

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-502503  
(P2011-502503A)

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.27)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D	4 B 0 6 4
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	N	4 C 0 8 5
A 61 P 9/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 H 0 4 5
A 61 P 27/02 (2006.01)	A 61 P 9/00		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 205 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-532654 (P2010-532654)	(71) 出願人	506048038 ペレグリン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 92780 カリフォルニア州 タスチン スイート 100, フランクリン アベニュー 14272
(86) (22) 出願日	平成20年11月7日 (2008.11.7)	(71) 出願人	509268749 アフィテック リサーチ エイエス ノルウェー, エヌ-0349 オスロ, ガウスタダリーン 21, オスロ リサーチ パーク
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月12日 (2010.7.12)	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(86) 國際出願番号	PCT/GB2008/003745		
(87) 國際公開番号	W02009/060198		
(87) 國際公開日	平成21年5月14日 (2009.5.14)		
(31) 優先権主張番号	60/987,015		
(32) 優先日	平成19年11月9日 (2007.11.9)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/106,047		
(32) 優先日	平成20年10月16日 (2008.10.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/108,023		
(32) 優先日	平成20年10月24日 (2008.10.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 V E G F 抗体の組成物および方法

## (57) 【要約】

2つの主要な V E G F 受容体のうち1つ ( V E G F R 2 ) のみに対する V E G F 結合を特異的に阻害するヒト抗体を開示している。該抗体は血管新生を効果的に阻害し、腫瘍退縮を誘導するが、その特異性により安全性が向上している。このように、本発明は、癌および他の血管新生疾病を治療するための、新規なヒト抗体をベースとした組成物、方法ならびに併合したプロトコルを提供するものである。V E G F に特異的な新規ヒト抗体を使用するのに好都合な免疫抱合体および方法も提供する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

3つの C D R を含む重鎖可変領域の少なくとも 1 つと、3つの C D R を含む軽鎖可変領域の少なくとも 1 つとを含み、V E G F に結合する単離された抗体であって、

該軽鎖可変領域が、下記 ( a ) ~ ( c ) :

( a ) 配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する軽鎖可変 ( V L ) C D R 1 ,

( b ) 配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 , および

( c ) 配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3

を含み、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、該抗体。

**【請求項 2】**

1 つ以上の上記重鎖可変領域 C D R が、下記 ( a ) ~ ( c ) :

( a ) 配列番号 5 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する重鎖可変 ( V H ) C D R 1 ,

( b ) 配列番号 6 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 , および

( c ) 配列番号 7 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3

からなる群から選択され、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 3】**

2 つ以上の上記重鎖可変領域 C D R が、下記 ( a ) ~ ( c ) :

( a ) 配列番号 5 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する重鎖可変 ( V H ) C D R 1 ,

( b ) 配列番号 6 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 , および

( c ) 配列番号 7 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3

からなる群から選択され、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、請求項 2 に記載の抗体。

**【請求項 4】**

3 つの上記重鎖可変領域 C D R が、下記 ( a ) ~ ( c ) :

( a ) 配列番号 5 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する重鎖可変 ( V H ) C D R 1 ,

( b ) 配列番号 6 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 2 , および

( c ) 配列番号 7 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V H C D R 3

10

20

30

40

50

からなる群から選択され、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、 2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、請求項 3 に記載の抗体。

#### 【請求項 5】

上記軽鎖可変領域が、配列番号 4 のアミノ酸配列、または該配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を有する請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 6】

上記重鎖可変領域が、配列番号 3 のアミノ酸配列、または該配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を有する請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体。 10

#### 【請求項 7】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列、または該配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を有する請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 8】

完全にヒト抗体である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 9】

抗体定常領域を含む抗体全体である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 10】

I g G 抗体である請求項 9 に記載の抗体。 20

#### 【請求項 11】

配列番号 2 4 のアミノ酸配列または該配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を有する重鎖、および

配列番号 2 5 のアミノ酸配列または該配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を有する軽鎖

を含む請求項 9 または 10 に記載の抗体。

#### 【請求項 12】

抗体の抗原結合断片である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 13】

上記の抗体の抗原結合断片が、 F a b , F a b ' , F ( a b ' )<sub>2</sub> , s c F v , F v , d s F v , d s - s c F v , F d , D A B , T a n d A b 二量体、直線状抗体、 m i n i b o d y , d i a b o d y または二重特異性抗体断片である請求項 1 2 に記載の抗体。 30

#### 【請求項 14】

上記抗体が I g G 型である場合、 V E G F に対して、 1 0 n M 未満の K<sub>d</sub> に対応する結合親和性を有する請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 15】

少なくとも第一の診断薬または治療薬に付着した請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の抗体。

#### 【請求項 16】

少なくとも第一の、放射線治療薬剤、化学療法剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、チューブリン阻害薬、抗細胞剤もしくは細胞毒性剤、ステロイド、サイトカイン、ケモカインまたは凝固剤に付着した請求項 1 5 に記載の抗体。 40

#### 【請求項 17】

下記 ( a ) ~ ( f ) :

( a ) ヒ素放射性同位元素；

( b ) タキソール、ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、ゲムシタビン、コンブレタスタチン、ドキソルビシンもしくはアドリアマイシン；

( c ) リシン、グロニン、アブリン、ジフテリア、シュードモナス菌毒素もしくは百日咳毒素；

( d ) V 型 A T P アーゼ阻害剤； 50

(e) I L - 2 , I L - 1 2 , T N F - , インターフェロンもしくは L E C ; または  
 (f) 切り詰められた組織因子  
 に付着した請求項 15 に記載の抗体。

**【請求項 18】**

V E G F 受容体である V E G F R 1 ( F 1 t - 1 ) に対する V E G F の結合を有意に阻害せずに、V E G F 受容体である V E G F R 2 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対する V E G F の結合は有意に阻害し、かつ V E G F に結合する単離された抗体であって；

該抗体が、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

該軽鎖可変領域が、下記 (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 1 ,

(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 , および

(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3

を含み、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、該抗体。

**【請求項 19】**

単離された抗体が I g G 型である場合、V E G F に対して、1 0 n M 未満の K<sub>d</sub> に対応する結合親和性を有し、かつ V E G F に結合する該抗体であって；

該抗体が、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

該軽鎖可変領域が、下記 (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 1 ,

(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 , および

(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3

を含み、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、該抗体。

**【請求項 20】**

少なくともヒト V E G F およびマウス V E G F に結合する単離された抗体であって；

該抗体が、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む、少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

