

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-202994
(P2019-202994A)

(43) 公開日 令和1年11月28日(2019. 11. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46 ZNA	4B064
C07K 16/22 (2006.01)	C07K 16/22	4B065
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 Z	4C076
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-87553 (P2019-87553)
 (22) 出願日 令和1年5月7日(2019.5.7)
 (62) 分割の表示 特願2017-42516 (P2017-42516) の分割
 原出願日 平成25年10月31日(2013.10.31)
 (31) 優先権主張番号 61/721,072
 (32) 優先日 平成24年11月1日(2012.11.1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/787,927
 (32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (特許庁注：以下のものは登録商標)
 1. TWEEN

(71) 出願人 512212195
 アッヴィ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、
 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ
 ード・1
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ジョナサン・エイ・ヒクソン
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、
 レイク・ピラ、ノースウィンド・レイン・
 725
 (72) 発明者 ディアナ・エル・ハーシュ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60030、
 グレイズレイク、ベル・ヘブン・ドライブ
 ・1414
 最終頁に続く

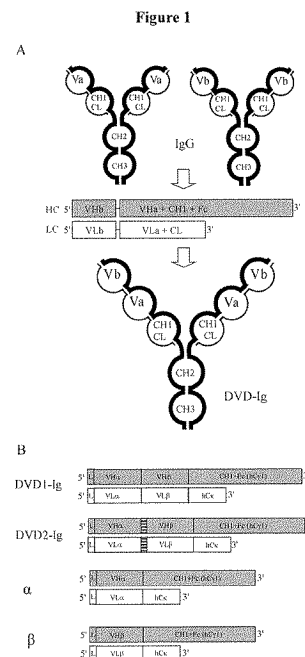
(54) 【発明の名称】抗VEGF/DLL4二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびこれらの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】抗VEGF/DLL4二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびこれらの使用の提供。

【解決手段】VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)nを含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、Cは、重鎖定常ドメインであり、X1は、リンカーであり、但し、CH1ではなく、X2は、Fc領域であり、nは、0または1であり、該結合タンパク質は、DLL4とVEGFに結合する。また、該結合タンパク質は、癌、腫瘍および/または異常なDLL4および/もしくはVEGF発現または活性によって特徴付けられる他の血管新生依存性疾患の診断、監視、阻害、予防および/または処置において使用される。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

- VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、
- VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、
- Cは、重鎖定常ドメインであり、
- X1は、リンカーであり、但し、CH1ではなく、
- X2は、Fc領域であり、
- nは、0または1であり、

10

結合タンパク質が、DLL4とVEGFに結合し、VD1およびVD2が、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53からの3つのCDRを独立して含み、VD1および/またはVD2の少なくとも1つが、配列番号39からの3つのCDRを含む結合タンパク質。

【請求項 2】

VD1およびVD2が、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53を独立して含み、VD1および/またはVD2の少なくとも1つが配列番号39を含む、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

20

- VD1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
- VD2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
- Cは、軽鎖定常ドメインであり、
- X1は、リンカーであり、但し、CH1またはCLではなく、
- X2は、Fc領域を含まず、
- nは、0または1であり、

結合タンパク質が、DLL4とVEGFに結合し、VD1およびVD2が、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54からの3つのCDRを独立して含み、VD1および/またはVD2の少なくとも1つが、配列番号40からの3つのCDRを含む結合タンパク質。

30

【請求項 4】

VD1およびVD2が、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54を独立して含み、VD1および/またはVD2の少なくとも1つが配列番号40を含む、請求項3に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

重鎖および/もしくは軽鎖上の(X1)_nが(X1)₀であり、ならびに/または重鎖および/もしくは軽鎖上の(X2)_nが(X2)₀である、請求項1または3に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

40

第一のポリペプチド鎖および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第一のポリペプチド鎖が、第一のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含み、

- VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、
- VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、
- Cは、重鎖定常ドメインであり、
- X1は、リンカーであり、但し、CH2ではなく、
- X2は、Fc領域であり、
- nは、0または1であり、

第二のポリペプチド鎖が、第二のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含み、

- VD1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

50

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
C は、軽鎖定常ドメインであり、
X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 または C L ではなく、
X 2 は、F c 領域を含まず、
n は、0 または 1 であり、

結合タンパク質が、D L L 4 と V E G F に結合し、V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1 または 5 3 からの 3 つの C D R を独立して含み、V D 1 および / または V D 2 重鎖可変ドメインの少なくとも 1 つが、配列番号 3 9 からの 3 つの C D R を含み、V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 または 5 4 からの 3 つの C D R を独立して含み、V D 1 および / または V D 2 軽鎖可変ドメインの少なくとも 1 つが、配列番号 4 0 からの 3 つの C D R を含む結合タンパク質。

10

【請求項 7】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1 または 5 3 を独立して含み、V D 1 および / または V D 2 重鎖可変ドメインの少なくとも 1 つが、配列番号 3 9 を含み、V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 または 5 4 を独立して含み、V D 1 および / または V D 2 軽鎖可変ドメインの少なくとも 1 つが、配列番号 4 0 を含む、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

X 1 が、配列番号 1 - 3 8 のいずれか 1 つまたは G / S ベースの配列を含む、請求項 1、3 または 6 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 9】

結合タンパク質が、2 つの第一のポリペプチド鎖と 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

F c 領域が、可変配列 F c 領域である、請求項 1、3 または 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D 由来の F c 領域である、請求項 1、3 または 6 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 12】

第一のポリペプチド鎖の V D 1 と第二のポリペプチド鎖の V D 1 が、それぞれ、異なる第一および第二の親抗体またはこれらの結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

第一のポリペプチド鎖の V D 2 と第二のポリペプチド鎖の V D 2 が、それぞれ、異なる第一および第二の親抗体またはこれらの結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 14】

第一および第二の親抗体が、同一の標的または異なる標的上の異なるエピトープに結合する、請求項 1 2 または 1 3 に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 15】

第一の親抗体またはその結合部分が、第二の親抗体またはその結合部分が第二の標的に結合する効力とは異なる効力で第一の標的に結合する、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 16】

第一の親抗体またはその結合部分が、第二の親抗体またはその結合部分が第二の標的に結合する親和性とは異なる親和性で第一の標的に結合する、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

50

【請求項 17】

4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、2つのポリペプチド鎖が、VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含み、

VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは、重鎖定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、但し、CH1ではなく、

X2は、Fc領域であり、

nは、0または1であり、

2つのポリペプチド鎖が、VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含み、

VD1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

Cは、軽鎖定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、但し、CH1またはCLではなく、

X2は、Fc領域を含まず、

nは、0または1であり、

結合タンパク質が、DLL4とVEGFに結合し、VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53からの3つのCDRを独立して含み、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つが、配列番号39からの3つのCDRを含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54からの3つのCDRを独立して含み、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つが、配列番号40からの3つのCDRを含む結合タンパク質。

【請求項 18】

VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53を独立して含み、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つが、配列番号39を含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54を独立して含み、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つが、配列番号40を含む、請求項17に記載の結合タンパク質。

【請求項 19】

表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のVEGFおよび/またはDLL4に対する結合速度定数(K_{on})を有する、請求項1、3、6または17に記載の結合タンパク質。

【請求項 20】

表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-2} s^{-1} ；最大約 10^{-3} s^{-1} ；最大約 10^{-4} s^{-1} ；最大約 10^{-5} s^{-1} ；または最大約 10^{-6} s^{-1} のVEGFおよび/またはDLL4に対する解離速度定数(K_{off})を有する、請求項1、3、6または17に記載の結合タンパク質。

【請求項 21】

表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-7} M ；最大約 10^{-8} M ；最大約 10^{-9} M ；最大約 10^{-10} M ；最大約 10^{-11} M ；または最大約 10^{-12} M のVEGFおよび/またはDLL4に対する平衡解離定数(K_D)を有する、請求項1、3、6または17に記載の結合タンパク質。

【請求項 22】

請求項1、3、6または17に記載の結合タンパク質を含む結合タンパク質コンジュゲートであって、結合タンパク質コンジュゲートが薬剤をさらに含み、薬剤が、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 23】

造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである、請求項 22 に記載の結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 24】

結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項 1、3、6 または 17 に記載の結合タンパク質。

【請求項 25】

請求項 1、3、6、17 または 22 に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の単離された核酸を含むベクター。

10

【請求項 27】

p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3 . 1 T O P O、p E F 6 T O P O、p H y b E、p B O S または p B J である、請求項 26 に記載のベクター。

【請求項 28】

請求項 26 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 29】

宿主細胞が、原核細胞である、請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 30】

宿主細胞が、真核細胞である、請求項 28 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 31】

真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞または真菌細胞である、請求項 30 に記載の宿主細胞。

【請求項 32】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培地中で培養することを含む、結合タンパク質を産生する方法。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の方法によって産生されるタンパク質。

【請求項 34】

請求項 1、3、6、17、22 または 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

30

【請求項 35】

少なくとも 1 つの追加の薬剤をさらに含む、請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

追加の薬剤が、免疫接着分子、造影剤、治療剤、細胞毒性剤、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、ビオチン、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤、化学療法剤；造影剤、血管新生阻害剤、共刺激阻害剤、キナーゼ阻害剤（限定されないが、K D R および T I E - 2 阻害剤を含む。）、共刺激分子調節剤（限定されないが、抗 B 7 . 1、抗 B 7 . 2、C T L A 4 - I g、抗 C D 2 0 を含む。）、接着分子遮断剤（限定されないが、抗 L F A - 1 抗体、抗 E / L セレクチン抗体、小分子阻害剤を含む。）、抗 V E G F m A b；抗 D L L 4 m A b；抗サイトカイン抗体またはその機能的断片（限定されないが、抗 I L - 1 8、抗 T N F または抗 I L - 6 / サイトカイン受容体抗体を含む。）、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、F K 5 0 6、検出可能な標識またはレポーター、T N F アンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬（N S A I D）、鎮痛剤、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化剤、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、

40

50

ベータアゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、抗高血圧薬、利尿薬、アドレナリン受容体アンタゴニスト、カルシウムチャネル遮断薬、レニン阻害剤、ACE阻害剤、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、血管拡張剤、アルファ-2アゴニスト、クロニジン、メチルドーパ、ヒドララジン、プラゾシン、レセルピン、モキシソニジン、グアンファシン、ペリンドプリルノインドパミド、ロフェキシジン、メチロシン、抗凝固薬、ワーファリン、ヘパリン、低分子量ヘパリン、ダルテパリン、アルガトロバン、ビバリルジン、レピルジンおよびデキストロースの少なくとも1つを含む、請求項35に記載の医薬組成物。

【請求項37】

追加の薬剤が、13-cis-レチノイン酸；2-CdA；2-クロロデオキシアデノシン；5-アザシチジン；5-フルオロウラシル；5-FU；6-メルカプトプリン；6-MP；6-TG；6-チオグアニン；アブラキサン；抗VEGF mAb；抗DLL4 mAb；Accutane (R)；アクチノマイシン-D；Adriamycin (R)；A drucil (R)；A finitor (R)；A grylin (R)；A la-Cort (R)；アルデスロイキン；アレムツズマブ；ALIMTA；アリトレチノイン；Alkaban-AQ (R)；Alkeran (R)；オールトランスレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルトレタミン；アメトプテリン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；Anandron (R)；アナストロゾール；アラビノシルシトシン；Ara-C Aranesp (R)；Aredia (R)；Arimidex (R)；Aromasin (R)；Arranon (R)；三酸化ヒ素；Arzerra (TM)；アスパラギナーゼ；ATRA；Avastin (R)；アザシチジン；BCG；BCNU；ベンダムスチン；ペバシズマブ；ベキサロテン；BEXXAR (R)；ピカルタミド；BiCNU；Blenoxane (R)；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブスルファン；Busulfex (R)；C225；カルシウムロイコポリン；Campath (R)；Camptosar (R)；カンプトセシン-11；カベシタピン；Carac (TM)；カルボプラチン；カルムスチン；カルムスチンウエハー；Casodex (R)；CC-5013；CCI-779；CCNU；CDDP；CeeNU；Cerubidine (R)；セツキシマブ；クロラムブシル；シスプラチン；シトロボラム因子；クラドリピン；コルチゾン；Cosmegen (R)；CPT-11；シクロホスファミド；Cytadren (R)；シタラピン；シタラピンリポゾーマル；Cytosar-U (R)；Cytosoxan (R)；ダカルバジン；ダコゲン；ダクチノマイシン；ダルベポエチンアルファ；ダサチニブ；ダウノマイシン；ダウノルピシン；塩酸ダウノルピシン；ダウノルピシンリポゾーマル；DaunoXome (R)；デカドロン；デシタピン；Delta-Cortef (R)；Deltasone (R)；デニロイキン；ジフチトクス；DepoCyt (TM)；デキサメタゾン；酢酸デキサメタゾン；リン酸デキサメタゾンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサソ；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセタキセル；Doxil (R)；ドキシソルピシン；ドキシソルピシンリポゾーマル；Droxia (TM)；DTIC；DTIC-Dome (R)；Duralone (R)；Efudex (R)；Eligard (TM)；Ellence (TM)；Eloxatin (TM)；Elspar (R)；Emcyt (R)；エナラプリル；エピルピシン；エポエチンアルファ；エルピタックス；エルロチニブ；エルウィニア L-アスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopophos (R)；エトポシド；リン酸エトポシド；Eulexin (R)；エベロリムス；Evistat (R)；エキセメスタン；Fareston (R)；Faslodex (R)；Femara (R)；フィルグラスチム；フロクスウリジン；Fludara (R)；フルダラピン；Fluoroplex (R)；フルオロウラシル；フルオロウラシル(クリーム)；フルオキシムエステル；フルタミド；フォリン酸；FUDR (R)；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタピン；ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleevec (TM)；Gliadel (R) ウエハー；GM-CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G-MCSF)；Halotesti

10

20

30

40

50

n (R) ; H e r c e p t i n (R) ; ヘキサドロール ; H e x a l e n (R) ; ヘキサ
 メチルメラミン ; H M M ; H y c a m t i n (R) ; H y d r e a (R) ; H y d r o c
 o r t A c e t a t e (R) ; ヒドロコルチゾン ; リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム
 ; コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム ; リン酸ハイドロコトロン ; ヒドロキシウレア ;
 イブリツモマブ ; イブリツモマブチウキセタン ; I d a m y c i n (R) ; I d a r u b
 i c i n l f e x (R) ; インターフェロン - アルファ ; インターフェロン - アルファ -
 2 b (P E G コンジュゲート) ; イホスファミド ; インターロイキン - 1 1 (I L - 1 1
) ; インターロイキン - 2 (I L - 2) ; メシル酸イマチニブ ; イミダゾールカルボキサ
 ミド ; I n t r o n A (R) ; I r e s s a (R) ; イリノテカン ; イソトレチノイン
 ; イキサベピロン ; I x e m p r a (T M) ; K A D C Y C L A (R) ; キドロラーゼ (10
 t) L a n a c o r t (R) ; ラパチニブ ; L - アスパラギナーゼ ; L C R ; レナリドミ
 ド ; レトロゾール ; ロイコボリン ; リューケラン ; L e u k i n (T M) ; ロイプロリド
 ; ロイコクリスチン ; L e u s t a t i n (T M) ; リボゾーマル Ara - C ; L i q u
 i d P r e d (R) ; ロムスチン ; L - P A M ; L - サルコリジン ; L u p r o n (R
) ; L u p r o n D e p o t (R) ; M a t u l a n e (R) ; マキシデックス ; メク
 ロレタミン ; 塩酸メクロレタミン ; M e d r a l o n e (R) ; M e d r o l (R) ; M
 e g a c e (R) ; メゲストロール ; 酢酸メゲストロール ; メルファラン ; メルカプトブ
 リン ; メスナ ; M e s n e x (T M) ; メトトレキサート ; メトトレキサートナトリウム
 ; メチルプレドニゾロン ; M e t i c o r t e n (R) ; マイトマイシン ; マイトマイシ
 ン - C ; ミトキサントロン M - P r e d n i s o l (R) ; M T C ; M T X ; M u s t
 a r g e n (R) ; ムスチン ; M u t a m y c i n (R) ; M y l e r a n (R) ; M y
 l o c e l (T M) ; M y l o t a r g (R) ; N a v e l b i n e (R) ; ネララビン
 ; N e o s a r (R) ; N e u l a s t a (T M) ; N e u m e g a (R) ; N e u p o
 g e n (R) ; N e x a v a r (R) ; ニフェジピン ; N i l a n d r o n (R) ; ニロ
 チニブ ; ニルタミド ; N i p e n t (R) ; N i t r o g e n M u s t a r d N o v
 a l d e x (R) ; N o v a n t r o n e (R) ; エヌプレート ; オクトレオチド ; 酢酸
 オクトレオチド ; オフタツムマブ ; O n c o s p a r (R) ; O n c o v i n (R) ; O
 n t a k (R) ; O n x a l (T M) ; オブレルベキン ; O r a p r e d (R) ; O r a
 s o n e (R) ; オキサリプラチン ; パクリタキセル ; タンパク質に結合したパクリタキ
 セル ; パミドロネート ; パニツムマブ ; P a n r e t i n (R) ; P a r a p l a t i n
 (R) ; パゾパニブ ; P e d i a p r e d (R) ; P E G インターフェロン ; ペグアスパ
 ラガーゼ ; ペグフィルグラスチム ; P E G - I N T R O N (T M) ; P E G - L - アスパ
 ラギナーゼ ; P E M E T R E X E D ; ペントスタチン ; フェニルアラニンマスタード ; P
 l a t i n o l (R) ; P l a t i n o l - A Q (R) ; プレドニゾロン ; プレドニゾン
 ; P r e l o n e (R) ; プロカルバジン ; P R O C R I T (R) ; P r o l e u k i n
 (R) ; カルムスチンインプラントを伴う P r o l i f e p r o s p a n 2 0 ; P u r
 i n e t h o l (R) ; ラロキシフェン ; R e v l i m i d (R) ; R h e u m a t r e
 x (R) ; R i t u x a n (R) ; リツキシマブ ; R o f e r o n - A (R) ; ロミプロ
 スチム ; R u b e x (R) ; 塩酸ルビドマイシン ; S a n d o s t a t i n (R) ; S a
 n d o s t a t i n L A R (R) ; サーグラモスティム ; S o l u - C o r t e f (R
) ; S o l u - M e d r o l (R) ; ソラフェニブ ; S P R Y C E L (T M) ; S T I -
 5 7 1 ; ストレプトゾシン ; S U 1 1 2 4 8 ; スニチニブ ; S u t e n t (R) ; T a m
 o x i f e n T a r c e v a (R) ; T a r g r e t i n (R) ; T a s i g n a (R
) ; T a x o l (R) ; T a x o t e r e (R) ; T e m o d a r (R) ; テモゾロミド
 テムシロリムス ; テニボシド ; T E S P A ; サリドマイド ; T h a l o m i d (R) ;
 T h e r a C y s (R) ; チオグアニン ; T h i o g u a n i n e T a b l o i d (R
) ; チオホスファミド ; T h i o p l e x (R) ; チオテパ ; T I C E (R) ; T o p o
 s a r (R) ; トボテカン ; トレミフェン ; T o r i s e l (R) ; トシツモマブ ; トラ
 スツズマブ ; T r e a n d a (R) ; トレチノイン ; T r e x a l l (T M) ; T r i s
 e n o x (R) ; T S P A ; T Y K E R B (R) ; V C R ; V e c t i b i x (T M) ;

10

20

30

40

50

Velban (R); Velcade (R); VePesid (R); Vesanoïd (TM); Viadur (TM); Vidaza (R); ビンブラスチン; 硫酸ビンブラスチン; Vincasar Pfs (R); ビンクリスチン; ビノレルピン; 酒石酸ビノレルピン; VLB; VM-26; ポリノスタット; ヴォトリエント; VP-16; Vumon (R); Xeloda (R); Zanosar (R); Zevalin (TM); Zinecard (R); Zoladex (R); ゴレドロン酸; ゴリンザ; または Zometa (R); ロイコボリン; 5-FU; テモゾロミド; ゲムシタピン; パクリタキセル; レゴラフェニブ; およびペルツズマブの少なくとも1つを含む、請求項35または36に記載の医薬組成物。

【請求項38】

対象における疾患または障害を処置するための医薬の調製における、請求項1、3、6、17、22または33に記載の結合タンパク質の使用。

【請求項39】

疾患または障害が、原発性または転移性癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、尿路癌、腎臓癌、膀胱癌、尿路上皮癌、女性生殖管癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、絨毛癌、妊娠性絨毛性疾患、男性生殖管癌、前立腺癌、精嚢癌、精巣癌、生殖細胞腫瘍、内分泌腺癌、甲状腺癌、副腎癌、下垂体癌、皮膚癌、血管腫、黒色腫、肉腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、脳の腫瘍、神経の腫瘍、目の腫瘍、髄膜の腫瘍、星状細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽細胞腫、神経鞘腫、および髄膜腫、造血器悪性腫瘍から生じる固形腫瘍、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、結腸直腸癌、ヘアリー細胞白血病、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、膵臓癌腫、腫瘍随伴症候群、悪性の高カルシウム血症、肉腫、固形腫瘍、黄斑変性症、1型糖尿病、糖尿病性網膜症、アテローム性動脈硬化症、または血管過剰増殖、浮腫または異常なDLL4もしくはVEGF活性によって特徴付けられる任意の他の血管新生依存性または非依存性疾患である、請求項38に記載の使用。

【請求項40】

対象への投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、眼内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内(intracavity)、腔内(intracelial)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膺、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮である、請求項38に記載の使用。

【請求項41】

VEGFおよびDLL4またはその断片に結合し得る結合タンパク質を生成するための方法であって、

a) VEGFおよびDLL4から選択される第一の標的に結合し得る、第一の親抗体またはその結合部分をコードする核酸を得る工程;

b) VEGFおよびDLL4から選択される第二の標的に結合し得る、第二の親抗体またはその結合部分をコードする核酸を得る工程;

c) 工程(a)および(b)の核酸を使用して、請求項1、3、6、17、22または33のいずれか一項に記載のポリペプチド鎖をコードする核酸構築物を調製する工程;

d) 単離された宿主細胞中でポリペプチド鎖を発現させる工程

を含み、それにより、VEGFおよびDLL4に結合し得る結合タンパク質を生成する方法。

【請求項42】

10

20

30

40

50

請求項 1、3、6、17、22 または 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を生成する、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

Fc 領域が、可変配列 Fc 領域である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

Fc 領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE または IgD 由来の Fc 領域である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 45】

第一の親抗体またはその結合部分が、第二の親抗体またはその結合部分が第二の標的に結合する親和性および/または効力とは異なる親和性および/または効力で第一の標的に結合する、請求項 41 に記載の方法。

10

【請求項 46】

イムノアッセイによって試験試料中の少なくとも 1 つの VEGF もしくは DLL4 またはその断片の存在を検出するための方法であって、

イムノアッセイが、試験試料を少なくとも 1 つの結合タンパク質および少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させることを含み、少なくとも 1 つの結合タンパク質が、請求項 1、3、6、17、22 または 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む方法。

【請求項 47】

少なくとも 1 つ検出の可能な標識が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンを含む、請求項 46 に記載の方法。

20

【請求項 48】

少なくとも 1 つの検出可能な標識が、少なくとも 1 つの結合タンパク質上にある、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質に接触させること；

(ii) 第二の複合体を形成するために、第一の複合体を、結合タンパク質に結合し、または結合タンパク質が結合しない、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させること；および

30

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片の存在を検出することをさらに含み、VEGF もしくは DLL4 またはその断片の存在が、検出可能な標識によって生じたシグナルと直接的に相関する、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 50】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質に接触させること；

(ii) 第二の複合体を形成するために、第一の複合体を、結合タンパク質への結合について、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片と競合する少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させること；および

40

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中の VEGF もしくは DLL4 またはその断片の存在を検出することをさらに含み、VEGF もしくは DLL4 またはその断片の存在が、検出可能な標識によって生じたシグナルと間接的に相関する、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 51】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者を診断し、予後診断しまたは患者の治療的もしくは予防的処置の有効性を評価することをさらに含み、

方法が、患者の治療的または予防的処置の有効性を評価することをさらに含む場合、有

50

効性を改善するために必要な、患者の治療的または予防的処置を改変することを場合によりさらに含む、請求項 4 6 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項 4 6 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

方法が、試料中の D L L 4 と V E G F の両方の存在を検出する、請求項 4 6 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

イムノアッセイによって試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片の量または濃度を決定するための方法であって、イムノアッセイが、

(a) 試験試料を、少なくとも 1 つの結合タンパク質および少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させること；ならびに

(b) 検出可能な標識によって生じたシグナルと、少なくとも 1 つの結合タンパク質および少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させた、既知の量もしくは濃度の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片を含む対照または校正物質によって生じたシグナルとを比較すること

を含み、校正物質は、場合により、一連の校正物質の一部であり、ここで、校正物質のそれぞれは、異なる量もしくは濃度の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片を有することによって、その一連の他の校正物質と異なっていて、

少なくとも 1 つの結合タンパク質は、請求項 1、3、6、17、22 または 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む方法。

【請求項 5 5】

少なくとも 1 つの検出可能な標識が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

少なくとも 1 つの検出可能な標識が、少なくとも 1 つの結合タンパク質上にある、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質に接触させること；

(i i) 第二の複合体を形成するために、第一の複合体を、結合タンパク質が結合しない、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させること；および

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片の量または濃度を決定することをさらに含み、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片の量または濃度が、検出可能な標識によって生じたシグナルと直接的に比例する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質に接触させること；

(i i) 第二の複合体を形成するために、第一の複合体を、結合タンパク質への結合について、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片と競合する少なくとも 1 つの検出可能な標識に接触させること；および

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中の V E G F もしくは D L L 4 またはその断片の量または濃度を決定することをさらに含み、V E G F もしくは D L L 4 またはその断片の存在が、検出可能な標識によ

10

20

30

40

50

って生じたシグナルと間接的に比例する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 9】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者を診断し、予後診断または患者の治療的もしくは予防的処置の有効性を評価することをさらに含み、

方法が、患者の治療的または予防的処置の有効性を評価することをさらに含む場合、方法は、有効性を改善するために必要な、患者の治療的または予防的処置を改変する場合によりさらに含む、請求項 5 4 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項 5 4 から 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 1】

方法が、試料中の D L L 4 と V E G F の量または濃度を決定する、請求項 5 4 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

D L L 4、V E G F もしくはこれらの両方の存在、量または濃度について試験試料をアッセイする際に使用するためのキットであって、

(a) V E G F および / もしくは D L L 4 またはその断片について試験試料をアッセイするための取扱説明書 ; ならびに

(b) 請求項 1、3、6、17、22 または 33 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む少なくとも 1 つの結合タンパク質

20

を含むキット。

【請求項 6 3】

配列番号 5 5 から 6 3 および 7 4 から選択される V H 配列を含む結合タンパク質。

【請求項 6 4】

配列番号 6 4 - 7 3 から選択される V L 配列を含む結合タンパク質。

【請求項 6 5】

配列番号 5 5 - 6 3 および 7 4 から選択される V H 配列と配列番号 6 4 - 7 3 から選択される V L 配列を含む結合タンパク質。

【請求項 6 6】

V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

30

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、

C は、重鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 ではなく、

X 2 は、F c 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

結合タンパク質が、V E G F と D L L 4 に結合し、さらに、結合タンパク質が、

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $5.42 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する V E G F ; または

40

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $3.40 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは $5.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する D L L 4

に結合する結合タンパク質。

【請求項 6 7】

V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

50

Cは、軽鎖定常ドメインであり、
 X 1は、リンカーであり、但し、C H 1ではなく、
 X 2は、F c領域を含まず、
 nは、0または1であり、
 結合タンパク質が、V E G FとD L L 4に結合し、さらに、結合タンパク質が、
 (a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $5.42 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および/もしくは最大約 $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数
 (K_D) を有するV E G F ; または
 (b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および/もしくは最大約 $3.40 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは 5
 $.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有するD L L 4
 に結合する結合タンパク質。

【請求項 6 8】

第一のポリペプチド鎖と第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第一の
 ポリペプチド鎖が、V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) nを含み、

V D 1は、第一の重鎖可変ドメインであり、
 V D 2は、第二の重鎖可変ドメインであり、
 Cは、重鎖定常ドメインであり、
 X 1は、リンカーであり、但し、C H 1ではなく、
 X 2は、F c領域であり、
 nは、0または1であり、

第二のポリペプチド鎖が、V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) nを含み、

V D 1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
 V D 2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
 Cは、軽鎖定常ドメインであり、
 X 1は、リンカーであり、但し、C H 1ではなく、
 X 2は、F c領域を含まず、
 nは、0または1であり、

結合タンパク質が、V E G FとD L L 4に結合し、さらに、結合タンパク質が、
 (a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $5.42 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および/もしくは最大約 $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数
 (K_D) を有するV E G F ; または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および/もしくは最大約 $3.40 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは 5
 $.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有するD L L 4
 に結合する結合タンパク質。

【請求項 6 9】

4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、2つのポリペプチド鎖が、V D
 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) nを含み、

V D 1は、第一の重鎖可変ドメインであり、
 V D 2は、第二の重鎖可変ドメインであり、
 Cは、重鎖定常ドメインであり、
 X 1は、リンカーであり、但し、C H 1ではなく、
 X 2は、F c領域であり、
 nは、0または1であり、

2つのポリペプチド鎖が、V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) nを含み、

V D 1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
 V D 2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
 Cは、軽鎖定常ドメインであり、
 X 1は、リンカーであり、但し、C H 1ではなく、

10

20

30

40

50

X 2 は、F c 領域を含まず、
 n は、0 または 1 であり、
 結合タンパク質が、V E G F と D L L 4 に結合し、さらに、結合タンパク質が、
 (a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $5.42 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数
 (K_D) を有する V E G F ; または
 (b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $3.40 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは 5
 $.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する D L L 4
 に結合する結合タンパク質。

10

【請求項 7 0】

4 つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、2 つのポリペプチド鎖が、V D
 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、

C は、重鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 ではなく、

X 2 は、F c 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

2 つのポリペプチド鎖が、V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

20

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は、軽鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 ではなく、

X 2 は、F c 領域を含まず、

n は、0 または 1 であり、

(i) 結合タンパク質が、V E G F と D L L 4 に結合し、

(i i) V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 3 9、4 1、4 3、4 5、
 4 7、4 9、5 1 もしくは 5 3 からの 3 つの C D R を独立して含み、V D 1 および / もし
 くは V D 2 重鎖可変領域の少なくとも 1 つが、配列番号 3 9 からの 3 つの C D R を含み、
 ならびに / または V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 4 0、4 2、4 4、
 4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 からの 3 つの C D R を独立して含み、V D 1 および /
 または V D 2 軽鎖可変領域の少なくとも 1 つが、配列番号 4 0 からの 3 つの C D R を含み

30

(i i i) 結合タンパク質が、

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $5.42 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数
 (K_D) を有する V E G F ; または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
 の解離速度定数 (K_{off}) および / もしくは最大約 $3.40 \times 10^{-8} \text{ M}$ もしくは 5
 $.00 \times 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する D L L 4
 に結合する結合タンパク質。

40

【請求項 7 1】

結合タンパク質が V E G F と D L L 4 に結合し、重鎖可変ドメインが配列番号 5 5 - 6
 3 および 7 4 を含む、請求項 6 6 から 7 0 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7 2】

結合タンパク質が V E G F と D L L 4 に結合し、軽鎖可変ドメインが配列番号 6 4 - 7
 3 を含む、請求項 6 6 から 7 0 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7 3】

結合タンパク質が V E G F と D L L 4 に結合し、重鎖可変ドメインが配列番号 5 5 - 6

50

3 および 74 を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号 64 - 73 を含む、請求項 66 から 70 に記載の結合タンパク質。

【請求項 74】

(X1)n が配列番号 1 - 38 から選択される、請求項 1、3、6、17、22、33 または 66 から 70 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 75】

VD1 重鎖可変ドメインと VD1 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、および / または VD2 重鎖可変ドメインと VD2 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、それぞれ配列番号 39 と 40 からの 3 つの CDR を含む、請求項 1、3、6、17、22、33 または 66 から 70 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 76】

h1A11.1-L-AV (配列番号 55 と 64 を含む。) ; h1A11.1-S-AV (配列番号 56 と 65 を含む。) ; h1A11.1-GS10-AV (配列番号 57 と 66 を含む。) ; h1A11.1-GS14-AV (配列番号 58 と 67 を含む。) ; AV-L-h1A11.1 (配列番号 59 と 68 を含む。) ; AV-S-h1A11.1 (配列番号 60 と 69 を含む。) ; AV-GS6-h1A11.1 (配列番号 61 と 70 を含む。) ; AV-GS10-h1A11.1 (配列番号 62 と 71 を含む。) ; AV-GS14-h1A11.1 (配列番号 63 と 72 を含む。) ; または h1A11.1-SL-AV (配列番号 73 と 74 を含む。) である、請求項 1、3、6、17、22、33 または 66 から 70 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 77】

結合タンパク質は、フローサイトメトリー (FACS) アッセイにおいて EC_{50} が最大約 5.04 nM で、DLL4 発現細胞に結合する、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 78】

結合タンパク質は、DLL4 の Notch 競合 ELISA アッセイまたは競合 FACS アッセイにおいて IC_{50} が最大約 3503 nM で、Notch1 への結合に干渉する、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 79】

30

結合タンパク質は、Notch レポーターアッセイにおいて IC_{50} が最大約 7.47 nM で、Notch1 活性化を妨げる、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 80】

結合タンパク質は、捕捉 ELISA アッセイにおいて EC_{50} が最大約 2.50 nM で、VEGF に結合する、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 81】

結合タンパク質は、VEGF 競合 ELISA アッセイにおいて IC_{50} が最大約 37.2 nM で、細胞生存 / 増殖に干渉する、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 82】

結合タンパク質は、VEGF の内皮細胞増殖アッセイにおいて IC_{50} が最大約 4.2 nM で、VEGFR への結合に干渉する、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 83】

結合タンパク質で処置されていないマウスと比較して、雌性マウスにおける HT-29 ヒト結腸直腸腺癌腫瘍異種移植片のサイズを少なくとも約 47% 減少させ、腫瘍増殖を少なくとも約 42% 遅延させる、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

50

【請求項 8 4】

結合タンパク質で処置されていないマウスと比較して、雌性マウスにおける U 8 7 - M G 膠芽細胞腫腫瘍異種移植片のサイズを少なくとも約 6 4 % 減少させ、腫瘍増殖を少なくとも約 4 8 % 遅延させる、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 8 5】

テモゾロミドと組み合わせて、結合タンパク質で処置されていないマウスと比較して、雌性マウスにおける U 8 7 - M G 膠芽細胞腫腫瘍異種移植片のサイズを少なくとも約 6 5 % 減少させ、腫瘍増殖を少なくとも約 4 5 % 遅延させる、請求項 1、3、6、17、22、33、66 から 70 または 76 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 8 6】

配列番号 7 3 と 7 4 を含む結合タンパク質。

【請求項 8 7】

F c 領域が、ヒト I g G 1 L A L A 変異体由来の F c 領域である、請求項 1、3、6 または 10 に記載の結合タンパク質。

【請求項 8 8】

1 つ以上のアミノ酸、
1 つ以上の多糖および / またはポリソルベート、ならびに
約 0 . 1 - 1 0 0 m g / m l 濃度の結合タンパク質
を含む医薬組成物であって、
医薬組成物の p H が約 5 . 0 - 7 . 0 であり、
結合タンパク質が、それぞれ独立して V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を
含む第一および第二のポリペプチド鎖を含み、
V D 1 は、第一の可変ドメインであり、
V D 2 は、第二の可変ドメインであり、
C は、定常ドメインであり、
X 1 は、リンカーであり、
X 2 は、F c 領域であり、
n は、0 または 1 であり、
第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインが、第一の機能的標的結合部位を
形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメインが、第二の機能的標的結合
部位を形成し、結合タンパク質が D L L 4 と V E G F に結合することができる医薬組成物
。

20

30

【請求項 8 9】

少なくとも 1 つのアミノ酸が、ヒスチジンであり、約 1 0 - 2 0 m M または約 1 5 m M の濃度で存在する、請求項 8 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 0】

組成物の p H が、約 5 . 5 - 6 . 0 または約 5 . 5 または約 6 . 0 である、請求項 8 8 または 8 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 1】

少なくとも 1 つの多糖が、ショ糖であり、約 0 - 8 . 0 重量 / 体積 (w / v) % の濃度で存在する、請求項 8 8 から 9 0 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 9 2】

ポリソルベートが、ポリソルベート 8 0 であり、約 0 - 0 . 0 6 w / v % の濃度で存在する、請求項 8 8 から 9 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 3】

少なくとも 1 つのアミノ酸が、アルギニンであり、約 0 - 1 . 5 w / v % の濃度で存在する、請求項 8 8 から 9 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 4】

結合タンパク質が、約 1 - 1 0 0 m g / m l、または約 1 - 1 5 m g / m l、または約

50

1 - 7.5 mg/ml、または約 2.5 - 7.5 mg/ml、または約 5 - 7.5 mg/ml、または約 25 - 100 mg/ml、または約 20 - 60 mg/ml、または約 25 - 50 mg/ml、または約 2.5 mg/ml、または約 50 mg/ml の濃度で存在する、請求項 88 から 93 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 95】

結合タンパク質が、約 0.1 - 60 mg/ml、または約 0.1 - 25 mg/ml、または約 1.0 - 60 mg/ml、または約 0.5 - 60 mg/ml、または約 0.1 - 2.0 mg/ml、または約 0.5 - 2.0 mg/ml、または約 1 - 5 mg/ml、または約 1 - 7.5 mg/ml、または約 1 - 15 mg/ml、または約 0.5 mg/ml、または約 1.0 mg/ml の濃度で存在する、請求項 88 から 93 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 96】

医薬組成物が、凍結乾燥される、請求項 88 から 95 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 97】

医薬組成物が、水和されまたは凍結乾燥され再水和されている、請求項 88 から 96 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 98】

医薬組成物が、デキストロースおよび/または生理食塩水を含む水和溶液中にある、請求項 97 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 99】

デキストロースが約 5 w/v % の濃度であり、および/または生理食塩水が約 0.9 w/v % の濃度である、請求項 98 に記載の医薬組成物。

【請求項 100】

医薬組成物が、約 15 mM のヒスチジン、約 0.03 % (w/v) のポリソルベート 80、約 4.0 % (w/v) のショ糖、および約 25 mg/ml の結合タンパク質または約 1 - 15 mg/ml の結合タンパク質を含み、pH が約 6.0 であり、結合タンパク質が配列番号 73 と配列番号 74 を含む、請求項 88 から 99 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 101】

結合タンパク質が、
 (i) 配列番号 39 からの 3 つの CDR と配列番号 40 からの 3 つの CDR を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、および
 (ii) 配列番号 41 からの 3 つの CDR と配列番号 42 からの 3 つの CDR、配列番号 43 からの 3 つの CDR と配列番号 44 からの 3 つの CDR、配列番号 45 からの 3 つの CDR と配列番号 46 からの 3 つの CDR、配列番号 47 からの 3 つの CDR と配列番号 48 からの 3 つの CDR、配列番号 49 からの 3 つの CDR と配列番号 50 からの 3 つの CDR、配列番号 51 からの 3 つの CDR と配列番号 52 からの 3 つの CDR、または配列番号 53 からの 3 つの CDR と配列番号 54 からの 3 つの CDR を含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインを含む、請求項 88 から 100 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

40

【請求項 102】

結合タンパク質が、
 (i) 配列番号 39 および/または配列番号 40 を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、ならびに
 (ii) 配列番号 41 から 54 からなる群から選択される配列を含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインを含む、請求項 88 から 101 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 103】

50

結合タンパク質が、第一のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含む第一のポリペプチド鎖であって、

VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは、重鎖定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、

X2は、Fc領域であり、

nは、0または1である

第一のポリペプチド鎖を含み、

結合タンパク質が、第二のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含む第二のポリペプチド鎖であって、

VD1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

Cは、軽鎖定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、

nは、(X1)_nについて0または1であり、

nは、(X2)_nについて0である

第二のポリペプチド鎖を含み、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成する、請求項88から102のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項104】

結合タンパク質が、

(i) 配列番号39と配列番号40を含む、DLL4について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、および

(ii) 配列番号41と配列番号42、

配列番号43と配列番号44、

配列番号45と配列番号46、

配列番号47と配列番号48、

配列番号49と配列番号50、

配列番号51と配列番号52、または

配列番号53と配列番号54

を含む、VEGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項88から103のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項105】

結合タンパク質が、2つの第一のポリペプチド鎖と2つの第二のポリペプチド鎖を含み、4つの機能的標的結合部位を形成する、請求項88から104のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項106】

結合タンパク質が、

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 7.40×10^{-9} Mの解離定数(K_D)を有するVEGF; および/または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 3.40×10^{-8} Mまたは 5.00×10^{-8} Mの解離定数(K_D)を有するDLL4

に結合することができる、請求項88から105のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項107】

(a) 結合タンパク質におけるリンカーX1が、配列番号1 - 38のいずれか1つもしくはG/Sベースの配列を含み、

(b) 結合タンパク質におけるリンカーX1が、CLではなく、

(c) 結合タンパク質のFc領域が、可変配列Fc領域であり、

(d) Fc領域が、ヒトIgG1 LALA変異体由来のFc領域であり、

(e) 結合タンパク質のFc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEもしくはIgDまたはこれらのバリエーション由来のFc領域であり、および/または

(f) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項88から106のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項108】

結合タンパク質が、

配列番号55と配列番号56、

配列番号57と配列番号58、

配列番号59と配列番号60、

配列番号61と配列番号62、

配列番号63と配列番号64、

配列番号65と配列番号66、

配列番号67と配列番号68、

配列番号69と配列番号70、

配列番号71と配列番号72、または

配列番号73と配列番号74

を含む、請求項88から107のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項109】

結合タンパク質が

(i) 配列番号39からの3つのCDRおよび配列番号40からの3つのCDRを含む、DLL4について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号41からの3つのCDRおよび配列番号42からの3つのCDRを含む、VEGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインを含む、請求項88から108のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項110】

結合タンパク質が、

(i) 配列番号39と配列番号40を含む、DLL4について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、および

(ii) 配列番号41と配列番号42を含む、VEGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項88から109のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項111】

結合タンパク質が、h1A11.1-SL-Av(配列番号73と74を含む。)を含む、請求項88から110のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項112】

Fc領域が、ヒトIgG1 LALA変異体由来のFc領域である、請求項88から111のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項113】

少なくとも1つの追加の薬剤をさらに含む、請求項88から112のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項114】

少なくとも1つの追加の薬剤が、免疫接着分子、造影剤、治療剤、細胞毒性剤、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、ビオチン、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤、化学療法剤；造影剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤(限定されないが、KDRおよびTIE-2阻害剤を含む。)、共刺激分子調節剤(限定されないが、抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗CD20を含む。)、接着分子阻害剤(限定されないが、抗LFA-1抗体、抗E/Lセレクチン抗

