がC1qに結合することができないので、CDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合アッセイも行われ得る（例えば、国際公開公報第2006/029879号及び国際公開公報第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと）。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが実施され得る（例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; 及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743を参照のこと）。FcRn結合及びin vivoクリアランス/半減期の決定はまた、当技術分野で公知の方法を使用して実施され得る（例えば、Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006: 1759-1769を参照のこと）。

【0265】

減少したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238位、265位、269位、270位、297位、327位及び329位の1つ以上の置換を有するものが挙げられる（米国特許第6,737,056号）。このようなFc突然変異体としては、アミノ酸265位、269位、270位、297位及び327位の2つ以上において置換を有するFc突然変異体（アラニンへの残基265位及び297位の置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む）が挙げられる（米国特許第7,332,581号）。

【0266】

改善又は減弱したFcR結合性を有する特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開公報第2004/056312号及びShield

10

20

30

40

50

s, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604を参照のこと)。

【0267】

特定の実施態様では、抗体変異体は、ADCを改善する1つ以上のアミノ酸置換（例えば、Fc領域の298位、333位及び／又は334位（残基のEUナンバリング）における置換）を有するFc領域を含む。

【0268】

いくつかの実施態様では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開公報第99/51642号及びIdusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184に記載されているように、変化（すなわち、改善又は減弱のいずれか）したC1q結合及び／又は補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす変化が、Fc領域において行われる。

10

【0269】

増加した半減期及び改善された新生児Fcレセプター（FcRn）結合性（これは、胎児への母親のIgGの移行に関与する）を有する抗体（Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593及びKim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434）は、米国特許出願公開第2005/0014934号に記載されている。これらの抗体は、FcRnに対するFc領域の結合を改善する1つ以上の置換をその中に有するFc領域を含む。このようなFc変異体としては、Fc領域残基：238位、256位、265位、272位、286位、303位、305位、307位、311位、312位、317位、340位、356位、360位、362位、376位、378位、380位、382位、413位、424位又は434位の1つ以上において置換（例えば、Fc領域残基434位の置換）を有するものが挙げられる（米国特許第7,371,826号）。

20

【0270】

Fc領域変異体の他の例については、Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821；及び国際公開公報第94/29351号も参照のこと。

30

【0271】

d) システイン操作抗体変異体

特定の実施態様では、システイン操作抗体、例えば、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている「チオMAb」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施態様では、置換残基は、抗体のアクセス可能な部位に存在する。前記残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書にさらに記載されるように、薬物部分又はリンカー-薬物部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを作製するために使用され得る。特定の実施態様では、以下の残基の任意の1つ以上がシステインで置換され得る：軽鎖のV205（Kabatのナンバリング）；重鎖のA118（EUナンバリング）；及び重鎖Fc領域のS400（EUナンバリング）。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されているように作製され得る。

30

【0272】

e) 抗体誘導体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で公知であり、容易に入手可能なさらなる非タンパク性部分を含有するようさらに改変され得る。抗体の誘導体化に適切な部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定されないが、ポリエチレン glycol (PEG)、エチレン glycol / プロピレン glycol の共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダム共重合体のいずれか）及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレン glycol、プロピレン glycol ホモポリマー、プロリプロピレン (propylene) オキシド / エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物

40

50

が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中安定性により、製造に有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分枝状又は非分枝状であり得る。抗体に結合しているポリマーの数は変動し得、複数のポリマーが結合している場合、それらは、同じ分子又は異なる分子であり得る。一般的に、誘導体化のために使用されるポリマーの数及び／又は種類は、限定されないが、改善すべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が所定条件下の治療法で使用されるかなどを含む検討事項に基づいて決定され得る。

【0273】

別の実施態様では、抗体と、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る非タンパク性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク性部分は、カーボンナノチューブである (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線は、任意の波長のものであり得、限定されないが、普通の細胞を害しないが、抗体 - 非タンパク性部分の近くの細胞が殺傷される温度に非タンパク性部分を加熱する波長を含む。

10

【0274】

B. リコンビナント法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているリコンビナント法及びリコンビナント組成物を使用して生産され得る。一実施態様では、本明細書に記載される抗ANG2抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び／又はVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖）をコードし得る。さらなる実施態様では、このような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施態様では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。このような一実施態様では、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、それらでトランスフォーメーションされている）。一実施態様では、宿主細胞は、真核生物性、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はリンパ系細胞（例えば、Y0細胞、NS0細胞、Sp20細胞）である。一実施態様では、抗ANG2抗体を作製する方法であって、抗体の発現に適切な条件下で、上記で提供される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、及び場合により、宿主細胞（又は宿主細胞培地）から抗体を回収することを含む方法が提供される。

20

【0275】

抗ANG2抗体のリコンビナント生産では、例えば上記抗体をコードする核酸を単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニング及び／又は発現のために、1つ以上のベクターに挿入する。このような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離及び配列決定され得る。

30

【0276】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞としては、本明細書に記載される原核細胞又は真核細胞が挙げられる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が不要な場合には、細菌において生産され得る。細菌における抗体フラグメント及び抗体ポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号及び米国特許第5,840,523号を参照のこと。（E. coliにおける抗体フラグメントの発現が記載されているCharlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照のこと）。発現後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから抗体を単離し得、さらに精製し得る。

40

【0277】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物（そのグリコシル化経路が「ヒト

50

化」されており、その結果、部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体を产生する真菌株及び酵母株を含む)が、抗体コードベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; 及びLi, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215を参照のこと。

【0278】

グリコシル化抗体の発現のための適切な宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。特にSpodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と併せて使用され得る多数のバキュロウイルス株が同定されている。

【0279】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用され得る。例えば、米国特許第5,959,177号、米国特許第6,040,498号、米国特許第6,420,548号、米国特許第7,125,978号及び米国特許第6,417,429号(トランスジェニック植物において抗体を生産するためのPLANTIBODIES(商標)技術が記載されている)を参照のこと。

10

【0280】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合させた哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40でトランスフォーメーションされたサル腎臓CV1株(COS-7);ヒト胚性腎臓株(例えば、Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載されているHEK293又は293細胞);仔ハムスター腎臓細胞(BHK);マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載されているTM4細胞);サル腎臓細胞(CV1);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76);ヒト子宮頸部ガン細胞(HELA);イヌ腎臓細胞(MDCK);バッファローラット肝臓細胞(BRL3A);ヒト肺細胞(W138);ヒト肝臓細胞(HepG2);マウス乳房腫瘍(MMT060562);例えば、Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載されているTRI細胞;MRCS5細胞;及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞(Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHOC)細胞、並びにY0、NS0及びSp2/0などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体生産に適切な特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照のこと。

20

【0281】

C. アッセイ

本明細書で提供される抗ANG2抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイにより、その物理的/化学的特定及び/又は生物学的活性について同定、スクリーニング又は特性評価され得る。

30

【0282】

D. イムノコンジュゲート

40

本発明はまた、1つ以上の細胞傷害剤、例えば化学療法剤又は薬物、成長阻害剤、毒素(例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素活性毒素又はそのフラグメント)又は放射性同位体にコンジュゲートされている本明細書で報告される抗ANG2抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0283】

一実施態様では、イムノコンジュゲートは、抗体が、限定されないが、マイタンシノイド(米国特許第5,208,020号、米国特許第5,416,064号及び欧州特許第0425235号);アウリストチン、例えばモノメチルアウリストチン薬物部分DE及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5,635,483号、米国特許第5,780,588号及び米国特許第7,498,298号を参照のこと);ドラスタチン;カ

50

リチアマイシン又はその誘導体（米国特許第5,712,374号、米国特許第5,714,586号、米国特許第5,739,116号、米国特許第5,767,285号、米国特許第5,770,701号、米国特許第5,770,710号、米国特許第5,773,001号及び米国特許第5,877,296号；Hinman, L.M. et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342；及びLode, H.N. et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928を参考のこと）；アントラサイクリン、例えばダウノマイシン又はドキソルビシン（Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S.C., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362；Torgov, M.Y., et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721；Nagy, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834；Dubowchik, G.M., et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532；King, H.D., et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343；及び米国特許第6,630,579号を参考のこと）；メトトレキサート；ビンデシン；タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル及びオルタタキセル；トリコテシン；及びCC1065を含む1つ以上の薬物にコンジュゲートされている抗体-薬物複合体（ADC）である。
10

【0284】

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、(*Pseudomonas aeruginosa*由来の)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、*dianthin*タンパク質、*Phytolaca americana*タンパク質（PAPI、PAPII及びPA-P-S）、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonaria officinalis*阻害剤、ゲロニン、ミトグリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテシンを含む酵素活性毒素又はそのフラグメントにコンジュゲートされている本明細書に記載される抗体を含む。
20

【0285】

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性原子にコンジュゲートされているラジオコンジュゲートを形成する本明細書に記載される抗体を含む。様々な放射性同位体が、ラジオコンジュゲートの生産に利用可能である。例としては、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLu¹⁷⁵の放射性同位体が挙げられる。ラジオコンジュゲートが検出に使用される場合、それは、シンチグラフィ試験のための放射性原子、例えばTC^{99m}又はI¹²³、又は核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法、MRIとしても公知である）のためのスピン標識、例えば再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含み得る。
30