該軽鎖可変領域が、下記 (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 1 ,

(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 2 , および

(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する V L C D R 3

を含み、

10

20

30

40

50

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列と比較して 1 つ、 2 つもしくは 3 つのアミノ酸置換を含む配列であるか、または、

該実質的に相同的な配列が、上記所定の C D R 配列の保存的アミノ酸置換を含む配列である、該抗体。

【請求項 2 1】

少なくとも第一の治療薬または診断薬に付着した請求項 1 ~ 2 0 のいずれかの抗体を含む免疫抱合体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の少なくとも第一の抗体、またはその免疫抱合体を含む組成物。

【請求項 2 3】

薬学的に許容し得る請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

さらに、少なくとも第二の治療薬を含む請求項 2 2 または 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体をコードするヌクレオチド配列領域を含む核酸分子。

【請求項 2 6】

上記ヌクレオチド配列領域が、配列番号 2 1 のアミノ酸配列または該配列の少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を有する抗体をコードする請求項 2 5 に記載の核酸分子。

【請求項 2 7】

上記ヌクレオチド配列領域が、配列番号 2 0 のヌクレオチド配列を有する請求項 2 6 に記載の核酸分子。

【請求項 2 8】

上記ヌクレオチド配列領域が、  
配列番号 2 4 のアミノ酸配列または該配列の少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を有する重鎖、および

配列番号 2 5 のアミノ酸配列または該配列の少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を有する軽鎖

を含む抗体をコードする請求項 2 5 に記載の核酸分子。

【請求項 2 9】

配列番号 2 4 をコードする上記ヌクレオチド配列領域が、配列番号 2 2 の該ヌクレオチド配列を有し、

配列番号 2 5 をコードする上記ヌクレオチド配列領域が、配列番号 2 3 の該ヌクレオチド配列を有する、請求項 2 8 に記載の核酸分子。

【請求項 3 0】

請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の核酸分子または請求項 3 0 の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 2】

請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の核酸分子または請求項 3 0 の発現ベクターを含むウイルス。

【請求項 3 3】

少なくとも第一の容器 [container] の中に、下記 ( a ) ~ ( g ) :

( a ) 請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体；

( b ) 請求項 2 1 に記載の免疫抱合体；

( c ) 請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれかに記載の組成物；

( d ) 請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の核酸分子；

10

20

30

40

50

- (e) 請求項 3 0 に記載の発現ベクター；
- (f) 請求項 3 1 に記載の宿主細胞；または
- (g) 請求項 3 2 に記載のウイルス

を含むキット。

**【請求項 3 4】**

下記 (a) ~ (b) :

- (a) コードされた抗体を発現させるのに効果的な条件下で、請求項 3 0 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること；および
  - (b) 該宿主細胞から発現された抗体を得ること
- を含む、抗体を製造する方法。

10

**【請求項 3 5】**

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体に、VEGF を含む組成物を接触させることを含む、VEGF を結合させる方法。

**【請求項 3 6】**

VEGF / 抗体複合体を形成させるのに効果的な条件下で、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体に、VEGF を含む疑いのある組成物を接触させること；および

そのように形成された該複合体を検出すること  
を含む、VEGF を検出する方法。

**【請求項 3 7】**

下記 (a) ~ (c) :

- (a) VEGF / 抗体複合体を形成させるのに効果的な条件下で、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体に動物由来の試験検体を接触させること；

(b) そのように形成された VEGF / 抗体複合体を検出し、それによって該試験検体中の VEGF 量を測定すること；および

(c) 該試験検体中の VEGF 量を対応する対照検体中の VEGF 量と比較することであって、該対照検体中の VEGF 量と比較して該試験検体中の VEGF 量が増加していること、血管新生を伴う疾病であることを示すこと

を含む、動物における血管新生を伴う疾病を診断する方法。

20

**【請求項 3 8】**

上記試験検体を上記動物から単離し、インピトロで上記の抗体または免疫抱合体に接触させる請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 3 9】**

上記の抗体または免疫抱合体を上記動物に投与し、それによってインピボで上記試験検体を接触させる請求項 3 7 に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

上記の血管新生を伴う疾病が、癌である請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 4 1】**

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体を、動物における血管新生またはリンパ管形成を阻害する有効量で、該動物に投与することを含む、血管新生またはリンパ管形成を阻害する方法。

40

**【請求項 4 2】**

上記動物が、癌または眼の血管新生に係る疾病を有する請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

上記動物が、ヒトの対象である請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体の治療上有効な量を、血管新生を伴う疾病を患う動物に投与することを含む、該疾病を治療する方法。

**【請求項 4 5】**

上記動物が、眼の血管新生に係る疾病、黄斑変性症、加齢性黄斑変性症、関節炎、リウ

50

マチ性関節炎，アテローム性動脈硬化症，糖尿病性網膜症，甲状腺過形成，グレーブス病，血管腫，血管新生線内障または乾癬を有する請求項4～4に記載の方法。

**【請求項4～6】**

上記動物が、癌を有する請求項4～1に記載の方法。

**【請求項4～7】**

さらに、第二の治療薬を上記動物に投与することを含む請求項4～4～6のいずれかに記載の方法。

**【請求項4～8】**

上記動物が、ヒトの対象である請求項4～4～7のいずれかに記載の方法。

**【請求項4～9】**

請求項1～20のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体の治療上有効な量を、リンパ管形成を伴う疾病を患う動物に投与することを含む、該疾病を治療する方法。

10

**【請求項5～0】**

上記動物が、癌を有する請求項4～9に記載の方法。

**【請求項5～1】**

上記動物が、ヒトの対象である請求項4～9または5～0に記載の方法。

**【請求項5～2】**

治療または診断に使用するための請求項1～20のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体。

20

**【請求項5～3】**

血管新生もしくはリンパ管形成を伴う疾病的治療法または診断に使用するための請求項1～20のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体。

**【請求項5～4】**

癌，眼の血管新生に係る疾病，黄斑変性症，加齢性黄斑変性症，関節炎，リウマチ性関節炎，アテローム性動脈硬化症，糖尿病性網膜症，甲状腺過形成，グレーブス病，血管腫，血管新生線内障および乾癬からなる群から選択される疾病的治療法または診断に使用するための請求項5～2または5～3に記載の抗体または免疫抱合体。