10

20

30

40

50

体、抗 V E G F m A b ; 抗 D L L 4 m A b ; 小分子阻害剤を含む。) 、 抗サイトカイン抗体またはその機能的断片 (限定されないが、 抗 I L - 1 8 、 抗 T N F または抗 I L - 6 / サイトカイン受容体抗体を含む。) 、 メトトレキサート、 シクロスポリン、 ラパマイシン、 F K 5 0 6 、 検出可能な標識またはレポーター、 T N F アンタゴニスト、 抗リウマチ薬、 筋肉弛緩剤、 麻酔薬、 非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D) 、 鎮痛剤、 麻酔剤、 鎮静剤、 局所麻酔剤、 神経筋肉遮断剤、 抗微生物剤、 抗乾癬剤、 コルチコステロイド、 アナボリックステロイド、 エリスロポエチン、 免疫化剤、 イムノグロブリン、 免疫抑制剤、 成長ホルモン、 ホルモン置換薬、 放射性医薬、 抗うつ剤、 抗精神病薬、 刺激物質、 喘息薬、 アゴニスト、 吸入用ステロイド、 エピネフリンまたは類似体、 サイトカイン、 サイトカインアンタゴニスト、 抗高血圧薬、 利尿薬、 アドレナリン受容体アンタゴニスト、 カルシウムチャンネル遮断薬、 レニン阻害剤、 A C E 阻害剤、 アンジオテンシン I I 受容体アンタゴニスト、 血管拡張剤、 アルファ - 2 アゴニスト、 クロニジン、 メチルドーパ、 ヒドララジン、 プラゾシン、 レセルピン、 モキシソニジン、 グアンファシン、 ベリンドプリル / イングダパミド、 ロフェキシジン、 メチロシン、 抗凝固薬、 ワーファリン、 ヘパリン、 低分子量ヘパリン、 ダルテパリン、 アルガトロバン、 ビバリルジン、 レピルジンおよびデキストロースの少なくとも1つを含む、 請求項 1 1 3 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 1 5】

少なくとも1つの追加の薬剤が、 1 3 - c i s - レチノイン酸 ; 2 - C d A ; 2 - クロロデオキシアデノシン ; 5 - アザシチジン ; 5 - フルオロウラシル ; 抗 V E G F m A b ; 抗 D L L 4 m A b ; 5 - F U ; 6 - メルカプトプリン ; 6 - M P ; 6 - T G ; 6 - チオグアニン ; アブラキサ ; A c c u t a n e (R) ; アクチノマイシン - D ; A d r i a m y c i n (R) ; A d r u c i l (R) ; A f i n i t o r (R) ; A g r y l i n (R) ; A l a - C o r t (R) ; アルデスロイキン ; アレムツズマブ ; A L I M T A ; アリトレチノイン ; A l k a b a n - A Q (R) ; A l k e r a n (R) ; オールトランスレチノイン酸 ; アルファインターフェロン ; アルトレタミン ; アメトプテリン ; アミホスチン ; アミノグルテチミド ; アナグレリド ; A n a n d r o n (R) ; アナストロゾール ; アラビノシルシトシン ; A r a - C A r a n e s p (R) ; A r e d i a (R) ; A r i m i d e x (R) ; A r o m a s i n (R) ; A r r a n o n (R) ; 三酸化ヒ素 ; A r z e r r a (T M) ; アスパラギナーゼ ; A T R A ; A v a s t i n (R) ; アザシチジン ; B C G ; B C N U ; ベンダムスチン ; ベバシズマブ ; ベキサロテン ; B E X X A R (R) ; ビカルタミド ; B i C N U ; B l e n o x a n e (R) ; プレオマイシン ; ボルテゾミブ ; プスルファン ; B u s u l f e x (R) ; C 2 2 5 ; カルシウムロイコボリン ; C a m p a t h (R) ; C a m p t o s a r (R) ; カンプトセシン - 1 1 ; カペシタビン ; C a r a c (T M) ; カルボプラチン ; カルムスチン ; カルムスチンウエハー ; C a s o d e x (R) ; C C - 5 0 1 3 ; C C I - 7 7 9 ; C C N U ; C D D P ; C e e N U ; C e r u b i d i n e (R) ; セツキシマブ ; クロラムブシル ; シスプラチン ; シトロボラム因子 ; クラドリピン ; コルチゾン ; C o s m e g e n (R) ; C P T - 1 1 ; シクロホスファミド ; C y t a d r e n (R) ; シタラビン ; シタラビンリボゾーマル ; C y t o s a r - U (R) ; C y t o x a n (R) ; ダカルバジン ; ダコゲン ; ダクチノマイシン ; ダルベポエチンアルファ ; ダサチニブ ; ダウノマイシン ; ダウノルピシン ; 塩酸ダウノルピシン ; ダウノルピシンリボゾーマル ; D a u n o X o m e (R) ; デカドロン ; デシタビン ; D e l t a - C o r t e f (R) ; D e l t a s o n e (R) ; デニロイキン ; ジフチトクス ; D e p o C y t (T M) ; デキサメタゾン ; 酢酸デキサメタゾン ; リン酸デキサメタゾンナトリウム ; デキサゾン ; デクスラゾキサ ; D H A D ; D I C ; ジオデックス ; ドセタキセル ; D o x i l (R) ; ドキソルピシン ; ドキソルピシンリボゾーマル ; D r o x i a (T M) ; D T I C ; D T I C - D o m e (R) ; D u r a l o n e (R) ; E f u d e x (R) ; E l i g a r d (T M) ; E l l e n c e (T M) ; E l o x a t i n (T M) ; E l s p a r (R) ; E m c y t (R) ; エナラプリル ; エピルピシン ; エポエチンアルファ ; エルビタックス ; エルロチニブ ; エルウィニア L - アスパラギナーゼ ; エストラムスチン ; エチオール ; E t o p o p h o s (R) ; E

20

30

40

50

トポシド；リン酸エトポシド；Eulexin (R)；エベロリムス；Evista (R)；エキセメスタン；Fareston (R)；Faslodex (R)；Femara (R)；フィルグラスチム；フロクスウリジン；Fludara (R)；フルダラビン；Fluoroplex (R)；フルオロウラシル；フルオロウラシル（クリーム）；フルオキシムエステロン；フルタミド；フォリン酸；FUDR (R)；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタピン；ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleevec (TM)；Gliadel (R) ウエハー；GM-CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G-MCSF）；Halotestin (R)；Herceptin (R)；ヘキサドロール；Hexalen (R)；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin (R)；Hydrea (R)；Hydrocort Acetate (R)；ヒドロコルチゾン；リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハイドロコトロン；ヒドロキシウレア；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Idamycin (R)；Idarubicin Ifex (R)；インターフェロン-アルファ；インターフェロン-アルファ-2b（PEGコンジュゲート）；イホスファミド；インターロイキン-11（IL-11）；インターロイキン-2（IL-2）；メシル酸イマチニブ；イミダゾールカルボキサミド；Intron A (R)；Iressa (R)；イリノテカン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ixempra (TM)；KADCYCLA (R)；キドロラーゼ（t）Lanacort (R)；ラパチニブ；L-アスパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リユーケラン；Leukin (TM)；ロイプロリド；ロイコクリスチン；Leustatin (TM)；リボゾーマル Ara-C；Liquid Pred (R)；ロムスチン；L-PAM；L-サルコリジン；Lupron (R)；Lupron Depot (R)；Matulane (R)；マキシデックス；メクロレタミン；塩酸メクロレタミン；Medralone (R)；Medrol (R)；Megace (R)；メゲストロール；酢酸メゲストロール；メルファラン；メルカプトプリン；メスナ；Mesnex (TM)；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メチルプレドニゾロン；Meticorten (R)；マイトマイシン；マイトマイシン-C；ミトキサントロン M-Prednisol (R)；MTC；MTX；Mustargen (R)；ムスチン；Mutamycin (R)；Myleran (R)；Mylocel (TM)；Mylotarg (R)；Navelbine (R)；ネララビン；Neosar (R)；Neulasta (TM)；Neumega (R)；Neupogen (R)；Nexavar (R)；ニフェジピン；Nilandron (R)；ニロチニブ；ニルタミド；Nipent (R)；Nitrogen Mustard Novaldex (R)；Novantrone (R)；エヌプレート；オクトレオチド；酢酸オクトレオチド；オクタツムマブ；Oncospar (R)；Oncovin (R)；Ontak (R)；Onxal (TM)；オペレルベキン；Orapred (R)；Orasone (R)；オキサリプラチン；パクリタキセル；タンパク質に結合したパクリタキセル；パミドロネート；パニツムマブ；Panretin (R)；Paraplatin (R)；パゾパニブ；Pediapred (R)；PEGインターフェロン；ペグアスパラガーゼ；ペグフィルグラスチム；PEG-INTRON (TM)；PEG-L-アスパラギナーゼ；PEMETREXED；ペントスタチン；フェニルアラニンマスタード；Platinol (R)；Platinol-AQ (R)；プレドニゾロン；プレドニゾン；Prelone (R)；プロカルバジン；PROCRIT (R)；Proleukin (R)；カルムスチンインプラントを伴うProlifeprosopan 20；Purinethol (R)；ラロキシフェン；Revlimid (R)；Rheumatrex (R)；Rituxan (R)；リツキシマブ；Roferon-A (R)；ロミプロスチム；Rubex (R)；塩酸ルビドマイシン；Sandostatatin (R)；Sandostatatin LAR (R)；サーグラモスティム；Solucortef (R)；Solu-Medrol (R)；ソラフェニブ；SPRYCEL (TM)；STI-571；ストレプトゾシン；SU11248；スニチニブ；Sut

10

20

30

40

50

ent (R); Tamoxifen Tarceva (R); Targretin (R); Tassigna (R); Taxol (R); Taxotere (R); Temodar (R); テモゾロミド テムシロリムス; テニボシド; TESP A; サリドマイド; Thalomid (R); Theracys (R); チオグアニン; Thioguanine Tabloid (R); チオホスファミド; Thioplex (R); チオテパ; TICE (R); Toposar (R); トポテカン; トレミフェン; Torisel (R); トシツモマブ; トラスツズマブ; Treanda (R); トレチノイン; Trexall (TM); Trisenox (R); TSPA; TYKERB (R); VCR; Vectibix (TM); Velban (R); Velcade (R); VePesid (R); Vesanoïd (TM); Viadur (TM); Vidaza (R); ビンブラスチン; 硫酸ビンブラスチン; Vincasar Pfs (R); ピンクリスチン; ピノレルピン; 酒石酸ピノレルピン; VLB; VM-26; ポリノスタット; ヴォトリエント; VP-16; Vumon (R); Xeloda (R); Zanosar (R); Zevalin (TM); Zinecard (R); Zoladex (R); ゴレドロン酸; ゴリンザ; Zometax (R); ロイコボリン; 5-FU; テモゾロミド; ゲムシタピン; パクリタキセル; レゴラフェニブ; およびペルツズマブの少なくとも1つを含む、請求項113または114に記載の医薬組成物。

10

【請求項116】

少なくとも1つの追加の薬剤が、イリノテカン; ロイコボリン; 5-FU; フォルフィリ; エナラプリル; ニフェジピン; クロニジン; テモゾロミド; ゲムシタピン; パクリタキセル; レゴラフェニブ; カペシタピン; およびペルツズマブの少なくとも1つを含む、請求項113から115のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項117】

対象における疾患または障害の処置に使用するための、請求項88から116のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項118】

疾患または障害が、原発性もしくは転移性癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、尿路癌、腎臓癌、膀胱癌、尿路上皮癌、女性生殖管癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、絨毛癌、妊娠性絨毛性疾患、男性生殖管癌、前立腺癌、精嚢癌、精巣癌、生殖細胞腫瘍、内分泌腺癌、甲状腺癌、副腎癌、下垂体癌、皮膚癌、血管腫、黒色腫、肉腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、カボジ肉腫、脳の腫瘍、神経の腫瘍、目の腫瘍、髄膜の腫瘍、星状細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽細胞腫、神経鞘腫、および髄膜腫、造血器悪性腫瘍から生じる固形腫瘍、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(PLL)、結腸直腸癌、ヘアリー細胞白血病、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、膵臓癌腫、腫瘍随伴症候群、悪性の高カルシウム血症、肉腫、固形腫瘍、黄斑変性症、1型糖尿病、糖尿病性網膜症、アテローム性動脈硬化症、または血管過剰増殖、浮腫もしくは異常なDLL4もしくはVEGF活性によって特徴付けられる任意の他の血管新生依存性もしくは非依存性疾患である、請求項117に記載の医薬組成物。

30

40

【請求項119】

医薬組成物が、皮下、筋肉内、静脈内、眼内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内(intracavity)、腔内(intracelial)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポーラス、腔、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与用に製剤化される、請求項117または118に記載の医薬組成物。

50

【請求項 1 2 0】

請求項 8 8 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む処置方法。

【請求項 1 2 1】

医薬組成物が、原発性もしくは転移性癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、尿路癌、腎臓癌、膀胱癌、尿路上皮癌、女性生殖管癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、絨毛癌、妊娠性絨毛性疾患、男性生殖管癌、前立腺癌、精嚢癌、精巣癌、生殖細胞腫瘍、内分泌腺癌、甲状腺癌、副腎癌、下垂体癌、皮膚癌、血管腫、黒色腫、肉腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、カボジ肉腫、脳の腫瘍、神経の腫瘍、目の腫瘍、髄膜の腫瘍、星状細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽細胞腫、神経鞘腫、および髄膜腫、造血器悪性腫瘍から生じる固形腫瘍、白血病、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、結腸直腸癌、ヘアリー細胞白血病、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、膵臓癌腫、腫瘍随伴症候群、悪性の高カルシウム血症、肉腫、固形腫瘍、黄斑変性症、1型糖尿病、糖尿病性網膜症、アテローム性動脈硬化症、または血管過剰増殖、浮腫もしくは異常なDLL4もしくはVEGF活性によって特徴付けられる任意の他の血管新生依存性または非依存性疾患を処置するために投与される、請求項 1 2 0 に記載の方法。

10

20

【請求項 1 2 2】

医薬組成物が、場合により、イリノテカン、ロイコボリン、テモゾロミド、ゲムシタピン、パクリタキセル、カペシタピンおよび5-FUの1つ以上と組み合わせて、結腸癌を処置するために投与される、請求項 1 2 0 または 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

医薬組成物が、場合により、テモゾロミドと組み合わせて、膠芽細胞腫を処置するために投与される、請求項 1 2 0 または 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

医薬組成物が、場合により、ゲムシタピンと組み合わせて、膵臓癌を処置するために投与される、請求項 1 2 0 または 1 2 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 5】

医薬組成物が、場合により、パクリタキセルと組み合わせて、乳癌を処置するために投与される、請求項 1 2 0 または 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

それぞれ独立してVD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

VD1は、第一の可変ドメインであり、

VD2は、第二の可変ドメインであり、

Cは、定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、

X2は、Fc領域であり、

nは、0または1であり、

40

第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成し、結合タンパク質が、DLL4とVEGFに結合することができ、

(i) 配列番号39からのCDR1から3および配列番号40からのCDR1から3を含む、DLL4について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン；ならびに

(ii) 配列番号41からのCDR1から3および配列番号42からのCDR1から3

50

配列番号 43 からの C D R 1 から 3 および配列番号 44 からの C D R 1 から 3、
 配列番号 45 からの C D R 1 から 3 および配列番号 46 からの C D R 1 から 3、
 配列番号 47 からの C D R 1 から 3 および配列番号 48 からの C D R 1 から 3、
 配列番号 49 からの C D R 1 から 3 および配列番号 50 からの C D R 1 から 3、
 配列番号 51 からの C D R 1 から 3 および配列番号 52 からの C D R 1 から 3、または
 配列番号 53 からの C D R 1 から 3 および配列番号 54 からの C D R 1 から 3
 を含む、V E G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン
 を含む結合タンパク質。

【請求項 127】

(i) 配列番号 39 および / または配列番号 40 を含む、D L L 4 について機能的標的
 結合部位を形成する可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号 41 - 54 からなる群から選択される配列を含む、V E G F について
 機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン
 を含む、請求項 126 に記載の結合タンパク質。

【請求項 128】

結合タンパク質が、第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含む第一の
 ポリペプチド鎖であって、

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、

C は、重鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、

X 2 は、F c 領域であり、

n は、0 または 1 である

第一のポリペプチド鎖を含み、

結合タンパク質が、第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含む第二の
 ポリペプチド鎖であって、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は、軽鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、

n は、(X 1) n について 0 または 1 であり、

n は、(X 2) n について 0 である

第二のポリペプチド鎖を含み、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインが、
 第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメイ
 ンが、第二の機能的標的結合部位を形成する、請求項 126 または 127 に記載の結合タ
 ンパク質。

【請求項 129】

(i) 配列番号 39 と配列番号 40 を含む、D L L 4 について機能的標的結合部位を形
 成する可変ドメイン、および

(ii) 配列番号 41 と配列番号 42、

配列番号 43 と配列番号 44、

配列番号 45 と配列番号 46、

配列番号 47 と配列番号 48、

配列番号 49 と配列番号 50、

配列番号 51 と配列番号 52、または

配列番号 53 と配列番号 54

を含む、V E G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 126 から 128 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 130】

2 つの第一のポリペプチド鎖と 2 つの第二のポリペプチド鎖を含み、4 つの機能的標的

10

20

30

40

50

結合部位を形成する、請求項 1 2 6 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 1】

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 7.40×10^{-9} M の解離定数 (K_D) を有する V E G F ; および / または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 3.40×10^{-8} M または 5.00×10^{-8} M の解離定数 (K_D) を有する D L L 4

に結合することができる、請求項 1 2 6 から 1 3 0 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 2】

(a) 結合タンパク質におけるリンカー X 1 が、配列番号 1 - 3 8 のいずれか 1 つもしくは G / S ベースの配列を含み、

(b) 結合タンパク質におけるリンカー X 1 が、C H 1 または C L ではなく、

(c) 結合タンパク質の F c 領域が、可変配列 F c 領域であり、

(d) F c 領域が、ヒト I g G 1 L A L A 変異体由来の F c 領域であり、

(e) 結合タンパク質の F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E もしくは I g D またはこれらのバリエーション由来の F c 領域であり、および / または

(f) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項 1 2 6 から 1 3 1 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 3】

配列番号 5 5 と配列番号 5 6、

配列番号 5 7 と配列番号 5 8、

配列番号 5 9 と配列番号 6 0、

配列番号 6 1 と配列番号 6 2、

配列番号 6 3 と配列番号 6 4、

配列番号 6 5 と配列番号 6 6、

配列番号 6 7 と配列番号 6 8、

配列番号 6 9 と配列番号 7 0、

配列番号 7 1 と配列番号 7 2、または

配列番号 7 3 と配列番号 7 4

を含む、請求項 1 2 6 から 1 3 2 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 4】

(i) 配列番号 3 9 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 0 からの C D R 1 から 3 とを含む、D L L 4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン ; および

(i i) 配列番号 4 1 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 2 からの C D R 1 から 3 とを含む、V E G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 1 2 6 から 1 3 3 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 5】

(i) 配列番号 3 9 と配列番号 4 0 を含む、D L L 4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン ; および

(i i) 配列番号 4 1 と配列番号 4 2 を含む、V E G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 1 2 6 から 1 3 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 6】

h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v (配列番号 7 3 と 7 4 を含む。) を含む、請求項 1 2 6 から 1 3 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 7】

F c 領域が、ヒト I g G 1 L A L A 変異体由来の F c 領域である、請求項 1 2 6 から 1 3 6 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3 8】

10

20

30

40

50

1つ以上のアミノ酸、
 1つ以上の多糖および/またはポリソルベート、ならびに
 約0.1 - 100 mg/ml濃度の結合タンパク質
 を含む医薬製剤であって、
 医薬製剤のpHが約5.0 - 7.0であり、
 結合タンパク質が、それぞれ独立してVD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)nを
 含む第一および第二のポリペプチド鎖を含み、
 VD1は、第一の変域ドメインであり、
 VD2は、第二の変域ドメインであり、
 Cは、定常ドメインであり、
 X1は、リンカーであり、
 X2は、Fc領域であり、
 nは、0または1であり、
 第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインが、第一の機能的標的結合部位を
 形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインが、第二の機能的標的結合
 部位を形成し、結合タンパク質がDLL4とVEGFに結合することができる医薬製剤。

10

【請求項139】

少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンであり、約10 - 20 mMまたは約15 mMの
 濃度で存在する、請求項138に記載の医薬製剤。

【請求項140】

組成物のpHが、約5.5 - 6.0または約5.5または約6.0である、請求項13
 8または139に記載の医薬製剤。

20

【請求項141】

少なくとも1つの多糖がショ糖であり、約0 - 8.0重量/体積(w/v)%の濃度で
 存在する、請求項138から140のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項142】

ポリソルベートがポリソルベート80であり、約0 - 0.06 w/v%の濃度で存在す
 る、請求項138から141のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項143】

少なくとも1つのアミノ酸がアルギニンであり、約0 - 1.5 w/v%の濃度で存在す
 る、請求項138から142のいずれか一項に記載の医薬製剤。

30

【請求項144】

結合タンパク質が、約1 - 100 mg/ml、または約1 - 15 mg/ml、または約
 1 - 7.5 mg/ml、または約2.5 - 7.5 mg/ml、または約5 - 7.5 mg
 /ml、または約25 - 100 mg/ml、または約20 - 60 mg/ml、または約2
 5 - 50 mg/ml、または約2.5 mg/ml、または約50 mg/ml、または約0.
 1 - 60 mg/ml、または約0.1 - 2.5 mg/ml、または約1.0 - 60 mg/m
 l、または約0.5 - 60 mg/ml、または約0.1 - 2.0 mg/ml、または約0
 .5 - 2.0 mg/ml、または約1 - 5 mg/ml、または約1 - 7.5 mg/ml、
 または約1 - 15 mg/ml、または約0.5 mg/ml、または約1.0 mg/mlの
 濃度で存在する、請求項138から143のいずれか一項に記載の医薬製剤。

40

【請求項145】

医薬製剤が、凍結乾燥される、請求項138から144のいずれか一項に記載の医薬製
 剤。

【請求項146】

医薬製剤が、水和されまたは凍結乾燥され再水和されている、請求項138から144
 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項147】

医薬製剤が、デキストロースおよび/または生理食塩水を含む水和溶液中にある、請求
 項146に記載の医薬製剤。

50

【請求項 148】

デキストロースが、約 5 w / v % の濃度であり、および / または生理食塩水が約 0 . 9 w / v % の濃度である、請求項 147 に記載の医薬製剤。

【請求項 149】

医薬製剤が、約 15 mM のヒスチジン、約 0 . 03 % (w / v) のポリソルベート 80、約 4 % (w / v) のショ糖、および約 0 . 1 - 25 mg / ml の結合タンパク質または約 1 - 15 mg / ml の結合タンパク質を含み、pH が約 6 であり、結合タンパク質が、

(i) 配列番号 39 と配列番号 40 を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン；および

(ii) 配列番号 41 と配列番号 42 を含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 138 から 148 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 150】

結合タンパク質が、

(i) 配列番号 39 からの CDR1 から 3 と配列番号 40 からの CDR1 から 3 を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン；および

(ii) 配列番号 41 からの CDR1 から 3 と配列番号 42 からの CDR1 から 3、配列番号 43 からの CDR1 から 3 と配列番号 44 からの CDR1 から 3、配列番号 45 からの CDR1 から 3 と配列番号 46 からの CDR1 から 3、配列番号 47 からの CDR1 から 3 と配列番号 48 からの CDR1 から 3、配列番号 49 からの CDR1 から 3 と配列番号 50 からの CDR1 から 3、配列番号 51 からの CDR1 から 3 と配列番号 52 からの CDR1 から 3、または配列番号 53 からの CDR1 から 3 と配列番号 54 からの CDR1 から 3

とを含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 138 から 149 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

20

【請求項 151】

結合タンパク質が、

(i) DLL4 について機能的標的結合部位を形成し、配列番号 39 および / または配列番号 40 を含む可変ドメイン、ならびに

(ii) VEGF について機能的標的結合部位を形成し、配列番号 41 - 54 からなる群から選択される配列を含む可変ドメイン

を含む、請求項 138 から 150 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

30

【請求項 152】

結合タンパク質が、第一の VD1 - (X1) n - VD2 - C - (X2) n を含む第一のポリペプチド鎖であって、

VD1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、

C は、重鎖定常ドメインであり、

X1 は、リンカーであり、

X2 は、Fc 領域であり、

n は、0 または 1 である

第一のポリペプチド鎖を含み、

結合タンパク質が、第二の VD1 - (X1) n - VD2 - C - (X2) n を含む第二のポリペプチド鎖であって、

VD1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は、軽鎖定常ドメインであり、

X1 は、リンカーであり、

n は、(X1) n について 0 または 1 であり、

n は、(X2) n について 0 である

40

50

第二のポリペプチド鎖を含み、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成する、請求項138から151のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項153】

結合タンパク質が、

(i) 配列番号39と配列番号40を含む、DLL4について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号41と配列番号42、

配列番号43と配列番号44、

配列番号45と配列番号46、

配列番号47と配列番号48、

配列番号49と配列番号50、

配列番号51と配列番号52、または

配列番号53と配列番号54

を含む、VEGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項138から152のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項154】

結合タンパク質が、2つの第一のポリペプチド鎖と2つの第二のポリペプチド鎖を含み、4つの機能的標的結合部位を形成する、請求項138から153のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項155】

結合タンパク質が、

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 7.40×10^{-9} Mの解離定数(K_D)を有するVEGF; および/または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 3.40×10^{-8} Mまたは 5.00×10^{-8} Mの解離定数(K_D)を有するDLL4

に結合することができる、請求項138から154のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項156】

(a) 結合タンパク質におけるリンカーX1が、配列番号1-38のいずれか1つもしくはG/Sベースの配列を含み、

(b) 結合タンパク質におけるリンカーX1が、CH1またはCLではなく、

(c) 結合タンパク質のFc領域が、可変配列Fc領域であり、

(d) Fc領域が、ヒトIgG1 LALA変異体由来のFc領域であり、

(e) 結合タンパク質のFc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEもしくはIgDまたはこれらのバリエーション由来のFc領域であり、および/または

(f) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項138から155のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項157】

結合タンパク質が、

配列番号55と配列番号56、

配列番号57と配列番号58、

配列番号59と配列番号60、

配列番号61と配列番号62、

配列番号63と配列番号64、

配列番号65と配列番号66、

配列番号67と配列番号68、

配列番号69と配列番号70、

配列番号71と配列番号72、または

10

20

30

40

50

配列番号 73 と配列番号 74

を含む、請求項 138 から 156 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 158】

結合タンパク質が

(i) 配列番号 39 からの CDR 1 から 3 および配列番号 40 からの CDR 1 から 3 を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号 41 からの CDR 1 から 3 および配列番号 42 からの CDR 1 から 3 を含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインを含む、請求項 138 から 157 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 159】

結合タンパク質が、

(i) 配列番号 39 と配列番号 40 を含む、DLL4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン、および

(ii) 配列番号 41 と配列番号 42 を含む、VEGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

を含む、請求項 138 から 158 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 160】

結合タンパク質が、h1A11.1-SL-Av (配列番号 73 と 74 を含む。)を含む、請求項 138 から 159 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 161】

Fc 領域が、ヒト IgG1 LALA 変異体由来の Fc 領域である、請求項 138 から 160 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 162】

少なくとも 1 つの追加の薬剤をさらに含む、請求項 138 から 161 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 163】

少なくとも 1 つの追加の薬剤が、免疫接着分子、造影剤、治療剤、細胞毒性剤、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、ビオチン、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤、化学療法剤；造影剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤（限定されないが、KDR および TIE-2 阻害剤を含む。）、共刺激分子調節剤（限定されないが、抗 B7.1、抗 B7.2、CTLA4-Ig、抗 CD20 を含む。）、接着分子阻害剤（限定されないが、抗 LFA-1 抗体、抗 E/L セレクチン抗体、抗 VEGF mAb；抗 DLL4 mAb；小分子阻害剤を含む。）、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片（限定されないが、抗 IL-18、抗 TNF または抗 IL-6 / サイトカイン受容体抗体を含む。）、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識またはレポーター、TNF アンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)、鎮痛剤、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化剤、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、抗高血圧薬、利尿薬、アドレナリン受容体アンタゴニスト、カルシウムチャネル遮断薬、レニン阻害剤、ACE 阻害剤、アンジオテンシン II 受容体アンタゴニスト、血管拡張剤、アルファ-2 アゴニスト、クロニジン、メチルドーパ、ヒドララジン、プラゾシン、レセルピン、モキシニジン、グアンファシン、ペリンドプリル/インダパミド、ロフェキシジン、メチロシン、抗凝固薬、ワーファリン、ヘパリン、低分子量ヘパリン、ダルテパリン、アルガトロバン、ビバリルジン、レピルジンおよびデキストロースの少なくとも 1 つを含む、請求項 162 に記載の医薬製剤。

【請求項 164】

10

20

30

40

50

少なくとも1つの追加の薬剤が、13 - c i s - レチノイン酸；2 - CdA；2 - クロ
 ロデオキシアデノシン；5 - アザシチジン；5 - フルオロウラシル；抗VEGF mAb
 ；抗DLL4 mAb；5 - FU；6 - メルカプトプリン；6 - MP；6 - TG；6 - チ
 オグアニン；アブラキサン；Accutane (R)；アクチノマイシン - D；Adri
 amyacin (R)；Adrucil (R)；Afinitor (R)；Agylin
 (R)；Ala - Cort (R)；アルデスロイキン；アレムツズマブ；ALIMTA；
 アリトレチノイン；Alkaban - AQ (R)；Alkeran (R)；オールトラン
 スレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルトレタミン；アメトプテリン；アミホ
 スチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；Anandron (R)；アナストロゾー
 ル；アラビノシルシトシン；Ara - C Aranesp (R)；Aredia (R)；
 Arimidex (R)；Aromasin (R)；Arranon (R)；三酸化ヒ素
 ；Arzerra (TM)；アスパラギナーゼ；ATRA；Avastin (R)；アザ
 シチジン；BCG；BCNU；ベンダムスチン；ベバシズマブ；ベキサロテン；BEXX
 AR (R)；ピカルタミド；BiCNU；Blenoxane (R)；プレオマイシン；
 ボルテゾミブ；ブスルファン；Busulfex (R)；C225；カルシウムロイコボ
 リン；Campath (R)；Camposar (R)；カンプトセシン - 11；カペ
 シタピン；Carac (TM)；カルボプラチン；カルムスチン；カルムスチンウエハー
 ；Casodex (R)；CC - 5013；CCI - 779；CCNU；CDDP；Ce
 eNU；Cerubidine (R)；セツキシマブ；クロラムブシル；シスプラチン；
 シトロプラム因子；クラドリピン；コルチゾン；Cosmegen (R)；CPT - 11
 ；シクロホスファミド；Cytadren (R)；シタラビン；シタラビンリポゾーマル
 ；Cytosar - U (R)；Cytosar (R)；ダカルバジン；ダコゲン；ダクチ
 ノマイシン；ダルベポエチンアルファ；ダサチニブ；ダウノマイシン；ダウノルピシン；
 塩酸ダウノルピシン；ダウノルピシンリポゾーマル；DaunoXome (R)；デカド
 ロン；デシタピン；Delta - Cortef (R)；Deltasone (R)；デニ
 ロイキン；ジフチトクス；DepoCyt (TM)；デキサメタゾン；酢酸デキサメタゾ
 ン；リン酸デキサメタゾンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサソ；DHAD；DI
 C；ジオデックス；ドセタキセル；Doxil (R)；ドキシソルピシン；ドキシソルピシン
 リポゾーマル；Droxia (TM)；DTIC；DTIC - Dome (R)；Dura
 lone (R)；Efudex (R)；Eligard (TM)；Ellence (TM
)；Eloxatin (TM)；Elspar (R)；Emcyt (R)；エナラプリル
 ；エピルピシン；エポエチンアルファ；エルピタックス；エルロチニブ；エルウィニア
 L - アスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopophos (R)；エ
 トポシド；リン酸エトポシド；Eulexin (R)；エベロリムス；Evista (R
)；エキセメスタン；Fareston (R)；Faslodex (R)；Femara
 (R)；フィルグラスチム；フロクスウリジン；Fludara (R)；フルダラビン；
 Fluoroplex (R)；フルオロウラシル；フルオロウラシル (クリーム)；フル
 オキシムエステロン；フルタミド；フォリン酸；FUDR (R)；フルベストラント；ゲ
 フィチニブ；ゲムシタピン；ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleeve
 c (TM)；Gliadel (R) ウエハー；GM - CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニ
 ー刺激因子 (G - CSF)；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G - MCSF)；
 Halotestin (R)；Herceptin (R)；ヘキサドロール；Hexal
 en (R)；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin (R)；Hydrea (R
)；Hydrocort Acetate (R)；ヒドロコルチゾン；リン酸ヒドロコ
 ルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハイドロコト
 ン；ヒドロキシウレア；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Idamycin (R
)；Idarubicin Ifex (R)；インターフェロン - アルファ；インター
 フェロン - アルファ - 2b (PEGコンジュゲート)；イホスファミド；インターロイキ
 ン - 11 (IL - 11)；インターロイキン - 2 (IL - 2)；メシル酸イマチニブ；イ
 ミダゾールカルボキサミド；Intron A (R)；Iressa (R)；イリノテカ

10

20

30

40

50

ン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ixemptra (TM)；KADCYCLA (R)；キドロラーゼ (t) Lanacort (R)；ラパチニブ；L-アスパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リューケラン；Leukin (TM)；ロイプロリド；ロイコクリスチン；Leustatin (TM)；リボゾーマル Ara-C；Liquid Pred (R)；ロムスチン；L-PAM；L-サルコリジン；Lupron (R)；Lupron Depot (R)；Matulane (R)；マキシデックス；メクロレタミン；塩酸メクロレタミン；Medralone (R)；Medrol (R)；Megace (R)；メゲストロール；酢酸メゲストロール；メルファラン；メルカプトプリン；メスナ；Mesnex (TM)；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メチルプレドニゾロン；Meticorten (R)；マイトマイシシ 10
 シン；マイトマイシシ-C；ミトキサントロン M-Prednisol (R)；MTC；MTX；Mustargen (R)；ムスチン；Mutamycin (R)；Myleran (R)；Mylocel (TM)；Mylotarg (R)；Navelbine (R)；ネララピン；Neosar (R)；Neulasta (TM)；Neumega (R)；Neupogen (R)；Nexavar (R)；ニフェジピン；Nilandron (R)；ニロチニブ；ニルタミド；Nipent (R)；Nitrogen Mustard Novaldex (R)；Novantrone (R)；エヌプレート；オクトレオチド；酢酸オクトレオチド；オクタツムマブ；Oncospar (R)；Oncovin (R)；Ontak (R)；Onxal (TM)；オプレルベキン；Orapred 20
 red (R)；Orasone (R)；オキサリプラチン；パクリタキセル；タンパク質に結合したパクリタキセル；パミドロネート；パニツムマブ；Panretin (R)；Paraplatin (R)；パゾパニブ；Pediapred (R)；PEGインターフェロン；ペグアスパラガーゼ；ペグフィルグラスチム；PEG-INTRON (TM)；PEG-L-アスパラギナーゼ；PEMETREXED；ペントスタチン；フェニルアラニンマスタード；Platinol (R)；Platinol-AQ (R)；プレドニゾロン；プレドニゾン；Prelone (R)；プロカルバジン；PROCRIT (R)；Proleukin (R)；カルムスチンインプラントを伴う Prolifeprospan 20；Purinethol (R)；ラロキシフェン；Revlimid (R)；Rheumatrex (R)；Rituxan (R)；リツキシマブ；Roferon 30
 -A (R)；ロミプロスチム；Rubex (R)；塩酸ルビドマイシシ；Sandostatatin (R)；Sandostatatin LAR (R)；サーグラモスティム；Solu-Cortef (R)；Solu-Medrol (R)；ソラフェニブ；SPRYCEL (TM)；STI-571；ストレプトゾシン；SU11248；スニチニブ；Sutent (R)；Tamoxifen Tarceva (R)；Targretin (R)；Tasigna (R)；Taxol (R)；Taxotere (R)；Temodar (R)；テモゾロミド テムシロリムス；テニボシド；TESPA；サリドマイド；Thalomid (R)；TheraCys (R)；チオグアニン；Thioguanine Tabloid (R)；チオホスファミド；Thioplex (R)；チオテパ；TICE (R)；Toposar (R)；トポテカン；トレミフェン；Torisel (R) 40
 ；トシツモマブ；トラスツズマブ；Treanda (R)；トレチノイン；Trexall (TM)；Trisenox (R)；TSPA；TYKERB (R)；VCR；Vectibix (TM)；Velban (R)；Velcade (R)；Vepesid (R)；Vesanoïd (TM)；Viadur (TM)；Vidaza (R)；ピンブラスチン；硫酸ピンブラスチン；Vincasar Pfs (R)；ピンクリスチン；ピノレルピン；酒石酸ピノレルピン；VLB；VM-26；ポリノスタット；ヴォトリエント；VP-16；Vumon (R)；Xeloda (R)；Zanosar (R)；Zevalin (TM)；Zinecard (R)；Zoladex (R)；ゾレドロン酸；ゾリンザ；Zometax (R)；ロイコボリン；5-FU；テモゾロミド；ゲムシタピン；パクリタキセル；レゴラフェニブ；およびペルツズマブの少なくとも1つを含む、請求項 162または163に記載の医薬製剤。

10

20

30

40

50

【請求項165】

少なくとも1つの追加の薬剤が、イリノテカン；ロイコボリン；フォルフィリ；5-FU；エナブラリル；ニフェジピン；クロニジン；テモゾロミド；ゲムシタピン；パクリタキセル；レゴラフェニブ；およびペルツズマブの少なくとも1つを含む、請求項162から164のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項166】

結合タンパク質が、

(a) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、解離定数 (K_D) が最大約 7.40×10^{-10} M で、VEGF に結合することができ、および/もしくは VEGFR1 競合 ELISA において測定された場合に、 IC_{50} が最大約 3.8 nM で、VEGF 活性を遮断することができ、ならびに/または

(b) 表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、解離定数 (K_D) が最大約 1.0×10^{-8} M で、DLL4 に結合することができ、および/もしくは Notch 競合 ELISA において測定された場合に、 IC_{50} が最大約 1.09 nM で、DLL4 活性を遮断することができる、請求項136に記載の結合タンパク質または請求項160に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年11月1日に出願した米国仮特許出願第61/721,072号と2013年3月15日に出願した米国仮出願第61/787,927号の35U.S.C. § 119の優先権の利益を主張するものであり、これらはどちらもその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書において、多価および多重特異的結合タンパク質、結合タンパク質を作製する方法、ならびに癌、腫瘍および/または他の血管新生依存性疾患の診断、阻害、予防および/または処置におけるこれらの使用が開示される。

【背景技術】

【0003】

2つまたはそれ以上の抗原に結合することができる多重特異的結合タンパク質などの工学的に作製されたタンパク質が、本分野において公知である。このような多重特異的結合タンパク質は、細胞融合、化学的連結または組換えDNA技術を用いて作製することが可能である。当該技術分野において公知の多重特異的結合タンパク質の構造は様々に存在する。しかしながら、多数のこのような構造および方法には明らかな不利益がある。

【0004】

二特異的抗体は、クアドロマ技術を用いて作製されてきた。しかしながら、この技術における誤対合された副産物の存在および大幅に減少した産生率は、複雑な精製操作が必要とされることを意味している。二特異的抗体は、2つの異なるmAbの化学的連結によっても生産することが可能である。しかしながら、このアプローチは、均一な調製を与えない。

【0005】

以前に使用された他のアプローチは、ヘテロ-二官能性クロスリンカーを有する2つの親抗体のカップリング、タンデムな一本鎖Fv分子、ダイアボディ、二特異的ダイアボディ、一本鎖ダイアボディおよびジ-ダイアボディの製造を含む。しかしながら、これらのアプローチのそれぞれは不利益を有する。さらに、IgGの重鎖中に2つのFabリピートを含み、4つの抗原分子に結合することができる多価の抗体構築物が記載されている(PCT公開WO0177342およびMiller et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61参照)。

【0006】

リガンド-受容体系は、特異性を維持するために同時に進化してきた。それらの相互作用

用は、特定の生物活性に関して特定のシグナル伝達を活性化する。しかしながら、非リガンド - 受容体結合タンパク質、例えば、単一特異性抗体、二重もしくは多重特異性結合タンパク質、非競合性抗体の組合せまたは受容体の細胞外ドメイン（ECD）に対する他の受容体結合タンパク質は、受容体リガンド - 結合部位と異なるエピトープを認識し得る。受容体のECDに対するこのような異なるエピトープへの結合は、新たな予期しないシグナル伝達カスケードを生じ得る細胞内ドメインに立体構造変化を形質導入することがある。

【0007】

米国特許第7,612,181号（この全体が参照により本明細書に組み込まれる。）は、二重可変ドメイン結合タンパク質（DVD結合タンパク質）または二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig(TM））と呼ばれる、高親和性を有する2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規なファミリーを提供する。DVD分子は、同じ分子または同時に2つの異なる分子上の2つの異なるエピトープに結合することができる四価の二重特異的Ig様タンパク質である。DVDは、二価抗体のN末端に融合した2つの可変ドメインから構成される固有の結合タンパク質である。可変ドメインは、互いに直接融合されてもよく、または各種の長さおよびアミノ酸組成を有する合成ペプチドリンカーを介して直接接続されてもよい。DVDは、完全であり、機能的なFcドメインを用いて遺伝子操作され得て、次に適切なエフェクター機能を媒介することができる。DVDフォーマットは、抗体対の最適な柔軟性、2つの抗原結合ドメインの配向およびこれらを連結するリンカーの長さに起因して、新たな治療法を提供することができる。

【0008】

種々の構造が当該技術分野において提供され、いくつかは利点と欠点を有するが、特定の構築物は、特定の標的に結合する特定の特性を有する多価結合タンパク質を調製するために必要とされる。さらに、新しい可変ドメイン配列は、結合タンパク質の特性をさらに改善することができる。具体的には、DLL4とVEGFに結合する改良されたDVDは有益であることを明らかにすることができた。したがって、本明細書には、米国特許第7,612,181号（この全体が参照により本明細書に組み込まれる。）において開示された結合タンパク質フレームワークを用いる二重可変ドメイン免疫グロブリンであって、VEGFとDLL4について機能的標的結合部位を形成し、各々が第一および第二の可変ドメイン配列（例えば、表2に列挙されている配列）を含む、特定の第一および第二のポリペプチド鎖を含有する二重可変ドメイン免疫グロブリンが開示されている。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖は、各々が表2に列挙されている配列の1つからの3つのCDRを含有し、VEGFとDLL4について機能的結合部位を形成する、第一および第二の可変ドメイン配列を含む。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2001/77342号