【0286】

抗体及び細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-サクシニミジル-3-(2-ピリジニルジチオ)プロピオナート(SPD P)、サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IFT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジトイミド酸ジメチルHC1）、活性エステル（例えば、スペリン酸ジサクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート）及びビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を使用して作製され得る。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta, E.S. et al., *Science* 238 (1987) 1098-1104に記載されるように調製され得る。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン5酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートするための例示的なキレート剤である。国際公開公報第94/11026号を参照のこと
40
50

。リンカーは、細胞における細胞傷害薬の放出を容易にする「切断可能リンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーやジスルフィド含有リンカーが使用され得る (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131 ; 米国特許第5,208,020号)。

【0287】

本明細書におけるイムノコンジュゲート又はADCは、限定されないが、(例えば、Perce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから)市販のBMPs、EMCs、GMBs、HBVs、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAb、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCs、スルホ-GMBS、スルホ-KMUs、スルホ-MBs、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC及びスルホ-SMPB及びS10VSB(サクシニミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾアート)を含む架橋リンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明確に企図するが、これらに限定されない。

【0288】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗ANG2抗体はいずれも、生物学的サンプル中のヒトANG2の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される「検出」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。

【0289】

一実施態様では、診断又は検出の方法に使用するための抗ANG2抗体が提供される。さらなる態様では、生物学的サンプル中のANG2の存在を検出する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、ANG2に対するANG2抗体の結合を可能にする条件下で、生物学的サンプルと本明細書に記載される抗ANG2抗体とを接触させること、及び抗ANG2抗体とANG2との間で複合体が形成されるかを検出することを含む。このような方法は、in vitro又はin vivo方法であり得る。一実施態様では、例えば、ANG2が、患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗ANG2抗体は、抗ANG2抗体による治療に適格な被験体を選択するために使用される。

【0290】

特定の実施態様では、標識抗ANG2抗体が提供される。標識としては、限定されないが、直接的に検出される標識又は部分(例えば、蛍光、発色団、高電子密度、化学発光及び放射性標識)、並びに例えば酵素反応又は分子相互作用により間接的に検出される酵素又はリガンドなどの部分が挙げられる。例示的な標識としては、限定されないが、放射線同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I、蛍光体、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-ホスファートデヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ(過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼとカップリングされている)、ビオチン/アビシン、スピノ標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカルなどが挙げられる。

【0291】

F. 医薬製剤

本明細書に記載される抗ANG2抗体の医薬製剤は、所望の純度を有するこのような抗体を1つ以上の任意選択の薬学的に許容し得る担体(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980))と混合することによって、凍結乾燥製剤又は水性液剤の形態で調製される。一般的に、薬学的に許容し得る担体は、用いられる投与量及び濃度においてレシピエントに非毒性であり、限定されないが、バッファー、例えばリン酸、クエン酸及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存

10

20

30

40

50

剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコール若しくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベン若しくはプロピルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサンオール；3-ペントノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満の）ポリベプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン若しくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリ（ビニルピロリドン）；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン若しくはリシン；グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む单糖、二糖及び他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；並びに／又は非イオン系界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。本明細書における例示的な薬学的に許容し得る担体としてはさらに、侵入型薬物分散剤、例えば可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhupH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）が挙げられる。rhupH20を含む特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び米国特許出願公開第2006/0104968号に記載されている。一態様では、SHASEGPは、1つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと組み合わせられる。

10

20

30

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

【0292】

本明細書における製剤はまた、処置される特定の適応症に必要な複数の有効成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有し得る。例えば、抗IL-1抗体又は抗PDGF-B抗体をさらに提供することが望ましい場合がある。このような有効成分は、意図される目的のために有効な量で組み合わせて適切に存在する。

【0294】

有効成分は、例えば、コアセルベーション技術によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル中に、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリラート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中に、又はマクロエマルジョン中に封入され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)に開示されている。

40

【0295】

徐放調製物が調製され得る。徐放調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスであって、造形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態の半透性マトリックスが挙げられる。

40

【0296】

一般的に、in vivo投与に使用すべき製剤は、滅菌されている。滅菌は、例えば、滅菌ろ過膜によるろ過によって容易に達成され得る。

50

【0297】

G . 治療方法及び組成物

本明細書で提供される抗ANG2抗体はいずれも、治療方法に使用され得る。

【0298】

一態様では、医薬として使用するための抗ANG2抗体が提供される。さらなる態様では、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症の処置に使用するための抗ANG2抗体が提供さ

れる。特定の実施態様では、処置方法に使用するための抗ANG2抗体が提供される。特定の実施態様では、本発明は、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を有する個体を処置する方法であって、有効量の抗ANG2抗体を該個体に投与することを含む方法に使用するための抗ANG2抗体を提供する。このような一実施態様では、該方法は、有効量の少なくとも1つのさらなる治療剤（例えば、下記）を個体に投与することをさらに含む。さらなる実施態様では、本発明は、血管新生の阻害に使用するための抗ANG2抗体を提供する。特定の実施態様では、本発明は、個体における血管新生を阻害する方法であって、有効量の抗ANG2抗体を該個体に投与して、血管新生を阻害することを含む方法に使用するための抗ANG2抗体を提供する。上記実施態様のいずれかの「個体」は、好ましくはヒトである。

10

【0299】

さらなる態様では、本発明は、医薬の製造又は調製における抗ANG2抗体の使用を提供する。一実施態様では、医薬は、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を処置するためのものである。さらなる実施態様では、医薬は、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を処置する方法であって、有効量の医薬を、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を有する個体に投与することを含む方法に使用するためのものである。このような一実施態様では、該方法は、有効量の少なくとも1つのさらなる治療剤（例えば、下記）を個体に投与することをさらに含む。さらなる実施態様では、医薬は、血管新生を阻害するためのものである。さらなる実施態様では、医薬は、個体における血管新生を阻害する方法であって、有効量の医薬を該個体に投与して、血管新生を阻害することを含む方法に使用するためのものである。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトであり得る。

20

【0300】

さらなる態様では、本発明は、眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を処置するための方法を提供する。一実施態様では、該方法は、有効量の抗ANG2抗体を、このような眼血管疾患、好ましくは黄斑変性症を有する個体に投与することを含む。このような一実施態様では、該方法は、有効量の少なくとも1つのさらなる治療剤（例えば、下記）を個体に投与することをさらに含む。上記実施態様のいずれかの「個体」は、ヒトであり得る。

【0301】

さらなる態様では、本発明は、個体における血管新生を阻害するための方法を提供する。一実施態様では、該方法は、有効量の抗ANG2抗体を個体に投与して、血管新生を阻害することを含む。一実施態様では、「個体」は、ヒトである。

30

【0302】

さらなる態様では、本発明は、例えば上記治療方法のいずれかに使用するための医薬製剤であって、本明細書で提供される抗ANG2抗体のいずれかを含む医薬製剤を提供する。一実施態様では、医薬製剤は、本明細書で提供される抗ANG2抗体のいずれか、及び薬学的に許容し得る担体を含む。別の実施態様では、医薬製剤は、本明細書で提供される抗ANG2抗体のいずれか、及び少なくとも1つのさらなる治療剤（例えば、下記）を含む。

【0303】

治療では、本発明の抗体は単独で、又は他の薬剤と組み合わせて使用され得る。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つのさらなる治療剤と同時投与され得る。特定の実施態様では、さらなる治療剤は、抗IL-1抗体又は抗PDGF-B抗体である。

40

【0304】

このような上記併用療法は、併用投与（この場合、2つ以上の治療剤が同じ製剤又は別個の製剤に含まれる）及び個別投与（この場合、1つ又は複数のさらなる治療剤の投与の前に、同時に及び／又は後に、本発明の抗体の投与を行い得る）を包含する。一実施態様では、抗ANG2抗体の投与及びさらなる治療剤の投与は、互いに約1カ月以内、又は約1、2若しくは3週間以内、又は約1、2、3、4、5、若しくは6日以内に行なわれる。

【0305】

50

本発明の抗体（及び任意のさらなる治療剤）は、非経口、静脈内、硝子体内、肺内及び鼻腔内、並びに局所処置の場合には所望により病変内投与を含む任意の適切な手段によって投与され得る。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が挙げられる。投薬は、任意の適切な経路による、例えば、投与が短時間又は慢性的であるかに部分的に応じて、静脈内又は皮下注射などの注射によるものであり得る。限定されないが、単回投与又は様々な時点の複数回投与、ボーラス投与及びパルス注入を含む様々な投薬スケジュールが本明細書で企図される。

【 0 3 0 6 】

本発明の抗体は、優れた医療行為と一致した様式で、製剤化、投薬及び投与されるであろう。これとの関連での検討要因としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理及び医療従事者に公知の他の要因が挙げられる。抗体は、必須ではないが場合により、問題の障害を予防又は治療するために現在使用される1つ以上の薬剤と共に製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の種類及び上記で考察されている他の要因に依存する。これらは、一般的に、本明細書に記載されるのと同じ投与量及び投与経路で、又は本明細書に記載される投与量の約1～99%、若しくは適切であると経験的／臨床的に決定される任意の投与量で及び任意の経路で使用される。