**【請求項5～5】**

第二の治療薬の使用をさらに含む治療法または診断に使用するための請求項5～2～5～4のいずれかに記載の免疫抱合体の抗体。

30

**【請求項5～6】**

上記の治療法または診断がヒトの対象に対して実施される請求項5～2～5～5のいずれかに記載の免疫抱合体の抗体。

**【請求項5～7】**

血管新生またはリンパ管形成を阻害することによって疾病を治療するための医薬の製造における、請求項1～20のいずれかに記載の抗体またはその免疫抱合体の使用。

**【請求項5～8】**

上記疾病が、癌，眼の血管新生に係る疾病，黄斑変性症，加齢性黄斑変性症，関節炎，リウマチ性関節炎，アテローム性動脈硬化症，糖尿病性網膜症，甲状腺過形成，グレーブス病，血管腫，血管新生線内障および乾癬からなる群から選択される請求項5～7に記載の使用。

40

**【請求項5～9】**

さらに、第二の治療薬の使用を含む請求項5～7または5～8に記載の使用。

**【請求項6～0】**

上記治療がヒトの対象に対して実施される請求項5～7～5～9のいずれかに記載の使用。

**【発明の詳細な説明】**

**【背景技術】**

**【0001】**

**本発明の背景**

1. 関連出願の相互参照

50

本出願は、一番目として米国仮出願の特願第60/987,015号（2007年11月9日に出願），二番目として米国仮出願の特願第61/106,047号（2008年10月16日に出願），および三番目として米国仮出願の特願第61/108,023号（2008年10月24日に出願）に対して優先権を主張するものであり、これらの明細書，請求項，配列および図面全体は、権利を放棄することなく、参照により本明細書に援用される。

#### 【0002】

##### 2. 本発明の技術分野

本発明は、概して、抗体，血管新生および腫瘍治療の分野に関する。より詳しくは、本発明は、2つのVEGF受容体のうち1つ（VEGFR2）のみに対するVEGF結合を特異的に阻害するヒト抗VEGF抗体を提供する。このような抗体は血管新生を阻害し、腫瘍退縮を誘導するよう設計されているが、この特異的なブロッキング特性によって安全性が改善されている。本発明の、抗体をベースにした組成物および方法は、免疫抱合体[immunoconjugate]およびその他の治療上の組合せ，キットならびに方法の使用にも拡張される。

10

#### 【0003】

##### 3. 関連技術の説明

化学療法剤に対する腫瘍細胞の耐性が、臨床腫瘍学に深刻な問題を突き付けている。実際、この分野で確実に進歩しているにもかかわらず、このことは、ヒト癌で最も一般的な型の多くが有効な化学療法的介入に未だ抵抗するという主な理由の1つである。

20

#### 【0004】

他の腫瘍の治療戦略は、該腫瘍細胞に毒素を送達するために抗腫瘍細胞抗体を用いる、「抗毒素」を使用することである。しかしながら、固形腫瘍に適用する場合、化学療法アプローチと同様、抗毒素療法も深刻な欠点を孕んでいる。例えば、抗原陰性細胞または抗原欠損細胞は生き延びて腫瘍に生息することができ、またさらなる転移の原因となり得る。

#### 【0005】

抗体をベースにした治療法に対する固形腫瘍の耐性に係るさらなる原因是、腫瘍塊は通常、抗体や抗毒素などの高分子薬に対して非透過性であることである（Burrows et al., 1992; Dvorak et al., 1991a; Baxter および Jain, 1991）。物理的拡散距離と腫瘍内の間質圧との両方によって、このタイプの治療法が著しく制限されている。従って、これまでに、すべてのヒト癌の>90%を占める固形腫瘍は、抗体治療および抗毒素治療に耐性を有することがわかっている。

30

#### 【0006】

より最近の戦略は、固形腫瘍の血管系を標的にしている。腫瘍細胞自体よりもむしろ腫瘍の血管を標的にすることは、耐性腫瘍細胞の進行を招くことがないように思われる点、および標的細胞が容易に接近しやすい点で、一定の利点がある。さらに、腫瘍細胞の多くが酸素および栄養分を単一の血管に依存することから、血管の破壊は抗腫瘍効果の増幅に繋がる（Burrows および Thorpe, 1993; 1994）。血管を標的とする戦略の例が、U.S. Patent No. 5,855,866 および 5,965,132に記載され、血管腫瘍系のマーカーへの抗細胞剤および毒素の送達を標的とすることが特に記載されている。

40

#### 【0007】

血管を標的にするアプローチの他の有効な型としては、腫瘍血管系内に発現または吸着したマーカーに対する凝固因子を標的にすることである（Huang et al., 1997; U.S. Patent No. 5,877,289, 6,004,555, および 6,093,399）。腫瘍血管系に毒素よりもむしろ凝固剤を送達することは、免疫原生が減少し中毒性副作用の危険性がより低下するというさらなる利点を有する。U.S. Patent No. 5,877,289に開示されているように、このような腫瘍特異的「凝固リガンド[coaguligand]」に用いられる好ましい凝固因子は、ヒト凝固誘導タンパク質である組織因子（TF）の切り詰められた型であり、組織因子は血液凝固の主要なイニシエーターである。

50

## 【0008】

腫瘍血管への毒素および凝固因子の特異的な送達が腫瘍治療に著しい進歩を示すにもかかわらず、特定の末梢腫瘍細胞はこのような治療法に起因する腫瘍内破壊を乗り切ることができる。従って、抗血管新生戦略は、U.S. Patent No. 5,855,866 および 6,004,555 の腫瘍破壊法と併用される。

## 【0009】

抗血管新生腫瘍の治療戦略は、通常固体腫瘍の周辺で、血管芽の増殖を阻害することに基づく。この治療法は、より伝統的な介入（手術や化学療法など）後または同時に、微小転移巣の危険率を低下させ、そして固体腫瘍の成長を阻害することに特に有効である。

## 【0010】

血管新生は、前から存在する血管および/または血中内皮幹細胞から新規な血管系を発達させることである (Asahara et al., 1997; Springer et al., 1998; Folkman and Shing, 1992)。血管新生は、胚形成、創傷治癒および月経などの生理的過程の多くにおいて不可欠な役割を果たしている。血管新生は、特定の病的事象においても重要である。固体腫瘍の成長および転移での役割に加えて、血管新生の要素を有する他の注目すべき疾患は、関節炎、乾癬および糖尿病性網膜症である (Hanahan および Folkman, 1996; Fidler および Ellis, 1994)。

## 【0011】

血管新生は、標的組織内および遠隔部位で産生される血管新生刺激と血管新生阻害剤とのバランスにより正常組織および悪性組織で調節される (Fidler et al., 1998; McNamara et al., 1998)。血管内皮増殖因子A (VEGF；別名、血管透過因子、VPFともいう) は、血管新生の主要な刺激剤である。VEGFは、低酸素および発癌突然変異により誘導される多機能サイトカインであり、多種多様な組織から産生され得る (Kerbel et al., 1998; Mazure et al., 1996)。