【特許文献2】米国特許第7,612,181号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Miller et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

DLL4は、Notch受容体経路を介する細胞 - 細胞間シグナル伝達に関与するリガンドである。このような細胞 - 細胞間コミュニケーションは、分化、増殖およびホメオスタシスなどの多数の生物学的プロセスに必要である。Notchシグナル伝達経路は、広範な真核生物によって利用される1つの系である。また、この経路、特にNotch受容

体は、機能的な腫瘍血管新生に不可欠である。このようにして、Notch受容体機能の阻害、Notch受容体の遮断および/またはNotchシグナル伝達経路の遮断は、抗癌組成物および治療のための潜在的な戦略である。Notch受容体の小分子阻害剤は、多くの場合、身体中のNotch受容体の野生型(正常)組織発現を抑制するため、毒性があることが分かっている。したがって、Notchシグナル伝達経路の異なるメンバーが、治療のための潜在的な標的と考えられるべきである。Notch受容体の脈管構造リガンドは、デルタ4またはデルタ様4(DLL4)である。脈管構造において広く発現されるDLL4は、血管発生にとって重要である(Yanら、Clin. Cancer Res.、13(24):7243-7246(2007年); Shutterら、Genes Dev.、14(11):1313-1318(2000年); Galeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101(45):15949-15954(2004年); Krebsら、Genes Dev.、14(11):1343-1352(2000年))。DLL4についてヘテロ接合性のマウスは、血管発生の大きな欠陥のために、胚性に致死である(Galeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101(45):15949-15954(2004年); Duarteら、Genes Dev.、18(20):2474-2478(2004年); Krebsら、Genes Dev.、18(20):2469-2473(2004年))。

10

【0012】

DLL4の発現は、VEGFによって導入され得る(Liuら、Mol. Cell Biol.、23(1):14-25(2003年); Lobovら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、104(9):3219-3224(2007年))。VEGFは、血管新生に関与する細胞によって生成されるシグナル伝達タンパク質である。さらに、DLL4は、部分的にVEGFR2を抑制し、VEGR1を誘導することにより、VEGFシグナル伝達を負に制御し得る(Harringtonら、Microvasc. Res.、75(2):144-154(2008年); Suchtingら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、104(9):3225-3230(2007年))。機能的血管新生のためには、DLL4およびVEGF間の絶妙な協調が不可欠であり、DLL4とVEGFの両方を治療的介入のための潜在的な標的とさせる。

20

【0013】

また、DLL4およびVEGFは、これらの生理学的役割に加えて、腫瘍血管において上方制御される(Galeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101(45):15949-15954(2004年); Mailhosら、Differentiation、69(2-3):135-144(2001年); Patelら、Cancer Res.、65(19):8690-8697(2005年); Patelら、Clin. Cancer Res.、12(16):4836-4844(2006年); Noguera-Troiseら、Nature、444(7122):1032-1037(2006年))。DLL4の遮断は、複数のモデルにおいて原発腫瘍増殖を阻害することが示されている(Noguera-Troiseら、Nature、444(7122):1032-1037(2006年); Ridgwayら、Nature、444(7122):1083-1087(2006年); Schemetら、Blood、109(11):4753-4760(2007年))。DLL4の阻害は、抗VEGF治療に対して耐性である腫瘍に対してでさえ有効である。したがって、DLL4とVEGFの両方のコンビナトリアル阻害は、抗腫瘍療法の増大を提供し得た。興味深いことに、腫瘍血管形成を低減するVEGF阻害とは異なり、DLL4遮断は、腫瘍脈管構造密度の増大につながり、この場合、血管は異常であり、効率的な血液輸送を支持できず、効率的に非機能的である。したがって、VEGFとDLL4の両方の崩壊は、潜在的な抗癌処置に作用する異なる方法を提供する。

30

40

【0014】

抗体および様々な結合構築物は当該技術分野に知られているが、例えば、癌および腫瘍形成(tumorigenesis)を処置するために、VEGFおよびDLL4へのよ

50

り良好な標的と結合効率に対する必要性が残されている。このように、当該技術分野において、DLL4およびVEGFに結合することができる、改良された多価の結合タンパク質に対する必要性がある。したがって、新規な結合タンパク質が提供され、ここで、結合タンパク質は、DLL4およびVEGFに結合することができる。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、例えば、DLL4およびVEGFに結合することができ、改良された結合親和性および/または中和能力を有する。

【0015】

2つのエピトープを標的とすることができる結合タンパク質が提供され、ここで、結合タンパク質は、DLL4およびVEGFに結合することができる。一実施形態において、高親和性を有する、DLL4とVEGFのエピトープに結合することができる結合タンパク質が提供される。一実施形態において、結合タンパク質は、表2に列挙されているCDRおよび可変ドメイン配列を含有する二重可変ドメイン結合タンパク質フレームワークを含む。一実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質フレームワークは、米国特許第7,612,181号(この全体が参照により本明細書に組み込まれる。)に開示されているフレームワークを含む。

10

【課題を解決するための手段】

【0016】

一実施形態において、2つの異なるタンパク質(VEGFおよびDLL4)の2つのエピトープに結合し得るポリペプチド鎖を含む結合タンパク質が提供され、ここで、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを含み、VD1は、第一の可変ドメインであり、VD2は、第二の可変ドメインであり、Cは、定常ドメインであり、X1は、アミノ酸またはポリペプチドを表し、X2は、Fc領域を表し、nは、0または1である。いくつかの実施形態において、結合タンパク質におけるVD1およびVD2は、重鎖可変ドメインである。特定の実施形態において、VD1およびVD2は、DLL4のエピトープとVEGFのエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態において、Cは、重鎖定常ドメイン、例えばCH1である。特定の実施形態において、X1は、リンカーであり、ただし、X1はCH1ではない。

20

【0017】

様々な実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、DLL4のエピトープとVEGFのエピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ここで、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを含み、VD1は、第一の重鎖可変ドメインを含み、VD2は、第二の重鎖可変ドメインを含み、Cは、重鎖定常ドメインを含み、X1は、リンカーを含み、X2は、Fc領域を含む。一実施形態において、X1は、リンカーであり、ただし、それはCH1ではない。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、それぞれ、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53におけるCDRから選択される3つのCDR(すなわち、これらの配列番号のうちの一つからのCDR1から3)を含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも一つは、配列番号39における3つのCDRを含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、DLL4とVEGFを結合させることができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53を含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも一つは、配列番号39を含む。

30

40

【0018】

様々な実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、DLL4のエピトープとVEGFのエピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ここで、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを含み、VD1は、第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は、第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは、軽鎖定常ドメインであり、X1は、リンカーを含み、X2は、Fc領域を含まない。一実施形態において、X1は、リンカーであり、ただし、それはCH1およびCLではない。一実施形態において、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、それぞれ、配列番号40、42、44、4

50

6、48、50、52または54におけるCDRから選択される3つのCDR（すなわち、これらの配列番号のうちの1つからのCDR1から3）を含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40における3つのCDRを含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、DLL4およびVEGFに結合することができる。一実施形態において、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54を含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40を含む。

【0019】

別の実施形態において、DLL4のエピトープとVEGFのエピトープに結合する結合タンパク質が開示されている。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一および第二のポリペプチド鎖のそれぞれは、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを独立して含み、VD1は、第一の可変ドメインであり、VD2は、第二の可変ドメインであり、Cは、定常ドメインであり、X1は、リンカーであり、X2は、Fc領域であり、nは、0または1であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する。一実施形態において、X2は、n=1の場合、Fc領域を含み、X2は、n=0の場合、Fc領域を含まない。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上のX1配列は同じである。他の実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上のX1配列は異なっている。いくつかの実施形態において、ポリペプチド鎖の少なくとも1つにあるX1は、CH1ドメインではなく、および/またはCLドメインではない。一実施形態において、X1配列は、短い（例えば、6、5、4、3または2個のアミノ酸）リンカーである。別の実施形態において、X1配列は、長い（例えば、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30個またはそれを超えるアミノ酸）リンカーである。別の実施形態において、2つのポリペプチド鎖のうちの1つにあるX1配列は短いリンカーであり、他のポリペプチド鎖上のX1配列は長いリンカーである。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインはそれぞれ、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53からの3つのCDR（すなわち、これらの配列番号のうちの1つからのCDR1から3）を含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号39における3つのCDRを含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54からの3つのCDR（すなわち、これらの配列番号のうちの1つからのCDR1から3）を含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40における3つのCDRを含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、DLL4およびVEGFに結合することができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53を含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号39を含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54を含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40を含む。

【0020】

様々な実施形態において、VEGFとDLL4に結合することができる結合タンパク質が開示されている。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一および第二のポリペプチド鎖のそれぞれは、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを独立して含み、VD1は、第一の可変ドメインであり、VD2は、第二の可変ドメインであり、Cは、定常ドメインであり、X1は、リンカーであり、X2は、Fc領域であり、nは、0または1であり、ここで、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する。一実施形態において、VEGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメイン

は、配列番号 4 1 からの 3 つの C D R と配列番号 4 2 からの 3 つの C D R (例えば、別々の鎖に存在する配列番号 4 1 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 2 からの C D R 1 から 3、それぞれの鎖の C D R は、特定の順番で配置され、適切なフレームワーク配列によって分離され、機能的結合部位を形成する。)を含む。一実施形態において、D L L 4 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号 3 9 からの 3 つの C D R 1 からと配列番号 4 0 からの 3 つの C D R (例えば、別々の鎖に存在する配列番号 3 9 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 0 からの C D R 1 から 3、それぞれの鎖の C D R は、特定の順番で配置され、適切なフレームワーク配列によって分離され、機能的結合部位を形成する。)を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 4 1 からの 3 つの C D R と配列番号 4 2 からの 3 つの C D R (例えば、配列番号 4 1 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 2 からの C D R 1 から 3)を含む、V E G F についての機能的標的結合部位、および配列番号 3 9 からの 3 つの C D R と配列番号 4 0 からの 3 つの C D R (例えば、配列番号 3 9 からの C D R 1 から 3 と配列番号 4 0 からの C D R 1 から 3)を含む、D L L 4 についての機能的標的結合部位を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 4 1 と配列番号 4 2 を含む、V E G F についての機能的標的結合部位、および配列番号 3 9 と配列番号 4 0 を含む、D L L 4 についての機能的標的結合部位を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 5 6 を含む第一のポリペプチド鎖、および配列番号 6 4 を含む第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 3 を含む第一のポリペプチド鎖、および配列番号 7 4 を含む第二のポリペプチド鎖を含む。いくつかの実施形態において、D L L 4 について結合部位を形成する可変ドメインは、米国出願公開第 2 0 1 1 0 2 1 7 2 3 7 号の可変ドメインを含み、および/または V E G F について結合部位を形成する可変ドメインは、米国出願公開第 2 0 1 0 0 0 7 6 1 7 8 号の可変ドメインを含み、これらの文献は、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、結合タンパク質は、h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v を含む。一実施形態において、h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v 結合タンパク質は、ヒト I g G 1 L A L A 変異体由来の F c 領域を含む。

10

20

【 0 0 2 1 】

ヒト治療薬、例えば、抗癌剤 / 抗腫瘍剤としての使用に適した結合タンパク質の開発および生産は、所望の標的に結合することができる結合タンパク質の同定よりも多くのことを必要とし得る。例えば、候補物は、この標的に結合するが、この所望の標的を阻害または中和する能力の低下を示してもよく、安定に製剤化することが困難であることが明らかになってもよく、または適した発現系 (例えば、C H O などの宿主細胞における発現) において生成することが困難であることが明らかになってもよい。したがって、適した治療薬の開発において考慮すべき因子としては、限定されないが、(a) 内部と外部の抗原結合ドメインの両方についての結合動態 (結合速度、解離速度および親和性)、(b) 種々の生化学的アッセイおよび細胞バイオアッセイにおける効力、(c) 関連する腫瘍モデルにおけるインビボでの有効性、(d) 薬物動態学的および薬力学的特性、(e) 選択された細胞株におけるタンパク質発現レベル、拡張性、翻訳後修飾、物理化学的特性、例えば、モノマーの割合、溶解性および安定性 (固有の安定性、凍結 / 解凍安定性、保存安定性など) を含む製造安定性、(f) 製剤特性、(g) 潜在的な免疫原性リスク、および (h) 分子の毒性が挙げられる。また、結合様式および結合価は評価され得て、それは、これらが分子の結合特性および細胞効力に影響を及ぼし得るためである。いくつかの結合タンパク質について、可変ドメイン、定常ドメインおよび/またはリンカーのアミノ酸配列のごく小さな変化は、これらの因子の 1 つ以上に潜在的に (正または負に) 影響を与える可能性があり、そのため、因子の組み合わせは、リード候補物を選択するために評価され得る。リード候補物が同定されると、治療特性のさらなるインビボ評価が行われ、動物およびヒト対象における安全性、有効性および効力の評価が含まれる。

30

40

【 0 0 2 2 】

予想外に、配列番号 5 6 と配列番号 6 4 とを含む結合タンパク質または配列番号 7 3 と配列番号 7 4 とを含む結合タンパク質が、異なる可変ドメインおよび/またはリンカー配

50

列を含む他の評価された結合タンパク質と比較して、この点において特性の優れた組み合わせ、例えば、治療的に有用な閾値を超える結合動態（すなわち、解離定数）、改善された中和能力、増大したインビボ有効性、優れた製剤化性、所望のグリコシル化パターン、好ましい薬物動態プロファイル、および宿主細胞における効率的な発現を示したことが見出された。比較された結合タンパク質には、同じ可変ドメイン配列と配向を有するが、異なるリンカーを有するタンパク質、ならびに変更された結合ドメイン配向および/または他の可変ドメイン配列（例えば、親和性成熟配列、十分なヒト配列など）を有するタンパク質が含まれ得る。いくつかの実施形態において、これらの優れた特性は、特定の可変ドメイン配列（例えば、配列番号39-42）の選択、内部および外部の位置におけるVEGFおよびDLL4結合ドメインの特定の配向（例えば、配列番号56と配列番号64において提供される配向）、特定のリンカー配列（例えば、配列番号56において使用される重鎖可変ドメインと短いリンカー配列、ならびに配列番号64において使用される軽鎖可変ドメインと長いリンカー配列）、および/または特定の定常ドメイン配列（例えば、配列番号73と74において使用される定常ドメイン配列）に依存する。いくつかの実施形態において、単にリンカー配列を変更することにより、機能的特性に大きな影響を与える場合がある。例えば、配列番号73と74において使用されるリンカー配列（これらの配列番号に含まれる可変ドメインおよび定常ドメインとともに）を選択することは、結合タンパク質のヒト治療特性に予想外の改善を提供し得る。例えば、表9は、結腸直腸腺癌および神経膠芽腫異種移植モデルにおいて測定した場合、インビボでの抗腫瘍効果において異なるリンカー配列の効果を示す。したがって、例えば、配列番号56と64または配列番号73と74における配列（そこに含まれるリンカー配列を含む。）を用いることは、インビボでの抗腫瘍効果における予想外の利益を生み出すことができる。

10

20

【0023】

様々な実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、例えば、VEGFに対する抗体（例えば、AVASTIN(R)）またはDLL4に対する抗体（例えば、抗体h1A11.1）について観察されたものとおよそ比較し得るレベルで、VEGFおよび/またはDLL4について所望の結合親和性、遮断能力および/または中和効力を示す。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、他の可変ドメイン配列とリンカーを含むDVD-Ig結合タンパク質と比較して、VEGFおよび/またはDLL4について、親和性、遮断能力および/または中和効力の増加を示す。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、配列番号41からの3つのCDRと配列番号42からの3つのCDRを含むVEGFについての機能的標的結合部位、ならびに配列番号39からの3つのCDRと配列番号40からの3つのCDRを含むDLL4についての機能的標的結合部位を含み、または配列番号41と配列番号42を含むVEGFについての機能的標的結合部位、ならびに配列番号39と配列番号40を含むDLL4についての機能的標的結合部位を含み、または配列番号56と配列番号64を含み、または配列番号73と配列番号74とを含む。例えば、結合タンパク質（例えば、配列番号56と配列番号64とを含む結合タンパク質または配列番号73と配列番号74とを含む結合タンパク質）は、VEGFに結合することができ、表面プラズモン共鳴によって測定された場合、解離定数(K_D)は最大約 7.0×10^{-10} Mであり、および/またはVEGF活性を遮断することができ、VEGF R1競合ELISAにおいて測定された場合、 IC_{50} は最大約3.8 nMであり、および/またはDLL4に結合することができ、表面プラズモン共鳴によって測定された場合、解離定数(K_D)は最大約 1.0×10^{-8} Mであり、および/またはDLL4活性を遮断することができ、Notch競合ELISAにおいて測定された場合、 IC_{50} は最大約1.09 nMである。

30

40

【0024】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質（例えば、配列番号56と配列番号64を含む結合タンパク質、または配列番号73と配列番号74を含む結合タンパク質）は、VEGF抗体とDLL4抗体（例えば、結合タンパク質についての可変ドメインを提供するために使用される親抗体）の混合物と比較して、VEGFの存在下である場合も、DL

50

L 4 についての中和効力の増加を示し得る。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、VEGF 抗体とDLL4 抗体（例えば、結合タンパク質について可変ドメインを提供するために使用される親抗体）の混合物と比較して、VEGF の存在下である場合も、DLL4 についての中和効力の一桁大きい増加を示し得る。例えば、表 2 4 は、配列番号 7 3 と配列番号 7 4 を含む結合タンパク質が、VEGF 抗体と DLL4 抗体（結合タンパク質について可変ドメインを提供するために使用される親抗体）の混合物と比較して、少なくとも約 1 . 2 nM VEGF（例えば、少なくとも約 1 . 2、1 . 5、2、2 . 5、5、1 0、5 0、1 5 0 またはそれらを超える。）の存在下である場合も、DLL4 についての中和効力の一桁大きい増加を示し得る。この DLL4 中和効力は有益であり得て、これは、腫瘍に対する治療のインビボ状況において、VEGF レベルは、通常、血液循環におけるよりも腫瘍の近辺において高く、一般的に、腫瘍部位での改善された標的化と増大した機能的 DLL4 中和活性の両方を可能にする。

10

【 0 0 2 5 】

様々な実施形態において、結合タンパク質（例えば、配列番号 5 6 と配列番号 6 4 とを含む結合タンパク質または配列番号 7 3 と配列番号 7 4 とを含む結合タンパク質）は、癌および/または血管新生した腫瘍に対する他の治療と比較して、改善された特性、例えば、改善された安全性、増加した安定性、より大きな効力、減少した炎症もしくは免疫応答、またはインビボでのヒト治療特性に有益な他のものを示す。比較に適した治療には、小分子抗癌剤、VEGE に対する抗体（例えば、AVASTIN (R)）および/または DLL4（例えば、抗体 h 1 A 1 1 . 1）、または他の可変ドメイン配列および/またはリンカーを含む DVD - Ig 結合タンパク質の投与が挙げられ得る。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、癌および/または血管新生した腫瘍に対する療法の現在の標準と比較して、改善された特性を示す。例えば、結合タンパク質は、改善された結合動態、優れたインビボでの治療効果、増大した製剤化性（凝集減少および改善された保存安定性を含む。）、改善された薬物動態、減少した炎症または免疫応答、および/または増大した宿主細胞発現レベルを示すことができる。

20

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質（例えば、配列番号 5 6 と配列番号 6 4 とを含む結合タンパク質または配列番号 7 3 と配列番号 7 4 とを含む結合タンパク質）は、1 つ以上の抗癌剤と組み合わせた抗 VEGF 抗体もしくは抗 DLL4 抗体と比較して、または 1 つ以上の抗癌剤と組み合わせた他の可変ドメイン配列および/もしくはリンカーを含む DVD - Ig 結合タンパク質と比較して、1 つ以上の抗癌剤と組み合わせた優れた（例えば、相加的および/または超相加的）効果を示す。例えば、優れた結合特性は、表 2 7 - 3 0 および 3 4 において同定されたものであってもよい。例えば、結合タンパク質は、処置されていない腫瘍と比較して、単独でまたは 1 つ以上の抗癌剤と組み合わせた投与後に、腫瘍増殖の少なくとも約 5 0 % もしくはそれより大きい（例えば、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 2 5、1 5 0 % またはそれらを超える。）阻害または腫瘍増殖の遅延を示すことができる。抗癌剤は、例えば、1 つ以上のイリノテカン、FOLFIRI、テモゾロミド、ゲムシタピン、パクリタキセル、5 - FU およびカペシタビン、または特定の癌の処置に使用される任意の他の小分子または生物剤であってもよい。単独または 1 つ以上の抗癌剤と組み合わせた結合タンパク質は、例えば、結腸癌、膠芽腫、膵臓癌または乳癌を処置するための医薬として用いることができる。

30

40

【 0 0 2 7 】

一実施形態において、二重可変ドメイン (DVD - Ig) 結合タンパク質は、先の段落に記載されている 2 つの第一のポリペプチド鎖と 2 つの第二のポリペプチド鎖（すなわち、4 つのポリペプチド鎖を含む。）を含み、ここで、ポリペプチド鎖のそれぞれは、VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - (X 2) n を含み、VD 1 は、第一の可変ドメインであり、VD 2 は、第二の可変ドメインであり、C は、定常ドメインであり、X 1 は、リンカーであり、X 2 は、Fc 領域であり、n は、0 または 1 である。いくつかの実施形態におい

50

て、第一鎖は、重鎖であり、軽鎖である第二鎖と対を形成する。このようなDVD-Ig結合タンパク質は、4つの機能的標的結合部位を含む。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上のX1リンカーは、同一または異なっている。いくつかの実施形態において、DVD-Ig結合タンパク質は、いずれかの配向で、同一または異なるタンパク質の2つ以上のエピトープ（例えば、2つ、3つまたは4つ）に結合することができる少なくとも2つの可変ドメイン配列（例えば、VD1およびVD2）を含む。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインはそれぞれ、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53からの3つのCDRを含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号39における3つのCDRを含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54からの3つのCDRを含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40における3つのCDRを含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、DLL4およびVEGFに結合することができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインはそれぞれ、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53を含み、ここで、VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号39を含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインはそれぞれ、配列番号40、42、44、46、48、50、52または54を含み、ここで、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40を含む。

10

20

【0028】

別の実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質は、表2に示されている重鎖および軽鎖配列を含み、ここで、VD1および/もしくはVD2重鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号39を含み、ならびに/またはVD1および/もしくはVD2軽鎖可変ドメインの少なくとも1つは、配列番号40を含む。

【0029】

さらなる実施形態において、重鎖、軽鎖、2本鎖または4本鎖の実施形態のいずれかは、配列番号1-38から選択されるリンカーを含む少なくとも1つのX1リンカーを含む。一実施形態において、X2はFc領域である。別の実施形態において、X2は可変Fc領域である。

30

【0030】

さらに別の実施形態において、Fc領域は、第一のポリペプチド中に存在する場合、天然配列Fc領域またはバリエーション配列Fc領域である。さらに別の実施形態において、Fc領域は、IgG1のFc領域、IgG2のFc領域、IgG3のFc領域、IgG4のFc領域、IgAのFc領域、IgMのFc領域、IgEのFc領域またはIgDのFc領域である。特定の実施形態において、Fc領域は、HIVウイルスに対して保護を付与するb12抗体の変異体であるヒトIgG1 LALA変異体由来のFc領域である。

【0031】

2つの異なる標的タンパク質に結合する結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、結合タンパク質を作製する方法は、第一のエピトープに結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程；b)第二のエピトープに結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程；c)本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物を調製する工程；およびd)ポリペプチド鎖を発現させ、第一および第二のエピトープに結合する結合タンパク質を生じさせる工程を含む。

40

【0032】

本明細書における実施形態のいずれかにおいて、存在する場合、VD1重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第一の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよく；存在する場合、VD2重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第二の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよい。第一および第二の親抗体は同じであってもよくまたは異なってもよい。

50

【 0 0 3 3 】

一実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は第一の抗原に結合し、第二の親抗体またはその抗原結合部分は第二の抗原に結合する。一実施形態において、第一および第二の抗原は異なる抗原である。別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する。さらに別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原に結合する。

【 0 0 3 4 】

別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は、ヒト抗体、CDR移植された抗体、ヒト化抗体および/または親和性成熟された抗体である。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態において、結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分によってまたは第二の親抗体もしくはその抗原結合部分によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。あるいは、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分は、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および/または多重特異的結合タンパク質は、特に治療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および/または多重特異的結合タンパク質は、(1)抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれる(および/または異化される);(2)タンパク質に結合するアゴニストであり;および/または(3)多価結合タンパク質が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および/またはアポトーシスを誘導し得る。多価および/または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ(および/または異化される)抗体であり得、および/またはアゴニスト、細胞死誘導および/またはアポトーシス誘導抗体であり得、本明細書に記載されている多価および/または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、親抗体は、これらの特性の任意の1つ以上を欠損してもよいが、本明細書に記載されるように、多価結合タンパク質として構築された場合、これらの1つ以上を取得してもよい。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のうちの一つ以上の標的への結合速度定数(K_{on})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的に対する結合速度定数(K_{on})を有する。

【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-2} s^{-1} ; 最大約 10^{-3} s^{-1} ; 最大約 10^{-4} s^{-1} ; 最大約 10^{-5} s^{-1} ; または最大約 10^{-6} s^{-1} のうちの一つ以上の標的への解離速度定数(K_{off})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、約 10^{-2} s^{-1} から約 10^{-3} s^{-1} の、約 10^{-3} s^{-1} か

10

20

30

40

50

ら約 10^{-4} s^{-1} の、約 10^{-4} s^{-1} から約 10^{-5} s^{-1} の、または約 10^{-5} s^{-1} から約 10^{-6} s^{-1} の間の、1つ以上の標的に対する解離速度定数 (K_{off}) を有する。

【0038】

別の実施形態において、結合タンパク質は、1つ以上の標的に対する平衡解離定数 (K_D) が、最大約 10^{-7} M ; 最大約 10^{-8} M ; 最大約 10^{-9} M ; 最大約 10^{-10} M ; 最大約 10^{-11} M ; または最大約 10^{-12} M である。一実施形態において、結合タンパク質は、この標的に対する平衡解離定数 (K_D) が、約 10^{-7} M から約 10^{-8} M ; 約 10^{-8} M から約 10^{-9} M ; 約 10^{-9} M から約 10^{-10} M ; 約 10^{-10} M から約 10^{-11} M ; または約 10^{-11} M から約 10^{-12} M である。

10

【0039】

いくつかの実施形態において、抗 D L L 4 / 抗 V E G F 結合タンパク質は、抗 D L L 4 抗体または抗 V E G F 抗体と比較して、効力の増加 (例えば、D L L 4 および / または V E G F 活性に干渉し、阻害および / または中和する能力の増加) を示す。いくつかの実施形態において、結合タンパク質の効力は、V E G F および / または D L L 4 活性を評価するための任意のアッセイ、例えば、V E G F および / または D L L 4 結合 E L I S A アッセイ、B I A C O R E (T M) アッセイ、D L L 4 - N o t c h 受容体アッセイ、V E G F 刺激された内因性細胞増殖 / 生存アッセイ、または当業者に公知の任意の他のアッセイにおいて評価され得る。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、V E G F の存在下で、D L L 4 効力の増加を示す。

20

【0040】

別の実施形態において、本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかを含み、さらにある薬剤を含むコンジュゲートが提供される。一実施形態において、抗原は、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である。一実施形態において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである。別の実施形態において、放射性標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である。さらに別の実施形態において、治療剤または細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である。いくつかの実施形態において、薬剤は、イリノテカン、ロイコボリン、5 - F U、テモゾロミド、ゲムシタピンおよびパクリタキセルの1つ以上である。一実施形態において、薬剤はイリノテカンである、一実施形態において、薬剤はロイコボリンである。一実施形態において、薬剤は5 - F Uである。一実施形態において、薬剤は、イリノテカン、ロイコボリンおよび5 - F Uである。一実施形態において、薬剤はテモゾロミドである。一実施形態において、薬剤はゲムシタピンである。一実施形態において、薬剤はパクリタキセルである。

30

【0041】

別の実施形態において、コンジュゲートは、結合タンパク質および薬剤を含む。一実施形態において、コンジュゲートにおける結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一および第二のポリペプチド鎖のそれぞれは、V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n を独立して含み、V D 1 は、第一の変域ドメインであり、V D 2 は、第二の変域ドメインであり、C は、定常ドメインであり、X 1 は、リンカーであり、X 2 は、Fc領域であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のV D 1 ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のV D 2 ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成し、結合タンパク質は、V E G F と D L L 4 に結合することができる。いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は、表 2 に開示されている配列のいずれかからの C D R または可変ドメイン配列を含み、対を形成し、V E G F と D L L 4 について機能的結合部位を形成するために配置される。一実施形態において、コンジュゲートにおける薬物は、有糸分裂阻害剤、抗腫瘍性抗生物質、免疫調節剤、遺伝子治療用ベクター、アルキル化剤、抗血管新生剤、代謝拮抗剤、ホウ素含有剤、化

40

50

学保護剤、ホルモン、抗ホルモン剤、副腎皮質ステロイド、光活性治療剤、オリゴヌクレオチド、放射性核種剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤および放射線増感剤からなる群から選択される。別の実施形態において、薬剤は、イクセンブラ、ドラスタチン10、ドラスタチン15、アウリスタチンE、アウリスタチンPE、モノメチルアウリスタチンD (MMA DまたはアウリスタチンD誘導体)、モノメチルアウリスタチンE (MMA EまたはアウリスタチンE誘導体)、モノメチルアウリスタチンF (MMA FまたはアウリスタチンF誘導体)、アウリスタチンFフェニレンジアミン (AFP)、アウリスタチンEB (AEB)、アウリスタチンEFP (AEFP)、5-ベンゾイル吉草酸-AEエステル (AEVB)、メトトレキサート、ダウノルピシン、ピンクリスチン、メイタンシン、メイタンシノール、メイタンシノールのC-3エステル、アンサマイトシンP1、アンサマイトシンP2、アンサマイトシンP3、アンサマイトシンP4、ドセタキセル、パクリタキセル、ナノ粒子パクリタキセル、硫酸ピンデシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、アクチノマイシン、アクチノマイシンD、アントラマイシン、キカマイシンA、DC-18、マゼトラマイシン、ネオトラマイシンA、ネオトラマイシンB、プロトラカルシンB、SG2285、シバノマイシン、シビロマイシン、アントラサイクリン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、カリケアマイシン、 $1'$ 、 $2'$ 、 $3'$ 、N-アセチル $1'$ 、PSAG、 $1'$ 、デュオカルマイシン、アドゼレシン、ビゼレシン、およびカルゼレシン、プレオマイシン、マイトマイシン、プリカマイシン、パチルスカルメット-ゲラン (BCG)、レバミゾール、癌ワクチン、組換え二価ヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチン16および18型ワクチン、組換え四価ヒトパピローマウイルス (HPV) 6、11、16および18型ワクチン、シブリューセル-T、サイトカイン、副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、および黄体形成ホルモン (LH) などの糖タンパク質ホルモン、肝細胞増殖因子；線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子、ミューラー管阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン (TPO)、NGFなどの神経成長因子、血小板増殖因子、形質転換増殖因子 (TGF)、インスリン様増殖因子-IおよびII、エリスロポエチン (EPO)、骨誘導因子、インターフェロン α 、および β などのインターフェロン、コロニー刺激因子 (CSF)、顆粒球-マクロファージ-C-SF (GM-CSF) および顆粒球-C-SF (G-CSF)、インターロイキン (IL)、例えば、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、腫瘍壊死因子および他のポリペプチド因子、例えば、LIFおよびキットリガンド (KL)、コロニー刺激因子、エリスロポエチン (エポエチン)、フィルグラスチム、サルグラモスチム、プロメガポイエチン、オブレレベキン、免疫調節遺伝子治療剤、癌と関連した、変異したまたは他には機能不全 (例えば、切断された) 遺伝子を置換するために使用される機能的な治療的遺伝子をコードする核酸、癌を処置するための治療的タンパク質をコードするまたは他にはこの生成のために提供する核酸、スルホン酸アルキル、ブスルファン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、およびメルファラン、ニトロソウレア、カルムスチン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ストレプトゾシン、トリアジンおよびヒドラジン、ダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド、エチレンイミン、チオペタ (thiopeta)、ジアジコン、マイトマイシンC、メチルアミン誘導体、エポキシド、アルトレタミン、ジアンヒドロガラクトール、ジブプロモズルシトール、アンジオスタチン、ABX EF G、C1-1033、PKI-166、EGFワクチン、EKB-569、GW2016、ICR-62、EMD55900、CP358、PD153035、AG1478、IMC-C225、OSI-774、エルロチニブ、アンジオスタチン、アレスチン、エンドスタチン、BAY12-9566、w/フルオロウラシルまたはドキシソルピシン、カンスタチン、カルボキシアミドトリオゾールおよびパクリタキセルともに、EMD1219

10

20

30

40

50

74、S-24、ピタキシン、ジメチルキサンテノン酢酸、IM862、インターロイキン-12、インターロイキン-2、NM-3、HuMV833、PTK787、RhuMAb、アンジオザイム、IMC-1C11、ネオバスタット、マリムスタット、プリノマスタット、BMS-275291、COL-3、MM1270、SU101、SU6668、SU11248、SU5416、パクリタキセルとともに、ゲムシタピンとシスプラチンとともに、イリノテカンとシスプラチンとともにおよび放射線とともに、テコガラシ、テモゾロミドおよびPEGインターフェロン 2b、テトラチオモリブデン酸、TNP-470、サリドマイド、CC-5013およびタキソテレとともに、タムスタチン、2-メトキシエストラジオール、VEGFトラップ、mTOR阻害剤(デフォロリムス、エペロリムスおよびテムシロリムス)、チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、イマチニブ、ゲフィチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、ニロチニブ、ラパチニブ、ソラフェニブ、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)、葉酸アンタゴニスト、メトトレキサート、4-アミノ葉酸、ロメトレキサール、ペメトレキセド、トリメトレキサート、ピリミジンアンタゴニスト、アザチジン、カペシタピン、シタラピン、デシタピン、5-フルオロウラシル、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン-5'-リン酸、5-フルオロウリジントリホスフェート、ゲムシタピン、フロクスウリジン(foxuridine)、プリンアンタゴニストアザチオプリン、クラドリピン、メルカプトプリン、フルダラピン、ペントスタチン、6-チオグアニン、アデノシンデアミナーゼ阻害剤、クラドリピン、フルダラピン、ネララピン、ペントスタチン、ボロフィシン、ボルテゾミブ、化学保護剤、アミフォスチン、デクスラゾキサソ、メスナ、アンドロゲン、エストロゲン、酢酸メドロキシプロゲステロン、プロゲステロン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、ピカルタミド、クロロトリアニセス(chlorotrianisenes)、酢酸シプロテロン、デガレリクス、エキセメスタン、フルタミド、フルベストラント、ゴセレリン、レトロゾール、ロイプロリド、ルブロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、タモキシフェン、トリプトレリン、アスパラギナーゼ、ダカルバジン、ヒドロキシ尿素、レバミゾール、ミトタン、プロカルバジン、トレチノイン、グルココルチコイド、プレドニゾン、クロマゲン、染料、天然に存在するまたは標準的なおよび/もしくは非標準的なヌクレオチドを用いて合成されるアンチセンスオリゴヌクレオチド(RNA干渉(RNAi)を含む。)、二本鎖RNA(dsRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アプタマー、CpGオリゴヌクレオチド、リボザイム、アンジオザイム、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、²¹²Pb、²¹³Pb、²¹¹At、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹¹¹Ag、⁶⁷Ga、¹⁴²Pr、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、²¹²Pb、²²³Ra、²²⁵Ac、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、⁷⁷As、⁸⁹Sr、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、⁶⁹Er、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹Pb、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111 1、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m、Ir-192、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211 1、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Fm-255、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁷⁵Br、¹⁹⁸Au、²²⁴Ac、¹²⁶I、¹³³I、⁷Br、^{113m}In、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Ru、¹⁰⁷Hg、²⁰³Hg、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Tm、¹⁹⁷Pt、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁵Rh、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁹⁹Au、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、²⁰¹Tl、²²⁵Ac、⁷⁶Br、¹⁶⁹Yb、タキサン、シスプラチン、メトロニダゾール、ミソニダゾール、デスメチルミソニダゾール、ピモニダゾール、エタニダゾール、ニモラゾール、マイトマイシンC、RSU1069、SR4233、E09、RB6145、ニコチンアミド、5-プロモデオキシウリジン(BUdR)、5-ヨードデオキシウリジン(IUdR)、プロモデオキシシチジン、フルオロデオキシウリジン(FUdR)、

10

20

30

40

50

ヒドロキシウレア、ヘマトポルフィリン誘導体、フォトフリン(r)、ベンゾポルフィリン誘導体、NPe6、スズエチオポルフィリン(SnET2)、フェオホルビドa、バクテリオクロコフィルa、ナフトロシアニン、フタロシアニン、亜鉛フタロシアニン、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、ダウノルピシン、ドキシトルピシン(doxotrubicin)、エピドフィロトキシシン、エリブチシン、エピルピシン、エトポシド、ラゾキサン、テニポシド、アキシチニブ、ボスチニブ、セジラニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レスタウルチニブ、ニロチニブ、セマキサニブ、スニチニブ、バンデタニブ、ア布林、ア布林A鎖、アルファトキシシン、シナアブラギリタンパク質、アマトキシシン、クロチン、クルシン、ジアンチンタンパク質、ジフテリア毒素、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、デオキシリボヌクレアーゼ(DNアーゼ)、ゲロニン、マイトゲリン、モデシンA鎖、ゴーヤー阻害剤、ネオマイシン、オンコナーゼ、フェノマイシン、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス内毒素、シュードモナス外毒素、シュードモナス・エルギノーザ(Pseudomonas aeruginosa)由来の外毒素A鎖、レストリクトシン、リシン、リシンA鎖、リボヌクレアーゼ(Rnase)、サポナリア・オフィキナリス(saponaaria officinalis)阻害剤、サポリン、アルファ-サルシン、ブドウ球菌エンテロトキシシンA、破傷風毒素、シスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチン(エロキサチン、Sanofi Aventis)、プロテアソーム阻害剤、PS-341、HDAC阻害剤、ポリノスタット、ベリノスタット、エチノスタット、モセチノスタット、パノビノスタット、COX-2阻害剤、置換尿素、熱ショックタンパク質阻害剤、ゲルダナマイシン、副腎皮質抑制剤、トリコテセン、A12、19D12、Cp751-871、H7C10、アルファIR3、ScFv/FC、EM/164、マツズマブ、エルビタックス、ベクチピックス、mAb806、ニモツクマブ(Nimotuxumab)、AVEO、AMG102、5D5(OA-5d5)、H244G11、Ab#14(MM121-14)、ハーセプチン、1B4C3; 2D1D12、NVP-AEW541-A、BMS-536、924(1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-1H-ピリジン-2-オン)、BMS-554、417、シクロリガン、TAE226、PQ401、イレッサ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ、タルセバ、PKI-166、PD-158780、EKB-569、チルホスチンAG1478(4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)、PHA665752、ARQ197、カペシタピン、5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン、メトトレキサートナトリウム、ラルチトレキシド、ペメトレキシド、テガフル、シトシンアラビノシド(シタラビン)、5-アザシチジン、6-メルカプトプリン(メルカプトプリン、6-MP)、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリピン(2-CdA、2-クロロデオキシシアデノシン)、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤、シクロホスファミド、ネオザール、イホスファミド、チオテパ、BCNU 1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトソウレア、CCNU 1-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1-ニトロソウレア(メチルCCNU)、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、プロカルバジンHCL、ダカルバジン(DTIC)、クロラムブシル、メルファラン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ドキシソルピシンHCL、クエン酸ダウノルピシン、ミトキサントロンHCL、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCL、テニポシド、イリノテカンHCL(CPT-11)、ピンクリスチン、硫酸ピンブラスチン、酒石酸ピノレルピン、ピンデシン硫酸、パクリタキセル、ドセタキセル、アブラキサン、イクサベピロン、メシル酸イマチニブ、リンゴ酸スニチニブ、ソラフェニブトスラート(sorafenib tosylate)、ニロチニブ塩酸塩一水和物、L-アスパラギナーゼ、アルファインターフェロン、アバスチン、IL-2、アルデスロイキン、プロロイキン、IL-12、クエン酸トレミフェン、フルベストラント、ラロキシフェンHCL、アナストロゾール、レトロゾール、ファドロゾール(C

10

20

30

40

50

G S 1 6 9 4 9 A)、エキセメスタン、酢酸ロイプロリド、ルブロン、酢酸ゴセレリン、パモ酸トリプトレリン、ブセレリン、ナファレリン、セトロレリクス、ピカルタミド、ニルタミド、酢酸メゲストロール、ソマトスタチン類似体、プレンジソロン (p r e n d i n s o l o n e)、デキサメタゾン、ケトコナゾール、シロリムス、テムシロリムス (C C I - 7 7 9)、デフォロリムス (A P 2 3 5 7 3)、イリノテカン；ロイコボリン；フォルフィリ；5 - F U；エナラプリル；ニフェジピン；クロニジン；テモゾロミド；ゲムシタピン；カペシタピン；パクリタキセル；レゴラフェニブ；ペルツズマブおよびエベロリムス (R A D 0 0 I) からなる群から選択される。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている1つ以上の結合タンパク質および1つ以上の追加の薬剤、例えば、化学療法剤を含む組成物が開示されている。例えば、組成物は、1つ以上の追加の薬剤を含む溶液中の1つ以上の結合タンパク質を含むことができる。いくつかの実施形態において、薬剤は、イリノテカン、ロイコボリン、5 - F U、テモゾロミド、ゲムシタピンおよびパクリタキセルのうちの1つ以上である。一実施形態において、薬剤はイリノテカンである。一実施形態において、薬剤はロイコボリンである。一実施形態において、薬剤は5 - F Uである。一実施形態において、薬剤は、イリノテカン、ロイコボリンおよび5 - F Uである。一実施形態において、薬剤はテモゾロミドである。一実施形態において、薬剤はゲムシタピンである。一実施形態において、薬剤はパクリタキセルである。

【 0 0 4 3 】

別の実施形態において、結合タンパク質は結晶化された結合タンパク質であり、結晶として存在する。一実施形態において、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、この結合タンパク質の可溶性対応物より大きなインビボ半減期を有する。さらに別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は生物学的活性を保持する。

【 0 0 4 4 】

別の実施形態において、本明細書に記載されている結合タンパク質はグリコシル化される。例えば、グリコシル化パターンは、ヒトグリコシル化パターンである。

【 0 0 4 5 】

本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つをコードする単離された核酸も提供される。さらなる実施形態は、本明細書に開示されている単離された核酸を含むベクターを提供し、ベクターは、p c D N A ; p T T (D u r o c h e r e t a l . (2 0 0 2) N u c l e i c A c i d s R e s . 3 0 (2) ; p T T 3 (追加の多重クローニング部位を有する p T T) ; p E F B O S (M i z u s h i m a a n d N a g a t a , (1 9 9 0 年) N u c l e i c A c i d s R e s . 1 8 : (1 7) ; p B V ; p J V ; p c D N A 3 . 1 T O P O ; p E F 6 T O P O ; p B O S ; p H y b E ; または p B J である。一実施形態において、ベクターは、米国特許公開第 2 0 0 9 0 2 3 9 2 5 9 号に開示されているベクターである。