【 0 3 0 7 】

疾患の予防又は治療のために、（単独で又は1つ以上の他のさらなる治療剤と組み合わせて使用される場合の）本明細書で報告される抗体の適切な投与量は、処置すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的又は治療目的で投与されるか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への反応、並びに主治医の裁量に依存するであろう。抗体は、1回で又は一連の処置で患者に適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、1回以上の別個投与又は連續注入にかかわらず、約1μg/kg～50mg/kg（例えば、0.5mg/kg～30mg/kg）の抗体が、患者への投与のための初回候補投与量であり得る。1つの典型的な1日投与量は、上記要因に応じて、約1μg/kg～100mg/kg以上の範囲であり得る。症状に応じて数日間以上の反復投与では、処置は、一般的に、疾患症候の所望の抑制が起こるまで持続されるであろう。抗体の1つの例示的な投与量は、約0.05mg/kg～約10mg/kgの範囲内であろう。したがって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、10mg/kg、30mg/kg又は50mg/kg（又はそれらの任意の組み合わせ）の1つ以上の用量が患者に投与され得る。このような用量は、断続的に、例えば、毎週又は3週間毎に（例えば、患者が抗体の約2～約20、又は例えば、約6つの用量を受けるように）投与され得る。初回高ローディング用量とそれに続く1つ以上の低用量が投与され得る。しかしながら、他の投与量レジメンが有用であり得る。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

【 0 3 0 8 】

上記製剤化又は治療方法はいずれも、抗ANG2抗体の代わりに、又は抗ANG2抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを使用して行われ得ると理解される。

【 0 3 0 9 】

I I I . 製品

本発明の別の態様では、上記障害の治療、予防及び／又は診断に有用な材料を含む製品が提供される。製品は、容器と、該容器上の又は該容器に結合しているラベル又は添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなど様々な材料から形成され得る。容器は、組成物（これは、それ自体であるか、又は症状を治療、予防及び／若しくは診断するために有効な別の組成物と組み合わされている）を収容し、滅菌取出口を有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストップーを有する静注液バッグ又はバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択された症状を処置するために使用されることを示

10

20

30

40

50

す。また、製品は、(a)本発明の抗体を含む組成物がその中に含まれる第1の容器；及び(b)さらなる細胞傷害剤又は別の治療剤を含む組成物がその中に含まれる第2の容器を含み得る。本発明のこの実施態様の製品は、組成物が、特定の症状を処置するために使用され得ることを示す添付文書をさらに含み得る。あるいは又は加えて、製品は、注射用静菌水(BWFⅠ)、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容し得るバッファーを含む第2の(又は第3の)容器をさらに含み得る。それは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的観点及び使用者観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0310】

上記製品はいずれも、抗ANG2抗体の代わりに、又は抗ANG2抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ると理解される。10

【0311】

I V . 特定の実施態様

1. ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗体。

【0312】

2. ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗体。20

【0313】

3. (a)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様1～2のいずれか1つに記載の抗体。

【0314】

4. (a)配列番号：34のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：35のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：36のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様1～2のいずれか1つに記載の抗体。

【0315】

5. (a)配列番号：19のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、(b)配列番号：6若しくは配列番号：33のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、又は(c)(a)のVH配列及び(b)のVL配列を含む、実施態様1～4のいずれか1つに記載の抗体。30

【0316】

6. ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：38のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：39のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗体。

【0317】

7. ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、(a)配列番号：38のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号：40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号：41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、抗体。40

【0318】

8. (a)配列番号：43のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：44のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号：45のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、実施態様6～7のいずれか1つに記載の抗体。

【0319】

9. (a)配列番号：37のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、(b)配列番号：42のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、又は(c)(a)のVH配列及び(b)のVL配列を含む、実施態様6～8のいずれか1つに記載の抗体。50

【0320】

10. ヒトANG2に特異的に結合する抗体であって、
 i) 配列番号：19と70%超の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6と70%超の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み、
 ii) 重鎖可変ドメインにおいて28位にアミノ酸残基アスパラギン(N)、30位にアミノ酸残基アラニン(A)、100b位にアミノ酸残基プロリン(P)、及び100j位にアミノ酸残基アラニン(A)を有し、軽鎖可変ドメインにおいて51位にアミノ酸残基トレオニン(T)を有し(ナンバリングは、Kabatに従う)、
 iii) ヒトTie2を安定発現するHEK293細胞を使用した細胞系アッセイにおいて、Tie2リン酸化ELISAを使用して決定した場合に、そのレセプターTie2に対するANG2の結合の阻害について、配列番号：19と配列同一性を有する重鎖可変ドメイン、及び配列番号：6又は配列番号：33と配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体と比較して低いEC₅₀値を有する、抗体。

10

【0321】

11. 配列同一性が80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは95%超である、実施態様10に記載の抗体。

【0322】

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

20

【0323】

13. モノクローナル抗体である、実施態様1～12のいずれか1つに記載の抗体。

【0324】

14. 配列番号：28のVH配列及び配列番号：33のVL配列を含む、抗体。

【0325】

15. 配列番号：19のVH配列及び配列番号：24のVL配列を含む、抗体。

【0326】

16. 配列番号：37のVH配列及び配列番号：42のVL配列を含む、抗体。

【0327】

17. 二重特異性抗体である、実施態様1～16のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0328】

18. 二重特異性抗体がCrossMabである、実施態様17に記載の抗体。

【0329】

19. ヒトTie2レセプターに対するヒトANG2の結合を阻害することによって、ヒトANG2の生物学的活性を遮断する、実施態様1～18のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0330】

20. 二価二重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに
 b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖

40

を含み、

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二価二重特異性抗体である、実施態様1～19のいずれか1つに記載の抗体。

【0331】

21. i) a) の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が、リシン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)(ナンバリングは、Kabatに従う)で独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)で独立して)置換されており、a) の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)(ナンバリン

50

グは、KabatのEUインデックスに従う)で独立して置換されており、
又は

i i) b) の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸が、リシン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)(ナンバリングは、Kabatに従う)で独立して(好ましい一実施態様では、リシン(K)又はアルギニン(R)で独立して)置換されており、b) の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸又は213位のアミノ酸が、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)で独立して置換されている、実施態様20に記載の抗体。

【0332】

10

22 . 第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124位及び123位のアミノ酸がKで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)、実施態様20~21のいずれか1つに記載の抗体。

【0333】

23 . 第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147位及び213位のアミノ酸がEで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)、実施態様20~22のいずれか1つに記載の抗体。

【0334】

20

24 . 第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位及び123位のアミノ酸がKで置換されており、第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位及び213位のアミノ酸がEで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)、実施態様20~23のいずれか1つに記載の抗体。

【0335】

30

25 . 第2の重鎖の定常ドメインCLにおいて、124位及び123位のアミノ酸がKで置換されており、第2の軽鎖の定常ドメインCH1において、147位及び213位のアミノ酸がEで置換されており、第1の軽鎖の可変ドメインVLにおいて、38位のアミノ酸がKで置換されており、第1の重鎖の可変ドメインVHにおいて、39位のアミノ酸がEで置換されており、第2の重鎖の可変ドメインVLにおいて、38位のアミノ酸がKで置換されており、第2の軽鎖の可変ドメインVHにおいて、39位のアミノ酸がEで置換されている(ナンバリングは、KabatのEUインデックスに従う)、実施態様20~24のいずれか1つに記載の抗体。

【0336】

26 . 二価二重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに
b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の可変ドメインVL及びVHが互いに交換されており、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインCL及びCH1が互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖

を含み、

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二価二重特異性抗体である、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0337】

27 . 二価二重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに
b) 第2の抗原に特異的に結合する抗体の第2の軽鎖及び第2の重鎖であって、第2の軽鎖及び第2の重鎖の定常ドメインCL及びCH1が互いに交換されている第2の軽鎖及び第2の重鎖

を含み、

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である二価二重特異性抗体である、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

50

【0338】

28. 多重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2本の抗体重鎖及び2本の抗体軽鎖からなる全長抗体、並びに

b) 1~4つのさらなる抗原に特異的に結合する（すなわち、第2の及び／又は第3の及び／又は第4の及び／又は第5の抗原、好ましくは1つのさらなる抗原、すなわち第2の抗原に特異的に結合する）1つ、2つ、3つ又は4つの一本鎖Fabフラグメントを含み、

前記b)の一本鎖Fabフラグメントが、前記全長抗体の重鎖又は軽鎖のC末端又はN末端において、ペプチドリンカーを介して、前記a)の全長抗体に融合されており、

第1の抗原又はさらなる抗原の1つがヒトANG2である多重特異性抗体である、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0339】

29. 三価二重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2本の抗体重鎖及び2本の抗体軽鎖からなる全長抗体、

b)

b a) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)、

又は

b b) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び抗体定常ドメイン1(CH1)

20

からなる第1のポリペプチドであって、

そのVHドメインのN末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2本の重鎖の一方のC末端に融合されている第1のポリペプチド、

c)

c a) 抗体軽鎖可変ドメイン VL)、

又は

c b) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)及び抗体軽鎖定常ドメイン(CL)

30

からなる第2のポリペプチドであって、

VLDメインのN末端において、ペプチドリンカーを介して、前記全長抗体の2本の重鎖の他方のC末端に融合されている第2のポリペプチド、

を含み、

並びに

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)及び第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)が一緒になって、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、

並びに

第1の抗原又は第2の抗原がヒトANG2である三価二重特異性抗体である、実施態様1~19のいずれか1つに記載の抗体。

【0340】

30. b) のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(VH)及びc) のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)が、以下の位置間：

40

i) 重鎖可変ドメインの44位~軽鎖可変ドメインの100位、又は

ii) 重鎖可変ドメインの105位~軽鎖可変ドメインの43位、又は

iii) 重鎖可変ドメインの101位~軽鎖可変ドメインの100位(ナンバリングは常に、KabatのEUIインデックスに従う)