## 【0012】

病態において VEGF が血管新生の主要な刺激剤として認識されることが、VEGF活性を阻止する様々な試みに繋がった。抑制性の抗 VEGF 受容体抗体、可溶性の受容体構造物、アンチセンス戦略、VEGFに対するRNAアプタマーおよび低分子量 VEGF 受容体チロシンキナーゼ (RTK) 阻害剤のすべてが、VEGFシグナル伝達を阻害するために用いるよう提唱された (Siemeister et al., 1998)。マウス抗体がマウスの腫瘍成長を阻害したことを受けた (Kim et al., 1993; Asano et al., 1998; Mesiano et al., 1998; Luo et al., 1998a; 1998b; Borgstrom et al., 1996; 1998)、アバストン [Avastin] (ベバシズマブ) と称されるヒト化抗 VEGF 抗体 (Presta et al., 1997) が臨床使用に承認された (Hurwitz et al., 2004)。

## 【0013】

VEGFを認識し、かつ VEGF に誘導される機能を阻害する、他のマウス抗体が報告されている。これらは 2C3 と称されるマウス抗体を含み、2つの主要な VEGF 受容体のうち 1 つのみに VEGF が結合することを阻害する効果を有する (Brekken et al., 2000)。VEGFR1 でなく VEGFR2 に対する VEGF の結合をブロッキングすることによって、マウス 2C3 抗体は、VEGFR1 を介して伝達される有益な効果を維持しつつ、安全性プロフィールを改善している (Brekken et al., 2000; U.S. Patent No. 6,342,219, 6,524,583, 6,342,221)。

## 【0014】

しかしながら、本発明者らは、VEGF を認識し、かつ VEGF で誘導される血管新生を阻害するさらなる薬剤を同定することが治療選択数を拡大するのに有益であることを認めている。例えば、マウス 2C3 抗体は、有望ではあるが、一定の制限を有する。特に、この 2C3 抗体はマウス VEGF と結合しないものであり、マウス同系腫瘍を用いた前臨床試験において該抗体を使用することができないことを意味する。前臨床試験から臨床使用への最も効率的な移行において、このように、マウスおよびヒト VEGF の両方に結合する新規抗体を開発することによって恩恵がもたらされる。

10

20

30

40

50

## 【0015】

加えて、本発明者らは、免疫学的見地からより耐性の高いヒト治療用の治療薬の開発が有利であることを認めている。この点に関して、一般的に、ヒト抗体は、ヒト治療にとって、少なくとも3つの考えられる利点を有する。第一に、ヒト免疫系がその抗体を異物として認識しないはずである。第二に、ヒト血液循環におけるその半減期が天然に存在するヒト抗体と同じであり、そのため投与される用量がより少量かつより低頻度でもよい。第三に、エフェクタ部位がヒトであることから、そのヒト抗体は、例えば、補体依存性細胞障害(CDC)または抗体依存性細胞毒性(ADC)によってより効率的に標的細胞を破壊するための、ヒト免疫系の他の部分とよりよく相互作用する。

## 【0016】

しかしながら、一般的にヒト抗体はこれらの利点を示すものと認められているにもかかわらず、ヒト抗体を、ヒト治療を成功させる候補にさせるための、充分に高い親和性および適切な機能特性を有するヒト抗体の開発は、決して容易ではないことが知られている。従って、当該技術において、安全かつ有効なヒト治療のための、VEGFで誘導される血管新生を阻害する薬剤が未だになく、このような薬剤の開発に挑戦し続けている。

10

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0017】

【特許文献1】U.S. Patent No. 5,855,866

20

【特許文献2】U.S. Patent No. 5,965,132

【特許文献3】U.S. Patent No. 5,877,289

【特許文献4】U.S. Patent No. 6,004,555

【特許文献5】U.S. Patent No. 6,093,399

【特許文献6】U.S. Patent No. 6,342,219

【特許文献7】U.S. Patent No. 6,524,583

【特許文献8】U.S. Patent No. 6,342,221

## 【非特許文献】

## 【0018】

【非特許文献1】Burrows et al., 1992

30

【非特許文献2】Dvorak et al., 1991a

【非特許文献3】Baxter および Jain, 1991

【非特許文献4】Burrows および Thorpe, 1993

【非特許文献5】Burrows および Thorpe, 1994

【非特許文献6】Huang et al., 1997;

【非特許文献7】Asahara et al., 1997

【非特許文献8】Springer et al., 1998

【非特許文献9】Folkman および Shing, 1992

【非特許文献10】Hanahan および Folkman, 1996

【非特許文献11】Fidler および Ellis, 1994

40

【非特許文献12】Fidler et al., 1998

【非特許文献13】McNamara et al., 1998

【非特許文献14】Kerbey et al., 1998

【非特許文献15】Mazure et al., 1996

【非特許文献16】Siemeister et al., 1998

【非特許文献17】Kim et al., 1998

【非特許文献18】Asano et al., 1998

【非特許文献19】Mesiano et al., 1998

【非特許文献20】Luo et al., 1998a

【非特許文献21】Luo et al., 1998b

50

【非特許文献22】Borgstrom et al., 1996

【非特許文献 23】Borgstrom et al., 1998

【非特許文献 24】Presta et al., 1997

【非特許文献 25】Hurwitz et al., 2004

【非特許文献 26】Brekken et al., 2000 本発明の概要 本発明は、抗血管新生治療および抗腫瘍治療に用いる新規な治療組成物および治療方法を提供することによって、従来技術の一定の限界を克服するものである。本発明は、2つの主要な VEGF 受容体のうち 1つ (VEGFR2) のみに対する VEGF の結合を特異的に阻害する機能特性を有し、かつ有効な治療計画にとって充分に高い、VEGF に対する親和性を有するヒト抗体に基づく。このような抗体は、既に臨床使用に承認されている抗体を含む他の抗 VEGF 抗体と同程度効果的に血管新生を阻害し、腫瘍を治療するが、この特異的なブロッキング特性のために安全性が改善されている。本発明の組成物および方法も、提供する抗体の特定の種類を用いて、プロドラッグを含む免疫抱合体および組合せの使用にまで拡張される。