【 0 0 4 6 】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されたベクターで形質転換される。一実施形態において、宿主細胞は原核細胞、例えば、E . コリ (E . c o l i) である。別の実施形態において、宿主細胞は真核細胞、例えば、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である。一実施形態において、宿主細胞は、これらに限定されないが、C H O、C O S ; N S 0、S P 2、P E R . C 6 を含む哺乳動物細胞；またはサッカロミセス・セレビスシアエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) などの真菌細胞；または S f 9 などの昆虫細胞である。一実施形態において、異なる特異性を有する2つまたはそれ以上の結合タンパク質は、単一の組換え宿主細胞中で生産される。例えば、抗体の混合物の発現は、O l i g o c l o n i c s (T M) (M e r u s B . V . , T h e N e t h e r l a n d s) 米国特許第 7 , 2 6 2 , 0 2 8 号および第 7 , 4 2 9 , 4 8 6 号と呼ばれている。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞のいずれか1つを培地中において培養することを含む、本明細書に開示されている結合タンパク質を生産する方法が提供される。一実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の50%から75%が、二重特異的四価結合タンパク質である。別の実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の75%から90%が、二重特異的四価結合タンパク質である。別の実施形態において、生産された結合タンパク質の90%から95%が、二重特異的四価結合タンパク質である。

【 0 0 4 8 】

一実施形態は、結合タンパク質の放出のための組成物を提供し、この組成物は、結晶化された結合タンパク質、成分、および少なくとも1つのポリマー性担体を含む。一実施形態において、ポリマー担体は、ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-c o -グリコール酸)またはPLGA、ポリ(b-ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(ジオキサノン); ポリ(エチレングリコール)、ポリ((ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテル共重合体、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化多糖またはこれらの混和物および共重合体である。一実施形態において、成分は、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールである。

【 0 0 4 9 】

別の実施形態は、本明細書に開示された組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む哺乳動物を治療する方法を提供する。

【 0 0 5 0 】

本明細書に開示された結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、この医薬組成物は、疾患を治療するための少なくとも1つの追加の治療剤を含む。例えば、追加の薬剤は、治療剤、化学治療剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤(KDRおよびTIE-2阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。)、共刺激分子調節剤(抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗CD20が含まれるが、これらに限定されない。)、接着分子遮断剤(抗LFA-1抗体、抗E/Lセレクチン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。)、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片(抗IL-18、抗TNFまたは抗IL-6/サイトカイン受容体抗体が含まれるが、これらに限定されない。)、抗VEGF mAb; 抗DLL4 mAb; メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506; 検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性薬剤、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストであり得る。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は化学療法剤である。いくつかの実施形態において、追加の薬剤は、イリノテカン、ロイコボリン、5-FU、テモゾロミド、ゲムシタピンおよびパクリタキセルの1つ以上である。一実施形態において、薬剤はイリノテカンである。一実施形態において、薬剤はロイコボリンである。一実施形態において、薬剤は5-FUである。一実施形態において、薬剤はイリノテカン、ロイコボリンおよび5-FUである。一実施形態において、薬剤はテモゾロミドである。一実施形態において、薬剤はゲムシタピンである。一実施形態において、薬

剤はパクリタキセルである。

【 0 0 5 1 】

様々な実施形態において、V E G F および / または D L L 4 を標的とすることによって診断および / または処置され得る障害（例えば、任意の血管新生障害または V E G F および / もしくは D L L 4 の異常発現と関連した任意の他の障害）を患っているヒト対象を診断および / または処置するための方法が提供され、ヒト対象に本明細書に開示されている結合タンパク質を投与することを含み、それにより、ヒト対象における標的の活性が阻害され、1つ以上の症状が軽減されまたは処置が達成される。本明細書において提供されている結合タンパク質は、原発性または転移性癌、例えば、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、膵臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖管（子宮頸部、子宮、卵巣、ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖管（前立腺、精嚢、精巣および胚細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）、および皮膚の癌腫、ならびに血管腫、黒色腫、肉腫（骨および軟組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜（星細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン腫および髄膜腫を含む。）の腫瘍、造血器悪性腫瘍から生じる腫瘍、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、急性骨髄性白血病（A M L）、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病（C M L）、慢性リンパ球性白血病（C L L）、ヘアリー細胞白血病、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、造血器悪性腫瘍、カポジ肉腫、悪性リンパ腫、悪性組織球症、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、腫瘍随伴症候群 / 悪性の高カルシウム血症、または固形腫瘍を患っているヒト対象を診断および / または処置するために用いることができる。

10

20

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態において、患者における癌を処置する方法は、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。一実施形態において、癌は結腸癌である。一実施形態において、癌は膠芽細胞腫である。一実施形態において、癌は膵臓癌である。一実施形態において、癌は乳癌である。いくつかの実施形態において、癌を処置する方法であり、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含み、該方法は、抗 V E G F 抗体と抗 D L L 4 抗体の組み合わせの期待される付加的な効果に少なくともほぼ同等である、腫瘍増殖の低減または腫瘍増殖の遅延をもたらす。いくつかの実施形態において、該方法は、付加を超える腫瘍増殖の低減または腫瘍増殖の遅延（例えば、抗 V E G F 抗体および抗 D L L 4 抗体の予期される効果を付加することから期待されるものよりも大きな低減）をもたらす。

30

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、癌を処置する方法は、1つ以上の追加の薬剤、例えば、化学療法剤または生物剤と組み合わせて、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、薬剤は、レゴラフェニブ（S T I V A G R A (T M)）、ペルツズマブ（P E R J E C T A (T M)）、イリノテカン、ロイコボリン、5 - F U、テモゾロミド、ゲムシタピンおよびパクリタキセルの1つ以上である。一実施形態において、薬剤はイリノテカンである。一実施形態において、薬剤はロイコボリンである。一実施形態において、薬剤は5 - F Uである。一実施形態において、薬剤はイリノテカン、ロイコボリンおよび5 - F Uである。一実施形態において、薬剤はテモゾロミドである。一実施形態において、薬剤はゲムシタピンである。一実施形態において、薬剤はパクリタキセルである。いくつかの実施形態において、癌を処置する方法は、1つ以上の追加の薬剤を組み合わせ、本明細書に開示されている1つ以上の結合タンパク質またはこれらの医薬組成物を投与することを含み、該方法は、結合タンパク質と追加の薬剤の組み合わせにより期待される付加的な効果に少なくとも同等である腫瘍増殖の低減または腫瘍増殖の遅延をもたらす。いくつかの実施形態において、該方法は、付加を超える腫瘍増殖の低減または腫瘍増殖の遅延（例えば、

40

50

結合タンパク質および追加の薬剤の予期される効果を付加することから期待されるものよりも大きな低減)をもたらす。

【0054】

いくつかの実施形態において、結腸癌を処置する方法は、場合により、1つ以上のイリノテカン、ロイコボリンおよび5-FUと組み合わせて、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、膠芽細胞腫を処置する方法は、場合により、テモゾロミドと組み合わせて、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、膵臓癌を処置する方法は、場合により、ゲムシタピンと組み合わせて、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、乳癌を処置する方法は、場合により、パクリタキセルと組み合わせて、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上またはこれらの医薬組成物を投与することを含む。

10

【0055】

様々な実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質は、1つ以上の抗高血圧剤と組み合わせて投与することができる。1つ以上の抗高血圧剤は、利尿薬、アドレナリン受容体アンタゴニスト、カルシウムチャネル遮断薬、レニン阻害剤、ACE阻害剤、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、血管拡張剤およびアルファ-2アゴニストからなる群から選択され得る。例えば、薬剤は、1つ以上のクロニジン、エナラプリル；ニフェジピン；メチルドーパ、ヒドララジン、プラゾシン、レセルピン、モキシソニジン、グアンファシン、ペリンドプリル/インダパミド、ロフェキシジンおよびメチロシンであり得る。いくつかの実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質は、1つ以上の抗凝固剤と組み合わせて投与することができる。例えば、抗凝固剤は、1つ以上のワーファリン、ヘパリン、低分子量ヘパリン、ダルテパリンナトリウム、アルガトロバン、ビバルリジン、レピルジンおよびデキストロースであり得る。いくつかの実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質は、1つ以上の抗高血圧剤と1つ以上の抗凝固剤を組み合わせて投与することができる。

20

【0056】

様々な実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質は、黄斑変性症(湿潤形態を含む)、糖尿病性網膜症、および/または血管の異常増殖もしくは浮腫によって特徴付けられる任意の他の疾患もしくは障害を患っているヒトを診断および/または処置するために使用することができる。

30

【0057】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、単独でまたは放射線療法剤および/または化学療法剤と組み合わせて用いる場合、癌を治療するために使用されまたは本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防もしくは阻害において使用される。

【0058】

一実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤または生物剤には、以下の13-cis-レチノイン酸；2-CD A；2-クロロデオキシアデノシン；5-アザシチジン；5-フルオロウラシル；5-FU；6-メルカプトプリン；6-MP；6-TG；6-チオグアニン；アブラキサン；Accutane(R)；アクチノマイシン-D；Adriamycin(R)；Aducil(R)；Afinitor(R)；Agyrlin(R)；Ala-Cort(R)；アルデスロイキン；アレムツズマブ；ALIMTA；アリトレチノイン；Alkabon-AQ(R)；Alkeran(R)；オールトランスレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルトレタミン；アメトプテリン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；Anandron(R)；アナストロゾール；アラビノシルシトシン；Ara-C Aranesp(R)；Aredia(R)；Arimidex(R)；Aromasin(R)；Arranon(R)；三酸化ヒ素；Arzerra(TM)；

40

50

アスパラギナーゼ; A T R A ; A v a s t i n (R) ; アザシチジン; B C G ; B C N U
 ; ベンダムスチン; ベバシズマブ: ベキサロテン; B E X X A R (R) ; ビカルタミド;
 B i C N U ; B l e n o x a n e (R) ; プレオマイシン; ボルテゾミブ; ブスルファン
 ; B u s u l f e x (R) ; C 2 2 5 ; カルシウムロイコボリン; C a m p a t h (R)
 ; C a m p t o s a r (R) ; カンプトセシン - 1 1 ; カペシタピン; C a r a c (T M
) ; カルボプラチン; カルムスチン; カルムスチンウエハー; C a s o d e x (R) ; C
 C - 5 0 1 3 ; C C I - 7 7 9 ; C C N U ; C D D P ; C e e N U ; セルビジン; セツキ
 シマブ; クロラムブシル; シスプラチン; シトロボラム因子; クラドリピン; コルチゾン
 ; C o s m e g e n (R) ; C P T - 1 1 ; シクロフォスファミド; C y t a d r e n (R) ; シタラピン; シタラピンリポゾーマル; C y t o s a r - U (R) ; C y t o x a
 n (R) ; ダカルバジン; ダコゲン; ダクチノマイシン; ダルベポエチンアルファ; ダサ
 チニブ; ダウノマイシン; ダウノルピシン; 塩酸ダウノルピシン; ダウノルピシンリポゾ
 ーマル; D a u n o X o m e (R) ; デカドロン; デシタピン; D e l t a - C o r t e
 f (R) ; D e l t a s o n e (R) ; デニロイキン; ジフチトクス; D e p o C y t (T M) ; デキサメタゾン; 酢酸デキサメタゾン; リン酸デキサメタゾンナトリウム; デキサ
 ソン; デクスラゾキサソ; D H A D ; D I C ; ジオデックス; ドセタキセル; D o x i
 l (R) ; ドキソルピシン; ドキソルピシンリポゾーマル; D r o x i a (T M) ; D T
 I C ; D T I C - D o m e (R) ; D u r a l o n e (R) ; E f u d e x (R) ; E l
 i g a r d (T M) ; E l l e n c e (T M) ; E l o x a t i n (T M) ; E l s p a
 r (R) ; E m c y t (R) ; エピルピシン; エポエチンアルファ; エルビタックス; エ
 ルロチニブ; エルウィニア L - アスパラギナーゼ; エストラムスチン; エチオール E t
 o p o p h o s (R) ; エトボシド; リン酸エトボシド; E u l e x i n (R) ; エベロ
 リムス; E v i s t a (R) ; エキセメスタン; F a r e s t o n (R) ; F a s l o d
 e x (R) ; F e m a r a (R) ; フィルグラスチム; フロクスウリジン; F l u d a r
 a (R) ; フルダラピン; F l u o r o p l e x (R) ; フルオロウラシル; フルオロウ
 ラシル (クリーム); フルオキシムエステロン; フルタミド; フォリン酸; F U D R (R
) ; フルベストラント; ゲフィチニブ; ゲムシタピン; ゲムツズマブオゾガマイシン; ジ
 ェムザール; G l e e v e c (T M) ; G l i a d e l (R) ウエハー; G M - C S F ;
 ゴセレリン; 顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) ; 顆粒球マクロファージコロニー刺
 激因子 (G - M C S F) ; H a l o t e s t i n (R) ; H e r c e p t i n (R) ; ヘ
 キサドロール; H e x a l e n (R) ; ヘキサメチルメラミン; H M M ; H y c a m t i
 n (R) ; H y d r e a (R) ; H y d r o c o r t A c e t a t e (R) ; ヒドロコ
 ルチゾン; リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム; コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム;
 リン酸ハイドロコートン; ヒドロキシ尿素; イブリツモマブ; イブリツモマブチウキサタ
 ン; I d a m y c i n (R) ; I d a r u b i c i n I f e x (R) ; インターフェロ
 ン - アルファ; インターフェロン - アルファ - 2 b (P E G コンジュゲート); イホスフ
 アミド; インターロイキン - 1 1 (I L - 1 1) ; インターロイキン - 2 (I L - 2) ;
 メシル酸イマチニブ; イミダゾールカルボキサミド; I n t r o n A (R) ; I r e s
 s a (R) ; イリノテカン; イソトレチノイン; イキサベピロン; I x e m p r a (T M
) ; K A D C Y C L A (R) ; キドロラーゼ (t) ; L a n a c o r t (R) ; ラパチニ
 ブ; L - アスパラギナーゼ; L C R ; レナリドミド; レトロゾール; ロイコボリン; リュ
 ーケラン; L e u k i n (T M) ; ロイプロリド; ロイコクリスチン; L e u s t a t i
 n (T M) ; リポゾーマル A r a - C ; L i q u i d P r e d (R) ; ロムスチン; L
 - P A M ; L - サルコリジン; L u p r o n (R) ; L u p r o n D e p o t (R) ;
 M a t u l a n e (R) ; マキシデックス; メクロレタミン; 塩酸メクロレタミン; M e
 d r a l o n e (R) ; M e d r o l (R) ; M e g a c e (R) ; メゲストロール; 酢
 酸メゲストロール; メルファラン; メルカプトプリン; メスナ; M e s n e x (T M) ;
 メトトレキサート; メトトレキサートナトリウム; メチルブレドニゾロン; M e t i c o
 r t e n (R) ; マイトマイシン; マイトマイシン - C ; ミトキサントロン; M - P r e
 d n i s o l (R) ; M T C ; M T X ; M u s t a r g e n (R) ; ムスチン; M u t a

10

20

30

40

50

mycin (R); Myleran (R); Mylocel (TM); Mylotarg (R); Navelbine (R); ネララピン; Neosar (R); Neulasta (TM); Neumega (R); Neupogen (R); Nexavar (R); Nilandron (R); ニルタミド; Nipent (R); Nitrogen Mustard Novaldex (R); Novantrone (R); エヌプレート; オクトレオチド; 酢酸オクトレオチド; オクタツムマブ; Oncospar (R); Oncovin (R); Ontak (R); Onxal (TM); オブレルベキン; Orapred (R); Orasone (R); オキサリプラチン; パクリタキセル; タンパク質に結合したパクリタキセル; パミドロネート; パニツムマブ; Panretin (R); Paraplatin (R); パゾパニブ; Pediapred (R); PEGインターフェロン; ペグアスパラガーゼ; ペグフィルグラスチム; PEG-INTRON (TM); PEG-L-アスパラギナーゼ; PEMETREXED; ペントスタチン; フェニルアラニンマスタード; Platinol (R); Platinol-AQ (R); プレドニゾロン; プレドニゾン; Prelone (R); プロカルバジン; PROCRIT (R); Proleukin (R); カルムスチンインプラントを伴う Prolifeprospan 20; Purinethol (R); ラロキシフェン; Revlimid (R); Rheumatrex (R); Rituxan (R); リツキシマブ; Roferon-A (R); ロミブプロスチム; Rubex (R); 塩酸ルビドマイシン; Sandostatatin (R); Sandostatatin LAR (R); サーグラモスティム; Solu-Cortef (R); Solu-Medrol (R); ソラフェニブ; SPRYCEL (TM); STI-571; ストレプトゾシン; SU11248; スニチニブ; Suten (R); Tamoxifen Tarceva (R); Targretin (R); Tasigna (R); Taxol (R); Taxotere (R); Temodar (R); テモゾロマイド; テムシロリムス; テニボシド; TESPAA; サリドマイド; Thalomid (R); TheraCys (R); チオグアニン; Thioguanine Tabloid (R); チオホスファミド; Thioplex (R); チオテパ; TICE (R); Toposar (R); トポテカン; トレミフェン; Torisel (R); トシツモマブ; トラスツズマブ; Treanda (R); トレチノイン; Trexall (TM); Trisenox (R); TSPA; VCR; Vectibix (TM); Velban (R); Velcade (R); Vepesid (R); Vesanoide (TM); Viadur (R); Vidaza (R); ビンブラスチン; 硫酸ビンブラスチン; Vincasar Pfs (R); ピンクリスチン; ビノレルピン; 酒石酸ビノレルピン; VLB; VM-26; ポリノスタット; ヴォトリエント; VP-16; Vumon (R); Xeloda (R); Zanosar (R); Zevalin (TM); Zinecard (R); Zoladex (R); ゴレドロン酸; ゴリンザ; または Zometta (R)、および/または類似した経路を標的とする、ここに具体的に列挙されていない任意の他の薬剤が挙げられる。

【0059】

別の実施形態において、障害を患っている患者を処置する方法は、本明細書に開示されている結合タンパク質の1つ以上を単独で投与する工程、または第二の薬剤の投与前、第二の薬剤の投与と同時または第二の薬剤の投与後に、結合タンパク質（単独または複数）を投与する工程を含む。特定の実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物は、経口、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内 (intracavity)、腔内 (intracelial)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与によって、患者に投与される。

【0060】

様々な実施形態において、試験試料における1つ以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法が提供され、ここで、1つ以上の抗原またはその断片は、D

10

20

30

40

50

LL4 および / または VEGF である。この方法は、免疫アッセイによって、抗原またはその断片について試験試料をアッセイすることを含む。免疫アッセイは、(i) 少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、(ii) 試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標としての検出可能な標識によって生じるシグナルと、対照または校正因子における抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標として生じるシグナルとを比較することを含む。校正因子は、場合によって、一連の校正因子の一部であり、この場合、校正因子のそれぞれは、抗原またはその断片の濃度によって、その一連の校正因子中の他の校正因子と異なっている。本方法は、(i) 捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体を形成するために、試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤と接触させること、(ii) 検出複合体を形成するために、捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体を、検出可能な標識を含み、抗原またはその断片上のエピトープに結合し、捕捉剤に結合しない少なくとも1つの検出剤と接触させることおよび (iii) (ii) において形成された検出複合体における検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤および / または少なくとも1つの検出剤は少なくとも1つの結合タンパク質である。

10

【0061】

代わりに、いくつかの実施形態において、試験試料において1つ以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法は、(i) 捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体を形成するために、試験試料を、抗原上のエピトープまたはその断片に結合する少なくとも1つの捕捉薬剤に接触させ、同時にまたは連続して、いずれかの順番で、少なくとも1つの捕捉薬剤に結合させるために、試験試料を、試験試料において任意の抗原またはその断片と競合し得る、検出可能な標識された抗原またはその断片に接触させることであって、ここで、試験試料に存在する任意の抗原またはその断片、および検出可能な標識された抗原は互いに競合し、検出複合体を形成すること、および (ii) (i) において形成された検出複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料における抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、ここで、少なくとも1つ捕捉薬剤は、少なくとも1つの結合タンパク質であり、捕捉検出複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルは、試験試料における抗原またはその断片の量または濃度に反比例する。

20

30

【0062】

様々な実施形態において、試験試料は、患者由来であってもよく、この場合、該方法は、さらに、患者を診断し、予測または治療的 / 予防的処置の有効性を評価することを含むことができる。本方法が、患者の治療的 / 予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、この方法は、場合によって、効力を改善するために必要な、患者の治療的 / 予防的処置の改変を加えることをさらに含む。本方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合させることができる。したがって、本明細書に記載されている方法はまた、対象が、所与の疾患、障害または状態を有するまたはそれを発症する危険性があるか否かを判定するために使用することができる。具体的には、このような方法は、以下：

40

(a) 対象由来の試験試料における1つ以上の分析物もしくはその断片の濃度または量を (例えば、本明細書に記載されている方法または当該技術分野において公知の方法を用いて) 決定する工程；および

(b) 工程 (a) で決定された分析物またはその断片の濃度または量と、所定のレベルを比較する工程

を含むことができ、ここで、工程 (a) で決定された分析物の濃度または量が所定レベルと比較して好ましい場合は、対象は、所定の疾患、障害または状態でないまたはこの危険性がないものと決定される。しかしながら、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましくない場合、対象は、所定の疾患、

50

障害または状態を有するまたはその危険性があると決定される。

【0063】

さらに、本明細書において、対象における疾患の進行を監視する方法が提供される。いくつかの実施形態において、該方法は、

(a) 対象由来の試験試料中の1つ以上の分析物の濃度または量を決定する工程；

(b) 同対象由来の後の試験試料における分析物の濃度または量を決定する工程；および

(c) 工程(b)において決定された分析物の濃度または量と、工程(a)において決定された分析物の濃度または量を比較する工程

を含み、ここで、工程(b)において決定された濃度または量が、工程(a)において決定された濃度または量と比較して、変化していないまたは好ましくない場合、対象における減少は、継続し、進行しまたは悪化しているものと決定される。比較して、工程(b)において決定された濃度または量が、工程(a)において決定された濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は中断し、軽減しまたは改善されたと判断される。

10

【0064】

場合により、疾患の進行を監視する方法は、工程(b)において決定される分析物の濃度または量と、例えば、所定のレベルを比較することをさらに含む。さらに、場合によっては、例えば、工程(b)において決定された分析物の濃度または量が、予め決定されたレベルと比較して、不利に変更されたことを比較が示す場合、本方法は、ある期間、1以上の医薬組成物を用いて対象を治療することを含む。

20

【0065】

また、1つ以上の抗原もしくはその断片の存在または濃度について試験試料をアッセイするためのキットが提供され、ここで、1つ以上の抗原は、DLL4および/またはVEGFである。キットは、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするために、本明細書に開示されている少なくとも1つの結合タンパク質と、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための使用説明書を含む。一実施形態において、少なくとも1つの結合タンパク質は、場合により、検出可能に標識されている。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質構築物の模式図であり、2つの親抗体からDVD結合タンパク質を作製するための戦略を示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0067】

2つの異なるタンパク質上のエピトープに結合することができる多価および/または多重特異的結合タンパク質が提供される。また、二重可変ドメイン結合タンパク質(DVD、DVD結合タンパク質または二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig(TM))とも呼ばれる。)およびこの医薬組成物、ならびにこのようなDVD結合タンパク質を作製するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞が提供される。インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、特定の抗原を検出するDVD結合タンパク質を使用する方法もまた提供される。

40

【0068】

本明細書に別段の定義がなければ、本明細書で使用される科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。何らかの曖昧さが伏在している場合には、本明細書中に付与されている定義は、すべての辞書または本明細書外の定義に優越する。文脈上別段の必要がなければ、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。「または」の使用は、別段の記載がなければ、「および/または」を意味する。「含んでいる」という用語ならびに「含む」および「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。本明細書に記載されている任意の範囲は、端点および端点間の全ての値を含むものと理解される。

【0069】

50

本明細書で使用される項の見出しは、構成を目的とするに過ぎず、記載する主題を限定するものと解釈されるべきではない。この出願において引用されている全ての文献または文献の一部は、限定されないが、特許、特許出願、論説、書籍および論文を含むが、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に明示的に組み込まれる。参照により組み込まれる文献が本明細書に含まれる開示と矛盾する場合において、本明細書は、いずれもの矛盾する材料に優先する。

【0070】

一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリッド形成に関連して使用される命名法は、周知のものであり、本分野において一般的に使用されている。一般に、本明細書において提供される方法および技術は、別段の記載がなければ、本分野において周知の慣用方法に従い、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、当該技術分野において一般的に遂行されているように、または他に指示がなければ、本明細書に記載されているように実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品化学および薬化学に関して使用される命名法、ならびに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学の実験室操作および技術は、周知のものであり、他に指示がなければ、当該技術分野において一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、医薬の調製、調合、および送達、および患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

10

20

【0071】

本開示がより容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【0072】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から一般に構成される免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子のエピトープ結合特性を保持した機能的断片、変異体、バリエーションまたはこれらの誘導体を表すものとする。このような断片、変異体、バリエーションまたは誘導体抗体のフォーマットは、本分野において公知である。完全長の抗体の一実施形態において、各重鎖は、重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域（CH）から構成される。CHは、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）から構成される。CLは単一のCLドメインから構成される。VHおよびVLは、より保存された領域（フレームワーク領域（FR）と称される。）が散在された超可変領域（相補性決定領域（CDR）と称される。）へ、さらに細分割することが可能である。一般に、各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

30

【0073】

「二特異的抗体」という用語は、その2つの結合アーム（HC/LCの一对）の1つの上に1つの抗原（またはエピトープ）を結合し、その第二の結合アーム（HC/LCの異なる対）の上の異なる抗原（またはエピトープ）に結合する抗体を指す。二特異的抗体は、2つの異なる抗原結合アーム（特異性とCDR配列の両方における）を有し、それが結合するそれぞれの抗原について一価である。二特異的抗体には、クアドロマ技術（MilsteinおよびCuello（1983年）Nature 305（5934）：537-40）によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーション（Staerz et al.（1985年）Nature 314（6012）：628-31）によってまたはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に突然変異を導入する同様のアプローチ（Holliger et al.（1993）Proc. Natl. A

40

50

cad. Sci. USA 90(14):6444-6448)によって生成されるものが含まれる。

【0074】

「親和性成熟された」抗体とは、変化を有しない親抗体と比べて、抗体の1つ以上のCDR中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ以上の変化を有する抗体である。典型的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してnMの親和性を有し、またはpMの親和性さえ有する。親和性成熟された抗体は、本分野において公知の操作によって産生される。「Marks et al. (1992) BioTechnology 10:779-783」は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび/またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169:147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154(7):3310-9; Hawkins et al (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896によって記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または過剰変異位置での突然変異は、米国特許第6,914,128号に記載されている。

10

【0075】

「CDR移植された抗体」という用語は、VHおよび/またはVLのCDR領域の1つ以上の配列が別の抗体のCDR配列で置換されている重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体を指す。例えば、2つの抗体は、マウスCDRの1つ以上がヒトCDR配列で置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの異なる種由来であり得る。

20

【0076】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種由来の、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列配列により類似するように改変された抗体を表す。ヒト化抗体の1つの種類は、非ヒトCDR配列がヒトのVHおよびVL配列中に導入されて、対応するヒトCDR配列が置換されているCDR移植された抗体である。「ヒト化抗体」はまた、ヒト抗体FR配列のアミノ酸と実質的な同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%)を有するフレームワーク領域(FR)と、非ヒトCDRのアミノ酸配列と実質的な同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%)を有する少なくとも1つのCDRを含む、抗体またはそのバリエーション、誘導体、類似体もしくは断片である。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべての配列が非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)の配列に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべての配列がヒト免疫グロブリンの配列である、少なくとも1つの、典型的には2つ可変ドメイン(Fab、Fab'、Fab'')₂、FabC、Fv)の実質的にすべてを含んでもよい。また、ヒト化抗体は、ヒト抗体由来の重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含むことができる。一実施形態において、ヒト化抗体はまた、ヒト免疫グロブリンFc領域の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび/または重鎖のヒト化可変ドメインのみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖、ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、重鎖、ならびに軽鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。

30

40

【0077】

「二重可変ドメイン結合タンパク質」および「二重可変ドメイン免疫グロブリン」という用語は、その2つの結合アーム(例えば、HC/LCの一对)のそれぞれにおいて2つの可変ドメインを有する結合タンパク質を指し(PCT出願公開第WO02/02773

50

号参照)、それぞれが抗原に結合することができる。一実施形態において、それぞれの可変ドメインは、異なる抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、それぞれの可変ドメインは、同じ抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質は、同一の特異性と同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合するそれぞれの抗原に対して二価である。一実施形態において、DVD結合タンパク質は、単一特異的であってもよく、すなわち、1つの抗原に結合することができる。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVD-Ig(TM)と呼ばれる。一実施形態において、4本鎖DVD結合タンパク質の各半分は、重鎖DVDポリペプチド、軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。一実施形態において、それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたりの抗原結合に関与する全6つのCDRを有する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0078】

「抗イディオタイプ抗体」という用語は、別の抗体の抗原結合部位のアミノ酸配列に対して惹起された抗体を指す。抗イディオタイプ抗体は、抗原に対する免疫応答を増強するために投与され得る。

【0079】

「生物学的活性」という用語は、分子の1つ以上の固有の生物学的特性(インビボで見られるように天然に存在するものであっても、組換え手段によって提供される、または可能にされるものであっても)を表す。生物学的特性には、受容体に結合すること;細胞増殖の誘導、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインの誘導、アポトーシスの誘導および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0080】

「中和」という用語は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合した場合、抗原の生物学的活性を相殺することを指す。一実施形態において、中和結合タンパク質は、抗原(例えば、サイトカイン)に結合し、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上にその生物学的活性を低下させる。

【0081】

「特異性」とは、抗原に選択的に結合する結合タンパク質の能力を指す。

30

【0082】

「親和性」は、結合タンパク質と抗原との間の相互作用の強さであり、結合タンパク質のCDRの配列によって、ならびに抗原の性質、例えばそのサイズ、形状および/または電荷によって決定される。結合タンパク質は、負の副作用を最小限にしながら、所望の治療の評価項目を提供する親和性について選択することができる。親和性は、当業者に公知の方法(US20090311253)を用いて測定することができる。

【0083】

「効力」という用語は、所望の効果を達成するための結合タンパク質の能力を意味し、その治療有効性の測定である。効力は、当業者に公知の方法(US20090311253)を用いて評価することができる。

40

【0084】

「交差反応性」という用語は、惹起された標的以外の標的に結合する結合タンパク質の能力を指す。一般に、結合タンパク質は、適切に高い親和性でこの標的組織)/抗原に結合するが、非標的の正常組織に対しては適切に低い親和性を示す。個々の結合タンパク質は、一般に、2つの基準を満たすように選択される:(1)当該技術分野において公知である染色法を用いて視覚化される、抗体標的の既知の発現に適切な組織への抗体結合、および(2)同じ臓器由来のヒトとtox属種(マウスおよびカニクイザル)間の類似した染色パターン。交差反応性を評価するためのこれらの方法および他の方法は、当業者に公知である(US20090311253)。

【0085】

50

「生物学的機能」という用語は、結合タンパク質の特異的なインビトロまたはインビボにおける作用を意味する。結合タンパク質は、抗原のいくつかのクラスを対象とし、複数の作用機序を介して所望の治療結果を達成することができる。結合タンパク質は、可溶性タンパク質、細胞表面抗原および/または細胞外タンパク質沈着物を対象にすることができる。結合タンパク質は、それらの標的の活性を作用させ、拮抗または中和することができる。結合タンパク質は、それらが結合する標的のクリアランスを助けることができまたは細胞に結合したときに細胞毒性をもたらすことがある。2つ以上の抗体の部分は、単一の結合タンパク質分子において1つを超える異なる機能を達成するために、多価フォーマットに組み込むことができる。生物学的機能を評価するために使用されるインビトロアッセイおよびインビボモデルは、当業者に知られている(US 20090311253)

10

【0086】

「安定な」結合タンパク質は、結合タンパク質が、保存時にその物理的安定性、化学的安定性および/または生物学的活性を本質的に保持しているものである。長期間にわたって、種々の温度にてインビトロで安定である多価結合タンパク質が望ましい。結合タンパク質を安定化し、種々の温度でそれらの安定性を評価する方法は、当業者に知られている(US 20090311253)。

【0087】

「溶解性」という用語は、水性溶液中に分散させたままにするタンパク質の能力を意味する。水性製剤中のタンパク質の溶解性は、疎水性および親水性アミノ酸残基の適切な分布に依存し、したがって、溶解性は、正確に折り畳まれたタンパク質の生成と相関し得る。当業者は、日常的なHPLC技術および当業者に公知の方法(US 20090311253)を用いて、結合タンパク質の可溶性の増加または減少を検出することができる。

20

【0088】

結合タンパク質は、様々な宿主細胞を用いて生成されてもよく、またはインビトロで生成されてもよく、労力あたりの相対収率は「生成効率」を決定する。生成効率に影響を及ぼす因子には、限定されないが、宿主細胞型(原核生物または真核生物)、発現ベクターの選択、ヌクレオチド配列の選択および使用される方法が挙げられる。結合タンパク質生成に使用される材料および方法、ならびに生成効率の測定は、当業者に公知である(US 20090311253)。

30

【0089】

「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘導する物質の能力を意味する。治療的結合タンパク質の投与は、免疫応答の特定の発生率をもたらす得る。多価形式の免疫原性を誘導し得る潜在的な要素は、親抗体の選択中に分析することができ、このような危険性を低下させるための工程は、多価結合タンパク質形式にそれらの配列を組み込む前に、親抗体を最適化するために採用することができる。抗体と結合タンパク質の免疫原性を減少させる方法は、当業者に公知である(US 20090311253)。

【0090】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、特異的結合対のメンバー間の反応(例えば、結合)を検出可能なものにするために、抗体またはその分析物などの特異的結合対のメンバーに結合させた部分を意味する。特異的結合対の標識された部分は、「検出可能に標識されている」と呼ばれる。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の同定を与える標識が取り込まれたタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、視覚または計測手段によって検出可能な信号を生成することができる、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、または印を付けたアビジン(例えば、光学的方法または比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)によって検出することができる。ポリペプチド部分のポリペプチドへの付着である。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体または放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm)；色原

40

50

体、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）；酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；およびガドリニウムキレートなどの磁気作用物質が含まれるが、これらに限定されない。免疫アッセイに一般に使用される標識の代表例には、光を生じる部分、例えばアクリジニウム化合物および蛍光を生じる部分、例えばフルオレセインが含まれる。この関連で、部分自体が検出可能に標識され得るが、さらに別の部分との反応後に検出可能にされ得る。

【0091】

「連結体」という用語は、第二の化学部分（治療剤または細胞毒性剤など）に化学的に連結された抗体またはDVD-Igなどの結合タンパク質を表す。「作用物質」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子または生物由来物質から作製された抽出物を含む。治療剤または細胞毒性剤の例としては、限定されないが、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、メトプロロール、アテノロール、ピソプロロールおよびピューロマイシン、ならびにこれらの類似体または相同体が含まれる。免疫アッセイとの関連において使用される場合、連結体は、検出薬剤として使用される検出可能に標識された抗体またはDVD-Igであってよい。

【0092】

「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）またはその抗原結合部分を表す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、これは、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）または分子集合体（例えば、抗原/抗体複合体）の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、本分野においてよく理解されている特異的な数学的關係に従って整列されている。結晶中で反復されている基礎的単位または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に整えられた結晶的対称性に合致する配置での非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を与える。すべての三次元中での規則的な転換による単位格子の反復は、結晶を与える。Giege, R. and Ducruix, A. Barrett *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)を参照されたい。

【0093】

「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる該核酸分子を表す。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるDNAセグメントを連結し得る環状二本鎖DNAループを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ここで、追加のDNAセグメントはウイルスゲノム中に連結され得る。他のベクターにはRNAベクターが含まれる。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入されて、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。ある種のベクターは、それらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または単に、「発現ベクター」）と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現

10

20

30

40

50

ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、発現ベクターの他の形態もまた含まれ、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）なども含まれる。一群の pHybE ベクター（米国特許出願第 61/021,282 号）は、親抗体および DVD 結合タンパク質のクローニングに使用され得る。pJP183 由来の V1；pHybE-hCg1, z, 非V2 は、抗体および野生型定常領域を有する DVD 重鎖をクローニングするために使用され得る。pJP191 由来の V2；pHybE-hCK V3 は、抗体およびカッパ定常領域を有する DVD 軽鎖をクローニングするために使用され得る。pJP192 由来の V3；pHybE-hCI V2 は、抗体およびラムダ定常領域を有する DVD 軽鎖をクローニングするために使用され得る。V4 は、ラムダシグナルペプチドおよびカッパ定常領域を用いて構築され、ラムダ-カッパハイブリッド Vドメインを有する DVD 軽鎖をクローニングするために使用され得る。V5 は、カッパシグナルペプチドおよびラムダ定常領域を用いて構築され、カッパ-ラムダハイブリッド Vドメインを有する DVD 軽鎖をクローニングするために使用され得る。pJP183 由来の V7；pHybE-hCg1, z, 非V2 は、抗体および (234、235 AA) 突然変異定常領域を有する DVD 重鎖をクローニングするために使用され得る。

10

【0094】

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」という用語は、外来 DNA がその中に導入されている細胞を表す。このような用語は、当該細胞を表すのみならず、このような細胞の子孫も表す。突然変異または環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、原核および真核細胞が含まれる。一実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株 E. コリ；哺乳動物細胞株 CHO、HEK293、COS、NS0、SP2 および PER.C6；昆虫細胞株 Sf9 および真菌細胞 サッカロミセス・セレビスシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0095】

「トランスフェクション」という用語は、宿主細胞への外因性核酸（例えば、DNA）を導入するために一般的に用いられる様々な技術を包含し、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどが挙げられる。

30

【0096】

「サイトカイン」という用語は、細胞間媒介物質として別の細胞集団に作用する 1 つの細胞集団から放出されるタンパク質を指す。「サイトカイン」という用語には、天然源由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質および天然配列のサイトカインの生物学的に活性な同等物が含まれる。

【0097】

「生物学的試料」という用語は、生物または生物であったものから得られた物質の量を意味する。このような物質には、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節および脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0098】

「成分」という用語は、組成物の要素を指す。診断キットに関連して、例えば、成分は、試験試料のアッセイ用のキットに含めることができる、捕捉抗体、検出またはコンジュゲート抗体、対照、校正因子、一連の校正因子、感受性パネル、容器、緩衝液、希釈剤、塩、酵素、酵素の補因子、検出試薬、前処理試薬/溶液、基質（例えば、溶液として）、停止液などであってもよい。したがって、「成分」は、いくつかの実施形態において、例

50

えば、抗分析物（例えば、抗ポリペプチド）抗体に結合させることによって、固体支持体上に固定されている、上記のポリペプチドまたは他の分析物を含むことができる。いくつかの実施形態において、1つ以上の成分は、溶液中にあってもよくまたは凍結乾燥されていてもよい。

【0099】

「対照」とは、分析物を含まない（「陰性対照」）または分析物を含む（「陽性対照」）組成物を意味する。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。「対照」、「陽性対照」および「較正物質」は、既知の濃度の分析物を含む組成物を表すために本明細書において互換的に使用され得る。「陽性対照」は、アッセイ性能特性を確立するために使用することが可能であり、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

10

【0100】

「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、所定のカットオフ/レベルに対してアッセイの結果を比較することにより診断/予後診断/治療的効力の結果を評価するために使用されるアッセイのカットオフ値を一般に表し、所定のカットオフ/レベルは様々な臨床的パラメーター（例えば、疾患の重症度、進行/非進行/改善など）にすでにつながっておりまたは関連している。本開示は例示的な所定のレベルを提供し得るが、カットオフ値はイムノアッセイの性質（例えば、使用される抗体など）に応じて様々となり得ることが周知である。さらに、本明細書における開示を他のイムノアッセイに適合させて、本開示を基礎とする他のイムノアッセイについてのイムノアッセイ特異的なカットオフ値を得ることは、当業者の通常の技術の範囲内に十分にある。所定のカットオフ/レベルの正確な値はアッセイ間で様々となり得るが、（もしあれば）本明細書に記載されている相関は一般に適用可能であるはずである。

20

【0101】

本明細書に記載されている診断アッセイにおいて使用される「前処理試薬」、例えば、溶解、沈殿および/または可溶化試薬は、あらゆる細胞を溶解するものおよび/または試験試料中に存在するあらゆる分析物を可溶化するものである。前処理は、本明細書でさらに記載されるように、すべての試料に必要というわけでない。とりわけ、分析物（例えば、目的のポリペプチド）の可溶化は、試料中に存在する内在性結合タンパク質からの分析物の放出を伴い得る。前処理試薬は均一（分離工程を必要としない）または不均一（分離工程を必要とする）であり得る。いくつかの実施形態において、不均一前処理試薬を使用すると、アッセイの次の工程に進行する前に、沈殿した分析物-結合タンパク質は試験試料から除去される。

30

【0102】

本明細書に記載されているイムノアッセイおよびキットとの関連で「品質管理試薬」には、較正物質、対照および感受性パネルが含まれるが、これらに限定されない。1つ以上の「較正物質」または「標準物質」は、抗体または分析物などの標的分子の濃度を内挿するための較正（標準）曲線を確認するために典型的に使用される。いくつかの実施形態において、所定の陽性/陰性カットオフ近くにある単一の較正物質を使用することができる。代わりに、他の実施形態において、複数の較正物質（すなわち、1つを超える較正物質または様々な量の較正物質が、「感受性パネル」または「感受性勾配」を確認するように使用され得る。

40

【0103】

用語「特異的結合パートナー」とは、特異的結合対のメンバーを意味する。特異的結合対は、化学的または物理的な手段を介して互いに特異的に結合する2つの異なる分子を含む。様々な実施形態において、抗原および抗体の特異的結合に加えて、他の特異的結合対は、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含み得る。さらに、特異的結合対は、いくつかの実施形態において、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば、分析物類似体であるメンバーを含み得る。免疫反応性特異的結合メンバーには、単離または組換えで産生された抗原、抗原断片およ

50

びモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体ならびにその複合体、断片およびバリエーション（バリエーションの断片を含む）が含まれる。

【0104】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体のパパイン消化によって生成され得る、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義する。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、場合によって、CH4ドメインを含む。抗体エフェクター機能を変化させるために、Fc部分中のアミノ酸残基を置換することが、本分野において周知である（例えば、米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。Fc領域は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体と抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度を媒介する。いくつかの場合において、これらのエフェクター機能は、治療用の免疫グロブリンに対して望ましいが、他の場合において、治療目的に応じて、不要であるまたは有害でさえあり得る。