へのジスルフィド結合の導入による鎖間ジスルフィド架橋を介して連結及び安定化されている、実施態様29に記載の抗体。

【0341】

31. 三重特異性又は四重特異性抗体であって

a) 第1の抗原に特異的に結合する全長抗体の第1の軽鎖及び第1の重鎖、並びに

50

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する全長抗体の第 2 の（改変）軽鎖及び第 2 の（改変）重鎖であって、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されている第 2 の（改変）軽鎖及び第 2 の（改変）重鎖、並びに

を含み、

c) 1 つ又は 2 つのさらなる抗原（すなわち、第 3 の及び / 又は第 4 の抗原）に特異的に結合する 1 ~ 4 つの抗原結合ペプチドが、ペプチドリンカーを介して、a) 及び / 又は b) の軽鎖又は重鎖の C 末端又は N 末端に融合されており、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原又はさらなる抗原の 1 つがヒト A N G 2 である三重特異性又は四重特異性抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の抗体。

10

【 0 3 4 2 】

3 2 . 二重特異性四価抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する（及び 2 つの F a b フラグメントを含む）抗体の 2 本の軽鎖及び 2 本の重鎖、

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する抗体の 2 つのさらなる F a b フラグメントであって、ペプチドリンカーを介して、a) の重鎖の C 末端又は N 末端のいずれかに両方とも融合されている 2 つのさらなる F a b フラグメント

を含み、

並びに

該 F a b フラグメントにおいて、以下の改変

20

i) a) の両 F a b フラグメントにおいて、又は b) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに / 又は定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

又は

i i) a) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

並びに

b) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、又は定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

又は

i i i) a) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、又は定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

30

並びに

b) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

又は

i v) a) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されており、並びに b) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、

又は

v) a) の両 F a b フラグメントにおいて、定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに交換されており、並びに b) の両 F a b フラグメントにおいて、可変ドメイン V L 及び V H が互いに交換されている

が実施された二重特異性四価抗体である、実施態様 1 ~ 1 9 のいずれか 1 つに記載の抗体。

40

【 0 3 4 3 】

3 3 . 二重特異性四価抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の抗体の（改変）重鎖であって、第 1 の V H - C H 1 ドメインペアを含み、前記第 1 の抗体の第 2 の V H - C H 1 ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して、前記重鎖の C 末端に融合されている（改変）重鎖、

50

b) 前記 a) の第 1 の抗体の 2 本の軽鎖、

c) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗体の(改変)重鎖であって、第 1 の V H - C L ドメインペアを含み、前記第 2 の抗体の第 2 の V H - C L ドメインペアの N 末端が、ペプチドリンカーを介して、前記重鎖の C 末端に融合されている(改変)重鎖、及び

d) 前記 c) の第 2 の抗体の 2 本の(改変)軽鎖であって、それぞれが C L - C H 1 ドメインペアを含む 2 本の(改変)軽鎖

を含み、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原がヒト A N G 2 である二重特異性四価抗体である、実施態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 4 4 】

3 4 . 二重特異性抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の全長抗体の重鎖及び軽鎖、並びに

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の全長抗体の重鎖及び軽鎖であって、該重鎖の N 末端が、ペプチドリンカーを介して、該軽鎖の C 末端に接続されている重鎖及び軽鎖、を含み、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原がヒト A N G 2 である二重特異性抗体である、実施態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 4 5 】

3 5 . 二重特異性抗体であって

a) 第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体であって、2 本の抗体重鎖及び 2 本の抗体軽鎖からなる全長抗体、並びに

b) 第 2 の抗原に特異的に結合する F v フラグメントであって、V H ² ドメイン及び V L ² ドメインを含み、両ドメインが、ジスルフィド架橋を介して、互いに接続されている F v フラグメント

を含み、

該 V H ² ドメイン又は該 V L ² ドメインのいずれかのみが、ペプチドリンカーを介して、第 1 の抗原に特異的に結合する全長抗体の重鎖又は軽鎖に融合されており、

第 1 の抗原又は第 2 の抗原がヒト A N G 2 である二重特異性抗体である、実施態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 4 6 】

3 6 . 第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドを含み、

i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、

- ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- ヒト I g G 2 F c 領域ポリペプチド、

- ヒト I g G 3 F c 領域ポリペプチド、

- ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

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

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

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

10

20

30

40

50

- 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 K 3 9 2 D を有するヒト I g G 1、I g G 2 又は I g G 4、並びに
 - 突然変異 N 3 9 2 D を有するヒト I g G 3 を含む群から選択され、
- 並びに
- i i) 第 2 の F c 領域ポリペプチドが、
 - ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - ヒト I g G 2 F c 領域ポリペプチド、
 - ヒト I g G 3 F c 領域ポリペプチド、
 - ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチド、
 - 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト

10

20

30

40

50

I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト

I g G 1 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

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

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

- 突然変異 P 3 2 9 G を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

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

- 突然変異 P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト

I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 W を有するヒト

I g G 4 F c 領域ポリペプチド、

- 突然変異 D 3 9 9 K、D 3 5 6 K 及び / 又は E 3 5 7 K を有するヒト I g G 1、並びに

- 突然変異 D 3 9 9 K、E 3 5 6 K 及び / 又は E 3 5 7 K を有するヒト I g G 2、I g G 3 又は I g G 4

を含む群から選択される、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【 0 3 4 7 】

37. 第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドを含み、

i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i i i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i v) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト I g G 1 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、ヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

v i i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E を有するヒト I g G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

10

20

30

40

50

v i i i) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

i x) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、又は

x) 第 1 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、S 3 5 4 C、T 3 6 6 W を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドであり、第 2 の F c 領域ポリペプチドが、突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、P 3 2 9 G、Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V を有するヒト Ig G 4 F c 領域ポリペプチドである、実施態様 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。 10

【 0 3 4 8 】

3 8 . 第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドを含み、第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドにおいて、

i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A 及び H 4 3 5 A、又は

i i) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A 及び Y 4 3 6 A、又は

i i i) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D 及び L 4 3 2 D、又は

i v) i) ~ i i i) の組み合わせ

の突然変異の組み合わせを含む、実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。 20

【 0 3 4 9 】

3 9 . 第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドを含み、第 1 の及び第 2 の F c 領域ポリペプチドが両方とも、ヒト Ig G 1 又はヒト Ig G 4 サブクラスのものであり（ヒト起源に由来し）、総合すると、第 1 の及び第 2 の F c 領域ポリペプチドにおける突然変異の全ての結果として、突然変異 i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A 及び H 4 3 5 A、又は i i) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A 及び Y 4 3 6 A、又は i i i) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D 及び L 4 3 2 D が変異体（ヒト）Ig G クラス F c 領域に含まれることになるように、第 1 の F c 領域ポリペプチドにおいて、i) 群 I 2 5 3 A、H 3 1 0 A 及び H 4 3 5 A、又は i i) 群 H 3 1 0 A、H 4 3 3 A 及び Y 4 3 6 A、又は i i i) 群 L 2 5 1 D、L 3 1 4 D 及び L 4 3 2 D（ナンバリングは、Kabat の EU インデックスナンバリングシステムに従う）から選択される突然変異の 1 つ又は 2 つを含み、第 2 の F c 領域ポリペプチドにおいて、突然変異 L 2 5 1 D、I 2 5 3 A、H 3 1 0 A、L 3 1 4 D、L 4 3 2 D、H 4 3 3 A、H 4 3 5 A 及び Y 4 3 6 A（ナンバリングは、Kabat の EU インデックスナンバリングシステムに従う）を含む群から選択される突然変異の 1 つ又は 2 つを含み、 30

又は

b) 第 1 の及び第 2 の F c 領域ポリペプチドが両方とも、ヒト Ig G 1 又はヒト Ig G 4 サブクラスのものであり（すなわち、ヒト起源に由来し）、総合すると、第 1 の及び第 2 の F c 領域ポリペプチドにおける突然変異の全ての結果として、突然変異 i) I 2 5 3 A、H 3 1 0 A 及び H 4 3 5 A、又は i i) H 3 1 0 A、H 4 3 3 A 及び Y 4 3 6 A、又は i i i) L 2 5 1 D、L 3 1 4 D 及び L 4 3 2 D が該 F c 領域に含まれることになるよう、該 F c 領域において、突然変異 I 2 5 3 A / H 3 1 0 A / H 4 3 5 A 又は H 3 1 0 A / H 4 3 3 A / Y 4 3 6 A 又は L 2 5 1 D / L 3 1 4 D / L 4 3 2 D 又はそれらの組み合わせ（ナンバリングは、Kabat の EU インデックスナンバリングシステムに従う）を両方が含み、それにより、全ての突然変異が第 1 の若しくは第 2 の F c 領域ポリペプチド内にあるか、又は 1 つ若しくは 2 つの突然変異が第 1 の F c 領域ポリペプチド内にあり、1 つ若しくは 2 つの突然変異が第 2 の F c 領域ポリペプチド内にあり、

又は

c) 第 1 の及び第 2 の F c 領域ポリペプチドが両方とも、ヒト Ig G 1 又はヒト Ig G 4 50

サブクラスのものであり（すなわち、ヒト起源に由来し）、第1の及び第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異I253A/H310A/H435A又はH310A/H433A/Y436A又はL251D/L314D/L432D（ナンバリングは、KabatのEUインデックスナンバリングシステムに従う）を含むか、又は第1のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせI253A/H310A/H435Aを含み、第2のFc領域ポリペプチドにおいて、突然変異の組み合わせH310A/H433A/Y436A（ナンバリングは、KabatのEUインデックスナンバリングシステムに従う）を含む、実施態様1～37のいずれか1つに記載の抗体。