【0019】

本発明の特別な利点は、提供するこのヒト抗体が VEGF の VEGFR2 に対する結合のみを阻害し、VEGFR1 に対する結合は阻害しない点である。これは、VEGFR2 および VEGFR1 の両方に対する VEGF の結合を阻害する、A4.6.1 およびヒト化型のアバスチンを含む従来技術の主要な抗体と対照をなす。VEGFR1 が血管新生とは無関係の、例えば、破骨細胞機能および軟骨吸収細胞機能における生物学的に重要な役割を有するから、VEGFR2 を媒介する血管新生のみを阻害することができる本発明は明白な利点を有する。例えば、小児癌の治療における骨代謝に悪影響を及ぼさない点において、これは臨床的利益につながる。腫瘍進行および転移におけるマクロファージの有害な効果も阻害されるのは、本発明の抗体に阻害される VEGFR2 をこのマクロファージの集団が発現しているからである。

【0020】

さらなる利点は、本発明の抗体が存在していても VEGFR1 (腫瘍内皮で上方制御されている) に対する VEGF の結合は維持されるから、VEGFR1 に結合している VEGF に本発明の抗体が結合することによって、該抗体に付着した治療薬を腫瘍血管系に特異的に送達するために、本発明の抗体を用いることができる点である。従って、免疫抱合体に照らして、本発明は、同一分子の範囲内で抗血管新生特性および腫瘍破壊的特性の両方を有する薬剤を提供する。

【0021】

その上、さらなる利点は、提供する組成物が、VEGFR2 を介して伝達される VEGF の生存シグナルを中和できる点にある。このように、本発明の裸の抗体および接合した抗体は、他の治療法および / または付着した薬剤、特に、VEGF がそれらの破壊的な特性に対抗する能力のためにインピボで最大の効果を発揮できないものと相乗的な組合せを形成する。

【0022】

相補性決定領域 (CDR) を含む、VEGF, これらの VH および VL ドメインに結合する本発明の抗体分子のアミノ酸配列および / または DNA 配列は、本明細書にリストされた様々な配列番号で記載されている。

【0023】

本発明の一態様は、配列番号 5 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 CDR1 ドメインを含む、VEGF に結合する抗体を提供する。

【0024】

その代わりに、またはそれに加えて、本発明の一態様における VEGF に結合する抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 CDR2 ドメインを含む。

【0025】

その代わりに、またはそれに加えて、本発明の一態様における VEGF に結合する抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 CDR3 ド

10

20

30

40

50

メインを含む。

【0026】

その代わりに、またはそれに加えて、本発明の一態様におけるVEGFに結合する抗体は、配列番号8のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1ドメインを含む。

【0027】

その代わりに、またはそれに加えて、本発明の一態様におけるVEGFに結合する抗体は、配列番号9のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR2ドメインを含む。

【0028】

その代わりに、またはそれに加えて、本発明の一態様におけるVEGFに結合する抗体は、配列番号10のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3ドメインを含む。

【0029】

このように、特定の態様において、本発明は1つ以上の重鎖CDRドメインを含む、VEGFに結合する抗体を提供するものであって、該重鎖CDRドメインは下記(a)～(c)：

(a) 配列番号5のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR1ドメイン；

(b) 配列番号6のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR2ドメイン；および

(c) 配列番号7のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR3ドメイン

からなる群から選択される。

【0030】

特定の態様において、本発明は1つ以上の軽鎖CDRドメインを含む、VEGFに結合する抗体も提供するものであって、該軽鎖CDRドメインは下記(a)～(c)：

(a) 配列番号8のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1ドメイン；

(b) 配列番号9のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR2ドメイン；および

(c) 配列番号10のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3ドメイン

からなる群から選択される。

【0031】

特定の好ましい態様において、VEGFに結合する抗体は、下記(a)および(c)：

(a) 配列番号7のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR3；および

(b) 配列番号10のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR3

の両方を含んでいる。

【0032】

より好ましくは、配列番号5のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR1ドメインおよび/または配列番号8のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR1ドメイン、および/または配列番号6のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖CDR2ドメインおよび/または配列番号9のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖CDR2ドメインも存在する。

【0033】

好ましい一態様において、配列番号5のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配

10

20

30

40

50

列を含む重鎖 C D R 1 , 配列番号 6 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む C D R 2 , および配列番号 7 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む C D R 3 が、独立してまたは組み合わせて存在する。

**【 0 0 3 4 】**

さらに好ましいもう一つの態様において、配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 , 配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む C D R 2 , および配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む C D R 3 が、独立してまたは組み合わせて存在する。

**【 0 0 3 5 】**

別の見地から、特定の態様において、本発明は、  
配列番号 7 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメインおよび / または  
配列番号 10 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメイン  
を含む、 V E G F に結合する抗体を提供する。

**【 0 0 3 6 】**

該抗体は、任意に  
配列番号 6 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメインおよび / または  
配列番号 9 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメイン  
をさらに含み、および / または  
配列番号 5 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメインおよび / または  
配列番号 8 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメイン  
をさらに含む。

**【 0 0 3 7 】**

別の見地から、特定の態様において、本発明は、  
配列番号 6 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメインおよび / または  
配列番号 9 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメイン  
を含む、 V E G F に結合する抗体を提供する。

**【 0 0 3 8 】**

該抗体は、任意に  
配列番号 7 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメインおよび / または  
配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメイン  
をさらに含み、および / または  
配列番号 5 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメインおよび / または  
配列番号 8 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメイン  
をさらに含む。

**【 0 0 3 9 】**

別の見地から、特定の態様において、本発明は、  
配列番号 5 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 1 ドメインおよび / または

配列番号 8 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 1 ドメインを含む、 V E G F に結合する抗体を提供する。

【 0 0 4 0 】

該抗体は、任意に

配列番号 7 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 3 ドメインおよび／または

配列番号 10 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 3 ドメイン

をさらに含み、および／または

配列番号 6 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む重鎖 C D R 2 ドメインおよび／または

配列番号 9 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を含む軽鎖 C D R 2 ドメイン

をさらに含む。

【 0 0 4 1 】

本発明の好ましい特定の抗体は、配列番号 5 , 6 , 7 , 8 , 9 および 10 からなる群から選択される 1 つ以上の C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列を含む。

【 0 0 4 2 】

好ましい特定の抗体は、配列番号 8 , 9 もしくは 10 の 2 つ以上の軽鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列を含む。特に好ましい結合分子は、配列番号 8 , 9 もしくは 10 の 3 つの軽鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列（すなわち、上述した軽鎖 C D R 1 および C D R 2 および C D R 3 のそれぞれのうち 1 つまたは該配列と実質的に相同的な配列）を含む。