【0105】

結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する結合タンパク質（例えば、抗体）の1つ以上の断片を意味する。結合タンパク質の抗原結合機能は、全長抗体の断片、ならびに二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットで行うことができる。結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片（VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片）、(ii) F(ab')₂断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片）、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組換え法を用いて連結することが可能である（一本鎖Fv(scFv)として知られている）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。さらに、一本鎖抗体も、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する直列Fvセグメントの対を含む「直鎖抗体」（VH-CH1-VH-CH1）を含む。

【0106】

「多価結合タンパク質」という用語は、2つまたはそれ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を意味する。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つまたはそれ以上の抗原結合部位を有するように工学的に作製され、天然に存在しない抗体である。「多重特異的結合タンパク質」という用語は、2つ以上の関連標的または非関連標的に結合することができる結合タンパク質を指す。一実施形態において、本明細書に提供される二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または多価の結合タンパク質である。

【0107】

「リンカー」という用語は、アミノ酸残基または2つのポリペプチド（例えば、2つのVHまたは2つのVLドメイン）に連結させて用いられるペプチド結合によって接続された2つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを意味する。このようなリンカーポリペプチドの例は、本分野において周知である（例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123 参照）。

【0108】

「Kabata番号」、「Kabata定義」および「Kabata標識」という用語は、本

10

20

30

40

50

明細書において、互換的に使用される。本分野において認められているこれらの用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（すなわち、超可変的な）アミノ酸残基に付番するシステムを表す（Kabata et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391およびKabata et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置31から35、CDR2に対するアミノ酸位置50から65およびCDR3に対するアミノ酸位置95から102にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置24から34、CDR2に対するアミノ酸位置50から56およびCDR3に対するアミノ酸位置89から97にわたる。

10

【0109】

「CDR」という用語は、免疫グロブリン可変領域配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2およびCDR3と命名されている、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3つのCDRが存在する。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域中に生じる3つのCDR群を指す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabataによって記載された系（Kabata et al. (1987) and (1991)）は、抗体のいずれの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。これらのCDRは、Kabata CDRと称され得る。Chothiaおよび同僚（ChothiaおよびLesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothiaら (1989) Nature 342:877-883）は、Kabata CDR内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの亜部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3（「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabata CDRと重複する境界を有する。Kabata CDRと重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139およびMacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabata CDRと重複するが、これらは、特定の残基または残基の群またはさらにはCDR全体が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、KabataまたはChothiaによって定義されたCDRを使用する。

20

30

【0110】

用語「エピトープ」とは、結合タンパク質、例えば、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる抗原の領域を意味する。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および/または特異的な電荷特徴を有し得る。一実施形態において、エピトープは、特異的結合パートナー上の相補的部位に結合することが知られている抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基を含む。抗原断片は1を超えるエピトープを含むことができる。ある種の実施形態において、結合タンパク質が、タンパク質および/または高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合する。抗体が交差競合する（例えば、一方が、結合タンパク質への他方の結合を妨げまたは結合タンパク質への

40

50

他方の結合における調節作用を阻害する。) 場合、結合タンパク質は「同じエピトープに結合する」。エピトープ認識を可視化し、モデル化する方法は、当業者に知られている (US 20090311253)。

【0111】

「薬物動態」とは、薬物が、生物によって、吸収され、分散され、代謝されおよび排泄されるプロセスを指す。いくつかの実施形態において、所望の薬物動態プロファイルを有する多価結合タンパク質分子を生成するために、同様の所望の薬物動態プロファイルを有する親モノクローナル抗体が選択される。選択された親モノクローナル抗体のPKプロファイルは、例えば、当業者に公知の方法 (US 20090311253) においてげっ歯類を用いて、容易に決定することができる。

10

【0112】

「生物学的利用能」とは、投与後にその標的に到達する活性薬剤の量を指す。生物学的利用能は、安定性、溶解性、免疫原性および薬物動態を含む前述の特性のいくつかの関数であり、当業者に知られている方法 (US 20090311253) を用いて評価することができる。

【0113】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcore (R) システム (BIAcore International AB (GE Healthcare 社)、Uppsala, Sweden および Piscataway, NJ) を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能とする光学現象を意味する。さらなる記載については、Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26 を参照されたい。用語「 K_{on} 」とは、結合複合体 (例えば、DVD / 抗原複合体) を形成するために、抗原への結合タンパク質 (例えば、抗体または DVD) の結合についての結合速度 (on rate) 定数を意味する。「 K_{on} 」という用語はまた、本明細書において互換的に用いられ、「会合速度定数」または「 k_a 」を意味する。その標的抗原への結合タンパク質の結合速度または結合タンパク質 (例えば抗体) と抗原との間の複合体形成の速度を示す。この値はまた、以下の式によって示される。

20

抗体 (「Ab」) + 抗原 (「Ag」) \rightleftharpoons Ab - Ag

【0114】

用語「 K_{off} 」は、当該技術分野において公知である結合複合体 (例えば、DVD / 抗原複合体) からの結合タンパク質 (例えば、抗体または DVD) の解離についての解離速度 (off rate) 定数または「解離速度定数」を意味する。この値は、以下の式によって示されるように、結合タンパク質 (例えば抗体) のその標的抗原からの解離速度または遊離抗体と抗原への経時的な Ab - Ag 複合体の分離を示す。

30

Ab + Ag \rightleftharpoons Ab - Ag

【0115】

「 K_D 」および「平衡解離定数」という用語は、平衡状態での滴定測定においてまたは解離速度定数 (K_{off}) を結合速度定数 (K_{on}) で割ることによって得られた値を意味する。会合速度定数、解離速度定数および平衡解離定数は、抗原への結合タンパク質 (例えば、抗体または DVD) の結合親和性を表すために使用される。結合および解離速度定数を決定する方法は本分野において周知である。蛍光を基礎とする技術の使用は、高い感度を提供し、平衡状態で生理的緩衝液中の試料を調べることができる。BIAcore (R) (生体分子相互作用分析) アッセイなどの他の実験的アプローチおよび機器を使用することが可能である (例えば、BIAcore International AB, GE Healthcare 社, Uppsala, Sweden から入手可能な機器)。さらに、Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinExA (R) (動態排除アッセイ) アッセイも使用することが可能である。

40

【0116】

50

「バリエーション」という用語は、アミノ酸の付加（例えば、挿入）、欠失または保存的置換によってアミノ酸配列中の所与のポリペプチドとは異なるが、所与のポリペプチドの生物活性を保持するポリペプチドを意味する（例えば、バリエーション V E G F 抗体は、V E G F との結合について抗 V E G F 抗体と競合することができる。）。アミノ酸の保存的置換、すなわち特性が類似する（例えば、親水性および/または荷電領域の程度もしくは分布）異なるアミノ酸とのアミノ酸の置き換えは、微小変化が典型的に関与すると本分野で認識されている。これらの微小変化は、本分野で理解されているように、アミノ酸のヒドロパシーインデックスを考慮することにより部分的に特定することが可能である（例えば、K y t e e t a l . (1 9 8 2) J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 2 参照）。一態様において、 ± 2 のヒドロパシーインデックスを有するアミノ酸が置換される。また、アミノ酸の親水性は、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を明らかにするために使用することができる。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考慮すると、抗原性および免疫原性とよく関連することが報告されている有用な尺度である、そのペプチドの最大の局所平均親水性の計算が可能となる（例えば、米国特許第 4, 5 5 4, 1 0 1 号参照）。本分野で理解されているように、類似した親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物活性、例えば免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。一態様において、互いに ± 2 以内の親水性値を有するアミノ酸を用いて置換が行われる。アミノ酸のヒドロパシーインデックスと疎水性値はどちらもそのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この観察に一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、アミノ酸、特に、疎水性、親水性、荷電、サイズおよび他の特性によって明らかにされるこれらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存することが理解されている。「バリエーション」という用語は、タンパク質分解、リン酸化または他の翻訳後修飾などによって異なる形でプロセッシングされているが、生物活性および/または抗原反応性、例えば V E G F および/または D L L 4 に結合する能力を保持するポリペプチドまたはその断片を含む。「バリエーション」という用語は、他に定義がなければ、バリエーションの断片を包含する。バリエーションは、野生型配列に対して 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、9 0 %、8 9 %、8 8 %、8 7 %、8 6 %、8 5 %、8 4 %、8 3 %、8 2 %、8 1 %、8 0 %、7 9 %、7 8 %、7 7 %、7 6 % または 7 5 % 同一であってもよい。

10

20

【 0 1 1 7 】

I . 結合タンパク質の生成

30

2 つの異なる抗原に結合することができる結合タンパク質およびこれを作製する方法が提供される。結合タンパク質は、様々な技術を用いて生成することができる。発現ベクター、宿主細胞および結合タンパク質を生成する方法も提供される。

【 0 1 1 8 】

A . 親モノクローナル抗体の作製

D V D 結合タンパク質の変域ドメインは、目的とする抗原に結合することができるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体 (m A b) を含む親抗体 (A b) から得ることができる。これらの抗体は、天然に存在し得、または組換え技術によって作製され得る。当業者は、例えば、限定されないが、ハイブリドーマ技術の使用、選択されたリンパ球抗体法 (S L A M)、ファージ、酵母もしくは R N A - タンパク質融合ディスプレイまたは他のライブラリーの使用、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも一部を含む非ヒト動物の免疫化、ならびにキメラ抗体、C D R 移植された抗体およびヒト化された抗体の調製を含む、抗体を生成するための多数の方法に精通している。例えば、米国特許公開第 2 0 0 9 0 3 1 1 2 5 3 A 1 参照。変域ドメインは、親和性成熟技術を用いて調製することができる。

40

【 0 1 1 9 】

B . 親モノクローナル抗体を選択するための基準

D V D 結合タンパク質分子において望まれる少なくとも 1 つ以上の特性を有する親抗体を選択することを含む実施形態が提供される。一実施形態において、所望の特性は、例えば、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、

50

可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用能、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合などの1つ以上の抗体パラメーターである。例えば、米国特許出願公報第20090311253号を参照されたい。

【0120】

C. 結合タンパク質分子

様々な実施形態において、結合タンパク質は、2つの異なる親モノクローナル抗体由来の2つの異なる軽鎖可変ドメイン(VL)が、組換えDNA技術によって、直接または短いリンカーを介して直列に連結され、その後軽鎖定常ドメインCLが続くように設計され得る。同様に、重鎖は、直接的にまたはリンカーを介して、タンデムに連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン(VH)、その後定常ドメインCH1およびFc領域を含む(図1)。

10

【0121】

様々な実施形態において、可変ドメインは、本明細書に記載されている方法のいずれか1つによって作製された親抗体から得られた組換えDNA技術を用いて取得することが可能である。一実施形態において、可変ドメインは、マウス重鎖または軽鎖可変ドメインである。別の実施形態において、可変ドメインは、CDR移植されたまたはヒト化された可変重鎖または軽鎖ドメインである。一実施形態において、可変ドメインは、ヒト重鎖または軽鎖可変ドメインである。

【0122】

様々な実施形態において、リンカー配列は、単一のアミノ酸またはポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列の選択は、いくつかのFab分子の結晶構造分析に基づいている。Fabまたは抗体分子構造中の可変ドメインとCH1/CL定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、一般に、VドメインのC末端由来の4-6残基およびCL/CH1ドメインのN末端由来の4-6残基によって構成される約10から12個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、DVD結合タンパク質は、それぞれ、軽鎖および重鎖中のリンカーとしてCLまたはCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、または11から12アミノ酸残基を用いて作製される。CLまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5から6個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採ることが可能であり、したがって、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーとして作用することが可能である。CLまたはCH1ドメインのN末端残基は、それらがIg配列の一部であるため、可変ドメインの天然の伸長である。したがって、それらの使用は、リンカーおよび接合分析物から潜在的に生じる任意の免疫原性を大幅に最小化する。

20

30

【0123】

種々の実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、配列番号1-38(表1)の1つ以上を含む少なくとも1つのリンカーを含む。一実施形態において、X2は、Fc領域である。別の実施形態において、X2は、可変Fc領域である。

【0124】

【表 1】

表1:リンカー配列のリスト

配列番号:	配列	配列番号:	配列
1	ASTKGPSVFPLAP	20	RADAAAAGGPGS
2	ASTKGP	21	RADAAA
3	GGGGSG	22	SAKTTPKLEEGEFSEARV
4	GGGGSGGGGS	23	ADAAP
5	GGGGSGGGGSGGGG	24	ADAAPTVSIFPP
6	TVAAPSVFIFPP	25	TVAAP
7	TVAAP	26	TVAAPSVFIFPP
8	GGGGSG	27	QPKAAP
9	GGSGGGGSG	28	QPKAAPSVTLFPP
10	GGSGGGGSGGGGS	29	AKTTPP
11	GGSGG	30	AKTTPPSVTPLAP
12	GGSGGGGSGGGGS	31	AKTTAP
13	AKTTPKLEEGEFSEAR	32	AKTTAPSVYPLAP
14	AKTTPKLEEGEFSEARV	33	GGGGSGGGGSGGGGS
15	AKTTPKLG	34	GENKVEYAPALMALS
16	SAKTTPKLGG	35	GPAKELTPLKEAKVS
17	SAKTTTP	36	GHEAAAVMQVQYPAS
18	RADAAP	37	TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP
19	RADAAPTVS	38	ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP

【0125】

他のリンカー配列は、CL/CH1ドメインの全ての残基ではなく、CL/CH1ドメイン由来の任意の長さの任意の配列；例えば、CL/CH1ドメインの最初の5-12個のアミノ酸残基を含んでもよい。別の実施形態において、軽鎖リンカーは、C またはC から選択され得て；重鎖リンカーは、C₁、C₂、C₃、C₄、C₁、C₂、C₃、C₄ およびC_μを含む、任意のアイソタイプのCH1に由来してもよい。リンカー配列は、Ig様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR）、G/Sを基礎とする配列（例えば、G4Sリピート）；ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。他のリンカー配列は、G/Sリピートを含む任意の長さの任意の配列（例えば、GGGSモチーフのリピートを含む配列）、または任意の他のペプチドリンカーを含んでもよい。

【0126】

一実施形態において、定常ドメインは、組換えDNA技術を用いて、2つの連結された可変ドメインに連結されている。一実施形態において、連結された重鎖可変ドメインを含む配列は、重鎖定常ドメインに連結され、連結された軽鎖可変ドメインを含む配列は、軽鎖定常ドメインに連結される。一実施形態において、定常ドメインは、それぞれ、ヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインである。一実施形態において、DVD重鎖は、Fc領域にさらに連結されている。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーション

F c 領域であり得る。別の実施形態において、F c 領域は、ヒト F c 領域である。別の実施形態において、F c 領域には、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D から得られる F c 領域が含まれる。

【 0 1 2 7 】

一実施形態において、抗体またはこの機能的抗原結合断片が開示され、これは、表 2 に列挙されている標的抗原の 1 つについて機能的結合部位を有する抗体を含み、表 2 に列挙されている対から選択される、対を形成した V H 領域および V L 領域を含み、またはこれらの V H 領域および V L 領域の C D R 領域を含む。例えば、抗体は、D L L 4 について機能的結合部位を形成する、表 2 の V H 領域および V L 領域を含むことができる。一実施形態において、機能的抗原結合断片は、標的抗原に結合するには十分な可変ドメイン領域（例えば、表 2 における、対を形成した V H 配列および V L 配列から取り出される C D R 領域）を保持する。機能的抗原結合断片は、ヒト化抗体、十分にヒトの抗体、ラクダ化された抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、変異抗体、復帰変異抗体もしくは C D R 移植抗体、または F a b、F (a b ') 2、F v、s c F v、F d、d A b、V H H (ナノボディとも呼ばれる。)、または二特異的もしくは二重特異的抗体を含む、抗原 - 結合機能を保持する他の抗体断片を含み得る。

10

【 0 1 2 8 】

一実施形態において、表 2 におけるドメインから選択される可変ドメインを含む結合タンパク質が開示されている。一実施形態において、結合タンパク質は、上記されるように第一鎖と第二鎖、および 2 つの機能的結合部位を含み、ここで、結合タンパク質の第一鎖と第二鎖は、表 2 において列挙されている標的抗原の 1 つ以上について 2 つの機能的結合部位を形成する。一実施形態において、各々の機能的結合部位は、表 2 に列挙されている対から選択される、対を形成した V H 配列と V L 配列（例えば、D L L 4 について結合部位を形成する、対を形成した V H 配列と V L 配列）を含み、またはこれらの V H 領域と V L 領域の C D R 領域を含む。いくつかの実施形態において、第一鎖は、表 2 から選択される第一の V H 配列と第二の V H 配列を含み、またはこれらの V H 配列から C D R 配列を含有し、第二鎖は、表 2 から選択される第一の V L 配列と第二の V L 配列を含み、またはこれらの V L 配列から C D R 配列を含有する。他の実施形態において、第一または第二の結合部位の V H - V L 配置は、2 つの鎖を交差して反転され、それにより、各々の鎖は、2 つの機能的結合部位を保持しながら、1 つの結合部位からの V H ドメインと他の結合部位からの V L ドメインを含む。

20

30

【 0 1 2 9 】

一実施形態において、2 つの重鎖 D V D ポリペプチドおよび 2 つの軽鎖 D V D ポリペプチドは組み合わされて、D V D 結合タンパク質を形成する。表 2 は、疾患の治療に有用な例示的な抗体の V H および V L 領域のアミノ酸配列を列挙している。一実施形態において、いずれかの配向で、表 2 に列挙されている V H 領域および / または V L 領域のうちの少なくとも 2 つを含む D V D が提供され、ここで、V H 配列および / または V L 配列の少なくとも 1 つは、配列番号 3 9 または配列番号 4 0 である。いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は、独立して選択される。以下に与えられる V H および V L ドメイン配列は、相補性決定領域 (C D R) およびフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上のこれらの C D R および / またはフレームワーク配列は、同じ抗原に結合する、当該技術分野において知られている結合タンパク質由来の他の C D R および / またはフレームワーク配列によって、機能を損なうことなく置換される。

40

【 0 1 3 0 】

【表 2】

表2: 多価結合タンパク質を含む結合タンパク質を生成するための抗VEGF抗体および抗DLL4抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列のリスト
(CDR配列をボールドで示す。)

配列番号	ABT固有ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
39	h1A11.1	DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNPFMAWVRQA PGKGLEWVAT ISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMN SLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQ GLTVTVSS
40	h1A11.1	DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASV GD RVTI TCRASEDIYSNLAWYQQK PG GKAPKLLI YDTNNLADG VPSR FR SGSGSGTDF TLT ISSLQ P EDFATYYC QQYNNYPPT FGQ GT TKLEIKR
41	Av	VEGF VH (配列1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYGMN WVRQ AP GKGLEWV GWINTYTG EPT YAADF KRRFT FSL DT SK STAYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKYPHYGSSHWYFDV WGQ GT LTVTVSS
42	Av	VEGF VL (配列1)	DIQMTQSPSSLSASV GD RVTI TC S ASQDIS NYLNWY QQK PG KAPK VLIYFTSSLH SGVPSR FR SGSGSGTDF TLT ISSLQ P ED FATYYC QQYSTVP WTFGQ GT TKVEIKR
43	AB285VH	VEGF VH (配列2)	EVT LR ESGPALV KPTQ TL TLTCT ASGYT FTNYGMN WVRQ PP GKGLEWV GWINTYTG EPT YAADF KRRFT FSL DT SK SQAVLT MTNMDPVD TATYYC AKYPHYGSSHWYFDVWGQ GT TVTVSS
44	AB285VL	VEGF VL (配列2)	DIVMTQSPD SLAV SLGERAT INCS ASQDISNYLNWY QQK PG QAPK VLIYFTSSLH SGVPDR FR SGSGSGTDF TLT ISSLQ AED VAVYYC QQYSTVP WTFG GGT TKVEIKR
45	AB288VH	VEGF VH (配列3)	EVQLVQSGTEV KKPG ESL KISCK ASGYT FTNYGMN WVRQ MP GKGLEWV GWINTYTG EPT YAADF KRQ FT FSLDT SF STAF LQ WSSLKASDT AMYYC AKYPHYGSSHWYFDVWGQ GT MVTVSS
46	AB288VL	VEGF VL (配列3)	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSC SASQDISNYLNWY QQK PG QAPR VLIYFTSSLH SDV PAR FRSGSGSGTE FTLT ISSLQ SED FAVYYC QQYSTVP WTFGQ GT TRLEIKR
47	AB305VH	VEGF VH (配列4)	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGYTFTNYGMN WVRQ AP GKGLEWV GWINTYTG EPT YAADF KRRFT FSL DT SK STAYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKYPHYGSSHWYFDV WGQ GT LTVTVSS
48	AB305VL	VEGF VL (配列4)	EIVMTQSP GTLSL SPGERAT LSC SASQDISNYLNWY QQK PG QAPR VLIYFTSSLH SGVPDR FR SGSGSGTDF TLT ISRLE P ED FAV FYC QQYSTVPWTFGQ GT TKVEIKR
49	AB308VH	VEGF VH (配列5)	EVQLVESGGGLVQ PGR SLRLS CAASGYTFTNYGMN WVRQ AP GKGLEWV GWINTYTG EPT YAADF KRRFT FSL DT AK SSAYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKYPHYGSSHWYFDV WGQ GT LTVTVSS
50	AB308VL	VEGF VL (配列5)	DIQMTQSPSSLSASV GD RVTI TC S ASQDIS NYLNWY QQK PG KAPK VLIYFTSSLH SGVPSR FR SGSGSGTDF TLT ISSLQ P ED VATYYC QQYSTVP WTFGQ GT TKVEIKR

配列番号	ABT固有ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
51	AB318VH	VEGF VH (配列6)	EVQLVESGGGLVQPANSLKLSCAASGYTFTNYGMNWRQSP KKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTAKSTAYLQ MDSLRS EDTATYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGVLTVSS
52	AB318VL	VEGF VL (配列6)	DIRMTQSPASLSASLGETVNIIECSASQDISNYLNWYQQKPG KAPQVLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTQFSLKINSLQSED VATYYCQQYSTVPWTFGGGKLELKR
53	AB333VH	VEGF VH (配列7)	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTNYGMNWKQRP GHGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRKF T FTLDTSSSTAYIQ LISLT T EDSAIYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSA
54	AB333VL	VEGF VL (配列7)	DILMTQSPAILS V SPGERV S FSCSASQDISNYLNWYQQRTN GAPRVLIYFTSSLHSGVPSRFRSGGGSGTDF T LSINSVESED IADYYCQQYSTVPWTFGAGTKLELKR

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態において、配列番号55 - 63から選択されるVH領域を含むDVD結合タンパク質が提供される。特定の実施形態において、DVD結合タンパク質は、配列番号64 - 73から選択されるVL領域を含む。いくつかの実施形態において、DVD結合タンパク質は、配列番号55 - 63および74から選択されるVH領域と、配列番号64 - 73から選択されるVL領域を含む。これらのVHドメインとVLドメインのアミノ酸配列を以下の表3に示す。

20

【 0 1 3 2 】

【 表 3 】

表3: DLL4およびVEGFのエピトープに対して指向されたDVD結合タンパク質
(リンカー配列は下線; CDR配列は太字)

配列番号	ABT固有ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
55	h1A11.1-L-Av VH	DLL4 VH および VEGF VH	EVQLVESGGGLVQP <u>GGSLRL</u> SCAAS GF TFSNFP MAWVRQA PGKLEWVATI ISSSDG TYYRDSVKGR FTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARG YYNSPF AYWGQGT <u>LVTVSS</u> AS TKGPSV <u>FLAPE</u> EVQLVESGGGLVQP <u>GGSLRL</u> SCAAS GYTF TNYGMN WRQAPGKLEWVGW INTYTGEPT YAADFKRRFT FSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWY FDVWGQ GT <u>LVTVSS</u>
56	h1A11.1-S-Av VH	DLL4 VH および VEGF VH	EVQLVESGGGLVQP <u>GGSLRL</u> SCAAS GF TFSNFP MAWVRQA PGKLEWVATI ISSSDG TYYRDSVKGR FTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARG YYNSPF AYWGQGT <u>LVTVSS</u> AS <u>TKGPEV</u> QLVESGGGLVQP <u>GGSLRL</u> SCAAS GYTFTNYGMN W VRQAPGKLEWVGW INTYTGEPT YAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWY FDVWGQ GT <u>LVTVSS</u>

配列 番号	ABT 固有ID	タンパク質 領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
57	h1A11.1-GS10-Av VH	DLL4 VH および VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF TFSN F MAWVRQA PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGRFTISRDN A KN S LY LQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQGLTVTVSS GG GG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQ A PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVTVSS
58	h1A11.1-GS14-Av VH	DLL4 VH および VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF TFSN F MAWVRQA PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGRFTISRDN A KN S LY LQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQGLTVTVSS GG GG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQ A PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVTVSS
59	Av-L-h1A11.1 VH	VEGF VH および DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQA PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVT VSS A S T K G P S V F L A P E VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA S G F T F S N F MAWVRQ A PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V K G R F T ISRDN A KN S LYLQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A Y WGQGLTVTVSS
60	Av-S-h1A11.1 VH	VEGF VH および DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQA PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVT VSS A S T K G P E VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF T F S N F MAWVRQ A PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGRFTISR DN A KN S LYLQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQ GLTVTVSS
61	Av-GS6-h1A11.1 VH	VEGF VH および DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQA PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVT VSS GG GGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF T F S N F MAWVRQ A PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGRFTISR DN A KN S LYLQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQ GLTVTVSS
62	Av-GS10-h1A11.1 VH	VEGF VH および DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQA PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVT VSS GG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GF T F S N F MAWVRQ A PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGR FTISRDN A KN S LYLQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQGLTVTVSS
63	Av-GS14-h1A11.1 VH	VEGF VH および DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SG Y T F T N Y GM NWVRQA PGKGLEWVGW I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L DT S K S T A Y L QMN S LRAEDTAVYYC A K Y P H Y G S S H W Y F D V WGQGLTVT VSS GG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA AS GF T F S N F MAWVRQ A PGKGLEWVAT I SSSD G T T Y R DS V KGRFTISRDN A KN S LYLQMN S LRAEDTAVYYC A R G Y I NS P F A YWGQGLTVTVSS

配列	ABT 固有ID	タンパク質 領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
64	h1A11.1-L-Av VL	DLL4 VL および VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKP GKAPKLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKP GKAPKLLIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
65	h1A11.1-S-Av VL	DLL4 VL および VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKP GKAPKLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR TVAAPDIQMTQS PSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKPGKAPKVL IY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYY C QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
66	h1A11.1-GS10-Av VL	DLL4 VL および VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKP GKAPKLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR GGSGGGSGDIQ MTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKPGKA PKVLIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DF ATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
67	h1A11.1-GS14-Av VL	DLL4 VL および VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKP GKAPKLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE EDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR GGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQK PGKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
68	Av-L-h1A11.1 VL	VEGF VL および DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKP GKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPD IQMTQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKPG KAPKLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR
69	Av-S-h1A11.1 VL	VEGF VL および DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKP GKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR TVAAPDIQMTQSP SSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLI Y DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR
70	Av-GS6-h1A11.1 VL	VEGF VL および DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKP GKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR GGSGGDIQMTQSP SSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLI Y DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR
71	Av-GS10-h1A11.1 VL	VEGF VL および DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC SASQDISNYLNWY QQKP GKAPKVLIIY FTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC QQYSTVPWT FGQGTKVEIKR GGSGGGSGDIQM TQSPSSLSASVGDRVITIC CRASEDIYSNLAWY QQKPGKAP KLLIY DTNNLAD GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE DF ATYYC QQYNNYPPT FGQGTKLEIKR

配列番号	ABT固有ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
72	Av-GS14-h1A11.1 VL	VEGF VL および DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS SLQPE DFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRGGSGGGSGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKAPKVLIIYDTNNLADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS SLQPE DFATYYC QQYNNYPPTFGQGTKLEIKR

【 0 1 3 3 】

【 表 4 】

10

表3a: DLL4およびVEGFのエピトープに対して指向された全長結合タンパク質

73	h1A11.1-SL-Av 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKAPKVLIIYDTNNLADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS STYLSSTLTLSKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	h1A11.1-SL-Av 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNFPMAWVRQAPGKGL LEWVAT ISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSSASTKGP EVQLVESG GGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL EWV WINTYTGEPTYAADF KRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 1 3 4 】

表3aは、VEGFとDLL4に指向された結合タンパク質に関する全長重鎖および軽鎖配列を与える。リンカー配列に下線を付し、一方、CDRおよび定常領域配列は太字である。

【 0 1 3 5 】

特異的な標的に結合することができる特異的DVD結合タンパク質およびこれを作製する方法の詳細な説明は、以下の実施例の部において提供される。

【 0 1 3 6 】

D. 結合タンパク質の作製

本明細書において提供される結合タンパク質は、本分野で公知の多数のいずれかによって作製され得る。例えば、結合タンパク質は、宿主細胞において発現され得て、ここで、DVD重鎖およびDVD軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。いくつかの実施形態において、本明細書において提供されているDVD結合タンパク質は、原核宿主細胞において発現される。他の実施形態において、DVD結合タンパク質は、真核細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞において発現される。

40

50

【0137】

DVDタンパク質の組換え発現用の典型的なシステムにおいて、リン酸カルシウムによって媒介された形質移入によって、DVD重鎖およびDVD軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、DHFR-CHO細胞中に導入される。組換え発現ベクター内で、重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の転写の高いレベルを誘導するために、各々、CMVエンハンサー/A d M P Lプロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトトレキサート選択/増幅を用いて、ベクターで形質移入されたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も担持する。選択された宿主細胞は、DVD重鎖およびDVD軽鎖の発現を可能とするために培養され、完全な状態のDVD結合タンパク質が培地から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地からDVDタンパク質を回収するために、標準的な分子生物学的技術が使用される。様々な実施形態において、DVDタンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、宿主細胞を培養することによって、DVDタンパク質を合成する方法も本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、培地からDVDタンパク質を単離することをさらに含むことが可能である。

10

【0138】

DVD結合タンパク質の特徴は、DVD結合タンパク質が、慣用の抗体と類似の様式で産生および精製され得ることである。いくつかの実施形態において、DVD結合タンパク質の産生は、定常領域の配列修飾、または化学的修飾を必要とせずに、所望される二重特異的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、集合した不活性な単一特異的、多重特異的、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組合せを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生または分泌された産生をもたらし得る。

20

【0139】

いくつかの実施形態において、本明細書において提供されているDVDタンパク質の設計は、主として、宿主細胞における発現後、所望される「二重特異的多価全長結合タンパク質」へ集合する二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【0140】

いくつかの実施形態において、発現され、集合された二重可変ドメイン免疫グロブリン分子の少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%が、所望の二重特異的四価タンパク質であり、したがって、増大した商用的有用性を有する。このようにして、特定の実施形態において、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価全長結合タンパク質」の単一の主要生成物をもたらす方法が提供される。

30

【0141】

様々な実施形態において、「二重特異的四価全長結合タンパク質」の「主要生成物」をもたらす単一細胞において、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現させる方法が提供され、ここで、「主要生成物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の50%超であり、例えば、75%超および90%超（またはこれらの間の任意のパーセンテージ）である。

40

【0142】

II. 結合タンパク質の使用

1つ、2つまたはそれを超える抗原に結合する能力が付与されているため、本明細書において提供されている結合タンパク質は、特定の実施形態において、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、試料(例えば、血清または血漿などの生物学的試料)中の抗原を検出するために使用することができる。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍

50

光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例は、ルミノールであり、適切な放射性材料の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm が含まれる。

【0143】

様々な実施形態において、本明細書に提供される結合タンパク質はインビトロおよび/またはインビボにおいてそれらの抗原標的の活性を中和することができる。したがって、特定の実施形態において、結合タンパク質は、例えば、抗原を含有する細胞培養物において、ヒト対象において、または結合タンパク質が交差反応する抗原を有する他の哺乳動物対象において、抗原活性を阻害するために使用し得る。別の実施形態において、抗原が有害な疾患または障害を患っているヒトまたは非ヒト動物対象において抗原活性を低減する方法が提供される。様々な実施形態において、本明細書に提供されている結合タンパク質は、診断目的または治療目的で（例えば、疾患、例えば異常なVEGFおよび/またはDLL4発現によって特徴付けられる疾患を検出または処置するために）、ヒトまたは非ヒト動物対象に投与され得る。

【0144】

本明細書において使用される「抗原活性が有害である障害」という用語は、障害に罹患している対象における抗原の存在が、障害の病態生理に関与しているおよび/または障害の悪化に寄与する因子であるまたはそれが疑われることが示されている疾患および/または他の障害を含むことを意図する。したがって、抗原活性が有害である疾患は、抗原活性の低下が疾患の症候および/または進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本明細書において提供される結合タンパク質で治療することが可能な疾患の非限定的な例には、以下に、および結合タンパク質の医薬組成物に関するセクションに論述されている疾患が含まれる。

【0145】

様々な実施形態において、DVD結合タンパク質は、有害な抗原への結合を増加させ、および/または2つの異なる抗原標的（DLL4および/またはVEGF）を同時に遮断し、有効性/安全性を増大させ、および/または患者の対象範囲を増加させるための治療剤として有用である。

【0146】

さらに、いくつかの実施形態において、本明細書において提供されているDVD結合タンパク質は、細胞内送達（例えば、DVDを細胞内分子に標的化すること。）を含む、組織特異的な送達（例えば、増大された局所PKについて、より高い有効性および/またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび/または疾患媒介物質を標的とすること。）のために使用することが可能である。いくつかの実施形態において、DVD結合タンパク質はまた、その抗原の非中和エピトープへの結合を介して特異的な位置へ抗原を送達するための担体タンパク質としての役割も果たすことができ、さらに、抗原の半減期を増加させることもできる。さらに、DVD結合タンパク質は、特定の実施形態において、患者に植え込まれた医療デバイスに物理的に連結されまたはこれらの医療デバイスを標的とするように設計され得る（Burke et al., (2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58 (3): 437-446; Hildebrand et al., (2006) *Surface and Coatings Technology* 200 (22-23): 6318-6324; Drug/device combi

10

20

30

40

50

nations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) Biomaterials 27(11): 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices., Marques (2005) Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med. 377-397 参照)。

【0147】

A. 様々な疾病における結合タンパク質の使用

様々な実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質は、様々な疾患または障害、例えば、DLL4 および / または VEGF の有害発現レベルまたは発現レベルを伴う疾患または障害を処置するための治療分子として有用である。いくつかの実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、診断し、処置もしくは抗腫瘍治療を増大させるために投与され得て、および / または原発性癌および / もしくは転移性癌の処置に有益であってもよい。様々な実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、腫瘍状態を診断し、処置または処置を増大させるために投与することができる。他の実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、異常な血管新生によって特徴付けられる任意の他の疾患または障害（例えば、一般的な自己免疫障害および炎症性障害、創傷治癒）を診断し、処置または処置を増大するために投与することができる。様々な実施形態において、1つ以上の結合タンパク質の投与が VEGF および / または DLL4 への結合をもたらし、これは、過度の VEGF および / または DLL4 レベルによって特徴付けられる状態を患っている患者における VEGF および / または DLL4 のレベルを中和または他には低減させ得る。

【0148】

開示を制限することなく、特定の疾患状態に関する追加情報が提供される。

【0149】

1. 腫瘍疾患

モノクローナル抗体療法が、癌に対する重要な治療法として登場している (von Mehren et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54: 343-69)。本明細書に開示され、2つの別個の腫瘍媒介物質を標的とする二重特異的抗体の使用は、単一特異的療法と比較して、さらなる利益を与えるものと考えられる。

【0150】

様々な実施形態において、本明細書において提供されている組成物および方法を用いて診断および / または処置され得る腫瘍疾患には、限定されないが、原発性もしくは転移性癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、尿路癌（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖管癌（子宮頸部、子宮、卵巣、ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖管癌（前立腺、精嚢、精巣および胚細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺癌（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）、皮膚癌、血管腫、黒色腫、肉腫（骨および軟組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜（星細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン腫および髄膜腫を含む。）の腫瘍、造血器悪性腫瘍から生じる固形腫瘍、例えば、白血病、およびリンパ腫（ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の両方）、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、無リボタンパク血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生もしくは感染プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、結腸直腸癌腫、ヘアリー細胞白血病、ホジキン病、カポジ肉腫、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓癌腫、腫瘍随伴症候群 / 悪性の高カルシウム血症、肉腫、固形腫瘍、または異常な DLL4 もしくは VEGF 活性によって特徴付けられる任意の他

の血管新生非依存性または依存性疾患が挙げられる。

【 0 1 5 1 】

様々な実施形態において、D L L 4 および / もしくは V E G F またはその抗原結合部分に結合する D V D 結合タンパク質は、単独で使用する場または放射線治療剤および / もしくは他の化学療法剤と併用して使用する場または他の治療剤と併用して使用する場または処置し、および / または転移を予防するために使用される。

【 0 1 5 2 】

2 . 黄斑変性症

様々な実施形態において、本明細書において提供されている組成物および方法は、血管新生 (湿潤) 黄斑変性症などの黄斑変性症を処置するために使用することができる。黄斑変性症は、網膜損傷に起因する視野の中心に失明をもたらす医学的状態である。血管新生 (湿潤) 黄斑変性症は、異常な血管成長をもたらし、最終的には、光受容体に不可逆的な損傷を引き起こす可能性がある、黄斑下の血液およびタンパク質の漏れに至る。

【 0 1 5 3 】

様々な実施形態において、D L L 4 および / または V E G F に結合する D V D またはその抗原結合部分は、単独で使用する場または他の治療剤と併用して使用する場、黄斑変性症を診断および / または処置するために使用される。

【 0 1 5 4 】

3 . 糖尿病および糖尿病性網膜症

1 型糖尿病は、膵臓におけるインスリン産生細胞の自己免疫破壊に起因する糖尿病の一形態である。インスリンのその後の欠如により、血糖および尿糖の増加をもたらす。糖尿病性網膜症は、糖尿病の合併症として、網膜への損傷を伴う。

【 0 1 5 5 】

糖尿病性網膜症は、高血糖により誘発される周皮細胞死と血管壁の弱体化に起因する網膜の血管系における小さな変化の結果である。疾患が進行するにつれて、重度の非増殖性糖尿病性網膜症は、血管が増殖する進行段階に入る。処置しない場合、新しい血管が出血し、視界が曇り、さらに網膜が損傷する可能性がある。線維血管性の増殖はまた、網膜剥離を引き起こす場合がある。増殖している血管はまた、眼の前房へと成長し、血管新生緑内障を引き起こす可能性があり得る。

【 0 1 5 6 】

V E G F および D L L 4 シグナル伝達は、糖尿病性腎症と網膜症の両方の病因における関与を含む、糖尿病性内皮機能障害および血管障害の媒介に重要な役割を果たしていると考えられている。J . E x p . M e d . 2 0 9 (5) : 1 0 1 1 - 2 8 (2 0 1 2) ; N e p h r o l . D i a l . T r a n s p l a n t . 1 8 (8) : 1 4 2 7 - 1 4 3 0 (2 0 0 3 年) ; P N A S 1 0 9 (2 7) : E 1 8 6 8 - 7 7 (2 0 1 2) ; 米国特許出願第 2 0 1 1 0 1 8 9 1 7 6 (S k o k o s ら) 。したがって、V E G F および D L L 4 は、(例えば、患者において、V E G F および / または D L L 4 の血清レベルを同定しおよび / またはそのレベルを変更するために) 本開示の D V D を用いて、糖尿病および / または糖尿病性網膜症の診断および / または治療のために潜在的標的を表してもよい。様々な実施形態において、D L L 4 および / もしくは V E G F またはその抗原結合部分に結合する D V D は、単独で使用する場または他の治療剤と併用して使用する場または処置するために使用される。

【 0 1 5 7 】

4 . アテローム性動脈硬化症

V E G F および D L L 4 は、アテローム性動脈硬化症の進行に関与していると考えられる。C i r c u l a t i o n 9 8 (2 0) : 2 1 0 8 - 1 6 (1 9 9 8) ; P N A S 1 0 9 (2 7) : E 1 8 6 8 - 7 7 (2 0 1 2) 。具体的には、V E G F 発現は、ヒト冠状動脈におけるアテローム性動脈硬化性病変に示されており、これは、ヒト冠状動脈アテローム性硬化症の進行、および閉塞性冠動脈疾患における再開通プロセスにおいて V E G

Fの役割を示唆している。同様に、中和抗DLL4抗体を用いたDLL4シグナル伝達の阻害により、アテローム性動脈硬化症の発症を弱め、プラーク石灰化を減少させることが示されている。したがって、VEGFレベルおよびDLL4レベルは、(例えば、患者におけるVEGFおよび/もしくはDLL4の血清レベルを同定しならびに/またはそのレベルを変更するために)本開示のDVDを用いて、アテローム性動脈硬化症の診断および/または治療のための潜在的な標的を示す場合がある。様々な実施形態において、DLL4および/もしくはVEGFまたはその抗原結合部分に結合するDVDは、単独で使用する場合または他の治療剤と併用して使用する場合、アテローム性動脈硬化症を診断および/または処置するために使用される。

【0158】

10

III. 医薬組成物

様々な実施形態において、1つ以上の結合タンパク質を単独でまたは予防剤、治療剤および/もしくは医薬として許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物が本明細書において提供される。様々な実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物の使用の非制限的な例としては、障害を診断し、検出および/もしくは監視し、障害もしくは1つ以上のその症候を予防、処置、管理および/もしくは軽減すること、ならびに/または研究における使用が挙げられる。単独または予防薬、治療薬および/または医薬として許容される担体と組み合わせた医薬組成物の製剤は、当業者に公知である(米国特許出願公開第20090311253A1)。