【0350】

40. 第1のFc領域ポリペプチド及び第2のFc領域ポリペプチドを含み、10
- a) 第1の変異体Fc領域ポリペプチドが第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドに由来し、第2の変異体Fc領域ポリペプチドが第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドに由来し、それにより、第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドが第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドと同一であるか又は異なり、並びに
 - b) 第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチドが第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドと異なるアミノ酸残基以外の1つ以上のアミノ酸残基において、第1の変異体Fc領域ポリペプチドが第2の変異体Fc領域ポリペプチドと異なり、並びに
 - c) 第1の変異体Fc領域ポリペプチド及び第2の変異体Fc領域ポリペプチドを含むIgGクラスFc領域が、a)の第1の親IgGクラスFc領域ポリペプチド及びa)の第2の親IgGクラスFc領域ポリペプチドを含むIgGクラスFc領域のものと異なるヒトFc-レセプター親和性を有し、20
- 第1のFc領域ポリペプチド若しくは第2のFc領域ポリペプチドのいずれか又は両Fc領域ポリペプチドが互いに独立して、以下の突然変異の1つ又は突然変異の組み合わせ：
- T307H、又は
 - Q311H、又は
 - E430H、又は
 - N434H、又は
 - T307H及びQ311H、又は
 - T307H及びE430H、又は
 - T307H及びN434A、又は30
 - T307H及びN434H、又は
 - T307Q及びQ311H、又は
 - T307Q及びE430H、又は
 - T307Q及びN434H、又は
 - T307H及びQ311H及びE430H及びN434A、又は
 - T307H及びQ311H及びE430H及びN434H、又は
 - T307H及びQ311H及びE430H及びN434Y、又は
 - T307Q及びQ311H及びE430H及びN434A、又は
 - T307Q及びQ311H及びE430H及びN434H、又は
 - T307Q及びQ311H及びE430H及びN434Y、又是40
 - T307Q及びV308P及びN434Y及びY436H、又は
 - T307H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - T307Q及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - Q311H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - E430H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - N434H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - T307H及びQ311H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - T307H及びE430H及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - T307H及びN434A及びM252Y及びS254T及びT256E、又は
 - T307H及びN434H及びM252Y及びS254T及びT256E、又是50

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

10
を含む、実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0 3 5 1】

4 1 . 第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドを含み、
 第 1 の F c 領域ポリペプチドが突然変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A 及び Y 4 0
 7 V (ホール鎖) を含み、第 2 の F c 領域ポリペプチドが突然変異 S 3 5 4 C 及び T 3 6
 6 W (ノブ鎖) を含み、

20

第 1 の F c 領域ポリペプチド (ホール鎖) が突然変異

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、及び

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

を含み、

第 1 の F c 領域ポリペプチド及び第 2 の F c 領域ポリペプチドが、1 つ以上のジスルフィド架橋によって接続されており、

第 1 のポリペプチドの C H 3 - ドメイン及び第 2 のポリペプチドの C H 3 - ドメインが両方ともプロテイン A に結合するか、又は両方ともプロテイン A に結合しない (ナンバリングは、Kabat の EU インデックスに従う)、実施態様 1 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。

30

【0 3 5 2】**4 2 . 突然変異**

i) I 2 5 3 A 若しくは I 2 5 3 G、及び

i i) L 3 1 4 A 若しくは L 3 1 4 G 若しくは L 3 1 4 D、及び

i i i) T 2 5 0 Q、及び / 又は

i v) T 2 5 6 E 若しくは T 2 5 6 A

を含む、実施態様 4 1 に記載の抗体。

40

【0 3 5 3】**4 3 . 突然変異**

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、並びに

i i) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D、並びに

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

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

を含む、実施態様 4 1 ~ 4 2 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0 3 5 4】**4 4 . 突然変異**

50

i) I 2 5 3 A 又は I 2 5 3 G、並びに
 ii) L 3 1 4 A 又は L 3 1 4 G 又は L 3 1 4 D、並びに
 iii) a) T 2 5 0 Q、及び / 又は T 2 5 6 E 若しくは T 2 5 6 A、並びに
 iv) a) L 2 5 1 A 若しくは L 2 5 1 G 若しくは L 2 5 1 D、及び / 又は b) H 3 1 0 A 若しくは H 3 1 0 G
 v) 場合により a) T 3 0 7 A 若しくは T 3 0 7 H 若しくは T 3 0 7 Q 若しくは T 3 0 7 P、及び / 又は b) Q 3 1 1 H、及び / 又は c) M 2 5 2 Y、及び / 又は d) S 2 5 4 T を含む、実施態様 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0355】

45. 突然変異

10

i) T 2 5 0 Q、及び / 又は
 ii) M 2 5 2 Y、及び / 又は
 iii) S 2 5 4 T、及び / 又は
 iv) T 2 5 6 E 若しくは T 2 5 6 A、及び / 又は
 v) T 3 0 7 A 若しくは T 3 0 7 H 若しくは T 3 0 7 Q 若しくは T 3 0 7 P、及び / 又は
 vi) Q 3 1 1 H
 を含む、実施態様 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0356】

46. a) 配列番号：5 7 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

20

b) 配列番号：5 8 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

c) 配列番号：5 9 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

d) 配列番号：6 0 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

e) 配列番号：6 1 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

f) 配列番号：6 2 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

30

g) 配列番号：6 3 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

h) 配列番号：6 4 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

i) 配列番号：6 5 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

j) 配列番号：4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：6 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

k) 配列番号：4 6 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：6 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

40

l) 配列番号：6 8 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

m) 配列番号：6 9 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：5 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

n) 配列番号：7 0 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

o) 配列番号：4 7 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

p) 配列番号：7 1 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：4 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

50

q) 配列番号：72のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

r) 配列番号：73のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

s) 配列番号：72のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

t) 配列番号：73のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

u) 配列番号：48のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

v) 配列番号：48のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

w) 配列番号：74のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

x) 配列番号：74のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

y) 配列番号：47のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

z) 配列番号：51のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a a) 配列番号：52のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：49のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a b) 配列番号：52のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a c) 配列番号：53のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a d) 配列番号：47のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：78のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a e) 配列番号：48のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：78のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a f) 配列番号：46のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号：50のアミノ酸配列を有する軽鎖、又は

a g) 配列番号：83のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号：81のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、配列番号：84のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、及び配列番号：82のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖、又は

a h) 配列番号：85のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号：81のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、配列番号：86のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、及び配列番号：82のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖、又は

a i) 配列番号：89のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号：87のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、配列番号：90のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、及び配列番号：88のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖、又は

a j) 配列番号：81のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号：87のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、配列番号：92のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、及び配列番号：88のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖

を含む、単離された抗体又は単離されたF(ab)フラグメント。

【0357】

47. 医薬として使用するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体。

【0358】

48. 眼血管疾患の処置に使用するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体。

10

20

30

40

50

【0359】

49. 眼疾患、特に眼血管疾患を処置するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体の使用。

【0360】

50. 眼疾患の処置に使用するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体。

【0361】

51. 眼疾患、特に眼血管疾患の処置に使用するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体。

【0362】

52. 眼血管疾患有する個体を処置する方法であって、有効量の実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体を該個体に投与することを含む、方法。

10

【0363】

53. 実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体を含む、医薬製剤。

【0364】

54. 眼血管疾患の処置に使用するための医薬製剤であって、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体を含む、医薬製剤。

【0365】

55. 眼血管疾患を処置するための医薬を製造するための、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体の使用。

20

【0366】

56. 実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体を、このような処置を必要とする患者に投与することによって、眼血管疾患を患っている患者を処置する方法。

【0367】

57. 抗体が硝子体内適用によって投与される、実施態様53～54のいずれか1つに記載の医薬製剤。

【0368】

58. 投与が硝子体内適用である、実施態様56～57のいずれか1つに記載の投与。

【0369】

59. 実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体をコードする、核酸。

30

【0370】

60. 実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体をコードする1つ以上の核酸を含む、細胞。

【0371】

61. 実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体を生産するための方法であって、以下の工程：

a) 場合により、実施態様1～46のいずれか1つに記載の抗体をコードする1つ以上の核酸で哺乳動物細胞をトランスフェクションすること、

b) 該細胞を培養して、該抗体を発現させること、及び

c) 該細胞又は培養培地から該抗体を回収し、それにより、該抗体を生産することを含む、方法。

40

【実施例】**【0372】****V. 実施例**

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上記で提供される一般的な説明を考慮して、様々な他の実施態様を実施し得ると理解される。

【0373】

材料及び方法

クローニング：

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を使用し

50

て、点突然変異を導入した。数個の単一コロニーを採取し、LB - Amp 培地 4 ml 中に移し、37℃で 16 ~ 18 時間培養した。遠心分離によって 2 ml を回収し、続いて、製造業者の説明書にしたがって High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用して、プラスミド調製を行った。配列決定による確認後、プラスミドを E. coli 細胞 (Agilent Technologies) にリトランスフォーメーションした。単一コロニーを LB - Amp 培地 2 ml に移し、37℃で 6 ~ 8 時間培養した。その後、この培養物 200 μl を使用して、振盪フラスコ中の LB - Amp 培地 150 ml に植菌した。培養物を 37℃、300 rpm で一晩インキュベーションし、続いて、遠心分離によって細胞を回収した。製造業者の説明書にしたがって HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を使用して、プラスミド調製を実施した。