【 0 0 4 3 】

他の好ましい特定の抗体は、配列番号 5 , 6 もしくは 7 の 2 つ以上の重鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列を含む。特に好ましい結合分子は、配列番号 5 , 6 もしくは 7 の 3 つの重鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列（すなわち、上述した重鎖 C D R 1 および C D R 2 および C D R 3 のそれぞれのうち 1 つまたは該配列と実質的に相同的な配列）を含む。

【 0 0 4 4 】

とりわけ好ましい特定の抗体は、配列番号 8 , 9 もしくは 10 の 3 つの軽鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列（すなわち、上述した軽鎖 C D R 1 および C D R 2 および C D R 3 のそれぞれのうち 1 つまたは該配列と実質的に相同的な配列）、ならびに配列番号 5 , 6 もしくは 7 の 3 つの重鎖 C D R または上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列（すなわち、上述した重鎖 C D R 1 および C D R 2 および C D R 3 のそれぞれのうち 1 つまたは該配列と実質的に相同的な配列）を含む。

【 0 0 4 5 】

特に好ましい特定の抗体は、

配列番号 5 の重鎖 C D R 1 ドメイン ,

配列番号 6 の重鎖 C D R 2 ドメイン , および

配列番号 7 の重鎖 C D R 3 ドメイン ,

もしくは上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列；  
を含み、および／または

配列番号 8 の軽鎖 C D R 1 ドメイン ,

配列番号 9 の軽鎖 C D R 2 ドメイン , および

配列番号 10 軽鎖 C D R 3 ドメイン ,

もしくは上述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同的な配列  
を含む。

10

20

30

40

50

## 【0046】

さらなる態様において、本発明は、3つのCDRを含む重鎖可変領域の少なくとも1つと、3つのCDRを含む軽鎖可変領域の少なくとも1つとを含み、かつVEGFに結合する抗体を提供するものであって、該軽鎖可変領域は、下記(i)～(iii)：

- (i) 配列番号8のアミノ酸配列を有する軽鎖可変(VL)CDR1，
- (ii) 配列番号9のアミノ酸配列を有するVL CDR2，および
- (iii) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVL CDR3

を含む。

## 【0047】

この態様の好ましい側面において、1つ以上の上記重鎖可変領域CDRが、下記(i)～(iii)：

- (i) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVH CDR1，
- (ii) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR2，および
- (iii) 配列番号7のアミノ酸配列を有するVH CDR3

からなる群から選択される。

## 【0048】

この態様のより好ましい側面において、2つの上記重鎖可変領域CDRが、下記(i)～(iii)：

- (i) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVH CDR1，
- (ii) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR2，および
- (iii) 配列番号7のアミノ酸配列を有するVH CDR3

からなる群から選択される。

## 【0049】

この態様のさらに好ましい側面において、3つの上記重鎖可変領域CDRが、下記(i)～(iii)：

- (i) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVH CDR1，
- (ii) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR2，および
- (iii) 配列番号7のアミノ酸配列を有するVH CDR3

からなる群から選択される。

## 【0050】

本発明のさらに好ましい特定の態様は、

配列番号5, 6, もしくは7の1つ, 2つもしくは3つの重鎖CDRを含むVHドメインまたは配列番号5, 6, もしくは7の1つ以上と実質的に相同的な配列、および/または

配列番号8, 9, もしくは10の1つ, 2つもしくは3つの軽鎖CDRを含むVLドメインまたは配列番号8, 9, もしくは10の1つ以上と実質的に相同的な配列を含み、VEGFに結合する抗体を提供する。

## 【0051】

特に好ましいVLドメインは、配列番号8, 9および10の3つの軽鎖CDR、または配列番号8, 9もしくは10の1つ以上と実質的に相同的な配列（すなわち、CDR1, CDR2およびCDR3のそれぞれのうち1つまたは該配列と実質的に相同的な配列）を含む。

## 【0052】

特に好ましいVHドメインは、配列番号5, 6および7の3つの重鎖CDR、または配列番号5, 6もしくは7の1つ以上と実質的に相同的な配列（すなわち、CDR1, CDR2およびCDR3のそれぞれのうち1つまたは該配列と実質的に相同的な配列）を含む。

## 【0053】

とりわけ好ましい本発明の態様は、

配列番号8, 9および10の3つの軽鎖CDRを含むVL領域、ならびに  
3つの重鎖CDRを含むVH領域

を含み、VEGFに結合する抗体を提供する。好ましい態様において、1つ、2つまたは

10

20

30

40

50

3つの重鎖 C D R は、配列番号 5 , 6 , および 7 に定義された通りである。

**【 0 0 5 4 】**

本発明の好ましい特定の態様は、配列番号 3 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を有する V H ドメインおよび / または配列番号 4 のアミノ酸配列もしくは該配列と実質的に相同的な配列を有する V L ドメインを含む、 V E G F と結合する抗体を提供する。

**【 0 0 5 5 】**

さらに好ましい態様は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L ドメインおよび 3 つの重鎖 C D R を含む V H ドメインを含む、 V E G F と結合する抗体を提供する。該 V H ドメインが配列番号 3 のアミノ酸配列を有することが好ましい。

10

**【 0 0 5 6 】**

さらなる態様において、本発明は、配列番号 2 1 のアミノ酸配列（本明細書において r 8 4 もしくは P G N 3 1 1 もしくは E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 とも言及する上記抗体）もしくは V E G F と結合するその断片を含むか、またはそれらと実質的に相同的な配列を含む、 V E G F と結合する抗体を提供する。

**【 0 0 5 7 】**

さらなる態様において、本発明は、配列番号 2 1 のアミノ酸配列（本明細書において r 8 4 もしくは P G N 3 1 1 もしくは E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 とも言及する上記抗体）を含むか、または V E G F と結合するその断片を含む、 V E G F と結合する抗体を提供する。

20

**【 0 0 5 8 】**

本発明は、 r 8 4 モノクローナル抗体（本明細書において P G N 3 1 1 および E J - 1 7 3 - 1 1 2 - C 1 1 とも言及する）を例として挙げ、その単鎖型を図 1 （配列番号 2 1 および配列番号 2 0 ）に示し、その完全長 I g G 型を実施例 6 に示す。この r 8 4 抗体の C D R ドメイン、 V H および V L ドメインを、表 1 および図 1 に示す。これらの C D R ドメインもしくは V H および V L ドメイン（またはそれと実質的に相同的な配列）を含む抗体は、本発明の好ましい態様である。