【0159】

20

様々な実施形態において、医薬製剤は、1つ以上のアミノ酸、1つ以上の多糖および/またはポリソルベート、ならびに端点を含む約0.1 - 100 mg/mlの間(例えば、0.1 - 10、1 - 10、0.01 - 50、1 - 50、1 - 100、10 - 100、25 - 100、25 - 50または50 - 100 mg/ml)の濃度で存在する結合タンパク質を含み、ここで、製剤は、端点を含む約5.0 - 7.0の間のpH(例えば、約5.0 - 6.0、5.5 - 6.0、5.0 - 6.5、5.5 - 6.5または6.0 - 7.0のpH)である。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖を含み、ここで、第一および第二のポリペプチド鎖は、VD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)nを独立して含み、VD1は、第一の可変ドメインであり、VD2は、第二の可変ドメインであり、Cは、定常ドメインであり、X1は、リンカーであり、X2は、Fc領域であり、nは、0または1であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号56を含む第一のポリペプチド鎖と配列番号64を含む第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号73を含む第一のポリペプチド鎖と配列番号74を含む第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、製剤における少なくとも1つのアミノ酸はヒスチジンであり、約10 - 20 mM、10 - 15 mM、15 - 20 mM、または約15 mMの濃度で存在する。一実施形態において、製剤における少なくとも1つの多糖はショ糖であり、約0 - 8.0重量/体積(w/v)%の濃度で存在する。一実施形態において、製剤におけるポリソルベートはポリソルベート80であり、約0 - 0.06 w/v%の濃度である。一実施形態において、製剤における少なくとも1つのアミノ酸はアルギニンであり、約0 - 1.5 w/v%(例えば、0.5 - 1.5、1.0 - 1.5または0.5 - 1.0 w/v%)の濃度で存在する。一実施形態において、結合タンパク質は、約0.1 - 100 mg/ml(例えば、約1 - 100 mg/ml、または約1 - 15 mg/ml、または約1 - 7.5 mg/ml、または約2.5 - 7.5 mg/ml、または約5 - 7.5 mg/ml、または約25 - 100 mg/ml、または約20 - 60 mg/ml、または約25 - 50 mg/ml、または約25 mg/ml、または約50 mg/ml、または約0.1 - 60 mg/ml、または約0.1 - 25 mg/ml、または約1.0 - 60 mg/ml、または約0.5 - 60 mg/ml、または約0.1 - 2.0 mg/ml、または約0.5 - 2.0 mg/ml、また

30

40

50

は約 1 - 5 mg / ml、または約 1 - 7.5 mg / ml、または約 1 - 15 mg / ml、または約 0.5 mg / ml、または約 1.0 mg / ml) の濃度で製剤中に存在する。

【 0 1 6 0 】

様々な実施形態において、医薬製剤は、水性製剤、凍結乾燥された製剤、または凍結乾燥され、再水和された製剤である。一実施形態において、水和溶液は、デキストロースおよび/または生理食塩水(例えば、約 5 w / v %濃度のデキストロースおよび/または約 0.9 w / v %濃度の生理食塩水)である。一実施形態において、医薬製剤は、約 15 mMヒスチジン、約 0.03% (w / v) のポリソルベート 80、約 4% (w / v) のショ糖、および約 0.1 - 25 mg / ml の結合タンパク質または約 1 - 15 mg / ml の結合タンパク質を含み、pH は約 6 であり、ここで、結合タンパク質は、配列番号 56 と配列番号 64 または配列番号 73 と配列番号 74 を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、h1A11.1-SL-Av である。一実施形態において、h1A11.1-SL-Av 結合タンパク質は、ヒト IgG1 LALA 変異体由来の Fc 領域を含む。一実施形態において、製剤は、少なくとも 1 つの追加の薬剤をさらに含む。

10

【 0 1 6 1 】

様々な実施形態において、約 25 mg / ml の結合タンパク質(例えば、配列番号 56 と配列番号 64、または配列番号 73 と配列番号 74 を含む結合タンパク質)、約 15 mM のヒスチジン、0.03% のポリソルベート 80 (重量 / 体積、w / v)、4.0% のショ糖 (w / v) を含有し、pH が約 6.0 である製剤が使用される。いくつかの実施形態において、製剤はアルギニンを含まない。いくつかの実施形態において、製剤は、他の成分または濃度を含む他の製剤と比較して、予想外に改善された凍結 - 融解安定性、液体製剤安定性および/または凍結乾燥製剤安定性を示す。

20

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態において、上記で検討され、配列番号 56 と配列番号 64 を含み、配列番号 73 と配列番号 74 を含む結合タンパク質を含有する製剤は、製剤化可能性における予想外の改善を示す。例えば、製剤は、5 で保存した場合の望ましくないゲル化または高レベルの凝集体の形成を避ける。いくつかの実施形態において、製剤は、保存条件(5)と促進条件(40)の両方で安定である。

【 0 1 6 3 】

本明細書において提供されている予防剤または治療剤を投与方法には、限定されないが、経口投与、非経口投与(例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下)、硬膜外投与、腫瘍内投与、粘膜投与(例えば、鼻腔内および経口経路)および肺投与(例えば、吸入器または噴霧器を用いて投与されるエアロゾル化された化合物)が挙げられる。特定の投与経路のための医薬組成物の製剤ならびに投与の様々な方法に必要なとされる材料および技術が利用可能であり、当業者に公知である(米国特許出願公開第 20090311253A1)。

30

【 0 1 6 4 】

様々な実施形態において、投与計画は、最適な所望の反応(例えば、治療的または予防的反応)を提供するように調整されてもよい。例えば、単回ボラスが投与されてもよく、いくつかに分割した用量は経時的に投与されてもよく、または用量は比例的に減少されてもよくもしくは治療状況の緊急性によって示されるように増加されてもよい。いくつかの実施形態において、投与の容易性および投与量の均一性のために投薬単位形態において非経口組成物が処方される。「投薬単位形態」という用語は、処置されるべき哺乳動物対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を指し;それぞれの単位は、必要とされる医薬的担体と共に所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含有する。

40

【 0 1 6 5 】

本明細書において提供されている結合タンパク質の治療的または予防的に有効量の例示的であり、非制限的な範囲は、約 0.1 - 100 mg / kg (例えば、約 0.1 - 0.5、0.1 - 1、0.1 - 10、0.1 - 20、0.1 - 50、0.1 - 75、1 - 10、

50

1 - 15、1 - 7.5、1.25 - 15、1.25 - 7.5、2.5 - 7.5、2.5 - 15、5 - 15、5 - 7.5、1 - 20、1 - 50、7 - 75、1 - 100、5 - 10、5 - 15、5 - 20、5 - 25、5 - 50、5 - 75、10 - 20、10 - 50、10 - 75もしくは10 - 100 mg / kg またはその間の任意の濃度)である。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、医薬組成物に、治療的に有効な濃度、例えば、約0.1 - 100 mg / ml (例えば、約0.1 - 0.5、0.1 - 1、0.1 - 10、0.1 - 20、0.1 - 50、0.1 - 75、1 - 10、1 - 20、1 - 50、1 - 75、1 - 100、5 - 10、5 - 15、5 - 20、5 - 25、5 - 50、5 - 75、10 - 20、10 - 50、10 - 75もしくは10 - 100 mg / ml またはその間の任意の濃度)で存在する。用量値は、緩和されるべき状態の種類および/または重症度によって変化し得ることに留意すべきである。いずれかの特定の対象について、特定の投薬処方、個々の必要性および/または組成物を投与しもしくは投与を管理している者の専門的な判断に従って、経時的に調整されてもよく、本明細書において記載されている用量範囲は、単に例示的であり、請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図していないことはさらに理解されるべきである。

10

【0166】

IV. 併用療法

様々な実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質はまた、単独で、または疾患もしくは障害、例えば、DLL4 および/もしくはVEGFの有害発現もしくは発現レベルを伴う疾患もしくは障害を処置するために使用される1つ以上の追加の治療剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、診断し、処置しもしくは抗腫瘍治療を増大し、ならびに/または原発性および/もしくは転移性癌を処置するために、1つ以上の治療剤と組み合わせて投与することができる。様々な実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、腫瘍状態を診断し、処置しまたは処置を増大するために、1つ以上の治療剤と組み合わせて投与することができる。他の実施形態において、1つ以上の結合タンパク質は、異常な血管新生によって特徴付けられる任意の疾患または障害(例えば、一般的な自己免疫障害および炎症性疾患、創傷治療)を診断し、処置しまたは処置を増大するために、1つ以上の治療剤と組み合わせて投与することができる。様々な実施形態において、1つ以上の治療剤と組み合わせた1つ以上の結合タンパク質の投与は、過度のVEGFおよび/またはDLL4レベルによって特徴付けられる状態を患っている患者におけるVEGFおよび/またはDLL4のレベルにおいて中和または他の低減をもたらす、ならびに他の治療的变化が、結合タンパク質および/または1つ以上の治療剤の投与に起因する他の治療的变化をもたらす。

20

30

【0167】

様々な実施形態において、1つ以上の追加の薬剤は、その意図された目的で当業者によって選択される。例えば、追加の薬剤は、癌の処置に有用であるものと当該技術分野において認識されている治療剤であってもよい。併用療法はまた、1つを超える追加の薬剤、例えば、2つ、3つ、4つ、5つまたはこれらを超える追加の薬剤を含むことができる。

【0168】

様々な実施形態において、併用療法剤には、限定されないが、血管新生阻害剤、抗腫瘍剤、放射線療法剤、化学療法剤、例えば、DNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ジェムザール、アントラサイクリン、アドリアマイシン、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、イリノテカン、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブ)およびsiRNAが挙げられる。

40

【0169】

本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤の非制限的な例には、以下: 13-cis-レチノイン酸; 2-CdA; 2-クロロデオキシアデノシン; 5-アザシチジン; 5-フルオロウラシル; 5-FU; 6-メルカプトプ

50

リン；6 - MP；6 - TG；6 - チオグアニン；アブラキサン；Accutane (R)
 ；アクチノマイシン - D；Adriamycin (R)；Adrucil (R)；Afinitor (R)；Agrylin (R)；Ala - Cort (R)；アルデスロイキン
 ；アレムツズマブ；ALIMTA；アリトレチノイン；Alkaban - AQ (R)；Alkeran (R)；オールトランスレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルト
 レタミン；アメトプテリン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；Anandron (R)；アナストロゾール；アラビノシルシトシン；Ara - C Arane
 sp (R)；Aredia (R)；Arimidex (R)；Aromasin (R)；Arranon (R)；三酸化ヒ素；Arzerra (TM)；アスパラギナーゼ；AT
 RA；Avastin (R)；アザシチジン；BCG；BCNU；ベンダムスチン；ペバ
 シズマブ；ベキサロテン；BEXXAR (R)；ピカルタミド；BiCNU；Bleno
 xane (R)；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブスルファン；Busulfex (R
)；C225；カルシウムロイコボリン；Campath (R)；Camptosar (R)；Campthecin - 11；カペシタピン；Carac (TM)；カルボプ
 ラチン；カルムスチン；カルムスチンウエハー；Casodex (R)；CC - 5013
 ；CCI - 779；CCNU；CDDP；CeeNU；セルビジン；セツキシマブ；クロ
 ラムプシル；シスプラチン；シトロボラム因子；クラドリピン；コルチゾン；Cosme
 gen (R)；CPT - 11；シクロフォスファミド；Cytadren (R)；シタラ
 ピン；シタラピンリポゾーマル；Cytosar - U (R)；Cytosan (R)；ダ
 カルバジン；ダコゲン；ダクチノマイシン；ダルベポエチンアルファ；ダサチニブ；ダウ
 ノマイシン；ダウノルピシン；塩酸ダウノルピシン；ダウノルピシンリポゾーマル；Da
 unoXome (R)；デカドロン；デシタピン；Delta - Cortef (R)；D
 eltason (R)；デニロイキン；ジフチトクス；DepoCyt (TM)；デキ
 サメタゾン；酢酸デキサメタゾン；リン酸デキサメタゾンナトリウム；デキサゾン；デク
 スラゾキサン；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセタキセル；Doxil (R)；ド
 キソルピシン；ドキソルピシンリポゾーマル；Droxia (TM)；DTIC；DTI
 C - Dome (R)；Duralone (R)；Efudex (R)；Eligard (TM)；Ellence (TM)；Eloxatin (TM)；Elspar (R)；E
 mcyt (R)；エピルピシン；エポエチンアルファ；エルピタックス；エルロチニブ；
 エルウィニア L - アスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopoph
 os (R)；エトポシド；リン酸エトポシド；Eulexin (R)；エベロリムス；E
 vista (R)；エキセメスタン；Fareston (R)；Faslodex (R)
 ；Femara (R)；フィルグラスチム；フロクスウリジン；Fludara (R)；
 フルダラピン；Fluoroplex (R)；フルオロウラシル；フルオロウラシル (ク
 リーム)；フルオキシムエステロン；フルタミド；フォリン酸；FUDR (R)；フルベ
 ストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタピン；ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール
 ；Gleevec (TM)；Gliadel (R)ウエハー；GM - CSF；ゴセレリン
 ；顆粒球コロニー刺激因子 (G - CSF)；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G
 - MCSF)；Halotestin (R)；Herceptin (R)；ヘキサドロー
 ル；Hexalen (R)；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin (R)；
 Hydrea (R)；Hydrocort Acetate (R)；ヒドロコルチゾン；
 リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハイ
 ドロコートン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Ida
 mycin (R)；Idarubicin Ifex (R)；インターフェロン - アルフ
 ア；インターフェロン - アルファ - 2b (PEGコンジュゲート)；イホスファミド；イン
 ターロイキン - 11 (IL - 11)；インターロイキン - 2 (IL - 2)；メシル酸イ
 マチニブ；イミダゾールカルボキサミド；Intron A (R)；Iressa (R)
 ；イリノテカン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ixempra (TM)；KAD
 CYCLA (R)；キドローゼ (t)；Lanacort (R)；ラパチニブ；L - ア
 スパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リューケラン；

10

20

30

40

50

Leukine (TM); ロイプロリド; ロイコクリスチン; Leustatin (TM); リボゾーマルAra-C; Liquid Pred (R); ロムスチン; L-PAM; L-サルコリジン; Lupron (R); Lupron Depot (R); Matulane (R); マキシデックス; メクロレタミン; 塩酸メクロレタミン; Medralone (R); Medrol (R); Megace (R); メゲストロール; 酢酸メゲストロール; メルファラン; メルカプトプリン; メスナ; メスネックス (TM); メトトレキサート; メトトレキサートナトリウム; メチルプレドニゾロン; Meticorten (R); マイトマイシン; マイトマイシン-C; ミトキサントロン; M-Prednisol (R); MTC; MTX; Mustargen (R); ムスチン; Mutamycin (R); Myleran (R); Mylocel (TM); Mylotarg (R); Navelbine (R); ネララピン; Neosar (R); Neulasta (TM); Neumega (R); Neupogen (R); Nexavar (R); Nilandron (R); ニロチニブ; ニルタミド; Nipent (R); Nitrogen Mustard Novaldex (R); Novantrone (R); エヌプレート; オクトレオチド; 酢酸オクトレオチド; オフタツムマブ; Oncospar (R); Oncovin (R); Ontak (R); Onxal (TM); オブレルベキン; Orapred (R); Orasone (R); オキサリプラチン; パクリタキセル; タンパク質に結合したパクリタキセル; パミドロネート; パニツムマブ; Panretin (R); Paraplatin (R); パゾパニブ; PEDIAPRED (R); PEGインターフェロン; ベグアスパラガーゼ; ベグフィルグラスチム; PEG-INTRON (TM); PEG-L-アスパラギナーゼ; ペメトレキセド; ペントスタチン; フェニルアラニンマスタード; Platinol (R); Platinol-AQ (R); プレドニゾロン; プレドニゾン; Prelone (R); プロカルバジン; PROCREDIT (R); Proleukin (R); カルムスチンインプラントを伴うプロリフェプロスパン20; Purinethol (R); ラロキシフェン; Revlimid (R); Rheumatrex (R); Rituxan (R); リツキシマブ; Roferon-A (R); ロミプロスチム; Rubex (R); 塩酸ルビドマイシン; Sandostatatin (R); Sandostatatin LAR (R); サーグラモスティム; Solu-Cortef (R); Solu-Medrol (R); ソラフェニブ; SPRICEL (TM); STI-571; ストレプトゾシン; SU11248; スニチニブ; Sutent (R); Tamoxifen Tarceva (R); Targretin (R); Tassigna (R); Taxol (R); Taxotere (R); Temodar (R); テモゾロマイド; テムシロリムス; テニポシド; TESPAA; サリドマイド; Thalomid (R); TheraCys (R); チオグアニン; Thioguanine Tabloid (R); チオホスファミド; Thioplex (R); チオテパ; TICE (R); Toposar (R); トポテカン; トレミフェン; Torisel (R); トシツモマブ; トラスツズマブ; Treanda (R); トレチノイン; Trexall (TM); Trisenox (R); TSPA; TYKERB (TM); VCR; Vectibix (TM); Velban (R); Velcade (R); Vepesid (R); Vesanoide (R); Viadur (TM); Vidaza (R); ビンブラスチン; 硫酸ビンブラスチン; Vincasar-Pfs (R); ピンクリスチン; ビノレルピン; 酒石酸ビノレルピン; VLB; VM-26; ポリノスタット; ヴォトリエント; VP-16; Vumon (R); Xeloda (R); Zanosar (R); Zevalin (TM); Zinecard (R); Zoladex (R); ゴレドロン酸; ゴリンザ; または Zometa (R) が含まれる。

10

20

30

40

【0170】

いくつかの実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質は、1つ以上の Temozolomide (R)、イリノテカン、ロイコボリン、5-FU、ゲムシタピンおよびパクリタキセルと組み合わせて使用される。一実施形態において、結合タンパク質 h1A11.1-SL-Av は、1つ以上の Temozolomide (R)、イ

50

リノテカン、ロイコボリン、5-FU、ゲムシタピンおよびパクリタキセルと組み合わせて使用される。

【0171】

様々な実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジン、クロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン(pencilamine)、金チオリンゴ酸塩(筋内および経口)、アザチオプリン、コルヒチン(cochicine)、コルチコステロイド(経口、吸入および局所注射)、 β -2アドレナリン作動性受容体アゴニスト(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNFまたはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する薬剤(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体(例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体または誘導体p75TNFRIGG(Enbrel(TM)およびp55TNFRIGG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、炎症抑制性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β)、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム、アスピリン、トリムシノロン・アセトニド、プロポキシフェンナブシラート/pap、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩/pap、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組み換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン/fa/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、硫酸グルコサミン/コンドロイチン、塩酸アミトリプチリン、スルファジアジン、塩酸オキシコドン/アセトアミノフェン、塩酸オロパタジン、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメブラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗IL-18、抗IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX740、ロフルミラスト、IC-485、CDC-801およびメソプラムなどの作用物質とも組み合わせられ得る。いくつかの実施形態において、組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドとシクロスポリンが含まれ得る。

【0172】

いくつかの実施形態において、本明細書において提供される医薬組成物は、本明細書において提供される結合タンパク質の「治療的有効量」または「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するための投薬量で、および所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。結合タンパク質の治療的有効量は、当業者によって決定され得、病状、年齢、性別および個体の体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有効量は、抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、および所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有

10

20

30

40

50

効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が患者に使用されるので、予防的有効量は、治療的有效量より少ない。

【0173】

V. 診断

本明細書における開示はまた、診断の適用例を提供し、限定されないが、1つ以上の結合タンパク質を用いる診断アッセイ法、1つ以上の結合タンパク質を含有する診断用キット、ならびに自動化および/または半自動化システムにおける使用のための方法およびキットを提供する。いくつかの実施形態において、方法およびキットは、個体における疾患または障害の検出、監視および/または処置に用いることができる。

【0174】

A. アッセイ法

様々な実施形態において、少なくとも1つの結合タンパク質を用いて、試験試料中の少なくとも1つの分析物もしくはその断片の存在、量および/または濃度を決定する方法が提供される。例示的なアッセイには、限定されないが、イムノアッセイおよび/または質量分析法を用いる方法が挙げられる。

【0175】

例えば、本開示によって提供されるイムノアッセイは、とりわけ、サンドイッチイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ(RIA)、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、競合阻害イムノアッセイ、蛍光偏光イムノアッセイ(FPIA)、酵素増幅イムノアッセイ技術(EMIT)、生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)および均一系化学発光アッセイを含む。

【0176】

いくつかの実施形態において、試験試料中の1つ以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法が提供され、ここで、1つ以上の抗原もしくはその断片はDLL4および/またはVEGFである。本方法は、イムノアッセイによって抗原またはその断片について試験試料をアッセイすることを含む。イムノアッセイは、(i)少なくとも1つの結合タンパク質と少なくとも1つの検出可能な標識を用い、(ii)試験試料における抗原もしくはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的な指標として、検出可能な標識によって生じたシグナルと、対照または較正物質における、抗原もしくはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的な指標として生じるシグナルとを比較することを含む。較正物質は、場合により、一連の較正物質の一部であり、較正物質の各々は、抗原またはその断片の濃度による一連の他の較正物質と異なる。本方法は、(i)捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体を形成するために、試験試料を、抗原上のエピトープまたはその断片に結合する少なくとも1つの捕捉薬剤に接触させること、(ii)捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体と、検出可能な標識を含み、捕捉薬剤に結合しない抗原上のエピトープまたはその断片に結合する少なくとも1つの検出薬剤に接触させ、検出複合体を形成すること、(iii)(ii)で形成された検出複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料における抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含み、ここで、少なくとも1つの捕捉薬剤および/または少なくとも1つの検出薬剤は少なくとも1つの結合タンパク質である。

【0177】

代わりに、いくつかの実施形態において、試験試料中の1つ以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法は、(i)捕捉薬剤と抗原またはその断片を含む複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉薬剤に接触させ、同時にまたは連続して、いずれかの順番で、試験試料を、少なくとも1つの捕捉薬剤に結合させるために、任意の抗原またはその断片と競合し得る検出可能に標識された抗原またはその断片に接触させることであって、ここで、試験試料中に存在する任意の抗原またはその断片と、検出可能に標識された抗原は互いに競合し、検出複合体を形成すること、および(ii)(i)において形成した検出複合体における検出可能な標識によって生じたシグナルに基づいて、試験試料中の抗原もしくはその

10

20

30

40

50

断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができる。

【0178】

様々な実施形態において、試験試料は、患者由来であってもよく、この場合、方法は、患者を診断し、予測または治療的 / 予防的処置の有効性を評価することをさらに含むことができる。本方法が、患者の治療的 / 予防的処置の有効性を評価することをさらに含む場合、方法は、場合により、有効性を改善する必要がある場合、患者の治療的 / 予防的処置を改変することをさらに含む。本方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合され得る。したがって、本明細書において記載されている方法はまた、対象が、所定の疾患、障害もしくは状態であるまたはそれらを発症する危険性があるかどうかを決定するために使用され得る。具体的には、このような方法は、

(a) 対象からの試験試料中の 1 つ以上の分析物またはその断片を (例えば、本明細書において記載されている方法または当該技術分野において公知である方法を用いて) 決定する工程 ; および (b) 工程 (a) において決定された分析物またはその断片の濃度または量と所定レベルを比較する工程を含むことができ、ここで、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量が所定レベルと比較して好ましい場合は、対象は、所定の疾患、障害または状態でないおよびこの危険性がないものと決定される。しかしながら、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量が所定レベルと比較して好ましくない場合は、対象は、所定の疾患、障害または状態でありまたはこの危険性があるものと決定される。

【0179】

さらに、本明細書において、対象における疾患の進行を監視する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、

(a) 対象由来の試験試料中の 1 つ以上の分析物の濃度または量を決定する工程 ;

(b) 同対象由来の後の試験試料における分析物の濃度または量を決定する工程 ; および

(c) 工程 (b) において決定された分析物の濃度または量と、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量を比較する工程

を含み、ここで、工程 (b) において決定された濃度または量が、工程 (a) において決定された濃度または量と比較して、変化していないまたは好ましくない場合、対象における疾患は、継続し、進行または悪化しているものと決定される。比較によって、工程 (b) において決定された濃度または量が、工程 (a) において決定された濃度または量と比較した場合に好ましい場合には、対象における疾患は、終わり、後退されまたは改善されたものと決定される。

【0180】

場合により、疾患の進行を監視する方法は、工程 (b) において決定された分析物の濃度または量と、例えば、所定レベルとを比較することをさらに含む。さらに、場合により、本方法は、比較が、例えば、工程 (b) において決定された分析物の濃度または量が、所定レベルと比較して好ましくなく変更されたことを示す場合、所定期間、1 つ以上の医薬組成物を用いて対象を処置することを含む。

【0181】

いくつかの実施形態において、分析物もしくはその断片の存在、量または濃度は、化学発光標識 (アクリジニウム化合物) などの検出可能な標識を用いて、試料中において検出される。いくつかの実施形態において、生じる化学発光シグナルは、当業者に公知の日常的な技術を用いて検出され得る。生じたシグナルの強度に基づいて、試料の分析物の量または濃度が定量され得る。具体的には、いくつかの実施形態において、試料中の分析物の量は、生じたシグナルの強度に比例してもよい。特定の実施形態において、存在する分析物の量は、生じた光の量を分析物についての標準曲線と比較することによって、または参照標準もしくは較正物質との比較によって定量されてもよい。標準曲線は、既知の濃度の分析物の連続希釈物または溶液を用いて、質量分析、重量法および当該技術分野において公知の他の技術を用いることによって、生じさせてもよい。

【 0 1 8 2 】

分析物イムノアッセイは、一般的に、当該技術分野において公知の任意のフォーマット、例えば、限定されないが、サンドイッチフォーマットを用いて行うことができる。例えば、イムノアッセイにおいて、1つ以上の結合タンパク質は、試験試料中の分析物（またはその断片）を捕捉するために使用され得る（これらの結合タンパク質は、多くの場合、「捕捉」結合タンパク質と呼ばれる。）、1つ以上の結合タンパク質は、サンドイッチへの検出可能な（すなわち、定量できる）標識を結合させるために使用され得る（これらの結合タンパク質は、多くの場合、「検出」結合タンパク質、または「コンジュゲート」と呼ばれる。したがって、例示的なサンドイッチイムノアッセイフォーマットに照らして、本明細書に記載されているDVD（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）は、捕捉結合タンパク質、検出結合タンパク質またはこれらの両方として用いることができる。例えば、第一の分析物（またはその断片）上のエピトープに結合し得る第一のドメインと第二の分析物（またはその断片）上のエピトープに結合し得る第二のドメインとを有するDVDは、1つ以上の分析物（例えば、DLL4および/またはVEGF）を検出し、場合により定量するために、捕捉結合タンパク質および/または検出結合タンパク質として用いることができる。さらなる例において、サンドイッチアッセイ内で異なる親和性を有するDVDを用いることは、結合力優位性を提供し得る。本明細書において記載されているイムノアッセイに照らして、一般的には、DVDの構造内に1つ以上のリンカーを組み込むことが有益でありまたは望まれてもよい。存在する場合、場合により、リンカーは、内部ドメインによってエピトープに結合することができ、および外部ドメインによって別のエピトープに結合することができるように十分な長さで構造柔軟性を有する必要がある。この点において、DVDは、2つの異なる分析物に結合することができ、一方の分析物は他方よりも大きい場合、望ましくは、大きな分析物は外部ドメインに結合される。

10

20

【 0 1 8 3 】

様々な実施形態において、試験される試料（例えば、分析物またはその断片を含有することが疑われる試料）は、少なくとも1つの捕捉結合タンパク質および少なくとも1つの検出結合タンパク質と、同時にまたは連続して、およびいずれかの順番で接触させることができる。例えば、試験試料は、最初に少なくとも1つの捕捉結合タンパク質と接触され、次に（連続して）少なくとも1つの検出結合タンパク質と接触され得る。代わりに、試験試料は、最初に少なくとも1つの検出結合タンパク質に接触され、次に（連続して）少なくとも1つの捕捉結合タンパク質に接触され得る。なお別の代替において、試験試料は、同時に捕捉結合タンパク質と検出結合タンパク質に接触され得る。様々な実施形態において、本明細書に開示されている1つ以上のDVDを含む競合阻害イムノアッセイは、1つ以上の分析物もしくはその断片（例えば、DLL4および/またはVEGF）の存在、量または濃度を検出するために使用することができる。

30

【 0 1 8 4 】

様々な実施形態において、検出可能なレベルは、直接的にまたはカップリング剤を介して、結合タンパク質に結合し得る。用いることができるカップリング剤の例としては、Sigma-Aldrich、St. Louis、MOから市販されているEDAC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）である。用いることができる他のカップリング剤は当該技術分野において公知である。結合タンパク質に検出可能な標識を結合させる方法は、当該技術分野において公知である。

40

【 0 1 8 5 】

様々な実施形態において、検出アッセイにおける分析物およびDVDを含む複合体に結合した標識の存在または量は、当該技術分野において公知である技術を用いて定量することができる。例えば、酵素標識を用いる場合、標識された複合体は、発色などの定量可能な反応を与える標識について、基質と反応させ得る。標識が放射線標識である場合、標識は、シンチレーションカウンターなどの適切な手段を用いて定量され得る。標識が蛍光標識である場合、標識は、標識を刺激し、蛍光シグナルを検出することによって定量され得

50

る。標識が化学発光標識である場合、標識は、視覚的にまたは照度計、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどによって、発光を検出することによって定量され得る。いくつかの実施形態において、複合体における標識の量が定量されると、試験試料中の分析物またはその断片の濃度は、適切な手段、例えば、既知濃度の分析物もしくはその断片の連続希釈を用いて生じさせた標準曲線の使用または任意の他の較正物質によって決定することができる。

【0186】

一実施形態において、化学発光微粒子イムノアッセイ、特にARCHITECT(R)自動分析器(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を使用するものが、用いられる。

10

【0187】

いくつかの実施形態において、質量分析法を用いる方法は、本開示によって提供され、限定されないが、MALDI(マトリックス支援レーザー脱離/イオン化)およびSELDI(表面増強レーザー脱離/イオン化)が含まれる。

【0188】

イムノアッセイおよび質量分析法を用いて生物学的試験試料を回収し、操作し、処理しおよび分析するための方法は当業者に周知であり、本開示の実施において提供される(US 2009-0311253 A1)。

【0189】

B. キット

様々な実施形態において、試験試料中の少なくとも1つ分析物もしくはその断片の存在、量および/または濃度について試験試料をアッセイするためのキットがまた提供される。いくつかの実施形態において、キットは、分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分および分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書を含む。分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分は、本明細書に開示されている結合タンパク質および/またはその断片、バリエーションまたはそのバリエーションの断片を含む組成物を含むことができる。いくつかの実施形態において、成分は、場合により、固相に固定化されている。

20

【0190】

場合によって、いくつかの実施形態において、キットは、単離されたまたは精製された分析物を含み得る、較正因子または対照を含むことができる。特定の実施形態において、キットは、イムノアッセイおよび/または質量分析法によって、分析物について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分を含むことができる。キット成分は、分析物、結合タンパク質および/または抗分析物結合タンパク質またはその断片を含み、場合によって、当該分野で公知の任意の検出可能な標識を用いて標識されてもよい。(米国2009-0311253 A1)。

30

【0191】

C. 自動化

様々な実施形態において、試験試料中の少なくとも1つの分析物の存在、量および/または濃度を決定するためのキット(またはこの成分)および方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、例えば、ARCHITECT(R)としてAbbott Laboratories(Abbott Park, IL)によって市販されている、多数の自動化システムおよび半自動化システムにおいて使用するために適合され得る。

40

【0192】

結合タンパク質を用いて使用され得る他の自動化プラットフォームまたは半自動化プラットフォームには、限定されないが、ASYM(R)、IMx(R)(例えば、米国特許第5,294,404号参照)、PRISM(R)、EIA(ビーズ)およびQuantum(TM)II(Abbott Laboratoriesから全てを入手される。)ならびに当該技術分野で公知の他のプラットフォームが挙げられる。さらに、アッセイ

50

、キットおよびキットの成分は、他のフォーマットにおいて、例えば、電気化学的および/または他の携帯もしくはポイントオブケアアッセイシステムで使用することが可能である。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う商業的 Abbott Point of Care (i-STAT (R)、Abbott Laboratories) 電気化学的イムノアッセイシステムに適用可能である。免疫センサーならびに単回使用試験装置におけるこれらの製造および操作方法は、例えば、米国特許第 5,063,081号、第 7,419,821号、および第 7,682,833号；ならびに米国特許公開第 20040018577号、第 20060160164号、および US 20090311253 に記載されている。

【0193】

本明細書に記載されている本方法の他の適切な改変および適合が明白であり、本明細書に開示されている範囲または実施形態から逸脱することなく、適切な均等物を用いてこれらを行き得ることは、当業者に容易に明確になる。ここに、ある種の実施形態を詳細に記載してきたが、例示のみを目的とし、限定することを意図したものではない、下記の実施例を参照することによって、本発明がより明確に理解される。

【実施例】

【0194】

[実施例 1]

抗DLL4 / 抗VEGF DVD分子の構築

ヒト化抗DLL4 mAb (h1A11.1) および抗VEGF mAb (Av) からの可変ドメイン配列は、抗DLL4 / 抗VEGF DVD分子のVHドメインおよびVLドメインを設計するために使用された。可変領域は、二段階PCRを用いて合成された。プライマーは、クローニングベクターに対して相同な隣接領域と、それぞれのDVD可変対間のリンカー領域を用いて設計された。細菌の形質転換は、陽性クローンを同定するために行われ、構築物は、当該技術分野において公知の標準的なプロトコルを用いて、哺乳動物の形質転換において使用するために回収され、精製された。

【0195】

重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、変異ヒトIgG1 (L234、235A) 重鎖およびカッパ軽鎖定常領域にインフレームでクローニングされ、抗DLL4 / 抗VEGF DVD分子を生じさせた (表4)。

【0196】

【表5】

表4. 抗DLL4/抗VEGF DVD構築物

DVD名	重鎖(HC)	軽鎖(LC)
h1A11.1-LL-Av	h1A11.1-L-Av HC	h1A11.1-L-Av LC
h1A11.1-LS-Av	h1A11.1-L-Av HC	h1A11.1-S-Av LC
h1A11.1-SL-Av	h1A11.1-S-Av HC	h1A11.1-L-Av LC
h1A11.1-SS-Av	h1A11.1-S-Av HC	h1A11.1-S-Av LC
h1A11.1-GS10-Av	h1A11.1-GS10-Av HC	h1A11.1-GS10-Av LC
h1A11.1-GS14-Av	h1A11.1-GS14-Av HC	h1A11.1-GS14-Av LC
Av-LL-h1A11.1	Av-L-h1A11.1 HC	Av-L-h1A11.1 LC
Av-LS-h1A11.1	Av-L-h1A11.1 HC	Av-S-h1A11.1 LC
Av-SL-h1A11.1	Av-S-h1A11.1 HC	Av-L-h1A11.1 LC
Av-SS-h1A11.1	Av-S-h1A11.1 HC	Av-S-h1A11.1 LC
Av-GS6-h1A11.1	Av-GS6-h1A11.1 HC	Av-GS6-h1A11.1 LC
Av-GS10-h1A11.1	Av-GS10-h1A11.1 HC	Av-GS10-h1A11.1 LC
Av-GS14-h1A11.1	Av-GS14-h1A11.1 HC	Av-GS14-h1A11.1 LC

【0197】

10

20

30

50

[実施例 2]

抗 D L L 4 / 抗 V E G F DVD 構築物の親和性決定

B I A C O R E アッセイ (B i a c o r e , I n c , P i s c a t a w a y , N J) は、25 にて B i a c o r e 2 0 0 0、B i a c o r e 3 0 0 0 または B i a c o r e T 1 0 0 (G E H e a l t h c a r e , P i s c a t a w a y , N J) 上で行われる表面プラズモン共鳴に基づく測定によって決定される、精製された組換え D L L 4 細胞外ドメイン (E C D) または V E G F ₁₆₅ への D V D の結合を評価するために使用された。D L L 4 結合動態測定について、アッセイ緩衝液は、H B S - E P B : 1 0 m M H e p e s、p H 7 . 5、1 5 0 m M N a C l、3 m M E D T A、0 . 0 0 5 % T w e e n 2 0、0 . 1 m g / m l B S A (S i g m a A 7 9 0 6) であった。V E G F 結合動態測定について、アッセイ緩衝液は、H B S - E P + (3 N 0 1 B) : 1 0 m M H e p e s、p H 7 . 5、3 0 0 m M N a C l、3 m M E D T A、0 . 0 5 % T w e e n 2 0、0 . 1 m g / m l B S A (S i g m a A 7 9 0 6) であった。例えば、1 0 m M の酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) 中に希釈されたヤギ抗ヒト F c 特異的ポリクローナル抗体 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c I n c . , R o c k f o r d , I L) の約 9 0 0 0 R U は、製造業者の取扱説明書と手法に従って、2 5 μ g / m l にて、標準的なアミンカップリングキットを用いて C M 5 リサーチグレードのバイオセンサーチップ全体に直接固定された。バイオセンサー表面上の未反応部分をエタノールアミンでブロックされる。動態分析について、S c r u b b e r 2 (B i o L o g i c S o f t w a r e)、B i a c o r e B i o e v a l u a t i o n 4 . 0 . 1 ソフトウェアまたは B i a c o r e T 1 0 0 評価ソフトウェアを用いて、1 : 1 の L a n g m u i r 結合モデルから誘導された速度方程式は、複数の抗原注入に対して同時にフィッティングさせた (グローバルフィット解析の使用)。精製された抗体は、ヤギ抗ヒト F c 反応表面全体で捕捉させるために、稼働緩衝液に希釈される。リガンド (1 μ g / m l) として補足されるべき抗体は、流速 1 0 μ l / 分で反応マトリックス上に注入される。アッセイ中、全ての測定は、捕捉表面単独 (すなわち、捕捉された抗体を含まない。) に対して参照される。結合および解離速度定数の K_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) および K_{off} (s^{-1}) は、8 0 μ l / 分の連続的流速下で決定される。速度定数は、3 倍の希釈シリーズとして、1 . 2 3 から 9 0 0 n M の範囲の異なる抗原濃度で動的結合測定値を生じさせることによって導入され、緩衝液のみの注入を含んだ (二重参照に用いられるべきである。)。次に、抗体と標的抗原間の反応の平衡解離定数 K_D (M) は、以下の式 : $K_D = K_{off} / K_{on}$ によって、動態速度定数から計算される。結合は、時間の関数として記録され、動態速度定数が計算される。このアッセイにおいて、 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 程度に速い結合速度と $10^{-6} s^{-1}$ 程度に遅い解離速度が測定され得る。抗 D L L 4 / 抗 V E G F DVD の抗原結合親和性を表 5 および 6 に概要する。

【 0 1 9 8 】

10

20

30

【表 6】

表5. 抗DLL4/抗VEGF DVD結合タンパク質のBiacore動態

DVD名	BIAcore ヒトDLL4 ₅₂₉			BIAcore ヒトVEGF ₁₆₅		
	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)
Av	N/A	N/A	N/A	1.19E+05	3.47E-05	2.9E-10
h1A11.1	1.60E+05	1.93E-03	1.2E-08	N/A	N/A	N/A
h1A11.1-LL-Av	2.05E+05	2.63E-03	1.2E-08	5.19E+04	2.44E-05	4.7E-10
h1A11.1-LS-Av	2.15E+05	2.36E-03	1.1E-08	2.26E+04	2.83E-05	1.3E-09
h1A11.1-SL-Av	2.17E+05	2.24E-03	1.0E-08	4.57E+04	3.20E-05	7.0E-10
h1A11.1-SS-Av	1.92E+05	2.25E-03	1.2E-08	7.32E+03	5.42E-05	7.4E-09
h1A11.GS10-Av	2.52E+05	2.33E-03	9.3E-09	1.92E+04	4.26E-05	2.2E-09
h1A11.1-GS14-Av	2.40E+05	2.33E-03	9.7E-09	2.87E+04	3.72E-05	1.3E-09
Av-GS6-h1A11.1	1.41E+04	7.03E-04	5.0E-08	1.94E+05	3.72E-05	1.9E-10
Av-GS10-h1A11.1	3.45E+04	1.01E-03	2.9E-08	1.84E+05	3.59E-05	1.9E-10
Av-GS14-h1A11.1	3.97E+04	1.34E-03	3.4E-08	1.82E+05	3.08E-05	1.7E-10

N/A:該当なし

【 0 1 9 9 】

【表 7】

表6. h1A11.1-SL-Av DVDの追加のBiacore動態

DVD名	BIAcore カニクイザルDLL4 ₅₂₉			BIAcore マウスDLL4 ₅₃₀		
	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)
h1A11.1-SL-Av	4.43E+05	2.49E-03	5.6E-09	3.22E+05	7.74E-03	2.4E-08

【 0 2 0 0 】

[実施例 3]

抗DLL4 / 抗VEGF DVD分子のインビトロでの特徴付け

[実施例 3 . 1]

フローサイトメトリー (F A C S) によって決定されるDLL4結合活性

全長DLL4を過剰発現する安定なHEK293G細胞株は、組織培養フラスコから回収され、4回洗浄され、1%のウシ血清アルブミンおよび1mM CaCl₂を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) (F A C S 緩衝液) に再懸濁された。1.5 × 10⁵個の細胞は、FACS緩衝液中で様々な濃度のDVD結合タンパク質とともに、60分間、氷上でインキュベートされた。細胞は2回洗浄され、50 μLのR-フィコエリトリンをコンジュゲートさせた抗ラットIgG F (a b ')₂断片 (F A C S 緩衝液中で1 : 200希釈) (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A , C a t , # 1 1 2 - 1 1 6 - 0 7 2) が添加された。氷上でのインキュベーション (4 , 6 0 分) 後、細胞は3回洗浄され、FACS緩衝液に再懸濁された。蛍光は、Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (B e c t o n D i c k i n s o n , S a n J o s e , C A) を用いて測定された。データは、Graphpad Prismソフトウェアを用いて解析され、EC₅₀値は、DLL4を発現する細胞に結合する抗体の最大の50%を達成する抗体濃度として記録された。

【 0 2 0 1 】

[実施例 3 . 2]

可溶性DLL4細胞外ドメインを用いたNotch-1相互作用の阻害によって決定さ

20

30

40

50

れる抗DLL4 / 抗VEGF DVDタンパク質のDLL4遮断活性

96ウェルNunc - Immunoプレート (#439454、huDLL4 ELISA用)および96ウェルCostarプレート (#9018 muDLL4 ELISA用)は、16 nMヒトNotch-1 (R&D Systems #3647-TK、D-PBS中100 µl / ウェル)を用いて被覆され、一晩4 にてインキュベートされた。次に、プレートは、洗浄緩衝液 (PBS、0.05%のTween-20)で3回洗浄され、200 µl / ウェルのブロッキング緩衝液 (D-PBS、1%のBSA、1 mM CaCl₂、0.05%のTween-20)を用いて1時間、25 にてブロッキングされた。ブロッキング中、ビオチン標識されたDLL4細胞外ドメイン (14 nM)は、1時間、25 にて振とうさせながら、抗体 (30 pM - 66 nM、ブロッキング緩衝液中で3倍連続希釈)と混合された。アッセイプレートは、ブロッキング後に洗浄され、DLL4 / 抗体混合物 (100 µl / ウェル、振とうしながら1時間25 にて)とともにインキュベートされた。プレートは再度洗浄され、100 µl / ウェルの、HRPをコンジュゲートしたストレプトアビジン (Fitzgerald #65R-S104PHRPx、ブロッキング緩衝液中1:5,000希釈)が1時間、25 にて振とうしながら添加された。最終洗浄後、プレートは、100 µl / ウェルの基質 (TMB Sigma #T8665)を用いて発色され、100 µg / ウェルの1N HClを用いて反応を停止させ、吸光度を450 nmで読み取った。データは、Graphpad Prismソフトウェアを用いて分析され、IC₅₀値は、Notch1へのDLL4結合の50%の減少を達成するのに必要される抗体の濃度として記録された。

10

20

【0202】

[実施例3.3]