10

【0374】

Cross Fab 及び Cross Mab - 骨格プラスミドにおける VH 領域及び VL 領域をそれぞれ交換することによる、制限部位を介したクローニングの鋳型として、突然変異 Cross Fab を使用した。同じ制限酵素ペアによる鋳型及び骨格プラスミドの消化後、混合物を 1% アガロースゲルに追加して、ドナー DNA (VH 又は VL 領域) 及びアクセプター DNA (プラスミド骨格) を単離した。その後、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて、アガロース片を精製した。その後、rAPid Alkaline Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) によってアクセプター DNA を脱リン酸化し、次いで、Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用することによってアクセプター DNA 及びドナー DNA をライゲーションした。ライゲーションした DNA を E. coli 細胞 (Agilent Technologies) にトランスフォーメーションした。

20

【0375】

一過性発現

125 ml 振盪フラスコ (37℃、7% CO₂、湿度 85%、135 rpm でインキュベーション / 振盪) 中で解凍した後、少なくとも 4 倍希釈することによって (容量 30 ml)、HEK293F 細胞 (Invitrogen) を継代した。

30

【0376】

細胞を容量 250 ml で細胞 3 × 10⁵ 個 / ml に増殖させた。3 日後、細胞を分け、1 リットル振盪フラスコ中、容量 250 ml、細胞 7 × 10⁵ 個 / ml の密度で新たに播種した。24 時間後、細胞約 1.4 ~ 2.0 × 10⁶ 個 / ml の細胞密度で、トランスフェクションを行った。

40

【0377】

トランスフェクションの前に、プラスミド - DNA 250 μg (軽鎖プラスミド 122 μg 及び重鎖プラスミド 128 μg) を、予熱 (水浴; 37℃) Opti-MEM 培地 (Gibco) によって最終容量 10 ml で希釈した。この溶液を穏やかに混合し、室温で 5 分間未満インキュベーションした。その後、293-free トランスフェクション試薬 333.3 μl を DNA - OptiMEM 溶液に追加した。この溶液を穏やかに混合し、室温で 15 ~ 20 分間インキュベーションした。全容量の混合物を、HEK 細胞培養容量 250 ml で 1 L 振盪フラスコに追加した。フラスコを、37℃、7% CO₂、湿度 85%、135 rpm で 6 日間又は 7 日間振盪 / インキュベーションした。1 回目の遠心分離工程 (2000 rpm、4℃、10 分間) によって、上清を回収した。2 回目の遠心分離工程 (4000 rpm、4℃、20 分間) のために、上清を新たな遠心分離フラスコに移した。その後、無細胞上清を、0.22 μm ポトルトップフィルターでろ過し、冷凍庫 (-20℃) 中で保存した。

50

【0378】

精製

MabSelectSure-Sepharose (商標) (GE Healthcare, Sweden) を使用してアフィニティーアンカーマトリグラーによって、細胞培養上清から、抗体及び Cross Mab C H 1 - C L を精製した一方、KappaSelect-Agarose (非 Fc 領域含有結合ドメイン用) (GE Healthcare, Sweden) を使用し、続いて、butyl-Sepharose (GE Healthcare, Sweden) を使用した

50

疎水性相互作用クロマトグラフィー及びSuperdex 200 size exclusion (GE Healthcare, Sweden)クロマトグラフィーによって、AAA突然変異を有するF ab、Cross F ab及びAng 2 VEGF Cross MAbを精製した。

【0379】

簡潔に言えば、PBSバッファー(10 mM Na₂HPO₄、1 mM KH₂PO₄、137 mM NaCl及び2.7 mM KCl、pH 7.4)で平衡化したMabSelectSuRe樹脂上の滅菌ろ過細胞培養上清から、抗体及びCross MAbを捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25 mMクエン酸ナトリウム、pH 3.0で溶出した。25 mMトリス、50 mM NaCl、pH 7.2で平衡化したKappaSelect樹脂上にF abを捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25 mMクエン酸ナトリウム、pH 2.9で溶出した。溶出した抗体又はF ab含有画分をプールし、2 Mトリス、pH 9.0で中和した。1.6 M硫酸アンモニウム溶液を最終濃度0.8 Mの硫酸アンモニウムに追加することによって、疎水性相互作用クロマトグラフィーのために、抗体 / F ab プールを調製した。酢酸を使用して、pHをpH 5.0に調整した。35 mM酢酸ナトリウム、0.8 M硫酸アンモニウム、pH 5.0でbutyl-Sepharose樹脂を平衡化した後、抗体を樹脂にアプライし、平衡化バッファーで洗浄し、0~35 mM酢酸ナトリウム、pH 5.0の直線勾配を使用して溶出した。二重特異性抗体 / 抗体又はF ab含有画分をプールし、20 mMヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0で平衡化したSuperdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden)カラムを使用したサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。それぞれ抗体又はF ab含有画分をプールし、Vivaspin ultrafiltration devices (Sartorius Stedim Biotech S.A., France)を使用して必要濃度に濃縮し、-80°で保存した。
10
20
20

【0380】

C E - S D S 分析

各精製工程後、microfluidic Labchip technology (Caliper Life Science, USA)を使用してC E - S D Sによって、抗体の純度及び完全性を分析した。したがって、製造業者の説明書にしたがってHT Protein Express Reagent Kitを使用して、分析物溶液5 μlを調製し、HT Protein Express Chipを使用してLabChip GXII systemによって分析した。LabChip GX Softwareを使用して、データを分析した。

【0381】

実施例 1

アンジオポエチン2 (ANG2)に結合する交差抗体 (Cross Mab) 及び交差抗体 F abフラグメント (Cross F ab)。

方法のセクションに記載されているように分子生物学技術によってクローニングすることによって、交差抗体 (Cross Mab) 又は交差フラグメント抗原結合 (Cross F ab)を作製し、上記のようにHEK293細胞において一過性発現させた。

【0382】

CDRにおいて特定の点突然変異を有する作製した抗体及びF abの一般的スキームを表1に示す。表1に示されているアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使用して、交差抗体及び交差F abを発現させた。

30

20

30

【表 14】

表 1: 本明細書で報告される抗 ANG2 CrossFab のアミノ酸配列.

分子	突然変異 VH	VH-X 配列番号	突然変異 VL	VL-X 配列番号
XAng2-0009	wt	46	wt	49
XAng2-0015	S108P	57	wt	49
XAng2-0017	S-S 架橋 S55C- D100BC	59	wt	49
XAng2-0021	G100JA	60	wt	49
XAng2-0026	T28N, T30A	62	wt	49
XAng2-0029	S108P, G100JA	65	wt	49
XAng2-0033	T28N, S108P, G100JA	68	wt	49
XAng2-0041	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	wt	49
XAng2-0075	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	50
XAng2-0090	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	50
XAng2-0098	wt	51	wt	49
XAng2-0099	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	wt	49
XAng2-0100	G100JA, S108P, T28N, T30A	52	D50T	50
XAng2-0101	G100JA, S108P, T28N, T30A, D100BE	53	D50T	50
Xang2-0154	wt	46	wt	77
XAng2-0155	T30A, T28N, S108P, G100JA	47	D50T	78

10

20

30

40

分子	突然変異 VH	VH-X 配列番号	突然変異 VL	VL-X 配列番号
XAng2-0156	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	48	D50T	78
XAng2-0157	wt (Ang2i-LC06)	46	D50T	50

10

【0383】

実施例 2

アンジオポエチン - 2 (ANG2) 及び血管内皮成長因子 (VEGF) に結合する交差二価二重特異性抗体であって、ANG2 結合において CH1 - CL ドメイン交換 (Cross Mab^{CH1 / CL}) を有する交差二価二重特異性抗体

ANG2 Fab アームにおいて CH1 - CL 交差を有する ANG2 - VEGF Cross Mab^{CH1 - CL} を、上記のように分子生物学技術によってクローニングすることによって作製し、上記のように EK293 細胞において一過性発現させた。

【0384】

CDRにおいて特定の点突然変異を有する作製した ANG2 - VEGF Cross Mab^{CH1 - CL} の一般的なスキームを表2に示す。表2に示されているアミノ酸配列をコードする核酸を含有する発現プラスミドを使用して、ANG2 - VEGF Cross Mab^{CH1 - CL} を発現させた。

20

【表15】

表2: 本明細書で報告される抗 ANG2/VEGF 二重特異性二価 CrossMab^{CH1-CL}のアミノ酸配列.