**【 0 0 5 9 】**

本発明の好ましい態様は、配列番号 2 1 （アミノ酸）に示される r 8 4 抗体の s c F v 型であり、好ましくは配列番号 2 0 （核酸）にコードされている。

30

**【 0 0 6 0 】**

本発明の他の好ましい態様は、 r 8 4 抗体の完全長 I g G 型であり、その重鎖は配列番号 2 4 （アミノ酸）に示され、好ましくは配列番号 2 2 （核酸）にコードされており；その軽鎖は配列番号 2 5 （アミノ酸）に示され、好ましくは配列番号 2 3 （核酸）にコードされている。

**【 0 0 6 1 】**

実質的に相同的な配列の特定の例は、開示したアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列である。

**【 0 0 6 2 】**

特定の態様において、 V E G F に結合する本発明の抗体は、配列番号 4 のアミノ酸配列と、少なくとも約 7 5 % , より好ましくは少なくとも約 8 0 % , より好ましくは少なくとも約 8 5 % , より好ましくは少なくとも約 9 0 % もしくは 9 5 % および最も好ましくは少なくとも約 9 7 % , 9 8 % もしくは 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域；および / または配列番号 3 のアミノ酸配列と、少なくとも約 7 5 % , より好ましくは少なくとも約 8 0 % , より好ましくは少なくとも約 8 5 % , より好ましくは少なくとも約 9 0 % もしくは 9 5 % および最も好ましくは少なくとも約 9 7 % , 9 8 % もしくは 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域を含む。

40

**【 0 0 6 3 】**

実質的に相同的な配列の他の好ましい例は、開示したアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換

50

を含む配列である。

【0064】

実質的に相同な配列の他の好ましい例は、開示した1つ以上のCDR領域において、1個、2個または3個、好ましくは1個または2個のアミノ酸を変えた配列を含む配列である。このような変更は、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換であっても、それらを混合したものであってもよい。

【0065】

このようなすべての態様において、好ましい変更は、保存的アミノ酸置換である。

【0066】

すべての態様において、実質的に相同な配列を含む抗体は、VEGFに対する結合能を保持している。

【0067】

軽鎖CDR3ドメインでの変更が考えられる本発明の他の態様において、該CDRの8番目のL残基は変更せずに保持されることが好ましい。

【0068】

本発明の他の態様は、本発明の抗体、本発明のVHもしくはVL領域、または本発明の1つ以上のCDRを含み、かつVEGFに結合する結合タンパク質を提供する。好ましい態様において、このような結合タンパク質は抗体である。

【0069】

本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む重鎖可変領域の少なくとも1つおよび3つのCDRを含む軽鎖可変領域の少なくとも1つを含む。これらCDRの典型的かつ好ましい配列は、本明細書に記載されている。

【0070】

本明細書で用いられる「VEGF」という簡潔な用語は（特に明記しない、またはこの科学用語から明らかではない限り）、血管内皮増殖因子-A（VEGF-A）を意味するものであり、これは血管透過因子（VPF）としても知られている。

【0071】

特にVEGFが哺乳動物種全体にわたって保存されていることから、「VEGF」は任意の型のVEGFも意味する。このように、本発明の抗体または抗体断片は、例えば、ヒト、サル、畜牛（ウシ）、マウス、ラット、ハムスター、フェレット、モルモットおよび/またはウサギのVEGFに結合できる。本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトVEGFに結合することが好ましい。好ましい特定の態様において、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびマウスVEGFに結合する。

【0072】

本発明の抗体または抗体断片に係る文脈において、本明細書で用いられる「VEGFと結合する～」という用語は、下記(a)～(l)の1つ以上；好ましくは下記(a)～(l)の1つより多くの；および最も好ましくは下記(a)～(l)のすべてのことをすることができるヒト抗体または抗体断片を意味する：

(a) ウエスタンプロットでVEGFに対する結合によって評価するとおり、立体配座に依存しないVEGFエピトープに結合する；

(b) 遊離VEGF、または固体支持体上のVEGFに結合する；

(c) 少なくともヒトVEGFおよびマウスVEGFに結合する；

(d) VEGF受容体のVEGFR2（KDR/Flik-1）に対するVEGFの結合を有意に阻害または有意に減少する；

(e) VEGF受容体のVEGFR1（Flt-1）に対するVEGFの結合を有意に阻害しないか、または有意に減少しない；

(f) VEGFに誘導される、VEGFR2のリン酸化を阻害、好ましくは有意に阻害する；

(g) VEGFに誘導される血管透過を阻害、好ましくは有意に阻害する；

(h) VEGFに媒介される内皮細胞増殖を阻害、好ましくは有意に阻害する

10

20

30

40

50

;

( i ) 血管新生を阻害、好ましくは有意に阻害する；  
 ( j ) リンパ管形成を阻害、好ましくは有意に阻害する；  
 ( k ) V E G F R 1 を発現している破骨細胞や軟骨吸収細胞などの細胞に対する、V E G F R 1 に媒介される刺激または活性化を有意に阻害しない；および／または  
 ( l ) 血管が新生された腫瘍を患う動物への投与において、腫瘍血管系および／または腫瘍間質に局在する。

## 【 0 0 7 3 】

最も好ましくは、本発明のヒト抗体または抗体断片は、V E G F 受容体のV E G F R 1 ( F 1 t - 1 ) に対するV E G F 結合を有意に阻害することなく、V E G F 受容体のV E G F R 2 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対するV E G F 結合を有意に阻害するものである。 10

## 【 0 0 7 4 】

従って、本発明は、V E G F R 2 受容体に対するV E G F 結合を特異的に阻止する、または本質的にV E G F R 2 受容体のみに対するV E G F 結合を阻止するヒト抗体を提供する。このようなヒト抗体は、V E G F R 1 受容体 ( F 1 t - 1 ) に対するV E G F 結合を有意に阻害することなく、V E G F R 2 受容体 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対するV E G F 結合を有意に阻害する。よって、このようなヒト抗体は、V E G F R 2 受容体 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対するV E G F 結合を阻害し、V E G F R 1 受容体 ( F 1 t - 1 ) に対するV E G F 結合を実質的には阻害せず、インビボで抗血管新生効果および抗腫瘍効果を示し、破骨細胞または軟骨吸収細胞の機能などの、V E G F R 1 に媒介される事象は有意に阻害しない。 20