Notchレポーターアッセイを用いたDLL4依存性Notch活性化の阻害によって決定される抗DLL4 / 抗VEGF DVDタンパク質のDLL4ブロッキング活性

96ウェル黒色透明底組織培養プレートは、Notch応答性プロモーターによって駆動するルシフェラーゼを発現する遺伝子操作されたEA.hy926細胞とともに一晩播種された (7,000細胞 / ウェル)。200 nMから連続希釈された抗体は、全長DLL4を発現するHEK293G細胞を含有する等体積の溶液とともに15分間混合された (5,000細胞 / ウェル)。293G / DLL4細胞は、試験抗体の存在下で24時間、EA.hy926 Notchレポーター細胞と共培養された。ルシフェラーゼ活性は、Promegaの基質 (Promega #E2940)を用いて分析された。データは、Graphpad Prismソフトウェアを用いて分析され、IC₅₀値は、DLL4誘導によるNotch活性化の50%減少を達成するのに必要とされる抗体濃度として記録された。

30

【0203】

[実施例3.4]

捕捉ELISAによって決定される抗DLL4 / 抗VEGF DVDタンパク質のVEGF結合活性

ELISAプレート (Nunc、MaxiSorp、Rochester、NY)は、抗ヒトFc抗体 (PBS中5 µg / ml、Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA)とともに一晩4 にてインキュベートされた。プレートは、洗浄緩衝液 (0.05%のTween-20を含有するPBS)中で3回洗浄し、ブロッキング緩衝液 (1%のBSAを含有するPBS)中で1時間25 にてブロッキングされた。ウェルは3回洗浄され、それぞれの抗体またはDVDは、25 にて1時間インキュベートする前に、0.1%のBSAを含有するPBS中で連続して希釈された。ウェルは3回洗浄され、ビオチン化されたVEGF (2 nM)はプレートに添加され、1時間25 にてインキュベートされた。ウェルは3回洗浄され、次に、ストレプトアビジン-HRP (KPL #474-3000、Gaitheersbrug、MD)とともに1時間25 にてインキュベートされた。ウェルは3回洗浄され、100 µlのULTRA-TMB ELISA (Pierce、Rockford、IL)はウェルあたりに添加

40

50

された。発色後、反応は、1 M HClを用いて停止され、450 nmの吸光度が測定された。

【0204】

[実施例3.5]

VEGFR1を用いたVEGF相互作用の阻害によって決定される抗DLL4/抗VEGF DVDタンパク質のVEGFブロック活性

ELISAプレート(Nunc、MaxiSorp、Rochester、NY)は、組換えVEGFR1細胞外ドメイン-Fc融合タンパク質(5 µg/ml、R&D Systems、Minneapolis、MN)を含有する100 µl PBSとともに一晩4℃にてインキュベートされた。プレートは、洗浄緩衝液(0.05%のTween 20を含有するPBS)中で3回洗浄され、ブロック緩衝液(1%のBSAを含有するPBS)中で1時間25℃にてブロックされた。それぞれの抗体およびDVDは、0.1%のBSAを含有するPBS中で連続希釈され、50 µlの2 nMビオチン化VEGFとともに1時間25℃にてインキュベートされた。次に、抗体およびビオチン化されたVEGFの混合物またはDVDおよびビオチン化されたVEGF(100 µl)の混合物は、VEGFR1-Fcで被覆されたウェルに添加され、25℃にて10分間インキュベートされた。ウェルは3回洗浄され、次に、100 µlのストレプトアビジン-HRP(KPL #474-3000、Gaithersburg、MD)とともに1時間25℃にてインキュベートされた。ウェルは3回洗浄され、100 µlのULTRA-TMB ELISA(Pierce、Rockford、IL)はウェルあたり添加された。発色後、反応は、1 M HClを用いて停止され、450 nmの吸光度が測定された。

10

20

【0205】

[実施例3.6]

VEGF刺激された内皮細胞の増殖/生存の阻害によって決定される抗DLL4/抗VEGF DVDタンパク質のVEGFブロック活性

アッセイ用に播種する前に、TIME(ATCC)またはHUVEC(2から6継代)の内皮細胞は、EGM-2 Single Quots(Lonza-Clonetics、Walkersville、MD、#CC-4176)が補足されたEBM-2(Lonza-Clonetics、Walkersville、MD)中で維持された。細胞は、増殖因子の不存在下で、0.1%のFBSを含む100 µlのEMB-2中、コラーゲン被覆された黒色96ウェルプレート上に10,000細胞/ウェルで播種された。翌日、培地は、増殖因子の不存在で、0.1%のFBSを用いて置き換えられた。翌日、培地は、100 µlのEMB-2(増殖因子または血清を含まない)で置き換えられ、VEGFおよび抗体またはDVDの添加前に4時間インキュベートされた。抗VEGFモノクローナル抗体またはDVDは、0.1%のBSAを含むEMB-2中で連続希釈され、50 µl中、組換えヒトVEGF₁₆₅(50 ng/ml)とともに1時間25℃にてプレインキュベートされた。次に、抗体とVEGFの混合物またはDVDとVEGFの混合物が、細胞に添加され(50 µl)、プレートは、加湿された、5%のCO₂雰囲気下で72時間、37℃にてインキュベートされた。細胞の生存/増殖は、製造業者の使用説明書に従って、ATPliteキット(Perkin Elmer、Waltham、MA)を用いてATPレベルを評価することによって間接的に測定された。

30

40

【0206】

上記したアッセイによって特徴付けられる、抗DLL4/抗VEGF DVDのインビトロ活性を表7に概要する。

【0207】

【表 8】

表7. 抗DLL4/抗VEGF DVDのインビトロ特徴付け

DVD名	ヒトDLL4			ヒトVEGF		
	結合	機能的遮断		結合	機能的遮断	
	FACS EC ₅₀ (nM)	Notch競合 ELISA IC ₅₀ (nM)	Notch 活性化 IC ₅₀ (nM)	ELISA EC ₅₀ (nM)	VEGFR1競合 ELISA IC ₅₀ (nM)	内皮細胞増殖 IC ₅₀ (nM)
Av-LL-h1A11.1		2.43				
Av-LS-h1A11.1		2.77				
Av-SL-h1A11.1		7.38				
Av-SS-h1A11.1		3503				
h1A11.1-LL-Av	5.04	0.79	4.56	0.12	3.8	0.42
h1A11.1-LS-Av	5	0.76	4.59	0.16	7.7	0.57
h1A11.1-SL-Av	4.35	1.09	5.34	0.55	3.8	0.61
h1A11.1-SS-Av	3.75	0.91	7.47	2.5	26	4.2
h1A11.1-GS10-Av		0.65		0.99	37.2	1.21
h1A11.1-GS14-Av		0.68		0.41	20.2	0.84
Av-GS6-h1A11.1		3.41		0.25	7.44	4.14
Av-GS10-h1A11.1		1.5		0.12	2.01	0.57
Av-GS14-h1A11.1		1.54		0.17	4.69	0.48

【0208】

[実施例4]

抗DLL4/抗VEGF DVDのインビトロにおける薬物動態結果

h1A11.1-SL-Av DVDの薬物動態特性は、ボラス静脈内投与後に、カニクイザル(それぞれの投薬群についてn=2)およびCD1マウス(それぞれの投薬群についてはn=6)において評価された。CD1マウスとカニクイザルの両方でh1A11.1-SL-Av DVD薬物動態プロファイルは、従来のモノクローナル抗体の特徴を示している(表8)。

【0209】

【表9】

表8: ボラス静脈内投与後のh1A11.1-SL-Av DVDの平均PKパラメータ

種	投薬量	AUC	Cmax	Vss	CL	T1/2	MRT
マウス	1	30.4	16.6	56.6	33.6	1.4	1.8
	3	203.1	68.9	46.2	14.9	2.3	3.1
	10	570.3	187.2	102.8	18.3	4.7	5.9
	30	4488.1	496.2	94.4	6.8	9.8	13.7
サル	1	109.7	30.3	35.9	10.5	3.1	3.9
	3	403.9	92.8	33.9	7.5	4.3	4.6
	10	1957.1	395.1	35.9	5.1	5.0	7.1
	30	8626.9	1344.4	27.0	3.7	5.5	7.8

投薬量:mg/kg;AUC:0から時間無限までの濃度曲線下の面積($\mu\text{g}/\text{mL}$);Cmax:投薬後の最初に観察された濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$);Vss:分布の体積(mL/kg);CL:クリアランス($\text{mL}/\text{日}/\text{kg}$);T1/2:最終の半減期(日数);MRT:0から無限までの平均滞留時間(日数)。

【0210】

[実施例5]

抗DLL4 / 抗VEGF DVDのインビボでの抗腫瘍有効性

腫瘍増殖における抗DLL4 / 抗VEGF DVDの効果は、最初に、雌性裸ヌードマウスにおけるHT-29ヒト結腸直腸腺癌異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 2×10^6 個の細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は25日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群（群あたり $n = 10$ ）に配分され、そのため、それぞれのコホートは、治療開始前に 214 mm^3 の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、4週間、毎週、腹腔内に投薬され、腫瘍体積は、実験期間中に週2回測定された。結果を表9に示す。

【0211】

その後、腫瘍増殖における抗DLL4 / 抗VEGF DVDの効果は、雌性SCIDマウスにおけるU87-MGヒト膠芽細胞腫異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 3×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は17日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群（群あたり $n = 10$ ）に配分され、そのため、それぞれのコホートは、治療開始前に 221 mm^3 の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、4週間、毎週、腹腔内に投薬され、腫瘍体積は、実験期間中に週2回測定された。結果を表9に示す。

【0212】

【表 10】

表9. HT-29結腸直腸腺癌およびU87-MG膠芽細胞腫異種移植モデルにおける抗DLL4/抗VEGF DVDの有効性

処置	投薬経路、 レジメン	HT-29		U87-MG	
		%TGI ^a	%TGD ^b	%TGI ^c	%TGD ^b
h1A11.1-LL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	59**	42***	74***	100***
h1A11.1-LS-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	59**	42***	77***	124***
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	68***	61***	81***	100***
h1A11.1-SS-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	47*	49*	64***	48***

表9 凡例:a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後29日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のステューデントT検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の終点までの時間の中央値およびC=処置対照群の終点までの時間の中央値である。1000mm³の終点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される。c.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後24日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のステューデントT検定比較から誘導される(*p<0.01、**p<0.001、***p<0.0001)。

【0213】

[実施例6]

抗DLL4/抗VEGF DVDのインビボでの組み合わせ有効性

腫瘍増殖における化学療法と組み合わせた抗DLL4/抗VEGF DVDの効果は、雌性SCIDマウスにおけるU87-MGヒト膠芽細胞腫異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 3×10^6 個の細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は22日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=10)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、治療開始前に207mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、単回投薬のtemozolomide(R)および/または4週間毎の投薬の抗DLL4/抗VEGF DVDで腹腔内に投薬され、腫瘍体積は、実験期間中に週2回測定された。結果を表10に示す。

【0214】

【表 1 1】

表10. U87-MG膠芽細胞腫異種移植モデルにおける抗DLL4/抗VEGF DVDおよびテモゾロミドの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、 レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
テモゾロミド	5 mg/kg IP, qdX1	65***	45***
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	69***	100***
テモゾロミド + h1A11.1-SL-Av	5 mg/kg IP, qdX1 + 6.7 mg/kg IP, q7dX4	78***	147***

表10 凡例:a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後19日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の終点までの時間の中央値およびC=処置対照群の終点までの時間の中央値である。1000mm³の終点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される(*p<0.01、**p<0.001、***p<0.0001)。

【 0 2 1 5 】

[実施例 7]

抗DLL4 / 抗VEGF DVDの予備製剤化の特徴付け

抗DLL4 / 抗VEGF DVD (h1A11.1-SL-AV)の保存安定性(5)および安定性の促進(40)は、以下に列挙されている製剤およびタンパク質濃度において評価された。安定性は、サイズ排除クロマトグラフィー(SE-HPLC)によって評価され、凝集体%、モノマー%、断片%および回収された種全体が定量された。全体的に、製剤は、5-7のpH範囲をカバーし、1.0-118mg/mlのタンパク質濃度範囲をカバーする。

【 0 2 1 6 】

5と40の温度で、50、30および10mg/mlのタンパク質濃度にて、製剤は、15mM酢酸塩 pH5; 15mMリン酸塩 pH7; 30mM酢酸塩、80mg/mlシヨ糖、0.02%Tween 80 pH5; 30mMヒスチジン、80mg/mlシヨ糖、0.02%Tween 80 pH6; PBS(リン酸緩衝生理食塩水)であった。全ての製剤は、保存中に微生物の増殖を防止するために0.02%のアジ化ナトリウムを含有した。5と40の温度で、60、50、30および10mg/mlのタンパク質濃度にて、製剤は、15mMヒスチジン pH6であった(同様に、保存中に微生物の増殖を防止するために0.02%のアジ化ナトリウムを含有した。)。5で、118mg/mlのタンパク質濃度にて、製剤は、15mMヒスチジン pH6であった(同様に、保存中に微生物の増殖を防止するために0.02%のアジ化ナトリウムを含有した。)。40で、1.0mg/mlのタンパク質濃度にて、製剤は、pH5、6、7で10mMクエン酸塩+10mMリン酸塩であった。タンパク質を含む製剤は、可能な微生物

を除去するために濾過された。

【0217】

凍結 - 融解安定性は、製剤中のタンパク質を、 -80°C にて少なくとも20時間凍結させ、 30°C の水浴中での融解する4サイクルに供することによって行われた。凍結 - 融解安定性について試験された製剤は、以下に列挙される。安定性は、SE-HPLCによって評価され、凝集体%、モノマー%、断片%および回収された種全体が定量された。製剤は、 60 mg/ml タンパク質で 15 mM ヒスチジン $\text{pH}6$ (同様に、微生物の増殖を防止するために 0.02% のアジ化ナトリウムを含有した。)であり、 $\text{pH}5$ 、 6 、 7 および 1.0 mg/ml タンパク質で 10 mM クエン酸塩 + 10 mM リン酸塩 (可能な微生物を除去するために濾過された。)であった。

【0218】

最後に、熱安定性を測定するための示差走査熱量測定が、 pH は 5 、 6 、 7 および 1.0 mg/ml タンパク質で、 10 mM クエン酸 + 10 mM リン酸緩衝液中のタンパク質について行われた。それぞれのタンパク質ドメインのアンフォールディングの開始温度とアンフォールディングの中間温度 (T_m) が定量された。

【0219】

表11と12におけるデータに基づいて、h1A11.1-SL-Avは、DVD-Ig安定性についての予備製剤化基準を満たした。

【0220】

【表 1 2】

表11: 異なる濃度にて、異なる緩衝液、賦形剤およびpHにおけるh1A11.1-SL-Avの40°Cでの安定性促進

タンパク質濃度 (mg/ml)	時間	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
—	予備透析	—	—	—	2.71	96.31	0.98	53058
50, 30, 10	T0	—	ace	5	2.89	96.08	1.03	48033
50, 30, 10	T0	—	his	6	2.81	96.23	0.96	46995
50, 30, 10	T0	—	phos	7	2.91	96.09	1.00	52571
50, 30, 10	T0	—	ace-suc-tw	5	2.54	96.50	0.96	50185
50, 30, 10	T0	—	his-suc-tw	6	2.37	96.62	1.01	50771
50, 30, 10	T0	—	PBS	7	2.90	96.08	1.01	49170
50	T7d	40	ace	5	5.19	93.32	1.49	49028
30	T7d	40	ace	5	3.86	94.68	1.47	48171
10	T7d	40	ace	5	2.60	95.97	1.43	48379
50	T7d	40	his	6	5.25	93.46	1.29	47731
30	T7d	40	his	6	4.13	94.58	1.29	46684
10	T7d	40	his	6	2.73	95.84	1.42	46877
50	T7d	40	phos	7	9.02	89.52	1.46	53429
30	T7d	40	phos	7	6.11	92.40	1.49	51923
10	T7d	40	phos	7	3.94	94.57	1.49	53098
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	5.42	92.85	1.73	50373
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	4.07	94.06	1.87	48768
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	2.66	95.20	2.14	49396
50	T7d	40	his-suc-tw	6	3.44	95.02	1.54	50040
30	T7d	40	his-suc-tw	6	4.16	94.14	1.70	48715
10	T7d	40	his-suc-tw	6	2.86	95.24	1.90	49871
50	T7d	40	PBS	7	8.13	90.28	1.60	49207
30	T7d	40	PBS	7	5.82	92.55	1.63	48853
10	T7d	40	PBS	7	3.62	94.82	1.56	48166
50	T21d	40	ace	5	6.65	90.83	2.51	48536
30	T21d	40	ace	5	4.55	92.91	2.54	48520
10	T21d	40	ace	5	2.71	94.70	2.59	48395
50	T21d	40	his	6	7.01	90.71	2.27	46729
30	T21d	40	his	6	4.69	93.10	2.21	46687
10	T21d	40	his	6	2.77	94.93	2.30	46866
50	T21d	40	phos	7	13.39	83.83	2.78	52244
30	T21d	40	phos	7	9.38	87.76	2.86	53556
10	T21d	40	phos	7	4.77	92.32	2.91	52536
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	6.37	90.34	3.30	48268
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	4.27	91.91	3.82	47211
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	2.26	93.02	4.72	46322
50	T21d	40	his-suc-tw	6	6.84	89.82	3.34	47140
30	T21d	40	his-suc-tw	6	4.60	91.90	3.50	47416
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2.67	93.66	3.67	48166
50	T21d	40	PBS	7	12.13	84.81	3.06	49845

30	T21d	40	PBS	7	8.09	88.78	3.13	48108
10	T21d	40	PBS	7	4.20	92.63	3.17	48803

緩衝液凡例(全ての緩衝液は、微生物の増殖を防止するために0.02%アジ化ナトリウムを含有する。):ace=15mM酢酸塩 pH5;his=15mMヒスチジン pH6;phos=15mMリン酸塩 pH7

ace-suc-tw=30mM酢酸塩、80mg/mlショ糖、0.02%Tw80

his-suc-tw=30mMヒスチジン、80mg/mlショ糖、0.02%Tw80

PBS=リン酸緩衝生理食塩水

【 0 2 2 1 】

【表 1 3】

表12. 異なる濃度にて、異なる緩衝液、賦形剤およびpHにおけるh1A11.1-SL-Avの5°Cでの保存安定性

タンパク質濃度 (mg/ml)	時間	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
---	予備透析	---	---	---	2.71	96.31	0.98	53058
50, 30, 10	T0	---	ace	5	2.89	96.08	1.03	48033
50, 30, 10	T0	---	his	6	2.81	96.23	0.96	46995
50, 30, 10	T0	---	phos	7	2.91	96.09	1.00	52571
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	2.54	96.50	0.96	50185
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	2.37	96.62	1.01	50771
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2.90	96.08	1.01	49170
50	T7d	5	ace	5	2.96	95.99	1.05	49118
30	T7d	5	ace	5	2.74	96.21	1.06	48434
10	T7d	5	ace	5	2.62	96.23	1.15	48915
50	T7d	5	his	6	2.93	95.87	1.20	47967
30	T7d	5	his	6	2.75	96.06	1.19	47182
10	T7d	5	his	6	2.55	96.31	1.13	47395
50	T7d	5	phos	7	3.15	95.64	1.21	53843
30	T7d	5	phos	7	3.10	95.76	1.14	53372
10	T7d	5	phos	7	2.91	95.96	1.13	53269
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.75	96.13	1.12	50236
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.62	96.11	1.27	50026
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	2.56	96.18	1.26	49290
50	T7d	5	his-suc-tw	6	2.84	96.10	1.07	50129
30	T7d	5	his-suc-tw	6	2.58	96.19	1.23	49272
10	T7d	5	his-suc-tw	6	2.64	96.08	1.28	50926
50	T7d	5	PBS	7	3.26	95.59	1.15	49502
30	T7d	5	PBS	7	3.07	95.64	1.29	49724
10	T7d	5	PBS	7	2.83	95.87	1.29	49563
50	T21d	5	ace	5	2.57	95.76	1.67	49722
30	T21d	5	ace	5	2.37	96.03	1.60	48882
10	T21d	5	ace	5	2.22	96.09	1.69	49255
50	T21d	5	his	6	2.63	95.63	1.74	44884
30	T21d	5	his	6	2.42	95.95	1.62	47510
10	T21d	5	his	6	2.19	96.08	1.73	47015
50	T21d	5	phos	7	3.06	94.96	1.98	53449
30	T21d	5	phos	7	2.69	95.46	1.85	52938
10	T21d	5	phos	7	2.35	95.84	1.81	52703
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	2.25	95.76	1.99	50960
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	2.08	95.90	2.02	49042
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	1.97	95.84	2.19	49851
50	T21d	5	his-suc-tw	6	2.24	95.62	2.14	49983
30	T21d	5	his-suc-tw	6	2.09	95.86	2.05	48813
10	T21d	5	his-suc-tw	6	1.97	95.83	2.19	49984
50	T21d	5	PBS	7	2.84	95.07	2.09	50641

タンパク質 濃度 (mg/ml)	時間	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
30	T21d	5	PBS	7	2.27	95.62	2.12	48441
10	T21d	5	PBS	7	1.99	95.94	2.07	48978
50	T10mo	5	his	6	8.05	91.04	0.91	45552
30	T10mo	5	his	6	5.81	93.29	0.90	46607
10	T10mo	5	his	6	3.62	95.46	0.92	46207
50	T10mo	5	his-suc-tw	6	8.08	90.26	1.67	45430
30	T10mo	5	his-suc-tw	6	5.98	92.43	1.58	42967
10	T10mo	5	his-suc-tw	6	3.95	94.25	1.80	42567

【 0 2 2 2 】

【表 1 4】

表13. 異なる濃度にて、異なる緩衝液およびpHにおけるh1A11.1-SL-Avの5°Cでの保存安定性、40°Cでの安定性促進および凍結-融解安定性

タンパク質濃度 (mg/ml)	時間/FT	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
1	T0	---	cit-phos	5	7.07	92.14	0.80	46824
1	T8d	40	cit-phos	5	2.23	96.39	1.38	47090
1	T22d	40	cit-phos	5	7.10	89.62	3.28	47956
1	FT2	---	cit-phos	5	7.91	90.75	1.34	46502
1	FT4	---	cit-phos	5	7.41	92.18	0.41	52181
1	T0	---	cit-phos	6	7.17	92.33	0.50	45809
1	T8d	40	cit-phos	6	2.56	96.03	1.42	46783
1	T22d	40	cit-phos	6	5.79	91.73	2.48	47401
1	FT2	---	cit-phos	6	7.14	91.48	1.38	45256
1	FT4	---	cit-phos	6	7.09	92.56	0.34	45004
1	T0	---	cit-phos	7	6.82	92.67	0.51	47025
1	T8d	40	cit-phos	7	2.52	95.95	1.53	48080
1	T22d	40	cit-phos	7	5.52	91.58	2.90	48706
1	FT2	---	cit-phos	7	7.23	91.52	1.25	46732
1	FT4	---	cit-phos	7	7.15	92.49	0.36	46561
60および118	T0	---	his	6	8.03	91.15	0.82	43528
60	T7d	40	his	6	7.17	91.76	1.07	45333
60	T21d	40	his	6	15.77	82.13	2.10	44729
60	T7d	5	his	6	3.83	95.32	0.86	46774
60	T26d	5	his	6	7.14	92.56	0.30	63982
118	T5mo	5	his	6	12.82	86.65	0.53	55869
60	T5mo	5	his	6	9.46	90.03	0.51	64573
60	FT2	---	his	6	6.71	92.59	0.70	42259
60	FT4	---	his	6	6.33	93.62	0.05	41054

凡例:

FT=凍結融解

FT2=凍結および融解の2サイクル後の分析;-80°Cでの凍結と30°Cの水浴中での融解

FT4=凍結および融解の4サイクル後の分析;-80°Cでの凍結と30°Cの水浴中での融解

cit-phos=10mMクエン酸塩+10mMリン酸塩

his=15mMヒスチジン+0.02%アジ化ナトリウム(微生物の増殖を防止するためのアジド)

【 0 2 2 3 】

【表15】

表14. 異なるpHにおける10mMクエン酸塩+10mMリン酸塩中の1mg/mlのh1A11.1-SL-Av
の示差走査熱量測定データ

pH	開始 (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Tm4 (°C)
5	55	68.2	68.86	75.56	81.18
6	58	69.04	70.47	75.24	82.04
7	59	69.52	70.94	74.44	82.06

【0224】

[実施例8]

抗DLL4 / 抗VEGF DVDについての製剤選択

材料および方法。抗DLL4 / 抗VEGF DVD - Ig h1A11.1-SL-A Vタンパク質の安定性は、表15に列挙された6個の製剤において評価された。全ての製剤は、15mMのヒスチジン緩衝液中で調製された。製剤F1からF4は、50mg/mLのタンパク質濃度で調製された。これらの製剤において、pHは、5.5 - 6.0の範囲であり、ポリソルベート80の濃度は、0 - 0.05 w/v%の範囲であり、ショ糖濃度は、0 - 7.5 w/v%の範囲であり、アルギニン濃度は、0 - 1 w/v%の範囲であった。製剤F4は、いずれもの安定剤を含むことなく、15mMヒスチジン緩衝液 pH 6.0中に調製され、50mg/mL液体製剤安定性評価用の研究対照として機能を果たした。さらに、2つの製剤は、pH 6.0で25mg/mLのタンパク質濃度で調製された（製剤F5およびF6）。ポリソルベート80とショ糖との組成は、これらの2つの製剤においてわずかに異なっていた；ポリソルベート80の濃度は、0.025 w/v% - 0.03 w/v%の範囲であり、ショ糖の濃度は、3.8 w/v% - 4 w/v%の範囲であった。F1からF5の製剤は、初期の調製プロセスからの材料を使用し、一方、F6製剤は、より最適化されたプロセスからの材料を用いて製剤化された。製剤F5およびF6の組成は、非常に類似していたが、安定性の差異が、これらの2つの間に観察された。組成物は、異なるプロセスから調製されたため、これは、観察された安定性の差異の原因となり得る。

20

30

【0225】

【表16】

表15. 製剤組成物の説明

製剤識別子	抗DLL4/抗VEGF DVD濃度(mg/mL)	緩衝液	pH	ポリソルベート80 (Tween 80) (% w/v)	ショ糖 (% w/v)	アルギニン (% w/v)
F1	50	15mM ヒスチジン	6.0	0.05	7.5	0
F2	50	15mM ヒスチジン	5.5	0.05	7.5	0
F3	50	15mM ヒスチジン	6.0	0.05	7.5	1
F4	50	15mM ヒスチジン	6.0	0	0	0
F5	25	15mM ヒスチジン	6.0	0.025	3.8	0
F6	25	15mM ヒスチジン	6.0	0.03	4.0	0

【0226】

上記の製剤において、15mMのヒスチジン緩衝液は、標的とする製剤pHを維持する

50

のに十分な緩衝能を提供するため、選択された。シヨ糖は、凍結 - 融解ストレス（凍結防止剤）および凍結乾燥プロセスによって誘導されるストレス（凍結乾燥防止剤）に対する安定剤として評価された。ポリソルベート 80（界面活性剤）およびアルギニンは、凝集体および粒子形成に対して、製剤を潜在的に安定化させるために添加された。

【 0 2 2 7 】

液体製剤の安定性は、凍結 / 融解中に、 - 80、5、25 および 40 にて、視覚的外観、サイズ排除クロマトグラフィー（SE - HPLC）による凝集体%、陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX - HPLC）による電荷不均一性、還元型 SDS - キャピラリー電気泳動（CE - SDS）による断片化、およびマイクロフローイメージング（MFI）または光遮蔽（HIAC）によるサブ可視粒子を含む広範な分析的アッセイによって評価された。これらの結果を表 16 から 19 に与える。

10

【 0 2 2 8 】

【表 17】

表16. -80°Cでの凍結融解および液体製剤安定性の結果

製剤識別子	時間 (月)	視覚的外観	SE-HPLC による凝集 体%	CEX-HPLC			純度% (還元型C E-SDS)	MFI/HIACによる不可視粒子カウント			ELISAによる結合効力	
				% 酸性 領域	% 主要 ピーク	% 塩基性 領域		≥2µm/mL	≥10µm/mL	≥25µm/mL	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1.0	21.6	61.7	16.7	97.7	3333	5	0	93	113
	3FT	EFVP	1.1	21.5	61.8	16.6	97.7	2388	50	5	NP	NP
	1	EFVP	1.1	21.0	62.1	16.8	97.8	1364	15	5	NP	NP
	3	EFVP	1.1	21.0	62.3	16.6	97.6	714	20	0	NP	NP
F2	0	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.8	97.5	1589	15	0	93	113
	3FT	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.9	97.6	435	5	5	NP	NP
	1	EFVP	1.4	21.0	62.0	17.0	97.8	315	0	0	NP	NP
	3	EFVP	1.5	20.9	61.9	17.2	97.7	699	5	0	NP	NP
F3	0	EFVP	1.1	21.5	61.7	16.7	97.6	784	0	0	93	113
	3FT	EFVP	1.1	21.3	61.8	16.9	97.5	490	10	0	NP	NP
	1	EFVP	1.1	21.0	61.9	17.1	97.9	250	0	0	NP	NP
	3	EFVP	1.2	21.0	61.8	17.2	97.7	1219	35	0	NP	NP
F4	0	EFVP	1.2	21.6	61.8	16.6	97.4	23707	370	5	93	113
	3FT	TMTC	1.5	21.4	61.8	16.8	97.4	105467	5906	30	NP	NP
	1	TMTC	1.2	21.1	62.0	16.9	97.8	42024	1329	60	NP	NP
	3	TMTC	1.5	21.1	61.9	17.0	97.8	40065	3203	62.5	NP	NP
F5	0	EFVP	0.9	21.6	61.6	16.7	97.7	2808	5	5	93	113
	3FT	EFVP	1.2	21.5	61.8	16.8	97.6	1949	0	0	NP	NP
	1	EFVP	1.1	21.0	62.2	16.8	97.8	270	5	0	NP	NP
	3	EFVP	1.1	21.0	62.2	16.8	97.6	759	0	0	NP	NP

F6	0	EFVP	1.0	21.6	56.4	22.0	98.1	426	58	1	109	97
	3FT	EFVP	1.1	21.7	55.9	22.4	98.2	193	24	0	115	100
	1	EFVP	1.0	21.6	55.8	22.7	98.2	50	3	0	NP	NP
	3	EFVP	1.1	22.0	55.9	22.1	98.3	254	31	0	89	96

凡例:EFVP:可視粒子が本質的に存在しない、TMTC:非常に多すぎてカウントできない、NP:行っていない

【表 1 8】

表17. 5°Cでの液体製剤安定性の結果

製剤識別子	時間 (月)	視覚的 外観	SE-HPLC による凝 集体%	CEX-HPLC			純度% (還元型C E-SDS)	MF/HIACによる不可視粒子カウント			ELISAによる結合効力	
				% 酸性 領域	% 主要 ピーク	% 塩基性 領域		≧2µm/mL	≧10µm/mL	≧25µm/mL	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1.0	21.6	61.7	16.7	97.7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	2.0	21.2	62.4	16.3	97.8	1064	0	0	NP	NP
	3	EFVP	3.0	21.6	62.5	15.9	97.6	3452	15	0	NP	NP
F2	0	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.8	97.5	1589	15	0	93	113
	1	EFVP	2.1	20.9	62.3	16.8	97.8	230	5	5	NP	NP
	3	EFVP	3.0	21.1	62.5	16.3	97.8	1454	0	0	NP	NP
F3	0	EFVP	1.1	21.5	61.7	16.7	97.6	784	0	0	93	113
	1	EFVP	2.0	20.8	62.0	17.2	97.8	225	5	0	NP	NP
	3	EFVP	3.2	20.8	61.1	18.1	97.6	1369	5	0	NP	NP
F4	0	EFVP	1.2	21.6	61.8	16.6	97.4	23707	370	5	93	113
	1	EFVP	2.0	21.3	62.3	16.5	97.8	1189	0	0	NP	NP
	3	EFVP	3.3	21.6	62.6	15.8	97.8	6046	145	0	NP	NP
F5	0	EFVP	0.9	21.6	61.6	16.7	97.7	2808	5	5	93	113
	1	EFVP	1.5	21.2	61.9	16.8	97.8	709	10	0	NP	NP
	3	EFVP	2.2	21.4	62.4	16.1	97.6	3203	50	0	NP	NP
F6*	0	EFVP	1.0	21.6	57.0	21.5	98.1	426	58	1	109	97
	1	EFVP	1.1	21.6	55.9	22.5	98.1	2458	164	1	116	99
	3	EFVP	1.2	22.4	55.9	21.7	98.0	34	1	0	101	100

凡例:EFVP:可視粒子が本質的に存在しない、NP:行っていない

【表 19】

表18. 25°Cでの液体製剤安定性の結果

製剤識別子	時間 (月)	視覚的外観	SE-HPLCに よる凝集体%	CEX-HPLC			純度% (還元型C E-SDS)	MF/HIACによる不可視粒子カウント			ELISAによる結合効力	
				% 酸性 領域	% 主要 ピーク	% 塩基性 領域		≥2µm/mL	≥10µm/mL	≥25µm/mL	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1.0	21.6	61.7	16.7	97.7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	4.3	23.5	62.2	14.2	97.4	1559	5	5	NP	NP
	3	EFVP	6.7	29.2	57.0	13.9	96.3	9358	964	150	NP	NP
F2	0	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.8	97.5	1589	15	0	93	113
	1	EFVP	4.4	22.8	61.6	15.6	97.4	1149	5	0	NP	NP
	3	EFVP	7.1	27.2	56.6	16.2	95.4	6170	95	0	NP	NP
F3	0	EFVP	1.1	21.5	61.7	16.7	97.6	784	0	0	93	113
	1	EFVP	4.9	21.5	58.3	20.2	97.3	834	10	0	NP	NP
	3	EFVP	9.3	24.7	52.2	23.0	96.4	3677	150	10	NP	NP
F4	0	EFVP	1.2	21.6	61.8	16.6	97.4	23707	370	5	93	113
	1	EFVP	4.5	23.5	61.8	14.7	97.2	89299	3053	165	NP	NP
	3	EFVP	7.5	28.6	57.4	14.1	96.6	10527	1279	275	NP	NP
F5	0	EFVP	0.9	21.6	61.6	16.7	97.7	2808	5	5	93	113
	1	EFVP	2.6	23.5	62.0	14.6	97.2	944	15	0	NP	NP
	3	EFVP	3.9	29.4	57.7	12.9	96.2	13575	1259	225	NP	NP
F6	0	EFVP	1.0	21.6	57.0	21.5	98.1	426	58	1	109	97
	1	EFVP	1.2	23.5	54.8	21.7	97.7	386	50	0	100	96
	3	EFVP	1.6	28.8	52.5	18.7	96.2	40	1	0	94	100

凡例:EFVP:可視粒子が本質的に存在しない、NP:行っていない

【表 2 0】

表19. 40°Cでの液体製剤安定性の結果

製剤識別子	時間 (月)	視覚的外観	SE-HPLCによる凝集体 %	CEX-HPLC			純度% (還元型CE -SDS)	MF/HIACによる不可視粒子カウント			ELISAによる結合効力	
				% 酸性 領域	% 主要 ピーク	% 塩基性 領域		≥2µm/mL	≥10µm/mL	≥25µm/mL	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1.0	21.6	61.7	16.7	97.7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	7.2	35.8	43.0	21.2	95.0	1219	15	0	94	104
	3	EFVP	12.8	57.0	23.0	20.0	85.9	21464	635	30	73	72
F2	0	EFVP	1.3	21.4	61.8	16.8	97.5	1589	15	0	93	113
	1	EFVP	7.9	33.8	40.9	25.3	95.1	655	5	0	95	97
	3	EFVP	13.3	52.8	22.7	24.5	86.7	6041	90	0	68	73
F3	0	EFVP	1.1	21.5	61.7	16.7	97.6	784	0	0	93	113
	1	EFVP	11.3	32.1	42.3	25.6	95.0	1464	5	0	97	101
	3	EFVP	18.1	48.6	25.2	26.2	86.3	9103	165	15	81	72
F4	0	EFVP	1.2	21.6	61.8	16.6	97.4	23707	370	5	93	113
	1	EFVP	7.7	34.9	44.2	20.9	94.8	61754	5051	670	101	97
	3	EFVP	13.5	52.8	25.9	21.4	86.3	14000	1729	480	73	76
F5	0	EFVP	0.9	21.6	61.6	16.7	97.7	2808	5	5	93	113
	1	EFVP	3.9	37.0	44.4	18.6	95.0	974	20	0	92	95
	3	EFVP	7.4	59.6	24.5	15.9	87.0	11836	610	55	68	69
F6	0	EFVP	1.0	21.6	56.4	22.0	98.1	426	58	1	109	97
	1	EFVP	1.9	35.0	42.8	22.2	94.5	60	0	0	96	95

凡例:EFVP:可視粒子が本質的に存在しない

凍結乾燥された製剤の安定性試験。製剤を凍結乾燥した後、結合タンパク質 h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v を含有する選択製剤の安定性もまた評価された。凍結乾燥された薬品の安定性は、ショ糖を含有する全ての製剤 (F 1 、 F 2 、 F 3 、 F 5 および F 6) について評価された。安定性は、55 で 2 週間保存した後に評価された。安定性は、視覚的外観 (再構成の前後) 、再構成時間、サイズ排除クロマトグラフィー (S E - H P L C) による凝集体 % 、陽イオン交換クロマトグラフィー (C E X - H P L C) による電荷不均一性、還元型 S D S - キャピラリー電気泳動 (C E - S D S) による断片化、マイクロフローイメージング (M F I) または光遮蔽 (H I A C) によるサブ可視粒子、およびカールフィッシャー滴定による水分量などを含む広範な分析的アッセイによって試験された。

【 0 2 3 3 】

凍結乾燥された製剤の安定性試験結果を表 2 0 に与える。評価された全ての製剤について、再構成時間は約 1 から 2 分であった。S E C による凝集体の僅かな増加と C E X による塩基性領域 % は、55 のストレスが与えられた保存状態で全ての製剤について観察された。最小限の変更は、他の全ての測定された生成物の安定特性において観察された。

【 0 2 3 4 】

【表 2 1】

表20.55°Cでの凍結乾燥された製剤の安定性結果

製剤識別子	時間 (月)	視覚的外観		SE-HPLCによる凝集体%	CEX-HPLC			純度% (還元型C E-SDS)	MF/HIACによる不可視粒子カウント		
		再構成前	再構成後		% 酸性 領域	% 主要 ピーク	% 塩基性 領域		≥2µm/mL	≥10µm/mL	≥25µm/mL
F1	0	WTOWC	EFVP	1.1	21.3	61.9	16.8	97.6	749	20	10
	55°Cで2週間	WTOWC	EFVP	1.6	20.6	58.1	21.3	97.5	1639	15	0
F2	0	WTOWC	EFVP	1.3	21.2	61.8	17.0	97.6	1254	15	0
	55°Cで2週間	WTOWC	EFVP	2.0	20.4	57.8	21.8	97.6	1609	10	0
F3	0	WTOWC	EFVP	1.1	21.2	61.9	16.9	97.6	719	5	0
	55°Cで2週間	WTOWC	EFVP	1.4	20.8	59.5	19.8	97.5	475	10	5
F5	0	WTOWC	EFVP	1.0	21.3	61.8	16.9	97.5	844	35	5
	55°Cで2週間	WTOWC	EFVP	1.5	20.5	58.0	21.5	97.7	270	5	0
F6	0	WTOWC	EFVP	1.0	21.5	56.5	22.0	98.2	205	7	0
	55°Cで2週間	WTOWC	EFVP	1.5	21.1	53.4	25.5	98.2	126	5	1

凡例:WTOWC:白色からオフホワイト色のケーキ、EFVP:可視粒子が本質的に存在しない

【0 2 3 5】

製剤 F 6 の安定性 (凍結乾燥されている、1 バイアルあたり 2 0 0 個の結合タンパク質

h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v) もまた、12カ月の期間にわたって評価された。製剤は、試験期間にわたって安定していた。

【0236】

投薬溶液の安定性試験。抗DLL4 / 抗VEGF結合タンパク質は、静脈内投与 (IV) について試験される。投与前に、凍結乾燥された薬品は、注射用滅菌水 (SWFI) で再構成される。その後、再構成された生成物は、IV注入に適している溶液中に希釈される。投薬溶液が希釈される最終濃度は、投与される臨床投薬量に基づいて決定される。

【0237】

研究は、2つの通常使用されるIV希釈剤である0.9%の生理食塩水と5%のデキストロース (D5W) のうちの1つを含有する投薬溶液における場合、希釈された抗DLL4 / 抗VEGF結合タンパク質 h 1 A 1 1 . 1 - S L - A v の安定性を評価するために行われた。評価されたタンパク質濃度は、0.5および1 mg / mLであった。投薬溶液の安定性および注入成分との適合性を評価するために、試験条件あたり投薬溶液が調製され、IVバッグ (n = 2) に6時間、RT / RLで保存され、その後、模擬注入試験は、インラインフィルターを含む、通常使用される注入投与成分を用いて行われた。試験試料は、IVバッグ (T0) において投薬溶液を調製した後、バッグから直接引き出された。さらに、30分間の注入プロセスの終了時に回収された試料が試験された。試料は、視覚的外観、サイズ排除クロマトグラフィー (SE-HPLC) による凝集体%および光遮蔽 (HIAC) による不可視粒子を含む一団の分析的アッセイによって試験された。

10

【0238】

投薬溶液の安定性研究は、表21に与えられる。出発物質中の凝集体レベルは0.7%であった。投薬溶液が生理食塩水中に調製された後、生理食塩水中での希釈時 (T0) および注入の終了時には凝集体レベルの増加を示す明確な傾向が観察された。さらに、これらの試料における不可視粒子カウントは高かった。比較では、5%のデキストロース (D5W) 中に調製された投薬溶液は、微粒子に対する許容可能な安定性傾向とともに、一貫して低い凝集体%レベルを示した。

20

【0239】

【表 2 2】

表21. 臨床的に使用中の安定性結果

希釈剤	投薬溶液濃度 (mg/mL)	アッセイ口	視覚的外観	SE-HPLC による凝集 体%	HIACによる不可視粒子カウ ント		
		時点口			≥2µm/ mL	≥10µm /mL	≥25µm /mL
0.9% 生 理食塩 水	0.5 mg/mL (バッグ#1)	T0	EFVP	2.7	2139	86	8
		ポンプ注入後	EFVP	4.7	4398	63	1
	0.5 mg/mL (バッグ#2)	T0	EFVP	2.7	2729	189	12
		ポンプ注入後	EFVP	3.5	1879	31	2
	1.0 mg/mL (バッグ#1)	T0	EFVP	2.4	1774	85	3
		ポンプ注入後	EFVP	3.0	2300	24	0
1.0 mg/mL (バッグ#2)	T0	EFVP	1.8	914	23	0	
	ポンプ注入後	EFVP	2.5	3056	42	2	
5% デキ ストロ ース	0.5 mg/mL (バッグ#1)	T0	EFVP	0.6	1679	31	0
		ポンプ注入後	EFVP	0.6	7	0	0
	0.5 mg/mL (バッグ#2)	T0	EFVP	0.6	2944	135	0
		ポンプ注入後	EFVP	0.6	3	0	0
	1 mg/mL (バッグ#1)	T0	EFVP	0.6	1652	23	0
		ポンプ注入後	EFVP	0.6	2	0	0
1 mg/mL (バッグ#2)	T0	EFVP	0.6	2105	38	0	
	ポンプ注入後	EFVP	0.6	6	0	0	