分子	ANG2 結合部位				VEGF 結合部位	
	突然変異 VH	<VH-CL- CH2- CH3> 配 列番号	突然変異 VL	<VL- CH1> 配 列番号	HC 配列 番号	LC 配列 番号
Xang2-0162	wt	79	wt	80	81	82
Xang2-0163	T30A, T28N, S108P, G100JA	83	D50T	84	81	82
Xang2-0164	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	85	D50T	86	81	82
Xang2-0165	T30A, T28N, S108P, G100JA	89	D50T	90	87	88
Xang2-0166	T30A, T28N, S108P, G100JA, D100BS	91	D50T	92	87	88
Xang2-0167	wt	93	wt	94	87	88

【0385】

全ての構築物について、第1のCH3ドメインにおいて典型的なノブ(T366W)突然変異、及び第2のCH3ドメインにおいて対応するホール突然変異(T366S、L368A及びY407V)（及び、導入した2つのさらなるシステイン残基S354C/Y349C）（対応する上記各重鎖(HC)配列に含まれる）を用いて、ノブ・イントウ・ホールヘテロ二量体化技術を使用した。

【0386】

実施例3

HEK細胞におけるANG2結合CrossFab、抗体及びAng2-VEGF CrossMab^{CH1-CL}のトランスフェクション及び一過性発現

トランスフェクション試薬293-free (Novagen)を用いた、懸濁液適合HEK293F(FreeStyle 293-F細胞; Invitrogen)細胞における抗体の一過性発現。

【0387】

125ml振盪フラスコ(37°C、7%CO₂、湿度85%、135rpmでインキュベーション/振盪)中で解凍した後、少なくとも4倍希釀することによって(容量30ml)、細胞を継代した。

【0388】

細胞を容量250mlで細胞3×10⁵個/mlに増殖させた。3日後、細胞を分け、1リットル振盪フラスコ中、容量250ml、細胞7×10⁵個/mlの密度で新たに播種した。

10

20

30

40

50

24時間後、細胞約 $1.4 \sim 2.0 \times 10^6$ 個/mlの細胞密度で、トランスフェクションを行う。

【0389】

トランスフェクションの前に、プラスミド-DNA 250 µg(軽鎖122 µg及び重鎖128 µg)を、予熱(水浴；37℃)Opti-MEM(Gibco)によって最終容量10mlで希釈する。この溶液を穏やかに混合し、室温で5分間未満インキュベーションする。次いで、293-freeトランスフェクション試薬333.3 µlをDNA-OptiMEM溶液に追加する。この溶液を穏やかに混合し、室温で15～20分間インキュベーションする。全容量の混合物を、HEK細胞培養容量250mlで1L振盪フラスコに追加する。

【0390】

37℃、7%CO₂、湿度85%、135rpmで6日間又は7日間振盪/インキュベーションした。

【0391】

1回目の遠心分離工程(2000rpm、4℃、10分間)によって、上清を回収する。次いで、2回目の遠心分離(4,000rpm、4℃、20分間)のために、上清を新たな遠心分離フラスコに移す。その後、無細胞上清を、0.22 µmボトルトップフィルターでろ過し、冷凍庫(-20℃)中で保存する。

【0392】

実施例4

HEK上清からのFab精製

抗体を含有する細胞培養上清をろ過し、2回のクロマトグラフィー工程によって精製した。Kappa Select(GE Healthcare)を使用してアフィニティークロマトグラフィーによって、AAA突然変異を有するCross Fab及びCross Mabを捕捉し、さらなるHIC及びSECクロマトグラフィー工程によってポリッシュした。詳細については、上記材料及び方法を参照のこと。

【0393】

実施例5

HEK上清からのCross Mab_{CH1-CL}精製

培養上清をろ過し、3回のクロマトグラフィー工程によって精製した。HiTrap MabSelectSuRe(GE Healthcare)を使用してアフィニティークロマトグラフィーによって、抗体を捕捉し、HIC及びSECクロマトグラフィー工程でポリッシュした。Biomax-SK membraneを備えるUltrafree-CL centrifugal filter unit(Millipore, Billerica, MA)を用いて、抗体含有溶液を濃縮し、-80℃で保存した。

【0394】

実施例6

Cross Fab及びCross Mab_{CH1-CL}調製物の分析

アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を使用して、280nmの光学密度(OD)を測定することによって、調製物のタンパク質濃度を決定した。

【0395】

Protein Express Chip及びHT Protein Express Reagents Kitと共にLabChip GX II(PerkinElmer)を使用してCE-SDSによって、抗体の純度及び完全性を分析した。

【0396】

ランニングバッファーとして2×PBS、pH7.4を使用したTSK-GEL G3000SWXLを使用して高速SECによって、又はランニングバッファーとして200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄、250 mM KC1、pH7.0を使用したBioSuite High Resolution SEC, 250, 5 µm analytical size-exclusion column(Waters GmbH)を使用して高速SECによって、抗体調製物の凝集物含量を決定した。

【0397】

実施例7

抗体からのFabフラグメントの調製及び分析

10

20

30

40

50

抗体 1 2 mg (2 0 mM ヒスチジン、 1 4 0 mM NaCl、 pH 6 . 0 中 1 mg/ml) を、 L - システイン溶液 2 4 0 μ l (Merck Millipore ; 2 0 mM ヒスチジン、 1 4 0 mM NaCl、 pH 6 . 0 中 2 5 0 mM) 及びパパイン 3 2 7 μ l (Roche Life Science ; 0 . 0 0 1 U/mg 抗体) と共に 3 7 ℃ で 1 2 0 分間インキュベーションした。切断後、インタクトな IgG 及び Fc フラグメントの除去のために、 PBS (1 mM KH₂PO₄、 1 0 mM Na₂HPo₄、 1 3 7 mM NaCl、 2 . 7 mM KCl) 、 pH 7 . 4 で平衡化した HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) を使用したアフィニティークロマトグラフィーを使用した。続いて、第 2 の精製工程として Superdex 200 (商標) (GE Healthcare) によるサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、 MabSelectSuRe クロマトグラフィーのフロースルーハウジングをさらに精製した。 2 0 mM ヒスチジンバッファー、 0 . 1 4 M NaCl 、 pH 6 . 0 中で、 サイズ排除クロマトグラフィーを実施した。 Biomax-SK membrane を備える Ultrafree -CL centrifugal filter unit (Millipore, Billerica, MA) を用いて、 Fab フラグメント含有溶液を濃縮し、 - 8 0 ℃ で保存した。

10

【 0 3 9 8 】

アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を使用して、 2 8 0 nm の光学密度 (OD) を測定することによって、 Fab フラグメントのタンパク質濃度を決定した。

【 0 3 9 9 】

還元剤 (5 mM 1 , 4 - ジチオトレイトル) の存在下及び非存在下における SDS - PAGE (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) 並びに Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) による染色によって、 Fab フラグメントの純度及び完全性を分析した。

20

【 0 4 0 0 】

ランニングバッファーとして 2 0 0 mM KH₂PO₄ / KH₂PO₄ 、 2 5 0 mM KCl 、 pH 7 . 0 を使用した BioSuite High Resolution SEC, 250 ℓ , 5 μ m analytical size-exclusion column (Waters GmbH) を使用して高速 SEC によって、 Fab 調製物の凝集物含量を決定した。

【 0 4 0 1 】

実施例 8

成熟 Cross - Fab の ANG 2 結合動態及び交差反応性

BIACORE T200 instrument (GE Healthcare) を使用して表面プラズモン共鳴によって、ヒト ANG 2 - RBD - Fc 領域融合物に対する成熟 Cross - Fab の結合を調査した。 GE Healthcare が供給するアミンカップリングキットを使用することによって、約 4 0 0 0 RU の抗ヒト抗体 (1 0 μ g/ml 抗ヒト IgG (Fc) 抗体 ; 注文コード BR-1008-39; GE Healthcare) を Series S CM5 chip (GE Healthcare BR-1005-30) 上に pH 5 . 0 でカップリングした。固定化手順中のランニングバッファーとして、 HBS - N (1 0 mM HEPES 、 1 5 0 mM NaCl 、 pH 7 . 4 、 GE Healthcare) を使用した。その後の動態特性評価では、サンプル及びランニングバッファーは、 HBS - P (1 0 mM HEPES 、 1 5 0 mM NaCl 、 pH 7 . 4 、 0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0 ; GE Healthcare) であった。フローセルを 2 5 ℓ に設定し、サンプルプロックを 1 2 ℓ に設定し、動態特性評価前にランニングバッファーで 2 回プライミングした。

30

【 0 4 0 2 】

1 μ g/ml 溶液を流速 5 μ l / 分で 3 0 秒間注入することによって、ヒト又はカニクイザル ANG 2 - RBD - Fc 領域融合物を捕捉した。 3 0 0 nM から開始して連続 1 : 3 希釈で、様々な濃度の Cross - Fab 溶液を流速 9 0 μ l / 分で 9 0 秒間注入することによって、会合を測定した。解離相を最大 6 0 0 秒モニタリングし、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることによってトリガーした。 3 M MgCl₂ 溶液を用いて流速 5 μ l / 分で洗浄して、全ての表面を 6 0 秒間再生した。抗ヒト IgG 抗体 (Fc) 表面から得られた反応を減算することによって、バルク屈折率差を補正した。プランク注入も減算した (=二重参照) 。 KD 及び他の動態パラメータの計算のために、ラングミュア 1 : 1 モデルを使用した。

40

【 0 4 0 3 】

50

実施例 9

生物学的活性

該方法は、そのレセプター T i e 2 に対する A N G 2 の結合を阻害する抗体の能力を決定する。細胞表面上における T i e 2 レセプターチロシンキナーゼの発現のために、H E K 2 9 3 細胞株（ヒト胚性腎臓細胞株）をヒト T i e 2 の発現ベクターで安定トランスクレクションして、細胞株 H E K 2 9 3 _ T i e 2 を得た。

【 0 4 0 4 】

T i e 2 レセプターに結合し、該レセプターの自己リン酸化を誘導する A N G 2 で、該細胞を刺激する。本明細書で報告される抗 A N G 2 抗体の追加によって、T i e 2 に対する結合を阻害し得る。E L I S A によって、リン酸化の程度を分析する。O D 値はリン酸化 T i e 2 の量と相関し、抗体濃度に対してプロットする。E C ₅₀ 値を決定し、同じプレート上の参照標準と比べた相対的生物学的活性（R B A）として報告する。
10

【 0 4 0 5 】

ヒト T i e 2 レセプターに対する抗体で、マルチウェルプレートをコーティングした（1 0 μg/ml の 1 0 0 μl；R&D Systems, Cat# MAB3132；9 6 ウェル Maxisorb イムノプレートを室温で一晩インキュベーションし；コーティングプレートを容量 2 5 0 μl で 3 回洗浄し；その後、ブロッキング 2 0 0 μl と共に室温で 1 ~ 2 時間インキュベーション）。

【 0 4 0 6 】

別途、H E K 2 9 3 _ T i e 2 細胞（4 0 μl；細胞 5 × 1 0 ⁶ 個 / ml；D M E M / F 1 2 ）を、問題の抗体及び A N G 2 （R&D Systems, Cat# 623-CF）のプレインキュベーションした連続希釈混合物（8 0 μl）に追加した。1 0 分後、細胞を溶解し（溶解バッファー 6 0 μl を追加し、1 5 分間インキュベーション）、細胞溶解物を E L I S A 用のコーティングプレートに移した。
20

【 0 4 0 7 】

溶解物の T i e 2 レセプターは、捕捉抗 T i e 2 抗体に結合する（溶解物 1 0 0 μl；室温で 9 0 分間インキュベーション）。ビオチンにコンジュゲートされている抗ホスホチロシン抗体（1 0 0 μl；0 . 3 μg/ml 抗ホスホチロシン抗体、clone 4G10（登録商標）、ビオチンコンジュゲート、Upstate, Cat# 16-103；室温で 6 0 分間インキュベーション）によって、T i e 2 レセプター上のリン酸化チロシンを検出した。ストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート（1 0 0 μl；1 0 0 mU/ml；Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat# 11089153001；室温で 3 0 分間インキュベーション）によって、ビオチン残基を結合させた。ペルオキシダーゼ基質 T M B（1 0 0 μl；Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat# 11835033001）を追加し、5 ~ 1 0 分後に、光学密度を 4 5 0 nm で測定した。
30

【 0 4 0 8 】

実施例 1 0

化学分解試験

サンプルを 3 つのアリコートに分け、それぞれ 2 0 mM H i s / H i s * H C l、1 4 0 mM N a C l、p H 6 . 0 又は P B S に再緩衝し、4 0 °C (H i s / N a C l) 又は 3 7 °C (P B S) で保存した。コントロールサンプルを - 8 0 °C で保存した。
40

【 0 4 0 9 】

インキュベーションの終了後、相対的活性濃度（BIAcore）、凝集（S E C）及びフラグメンテーション（キャピラリー電気泳動又は S D S - P A G E）についてサンプルを分析し、未処理コントロールと比較した。

【 0 4 1 0 】

実施例 1 1

熱安定性

2 0 mM ヒスチジン / 塩化ヒスチジン、1 4 0 mM N a C l、p H 6 . 0 中で、サンプルを濃度 1 mg/mL で調製し、0 . 4 μm フィルタープレートによる遠心分離によって光学 3 8 4 ウェルプレートに移し、パラフィン油で覆った。サンプルを 0 . 0 5 °C / 分の速度で 2 5
50

から 80 に加熱する間に、DynaPro Plate Reader (Wyatt)による動的光散乱によって、流体力学的半径を反復測定した。

【0411】

あるいは、サンプルを 10 μL マイクロキュベットアレイに移し、それらを 0.1 / 分の速度で 25 から 90 に加熱する間に、静的光散乱データ、及び 266 nm レーザーによる励起時の蛍光データを、Optim1000 instrument (Avacta Inc.)で記録した。

【0412】

凝集開始温度は、流体力学的半径 (DLS) 又は散乱光強度 (Optim1000) が増加し始める温度と定義する。

【0413】

あるいは、サンプルを 9 μL マルチキュベットアレイに移した。Optim1000 instrument (Avacta Analytical Inc.)で、マルチキュベットアレイを 0.1 / 分の一定速度で 35 から 90 に加熱した。この機器は、約 0.5 ごとのデータ点で、266 nm レーザーの散乱光強度を連続的に記録する。光散乱強度を温度に対してプロットした。凝集開始温度 (T_{agg}) は、散乱光強度が増加し始める温度と定義する。

【0414】

融解温度は、波長グラフに対する蛍光強度の変曲点と定義する。

【0415】

理解を明確にするために、例示及び実施例によって、上記本発明を幾分詳細に説明したが、該説明及び実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に引用される全ての特許及び科学文献の開示は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。

【配列表】

2017534644000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP2015/075876
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/075876

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 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:

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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 practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/040508 A9 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BAEHNER MONIKA [DE]; BRINKMANN ULRICH [DE]; GE) 21 April 2011 (2011-04-21) page 24; claim 8 example 6 ----- WO 2014/177460 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 6 November 2014 (2014-11-06) page 13, line 25 - line 30 ----- -/-	1-16
Y		1-16 -/-

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent 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 citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring 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 combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
--

18 February 2016

08/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/075876

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MARKUS THOMAS ET AL: "A Novel Angiopoietin-2 Selective Fully Human Antibody with Potent Anti-Tumoral and Anti-Angiogenic Efficacy and Superior Side Effect Profile Compared to Pan-Angiopoietin-1/-2 Inhibitors", PLOS ONE, vol. 8, no. 2, E54923, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 1-11, XP055106057, DOI: 10.1371/journal.pone.0054923 the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
Y	<p>KYRIAKOS P. PAPADOPOULOS ET AL.: "A phase I first-in-human study of REGN910 (SAR307746), a fully human and selective angiopoietin-2 (Ang2) monoclonal antibody (MAB), in patients with advanced solid tumor malignancies. Abstract 2517.", ASCO Annual Meeting.</p> <p>, 2013, XP002738464, Retrieved from the Internet: URL:http://meetinglibrary.asco.org/print/155681 [retrieved on 2015-04-15]</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-16
X,P	<p>WO 2015/107026 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US])</p> <p>23 July 2015 (2015-07-23)</p> <p>page 126 - page 127</p> <p>examples 6,7</p> <p>-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/075876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010040508 A9	21-04-2011	AR 073775 A1 AU 2009301431 A1 BR P10919663 A2 CA 2739122 A1 CN 102753577 A CN 103936860 A CO 6351794 A2 CR 20110166 A DK 2344537 T3 EC SP11010969 A EP 2344537 A1 EP 2781526 A1 EP 2792687 A1 ES 2455217 T3 HK 1172354 A1 HK 1199265 A1 HR P20140376 T1 IL 211729 A JP 5368570 B2 JP 2012504943 A JP 2014039549 A KR 20110055726 A KR 20130118994 A MA 32712 B1 NZ 591602 A PE 04252011 A1 PT 2344537 E RU 2011117410 A SG 195536 A1 SI 2344537 T1 TW 201018485 A TW 201334788 A US 2010111967 A1 US 2012321627 A1 US 2015004166 A1 WO 2010040508 A1	01-12-2010 15-04-2010 01-12-2015 15-04-2010 24-10-2012 23-07-2014 20-12-2011 03-06-2011 10-02-2014 31-05-2011 20-07-2011 24-09-2014 22-10-2014 15-04-2014 24-10-2014 26-06-2015 23-05-2014 29-10-2015 18-12-2013 01-03-2012 06-03-2014 25-05-2011 30-10-2013 02-10-2011 29-06-2012 01-07-2011 09-05-2014 20-12-2012 30-12-2013 30-05-2014 16-05-2010 01-09-2013 06-05-2010 20-12-2012 01-01-2015 15-04-2010
WO 2014177460 A1	06-11-2014	AU 2014261630 A1 CA 2904806 A1 CN 105143262 A EP 2992012 A1 KR 20160002858 A PE 18072015 A1 SG 11201508911P A TW 201446799 A WO 2014177460 A1	17-09-2015 06-11-2014 09-12-2015 09-03-2016 08-01-2016 02-12-2015 27-11-2015 16-12-2014 06-11-2014
WO 2015107026 A1	23-07-2015	NONE	

International Application No. PCT/ EP2015/ 075876

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2(completely); 1, 4-16(partially)

Concerns aspects related to an anti-ANG2 antibody that binds specifically to ANG2, wherein the antibody comprises the heavy chain HVRs defined in claim 1 and the light chain HVRs defined in claim 2 i.e. a VH of SEQ ID NO: 19 and a VL of SEQ ID NO: 6.

2. claims: 3(completely); 1, 4-16(partially)

Concerns aspects related to an anti-ANG2 antibody that binds specifically to ANG2, wherein the antibody comprises the heavy chain HVRs defined in claim 1 and the light chain HVRs defined in claim 3 i.e. a VH of SEQ ID NO: 19 and a VL of SEQ ID NO: 33.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ジョルジュ , ギー

ドイツ国、8 2 3 9 2 ハーバッハ、アム・ベルクグラーベン 1 1

(72)発明者 ケッテンベルガー , フーベルト

ドイツ国、8 1 3 6 9 ミュンヘン、パッサウアー・シュトラーセ 3 0

(72)発明者 レグラ , イエルク・トーマス

ドイツ国、8 1 3 7 7 ミュンヘン、インナーコフラーシュトラーセ 1 7 ・ベー

(72)発明者 モルケン , イエルク

ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、オシエツキーシュトラーセ 2

(72)発明者 モルホイ , ミヒヤエル

ドイツ国、8 0 6 8 6 ミュンヘン、ファヒナーシュトラーセ 7 アー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01

4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 BB50 CC02 CC23 DD62 EE01 EE03

GG02 GG03 GG04 GG06

4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74