EFVP:可視粒子が本質的に存在しない

【 0 2 4 0 】

[実施例 9]

拡張された予備製剤化の特徴付け

抗 D L L 4 / 抗 V E G F D V D における拡張された予備製剤化の特性付けは、異なる製剤化条件が D V D の安定性にどのように影響を与えるのかを調査するために行われた。h 1 A 1 1 . 1 - L S - A v のデータは表 2 2 と 2 3 に提供される。D V D の保存安定性 (5) および安定性の促進 (4 0) は、以下に列挙された製剤とタンパク質濃度において評価された。安定性は、サイズ排除クロマトグラフィー (S E - H P L C) および凝集体 %、モノマー %、断片 % によって評価され、回収された種全体が定量された。全体的に、製剤は、5 - 7 の pH 範囲および 1 0 - 5 0 m g / m l のタンパク質濃度範囲をカバーする。

40

【 0 2 4 1 】

5 と 4 0 の温度で、5 0、3 0 および 1 0 m g / m l の濃度で、以下の製剤が評価された：1 5 m M 酢酸塩 pH 5、1 5 m M ヒスチジン pH 6、1 5 m M リン酸塩 pH 7、3 0 m M 酢酸塩、8 0 m g / m l ショ糖、0 . 0 2 % の T w e e n 8 0 pH 5、3 0 m M ヒスチジン、8 0 m g / m l ショ糖、0 . 0 2 % の T w e e n 8 0 pH 6 および P B S (リン酸緩衝生理食塩水)。全ての製剤は、保存中の微生物の増殖を防止するために 0 . 0 2 % のアジ化ナトリウムを含有した。

【 0 2 4 2 】

50

表22と23におけるデータに基づいて、h1A11.1-LS-Avは、DVD-Ig安定性についての予備製剤化基準を満たした。

【0243】

【表23】

表22. h1A11.1-LS-Avの40°Cでの安定性促進

タンパク質 濃度 (mg/ml)	時間	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
---	予備 透析	---	---	---	0.21	98.42	1.36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0.28	98.41	1.31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0.46	98.23	1.31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0.74	97.86	1.40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0.24	98.16	1.60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0.30	98.11	1.59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0.52	98.05	1.43	50085
50	T7d	40	ace	5	1.63	96.74	1.63	55563
30	T7d	40	ace	5	1.13	97.24	1.62	55194
10	T7d	40	ace	5	0.84	97.49	1.67	55029
50	T7d	40	his	6	2.00	96.62	1.38	53566
30	T7d	40	his	6	1.17	97.46	1.38	52443
10	T7d	40	his	6	0.60	98.00	1.40	53812
50	T7d	40	phos	7	4.31	94.02	1.67	52934
30	T7d	40	phos	7	2.85	95.46	1.69	52663
10	T7d	40	phos	7	1.20	97.11	1.69	52411
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	1.10	96.23	2.66	54837
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	0.77	96.40	2.83	52474
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	0.43	96.39	3.17	50855
50	T7d	40	his-suc-tw	6	1.69	96.27	2.05	53017
30	T7d	40	his-suc-tw	6	1.14	96.84	2.02	52153
10	T7d	40	his-suc-tw	6	0.59	97.30	2.11	52208
50	T7d	40	PBS	7	2.77	95.30	1.93	51623
30	T7d	40	PBS	7	1.73	96.28	1.99	49973
10	T7d	40	PBS	7	0.78	97.25	1.97	50851
50	T21d	40	ace	5	3.66	94.30	2.04	55920
30	T21d	40	ace	5	2.56	95.33	2.10	54188
10	T21d	40	ace	5	1.85	96.00	2.15	55213
50	T21d	40	his	6	4.14	94.28	1.58	54807
30	T21d	40	his	6	2.67	95.79	1.54	53071
10	T21d	40	his	6	1.59	96.82	1.58	54053
50	T21d	40	phos	7	8.52	89.32	2.16	53273
30	T21d	40	phos	7	5.58	92.54	1.89	53162
10	T21d	40	phos	7	3.01	94.89	2.10	52747
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	4.12	93.78	2.10	56278
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	2.93	94.94	2.13	55481
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	1.99	95.75	2.26	54696
50	T21d	40	his-suc-tw	6	4.94	93.21	1.85	54034
30	T21d	40	his-suc-tw	6	n/a	n/a	n/a	n/a
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2.00	96.30	1.70	52686
50	T21d	40	PBS	7	8.44	89.65	1.90	51697
30	T21d	40	PBS	7	5.54	92.43	2.03	50282

10	T21d	40	PBS	7	2.89	95.05	2.06	51580
----	------	----	-----	---	------	-------	------	-------

緩衝液凡例(全ての緩衝液は、微生物の増殖を防止するために0.02%アジ化ナトリウムを含有する。);ace=15mM酢酸塩 pH5;his=15mMヒスチジン pH6;phos=15mMリン酸塩 pH7;ace-suc-tw=30mM酢酸塩、80mg/mlシヨ糖、0.02%Tween 80;his-suc-tw=30mMヒスチジン、80mg/mlシヨ糖、0.02%Tween 80;PBS=リン酸緩衝生理食塩水。

【 0 2 4 4 】

【表 2 4】

表23. h1A11.1-LS-Avの5°Cでの保存安定性

タンパク質濃度 (mg/ml)	時間	温度 (°C)	緩衝液	pH	凝集体%	モノマー%	断片%	全領域
---	予備透析	---	---	---	0.21	98.42	1.36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0.28	98.41	1.31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0.46	98.23	1.31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0.74	97.86	1.40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0.24	98.16	1.60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0.30	98.11	1.59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0.52	98.05	1.43	50085
50	T7d	5	ace	5	0.18	98.17	1.64	57599
30	T7d	5	ace	5	0.16	98.21	1.64	55889
10	T7d	5	ace	5	0.13	98.17	1.70	53289
50	T7d	5	his	6	0.18	98.14	1.68	55742
30	T7d	5	his	6	0.12	98.06	1.82	53603
10	T7d	5	his	6	0.13	98.07	1.80	53505
50	T7d	5	phos	7	0.23	97.72	2.05	54355
30	T7d	5	phos	7	0.18	97.77	2.04	53561
10	T7d	5	phos	7	0.13	97.72	2.15	53151
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.09	97.40	2.51	57158
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.08	97.43	2.49	55025
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	0.08	97.34	2.58	53882
50	T7d	5	his-suc-tw	6	0.10	97.48	2.43	55272
30	T7d	5	his-suc-tw	6	0.08	97.63	2.29	52763
10	T7d	5	his-suc-tw	6	0.05	97.41	2.53	52903
50	T7d	5	PBS	7	0.12	97.31	2.58	51698
30	T7d	5	PBS	7	0.09	97.24	2.67	50144
10	T7d	5	PBS	7	0.08	97.28	2.64	50428
50	T21d	5	ace	5	0.87	98.45	0.68	57706
30	T21d	5	ace	5	0.80	98.55	0.65	56566
10	T21d	5	ace	5	0.83	98.47	0.70	54226
50	T21d	5	his	6	1.05	98.29	0.66	55911
30	T21d	5	his	6	0.92	98.40	0.68	54225
10	T21d	5	his	6	0.90	98.41	0.70	54128
50	T21d	5	phos	7	1.25	98.09	0.66	54980
30	T21d	5	phos	7	1.20	98.11	0.69	53903
10	T21d	5	phos	7	1.01	98.29	0.69	53271
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.92	98.36	0.72	61574
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.89	98.39	0.72	55532
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	0.83	98.46	0.71	55841
50	T21d	5	his-suc-tw	6	1.00	98.27	0.73	55484
30	T21d	5	his-suc-tw	6	0.92	98.37	0.70	53335
10	T21d	5	his-suc-tw	6	0.82	98.49	0.69	53736
50	T21d	5	PBS	7	1.49	97.79	0.71	52405
30	T21d	5	PBS	7	1.29	98.02	0.70	51284
10	T21d	5	PBS	7	1.12	98.18	0.70	51377

表23についての緩衝液凡例は、表22と同じである。

【 0 2 4 5】

[実施例 1 0]

D L L 4 細胞アッセイにおける抗 D L L 4 / 抗 V E G F D V D の中和活性における V E G F の効果

V E G F 結合が抗 D L L 4 / 抗 V E G F D V D の D L L 4 中和効力に影響を及ぼすか

どうかを評価するために、VEGFが、実施例3.3に記載されるDLL4-Notchレポーターアッセイに含まれた。簡単には、ヒトDLL4を発現するHEK293G細胞は、300nMから連続希釈されたh1A11.1-SL-Av DVDまたは抗DLL4 mAb (h1A11.1)と抗VEGF mAb (Av)の混合物の存在下で24時間、EA.hy926 Notchレポーター細胞と共培養された。組換えヒトVEGF₁₆₅ (VEGFの生理学的に関連するヒトスプライスアイソフォーム)または陰性対照タンパク質 (BSG2)もまた含まれた。DLL4中和効力は、IC₅₀値、DLL4誘導性のNotch活性化の50%減少を達成するのに必要とされる抗体の濃度を評価することによって決定された。表24に示されるように、6または150nM VEGFの存在が、h1A11.1-SL-Av DVDのDLL4中和効力を大いに増加させた。この増加した効力は、親mAb混合物が、含まれたVEGFの有無に関わらずに同様の効力を示したため、抗DLL4/抗VEGF DVDに固有である。

10

【0246】

【表25】

表24. VEGFは抗DLL4/抗VEGF DVDのDLL4効力を増大するが、抗DLL4/抗VEGF混合物は増大しない

	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	6nM VEGF	6nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	12.50	0.61	16.76
h1A11.1 + Av混合物	8.64	9.97	9.55
	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	150nM VEGF	150nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	12.69	0.40	14.11
h1A11.1 + Av混合物	9.17	10.32	10.93

【0247】

別の実験において、h1A11.1-SL-Av DVDの一価Fab断片はまた、DLL4中和細胞アッセイにおいて評価された。DVD Igとは対照的に、一価DVD Fabは弱いDLL4中和効力を有する。VEGFの存在は、DVD-Fabの効力を改善したが、DVD-Igを用いて観察された程度ではなかった(表25)。

30

【0248】

【表26】

表25. 抗DLL4/抗VEGF DVD IgとDVD FabのDLL4中和効力におけるVEGFの効果

	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	150nM VEGF	150nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	13.46	0.41	16.55
h1A11.1-SL-Av Fab	> 40*	4.56	> 40*

*正確なIC₅₀は、DLL4を完全に中和することができないことに起因して決定することができなかった

【0249】

別の実験において、VEGF濃度は、連続して徐々に減少され、上述のDLL4-Notchレポーターアッセイに適用された。表26に示されるように、VEGFは、1.2nM程度に低い濃度で、h1A11.1-SL-Av DVDのDLL4の中和活性を増大させることができる。

【0250】

【表 2 7】

表26. VEGFは抗DLL4/抗VEGF DVDのDLL4中和効力を増大する

		h1A11.1-SL-Av
	nM	IC ₅₀ (nM)
BSG2	150	11.0
VEGF	150	0.6
	30	0.7
	6	0.6
	1.2	1.1
	0.24	12.7
	0.048	12.3
	0.0096	11.5
	0	11.8

【 0 2 5 1】

[実施例 1 1]

D L L 4 - V E G F D V D - I g のインピボでの組み合わせ有効性

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗 D L L 4 - V E G F D V D - I g の効果は、雌性 S C I D マウスにおける S W - 4 8 ヒト結腸異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 5×10^6 個の細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は 1 3 日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群（群あたり $n = 10$ ）に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に 211 mm^3 の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表 2 7 における投薬量とスケジュールで、イリノテカン、抗 V E G F m A b および / または抗 D L L 4 - V E G F D V D - I g で投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週 2 回測定された。結果を表 2 7 に示す。

20

【 0 2 5 2】

【表 2 8】

表27. SW-48結腸異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igおよびイリノテカンの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
イリノテカン	60 mg/kg IP, q3dX4	77***	106***
抗 VEGF mAb	10 mg/kg IP, q7dX4	39*	50*
h1A11.1-SL-Av	13.3 mg/kg IP, q7dX4	72***	150***
抗 VEGF mAb + イリノテカン	10 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	78***	150***
h1A11.1-SL-Av + イリノテカン	13.3 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	90***	228***

表27 凡例:a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処理群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後18日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の時点までの時間の中央値およびC=処置対照群の時点までの時間の中央値である。1000mm³の時点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される。*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001。「q3dX4」は、4サイクル中に3日ごとの投与(すなわち、4回投薬)を示し、一方、「q7dX4」は、4サイクル中に7日ごとの投与を示す。

【0253】

また、腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるHCT-116ヒト結腸異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 5×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は14日間定着され、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=9)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に192mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表28における投薬量とスケジュールで、5-FU、ロイコボリン、イリノテカン、抗VEGF mAbおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表28に示す。

【0254】

【表 2 9】

表28. HCT-116結腸異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-IgとFOLFIRIの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a
5-FU ロイコボリン イリノテカン (FOLFIRI)	50 mg/kg IV, q7dX3 25 mg/kg PO, q7dX3 30 mg/kg IV, q7dX3	63***
抗 VEGF mAb	5 mg/kg IP, q7dX4	49***
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	67***
抗 VEGF mAb + FOLFIRI	5 mg/kg IP, q7dX4 + (上 記) q7dX3	81***
h1A11.1-SL-Av + FOLFIRI	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + (上 記) q7dX3	90***

表28 凡例:a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後26日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のシュューデントT検定比較から誘導される:*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001。「q7dX3」は、3サイクル中に7日ごとの投与(すなわち、3回投薬)を示し、一方、「q7dX4」は、4サイクル中に7日ごとの投与を示す。

【 0 2 5 5】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるHT-29ヒト結腸異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 5×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は25日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=10)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に 209 mm^3 の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表29における投薬量とスケジュールで、イリノテカンおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表29に示す。

【 0 2 5 6】

【表 3 0】

表29. HT-29結腸異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igおよびイリノテカンの
組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
イリノテカン	60 mg/kg IP, q3dX4	47*	60*
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	42*	45*
h1A11.1-SL-Av + イリノテカン	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	74**	76*

表29 凡例:a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後20日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の終点までの時間の中央値およびC=処置対照群の終点までの時間の中央値である。1000mm³の終点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される。*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001。「q3dX4」は、4サイクル中に3日ごとの投与(すなわち、4回投薬)を示し、一方、「q7dX4」は、4サイクル中に7日ごとの投与を示す。

【 0 2 5 7】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるU87-MGヒト膠芽細胞腫異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 3×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は13日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=10)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に207mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表30における投薬量とスケジュールで、テモゾロミド、抗VEGF mAbおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表30に示す。

【 0 2 5 8】

【表 3 1】

表30. U87-MG膠芽細胞腫異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igとテモゾロミドの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
テモゾロミド	5 mg/kg IP, qdX1	65***	45***
抗 VEGF mAb	5 mg/kg IP, q7dX4	47**	45**
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	69***	100***
抗 VEGF mAb + テモゾロミド	5 mg/kg IP, q7dX4 + 5 mg/kg IP, qdX1	68***	89***
h1A11.1-SL-Av + テモゾロミド	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + 5 mg/kg IP, qdX1	78***	155***

表30 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置瘍群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後19日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の終点までの時間の中央値およびC=処置対照群の終点までの時間の中央値である。1000mm³の終点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される:*p<0.05;**p<0.001;***p<0.0001。

【 0 2 5 9 】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性NSGマウスにおけるPA0123患者由来のヒト膵臓異種移植腫瘍において評価された。簡単には、凍結された腫瘍断片は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は28日間定着され、その時点で、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリア測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=7)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に193mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表31における投薬量とスケジュールで、ゲムシタピンおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表31に示す。

【 0 2 6 0 】

【表 3 2】

表31. PA0123患者由来の膵臓異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igおよびゲムシタビンの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
ゲムシタビン	100 mg/kg IP, [q3dX4]X2	48**	43**
h1A11.1-SL-Av	13.3 mg/kg IP, q7dX5	54**	75**
h1A11.1-SL-Av + ゲムシタビン	13.3 mg/kg IP, q7dX5 + 100 mg/kg IP, [q3dX4]X2	75***	114***

表31 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後38日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の時点までの時間の中央値およびC=処置対照群の時点までの時間の中央値である。1000mm³の時点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される:*p<0.05;**p<0.001;***p<0.0001。

【0261】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるMDA-MB-231-lucヒト乳房異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 2×10^6 細胞は、乳腺脂肪体に移植された。腫瘍は13日間定着され、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=10)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に150mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表32における投薬量とスケジュールで、パクリタキセルおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。さらに、生物発光画像は、肺および/またはリンパ節への癌細胞の自然転移を監視および追跡するために取得された。結果を表32に示す。

【0262】

【表 3 3】

表32. MDA-MB-231-luc乳房異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igとパクリタキセルの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b	転移率% ^c
パクリタキセル	25 mg/kg IP, q4dX3	78***	106***	40*
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	56***	85***	50*
h1A11.1-SL-Av + パクリタキセル	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + 25 mg/kg IP, q4dX3	92***	179***	0***

表32 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=腫瘍対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後15日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の時点までの時間の中央値およびC=処置対照群の時点までの時間の中央値である。1000mm³の時点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される。c.転移率%=生物発光画像に基づいて、肺およびまたはリンパ節において検出可能なシグナルを有する動物の割合。処置対照群は100%であった。サイズ適合測定後22日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001。

【0263】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるSUM149PTヒト乳房異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 1×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は28日間定着され、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=9)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に183mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表33における投薬量とスケジュールで、パクリタキセルおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表33に示す。

【0264】

【表 3 4】

表33. SUM149PT乳房異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igおよびパクリタキセルの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a	%TGD ^b
パクリタキセル	25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	60***	173***
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX8	88***	282***
h1A11.1-SL-Av + パクリタキセル	6.7 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	93***	459***

表33 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後22日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。b.%TGD=腫瘍増殖遅延率=(T-C)/C×100、ここで、T=処置群の時点までの時間の中央値およびC=処置対照群の時点までの時間の中央値である。1000mm³の時点に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群のカプラン・マイヤーのログランク比較から誘導される。*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001。

【 0 2 6 5】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるSUM149PTヒト乳房異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 1×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は25日間定着され、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=10)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に228mm³の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表34における投薬量とスケジュールで、パクリタキセル、抗VEGF mAbおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表34に示す。

【 0 2 6 6】

【表 3 5】

表34. SUM149PT乳房異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igおよびパクリタキセルの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a
パクリタキセル	25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	50*
抗 VEGF mAb	5 mg/kg IP, q7dX8	54*
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX8	78**
抗 VEGF mAb + パクリタキセル	5 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	81**
h1A11.1-SL-Av + パクリタキセル	6.7 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	87**

表34 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後18日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される(*p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001)。

【 0 2 6 7 】

腫瘍増殖における化学療法剤と組み合わせた抗DLL4-VEGF DVD-Igの効果は、雌性SCIDマウスにおけるHCT-116ヒト結腸異種移植腫瘍において評価された。簡単には、 5×10^6 細胞は、右の後ろ脇腹に皮下接種された。腫瘍は25日間定着され、式： $L \times W^2 / 2$ を用いて、点腫瘍体積は、電子キャリパー測定により決定された。マウスは、処置群(群あたりn=9)に配分され、そのため、それぞれのコホートは、処置開始前に 198 mm^3 の同等の平均腫瘍体積を有した。動物は、表35における投薬量とスケジュールで、5-FU、カペシタピンおよび/または抗DLL4-VEGF DVD-Igで投薬された。腫瘍体積は、実験期間中、週2回測定された。結果を表35に示す。

【 0 2 6 8 】

【表 3 6】

表35. HCT-116結腸異種移植モデルにおける抗DLL4-VEGF DVD-Igと5-FU、又は抗DLL4-VEGF DVD-Igとカペシタビンの組み合わせ有効性

処置	投薬経路、レジメン	%TGI ^a
5-FU	75 mg/kg IV, q7dX4	50**
カペシタビン	350 mg/kg PO, qdX14	69***
h1A11.1-SL-Av	6.7 mg/kg IP, q7dX4	66***
h1A11.1-SL-Av + 5-FU	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + 75 mg/kg IV, q7dX4	84***
h1A11.1-SL-Av + カペシタビン	6.7 mg/kg IP, q7dX4 + 350 mg/kg PO, qdX14	92***

表35 凡例。a.%TGI=腫瘍増殖阻害率=100-(T/C×100)、ここで、T=処置群の平均腫瘍体積およびC=処置対照群の平均腫瘍体積である。サイズ適合測定後21日目に基づく。P値(アスタリスクによって示される。)は、処置群対処置対照群の学生T検定比較から誘導される。* p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.0001)。

【 0 2 6 9 】

[実施例 1 2]

h1A11.1-SL-Av DVDの異種間の細胞効力

DLL4に対するh1A11.1-SL-Av DVDの異種間の中和効力は、種を超えて、固定された組換えDLL4細胞外ドメイン(ECD)を用いて細胞ベースアッセイにおいて比較された。このアッセイは、ヒト、ラット、マウスおよびカニクイザルの種に由来するDLL4の同濃度に対して、h1A11.1-SL-Av DVDの活性を比較するために利用された。

【 0 2 7 0 】

透明底ウェルを有する黒色96ウェル組織培養プレート(Costar、#3904)は、PBS中に希釈された100μL/ウェルのDLL4-ECD(11nM)(Invitrogen、#14190)または対照としての100μL/ウェルの11nM BSA(Sigma、#A9576)のいずれかで予め被覆された。アッセイプレートは密封され、4℃にて18時間インキュベートされた。翌日、h1A11.1-SL-Av DVDは、10%のFBSを含有するアッセイ培地DMEM(Invitrogen、#11995)中に連続希釈された。予め被覆されたアッセイプレートは、50μL/ウェルの連続希釈されたh1A11.1-SL-Av DVD溶液を添加する前に、アッセイ培地で1回濯がれた。次に、アッセイプレートは、25℃にて30分間インキュベートされた。インキュベーション中に、対照ウミシタケルシフェラーゼおよびNotch応答性プロモーターによって駆動されるホタルルシフェラーゼを発現するEA.hy926細胞は、0.25%のトリプシン-EDTA(Invitrogen、#25200)を用いて培養フラスコから脱着され、アッセイ培地中に3×10⁵細胞/mLに再懸濁され、その後、25μL細胞/ウェルでアッセイプレートに直接添加された。次に、アッセイプレートは、37℃、5%のCO₂にて24時間インキュベートされた。ホタルルシフェラーゼアッセイおよびウミシタケルシフェラーゼアッセイは、販売業者のプロトコール(Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega、#E2940)に従って行われた。発光は、プレートリーダー(Victor, Perkin Elmer、#1420-051)で読み取り、生じたデータはウミシタケルシフェラーゼの発光シグナルに対して標準化された。

30

40

50

【0271】

表36に示されるように、h1A11.1-SL-Av DVDは、同等な効力を有するヒトおよびカニクイザルのDLL4活性を阻害する。h1A11.1-SL-Av DVDはまた、マウスDLL4を阻害し、ヒトDLL4と比較して約3倍低い活性を有する。h1A11.1-SL-Av DVDは、細胞アッセイにおいて、ラットDLL4活性を阻害しない。

【0272】

VEGFに対するh1A11.1-SL-Av DVDの異種間の中和効力は、VEGFで刺激されたNIH3T3/VEGFR-2細胞増殖および生存率アッセイにおいて評価された。

【0273】

全長ヒトVEGFR-2のcDNAで安定にトランスフェクトされたNIH3T3細胞は、VEGFで刺激された増殖および生存アッセイに使用された。NIH3T3/VEGFR-2の安定な細胞株のコンフルエント培養物は、0.25%のトリプシン-EDTA (Invitrogen、#25200)を用いて培養フラスコから脱着され、アッセイ培地：0.1%のBSA (Sigma、#A9576)を含有するDMEM (Invitrogen、#11995)を用いて 1.33×10^5 細胞/mLに再懸濁された。細胞は、透明底を有する黒色96ウェル組織培養アッセイプレート (Costar、#3904)中に75 μ Lの全体積において10,000細胞/ウェルにて播種され、24時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にてインキュベートされた。翌日、組換えVEGFタンパク質およびh1A11.1-SL-Av DVDは、アッセイ培地で希釈され、96ウェルのポリプロピレン製プレート中で混合され、25 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートされた。次に、VEGFおよびh1A11.1-SL-Av DVDカクテル(4 \times)は、25 μ L/ウェルにてアッセイプレート上の細胞に添加された。その後、処理された細胞を含有するアッセイプレートは、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にてインキュベートされた。72時間後、生存率アッセイは、販売業者のプロトコール(ATPlite 1STEP、Perkin Elmer、#6016739)に従って行われた。発光は、プレートリーダー (Victor、Perkin Elmer、#1420-051)で読み取られた。

【0274】

表36に示されるように、h1A11.1-SL-Av DVDは、カニクイザルVEGF活性を中和し、ヒトVEGFと比較して同様の効力であった。h1A11.1-SL-Av DVDは、細胞アッセイにおいてマウスおよびラットVEGFを阻害しない。

【0275】

【表37】

表36: h1A11.1-SL-Av DVDの異種間の細胞効力

	効力アッセイ, IC ₅₀ (nM) ^a
ヒトDLL4	0.22 \pm 0.14
カニクイザルDLL4	0.12 \pm 0.08
マウスDLL4	0.65 \pm 0.23
ラットDLL4	検出不可
ヒトVEGF	0.9 \pm 0.1
カニクイザルVEGF	1.1 \pm 0.3
マウスVEGF	検出不可
ラットVEGF	検出不可

表36 凡例:a.DLL4細胞アッセイからの値は、4つの独立した実験からの平均 \pm 標準偏差である。VEGF細胞アッセイからの値は、3つの独立した実験からの平均 \pm 標準偏差である。

【0276】

10

20

30

50

[実施例 13]

スクリーニングファンネル (funnel) およびリード候補物の選択

リードDVD-Ig候補物の選択は、複数回サイクルの分子工学、数百の潜在的な候補分子の作製、続く、治療剤に必要とされる特性を有するDVD-Ig分子を同定するための一連のアッセイを含むことができるスクリーニングファンネルにおける試験を必要とし得て、これらの全ては、最適な機能特性を提供する可変ドメイン配列または他の構造に関するガイダンスがない。典型的には、これらの特性は、限定されないが、以下の評価を含む：(a) 内部と外部の抗原結合ドメインの両方についての結合動態（結合速度、解離速度および親和性）、(b) 種々の生化学的アッセイおよび細胞バイオアッセイにおける効力、(c) 関連する腫瘍モデルにおけるインビボでの有効性、(d) 薬物動態学的および薬力学的特性、(e) 選択された細胞株におけるタンパク質発現レベル、拡張性、翻訳後修飾、物理化学的特性、例えば、モノマーの割合、溶解性および安定性（固有の安定性、凍結/解凍安定性、保存安定性など）を含む製造安定性、(f) 製剤特性、(g) 潜在的な免疫原性リスク、および(h) 分子の毒性が挙げられる。また、結合様式および結合価は評価され得て、それは、これらが分子の結合特性および細胞効力に影響を及ぼし得るためである。閾値レベルは、それぞれの評価パラメータについて設定され、各パラメータの優れたレベルを示す結合タンパク質が記述される。数百個の分子の初期スクリーニングから、多くの場合、さらなる評価のためにリード候補物を同定する場合、考慮される他の因子のうち、列挙されたパラメータの全てを満たす特性を有するただ1つの分子が出現するまたは全く出現しない。リード候補物が同定されると、治療特性のさらなるインビボでの評価が調べられ、この評価には、動物およびヒト対象における安全性、有効性および効力が含まれる。

【 0277 】

[実施例 14]

抗DLL4 / 抗VEGF DVD-Igリード候補物の選択

本発明者らは、表2に列挙されたVEGFとDLL4配列を用いて、構築物、ならびにこれらの可変ドメインのCDR移植され、親和性成熟されたバージョンと追加のヒト化され、完全なヒト可変ドメイン配列を含む、約100個の抗DLL4 / 抗VEGF DVD-Ig分子を構築し、評価した。完全なヒト親抗DLL4 mAbは、PROfusion mRNAディスプレイ技術、続く、酵母ディスプレイ技術を用いた親和性成熟によって誘導された。CDR-再移植された親抗体は、抗DLL4 mAb E9.71に基づき、いくつかのヒト化抗DLL4 mAbは、h1A11.1とh38H12.11に基づいて調製され、さらに、いくつかの親和性成熟されたh1A11抗体が生成された。また、本発明者らは、DVD-Ig結合タンパク質において、多数の異なるリンカー配列を評価した。異なるリンカーの使用は、同じ可変ドメイン配列を有する結合タンパク質間でさえ、広く異なる特性をもたらした。

【 0278 】

生成された約100個のDVD-Ig分子のうち、これらのうちの10個は、一過性トランスフェクションによりHEK293細胞において所望レベルの発現を達成しなかったために除外され、22個は、DLL4への結合の所望の閾値レベルを示さず、19個は、VEGFへの結合の所望の閾値レベルを示さず、いくつかは、O結合型グリコシル化を含む準最適な翻訳後修飾を示した。いくつかのDVD-Igは、所定の閾値を下回る結合親和性を示したために除外された。DVD-Igの内部位置での抗原結合ドメインは、抗原結合親和性および効力のレベル低下を示す場合がある。例えば、VEGF結合ドメインが外部位置に配置され、DLL4結合ドメインが内部位置に配置されているh1A11 / AvシリーズのDVD-Ig分子の全ては、DLL4結合親和性の減少を示した。したがって、これらのDVD-Igは、さらなる研究のために選択されなかった。反対の配向（すなわち、内部位置のVEGF結合ドメインと外部位置のDLL4結合ドメイン）において、同じ可変ドメインと配向を用いるが、他のリンカー配列、例えば、h1A11.1-SS-Av（重鎖と軽鎖の両方にあるVD1とVD2ドメイン間の短いリンカー）を有する

結合タンパク質にさえ、予想外に優れていることが見出された。

【0279】

さらに、親和性成熟は、モノクローナル抗体の形態おける場合、非常に高い親和性と安定性を有する抗DLL4親抗体を生成するためにh1A11.1について行われたが、DVD-Igの形態においては、これらの構築物は、使用されたリンカーまたは結合ドメインの配向にもかかわらず、h1A11.1-SL-Avについて観察された安定性のレベルを示さなかった。同様に、Av(抗VEGF)可変ドメインの親和性成熟は、再び、リンカーと配向操作にもかかわらず、安定性レベルの低下を示す安定した親モノクローナル抗体を生成した。さらに、親和性成熟は、モノクローナル抗体のための優れた結合動態を生じさせる場合でさえ、その後のDVD-Igの活性を予測できない場合がある。例えば、h1A11.1が、その親和性成熟されたバリエーションで置換されたとき、これらの新規なDVD-Ig分子は、腫瘍モデルにおいて、安定性、より短い生体内での半減期、および抗腫瘍活性の減少を示した。さらに、親和性成熟されたh1A11.1および/またはAv可変ドメインを含有するDVD-Ig分子はまた、5での保存中に、ゲル化し、高レベルの凝集体を形成する傾向の増加を示した。この望ましくないゲル化および凝集は、特に、DVD-Ig h1A11.1-SL-Avに関して、同様の条件下で保存した場合、元の親抗体可変ドメイン(すなわち、親和性成熟されていない抗体由来の可変ドメイン)を含むDVD-Ig分子について観察されなかった。

10

【0280】

これは、抗原結合親和性単独が、臨床的候補物を選択した場合に考慮される唯一の因子ではないことを示し、実際の結合親和性は、他の結合タンパク質特性、例えば、安定性、製剤化性、物理化学的特性、インビボでの抗腫瘍効力および/または薬物動態学的特性を予測できない場合があり、これらは、ほんの僅かな構造的修飾に感受性である。例えば、h1A11.1-LS-Av、h1A11.1-LL-AVおよびh1A11.1-SL-Av DVD-Ig分子のVEGFおよびDLL4中和効力は、概して同等であったが(表7)、h1A11.1-SL-Avは、腫瘍増殖の阻害効力の最大レベルを示した(表9)。さらに、結合親和性および細胞効力を保持するDVD-Ig分子について、これらのうちのいくつかは、あまり良好でない物理化学的特性を示した。例えば、h1A11.1-LL-AVは、治療的リードh1A11.1-SL-Avに非常に類似しているが、2つの構築物における2つの可変ドメインを連結するリンカー間の相違は、h1A11.1-LL-Avについてあまり良好でない物理化学的特性をもたらした。これは、例えば、DVD-Igにおける2つの可変ドメイン間のリンカーに対するごく小さな変化が、評価された治療的特性において大きな影響を有し得ることを示す。

20

30

【0281】

特定の所望の特徴の存在に基づいて、上記されたアッセイにおいて測定したとき、約100個以上のDVD-Ig分子のうち17個は、抗腫瘍活性および薬物動態学的特性についてマウスモデルにおいてさらに試験された。DVD-Ig h1A11.1-SL-Avは、試験された他の結合タンパク質と比較して、予想外に優れた腫瘍抑制効力および薬物動態学的特性を示した。このようにして、スクリーニングファンネルにおいて使用される除外基準を評価すると、DVD-Ig h1A11.1-SL-Avは、最終的に、測定されたパラメータのそれぞれにおいて、良好な(すなわち、閾値値を上回る)特性を示す結合タンパク質として出現した。したがって、結合タンパク質は、さらなる評価および研究のために選択された。

40

【0282】

[実施例15]

初期のVEGF/DLL4 DVD-Igとの比較

h1A11.1-SL-Avは、米国特許出願公開第20100076178号(その出願の表5を参照されたい)において公開された96個の従来のVEGF/DLL4 DVD-Ig分子と直接比較されなかったが、間接的な比較を行うことができる。例えば、h1A11.1-SL-Avは、参照抗VEGF mAb AVに匹敵するVEGF結合活

50

性を示した(表5を参照されたい)。対照的に、米国特許出願公開第20100076178号において試験された96個のVEGF/DLL4 DVD-Ig分子のうち少なくとも3分の2が、参照抗VEGF mAb AB014よりも弱いVEGF結合活性を有した。(AB014は、抗体AVと同様の可変ドメイン配列を含む。)。したがって、h1A11.1-SL-Avは、先の出願において試験された大部分のDVD-Ig構築物と比較して、改善された結合動態を示すように見える。

【0283】

前述の実施例は、本開示を例証することが意図され、決して本発明を限定することを意図していない。開示されているデバイスおよび方法の他の実施形態は、本明細書に開示されているデバイスおよび方法の仕様および実施を考慮すれば当業者には明らかとなる。

10

【0284】

参照による援用

本出願を通して引用されてもよい、すべての引用される参考資料(参考文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む)の内容は、これによって、これらの参考資料がそこに記載されているかのように、いずれかの目的で参考資料の全体を参照することにより明確に援用される。本開示は、別段の記載がない限り、当該技術分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の従来技術を使用する。

【0285】

本開示は、分子生物学および薬物送達分野で周知の技術全体も、参照により組み込む。これらの技術には、以下の公報に記載されている技術が含まれるが、これに限定されるものではない。

20

【0286】

【表 3 8】

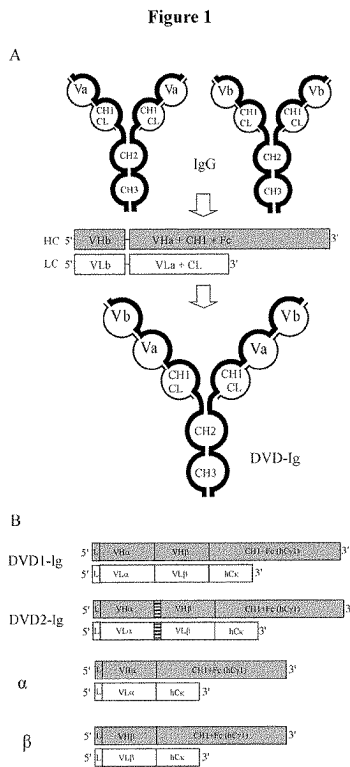
- Ausubel et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY (1993);
- Ausubel, F.M. et al. eds., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);
- CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
- Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
- Harlow et al. , ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);
- Kontermann and Dubel eds., ANTIBODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
- Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);
- Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
- Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
- SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauffs). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【 0 2 8 7 】

均等

本開示は、その精神または本質的な特徴から逸脱せずに他の具体的な形態で実施することができる。したがって、前述の実施形態は、本開示を限定するというよりはむしろ、すべての点において例示していると考えべきである。よって、本開示の範囲は、前述の記載によるというよりはむしろ、添付される特許請求の範囲によって示され、したがって、特許請求の範囲の意味および均等の範囲内にあるすべての変更は本明細書に包含されることが意図される。

【 図 1 】



【配列表】

2019202994000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年6月5日(2019.6.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

10

【請求項1】

VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_nを含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

VD1は、第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは、重鎖定常ドメインであり、

X1は、リンカーであり、但し、CH1ではなく、

X2は、Fc領域であり、

nは、0または1であり、

結合タンパク質が、DLL4とVEGFに結合し、VD1およびVD2が、配列番号39、41、43、45、47、49、51または53からの3つのCDRを独立して含み、VD1および/またはVD2の少なくとも1つが、配列番号39からの3つのCDRを含む結合タンパク質。

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19		4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/14		
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/18		
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/22		
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/26		
A 6 1 K 49/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/66		
A 6 1 K 49/08 (2006.01)	A 6 1 K 49/06		
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/08		
A 6 1 K 51/02 (2006.01)	A 6 1 K 51/00	2 0 0	
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 51/02	2 0 0	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 K 51/10	2 0 0	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 7/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/00		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/10		
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 5	
	G 0 1 N 33/53	D	

2. ブルロニック

- (72)発明者 スプリヤ・グプタ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 0 8 7、サニーベール、ロビン・ウェイ・9 2 7
- (72)発明者 ラビ・チャーリ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 6 0 6、ウースター、クララ・ストリート・2、アパートメント・2
- (72)発明者 カメリア・ザミリ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 5 3 9、フェルモント、リー・ストリート・4 8 1 5 2
- (72)発明者 ジー・ジェ・ゲー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 4 5、シュルーズベリー、クリムゾン・ドライブ・1 9
- (72)発明者 ドミニク・ジェイ・アンブロシ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 6 0 5、ウースター、オリエンタル・ストリート・2 8
- (72)発明者 スーザン・イー・ラッペ
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 1 5、リバーウッズ、イーグル・コート・6 0 1
- (72)発明者 インチュン・リー
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 8 9、バッファロー・グローブ、ニューフィールド・ドライブ

・ 1 0 3

(72)発明者 ルーイ・ナウモフスキ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94022、ロス・アルトス、ジェイ・ストリート・570

(72)発明者 シエンホワ・ツァオ

アメリカ合衆国、イリノイ・60047、ハウソーン・ウッド、ノース・エンプレス・ドライブ・

4

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA86X AA88X AA90X AB01 BA02 BD08 CA25

CA44 CA46

4C076 AA12 BB11 CC03 CC41 DD08 DD09 DD51 DD60 DD67 FF15

FF61 GG06

4C084 AA19 NA05 ZA331 ZA451 ZA511 ZB091 ZB261 ZB271 ZC351

4C085 AA13 AA14 AA19 AA25 BB36 BB42 CC22 CC23 DD62 EE01

GG01 HH03 HH07 HH11 KA03 KA04 KA27 KA28 KA29 LL18

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA20 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	抗vegf / dll4双可变域免疫球蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2019202994A	公开(公告)日	2019-11-28
申请号	JP2019087553	申请日	2019-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	阿布维公司		
申请(专利权)人(译)	AVVI公司		
[标]发明人	ジョナサンエイヒクソン ディアナエルハーシュ スプリヤグプタ ラビチャーリ カメリアザミリ ジージエグー ドミニクジェイアンブロシ スーザンイーラッペ インチュンリー ルーイナウモフスキ シエンホワツアオ		
发明人	ジョナサン・エイ・ヒクソン ディアナ・エル・ハーシュ スプリヤ・グプタ ラビ・チャーリ カメリア・ザミリ ジージエ・グー ドミニク・ジェイ・アンブロシ スーザン・イー・ラッペ インチュン・リー ルーイ・ナウモフスキ シエンホワ・ツアオ		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/22 C12N15/62 C12N15/13 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K9/19 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/14 A61K47/18 A61K47/22 A61K47/26 A61K47/66 A61K49 /06 A61K49/08 A61K51/00 A61K51/02 A61K51/10 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/10 A61P9/10 A61P27 /02 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/337 A61K31/4745 A61K31/495 A61K31/513 A61K31/525 A61K31/7068 A61K39/395 A61K39 /39591 A61K2039/505 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/22 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/56 C07K2317/64 C07K2317 /76 C07K2317/92 C07K2317/94 A61K2300/00 A61K39/39533 A61K45/06 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/468 A61K31/198 A61K31/715 C07K16/46 A61K39/3955 C07K2317/35 C07K2317/52 C07K2317/565		
FI分类号	C07K16/46.ZNA C07K16/22 C12N15/62.Z C12N15/13 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K9/19 A61K39/395.L A61K39/395.N A61K45/00 A61K47/14 A61K47/18 A61K47/22 A61K47/26 A61K47/66 A61K49/06 A61K49/08 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 A61P3 /10 A61P7/00 A61P7/10 A61P9/10 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574.A G01N33/543.595 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA86X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BD08 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA12 4C076/BB11 4C076/CC03 4C076/CC41 4C076/DD08 4C076/DD09 4C076/DD51 4C076/DD60 4C076/DD67 4C076/FF15 4C076/FF61 4C076/GG06 4C084		

/AA19 4C084/NA05 4C084/ZA331 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC351 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA25 4C085/BB36 4C085/BB42 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74

优先权 61/721072 2012-11-01 US
61/787927 2013-03-15 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

提供抗VEGF / DLL4双可变域免疫球蛋白及其用途。解决方案：提供一种结合蛋白，其包含包含VD1- (X1) n-VD2-C- (X2) n的多肽链，其中VD1为第一条重链可变域，VD2是第二个重链可变域，C是重链恒定域，X1是连接子，但不是CH1，X2是Fc区，n为0或1，结合蛋白与DLL4和VEGF结合。结合蛋白还用于诊断，监测，抑制，预防和/或治疗以DLL4和/或VEGF表达或活性异常为特征的癌症，肿瘤和/或其他血管生成依赖性疾病。