## 【 0 0 7 5 】

このように本発明のヒト抗体は、「V E G F R 2 - ブロッキング、V E G F R 1 - 非ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体」と簡潔に称される。より簡潔には、それらは「V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体」と称され、本発明のすべての組成物、使用および方法に関して簡単にするために用いられる。「V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体」は、V E G F R 2 受容体に対するV E G F 結合を阻止するV E G F に対するヒト抗体である。このような抗体がV E G F R 2 受容体自体に対する抗体でないことは明白である。 30

## 【 0 0 7 6 】

従って、本発明を踏まえて、様々なV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体は、V E G F R 1 受容体を介したV E G F シグナル伝達を阻害することなく、そしてそれに関連する著しい副作用および欠点をともなわずに、血管新生を阻害し、ならびに血管新生疾患および腫瘍を治療する態様を含む、様々な態様で使用し作製することができる。 30

## 【 0 0 7 7 】

特定の態様において、本出願は、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体の候補を生み出す方法論、およびその候補プールから、V E G F R 2 - ブロッキングに特異的な抗体を実際に同定するのに必要なアッセイの所定の技術的側面に対する方法論をさらに記載している。 40

## 【 0 0 7 8 】

本出願全体にわたって用いられる、「a」および「a n」という用語は、上限がその後に具体的に記載されている場合を除いて、「少なくとも1つ[at least one]」、「少なくとも第一の[at least a first]」、「1つ以上の[one or more]」もしくは「複数の[a plurality]」言及する成分または段階という意味で使用する。従って、「抗体」は、本明細書で用いられる「少なくとも第一の抗体」を意味する。任意の单一薬剤の量とともに組合わせる実施可能な限度およびパラメータは、本発明の開示を考慮して当業者に知られる。 40

## 【 0 0 7 9 】

「V E G F 受容体のV E G F R 2 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対するV E G F 結合を特異的に阻害する」本発明のヒト抗体は、競合アッセイおよび／または機能分析により同定す 50

ことができる。好ましいアッセイは、簡単にするために、ELISAに基づく競合アッセイである。競合アッセイにおいて、量を変えた試験抗体（例えば、モル濃度で100倍～1000倍過剰、例えば、モル濃度で500倍または750倍過剰）を用いて、ある抗体をVEGFと前混合または混合し、該試験抗体の、VEGFR2に対するVEGF結合の減少能を測定する。VEGFを予め標識し直接検出するか、または（二次）抗VEGF抗体もしくは二次および三次抗体検出システムを用いて検出することができる。このようなELISA型の競合アッセイは、好ましい型ではあるが、任意のタイプの免疫競合アッセイも実施することができる。

#### 【0080】

まったく無関係な抗体（非ブロッキング抗VEGFモノクローナル抗体を含む）存在下のVEGFR2に対するVEGF結合は、このような競合アッセイにおいて、対照の値が高い（100%）。試験アッセイにおいて、試験抗体存在下で、VEGFR2に対するVEGF結合を有意に減少させることは、試験抗体が、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を有意に阻害することを示す。10

#### 【0081】

有意な減少とは、「再現性がある」、すなわち一貫して観察される、結合の減少である。本出願に関する「有意な減少」は、抗体のモル濃度がVEGFに対して約100倍～約1000倍（例えば、約500倍や約750倍など）過剰の任意の量で（VEGFR2に対するVEGF結合を）、再現性よく少なくとも約50%，約55%，約60%または約65%減少させることとして定義される。別の見地から、50%（100%の対照値と比較した場合）未満のシグナルが、結合を有意に阻害すると見なされる。20

#### 【0082】

本発明の好ましい特徴は、提供するヒト抗体がVEGFR1に対するVEGF結合を実質的にまたは有意に阻害、減少または防止しないということである。VEGFR2に対するVEGF結合の適度に有意な減少を示すヒト抗体は、該抗体がVEGFR1に対するVEGF結合を実質的に阻害しない限り、なお有用である。そうではあるが、より好ましい抗体は、VEGFR2に対するVEGF結合をより有意に阻害することができるものである。これらの抗体は、そのモル濃度がVEGFに対して約100倍～約1000倍（例えば、約500倍や約750倍など）過剰の任意量で、VEGF結合を再現性よく少なくとも約70%，約75%または約80%に減少させることができるものである。本発明の実施に必要とはされないが、VEGFR2に対するVEGF結合を少なくとも約85%，約90%，約95%またはそれより高い確率で減少させる抗体は、決して排除されるものではない。30

#### 【0083】

VEGF受容体のVEGFR1（F1t-1）に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を阻害する、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片は、VEGFR1を用いざとも上述したような単純な競合アッセイにより容易に確認される。

#### 【0084】

有意な阻害または減少がないことは、「再現性がある」、すなわち、一貫して観察される、「結合の実質的な維持」である。本出願に関する「結合の実質的な維持」は、抗体のモル濃度がVEGFに対して約100倍～約1000倍過剰の任意量で（VEGFR1に対するVEGF結合を）、再現性よく少なくとも約60%，約75%，約80%または約85%維持することとして定義される。40

#### 【0085】

VEGFR1に対するVEGF結合を実質的に阻害しないヒト抗体を用いる意図は、VEGFR1に媒介される生物学的機能を維持することである。従って、生物学的反応がVEGFに誘導されるように、VEGFR1に対するVEGF結合を充分に維持するだけ抗体を必要とする。そうではあるが、より好ましい抗体は、VEGFR1に対するVEGF結合をより有意に維持できるものである。これらの抗体は、そのモル濃度がVEGFに対50

して約100倍～約1000倍過剰の任意量で、VEGFR1に対するVEGF結合を再現性よく少なくとも約88%，約90%，約92%，約95%または約98～99%のレベルで維持することができるものである。

#### 【0086】

VEGFR2に対するVEGF結合をより実質的に阻害するヒト抗体が、VEGFR1への結合における多くの減少を許容し得ることが理解されよう。同様に、抗体がVEGFR2に対するVEGF結合を適度に減少させる場合、VEGFR1に対する結合の維持はより厳しく追求されなければならない。

#### 【0087】

ある抗体がVEGF受容体のVEGFR2(KDR/F1k-1)に対するVEGF結合を阻害することを同定および/または確認するための他の好ましい結合アッセイは共沈アッセイである。共沈アッセイは、溶液中1つ以上の受容体に対するVEGFの結合を抗体が阻止できるかを試験するものである。このようなアッセイにおいて、VEGFまたは検出可能な標識がされたVEGFは、好適な形態の受容体とともにインキュベートされる。10

#### 【0088】

免疫沈降または共沈アッセイを実施するための型は多々存在する。本発明の場合、「好適な形態の受容体」は、問題としているVEGFR2受容体であっても、該受容体の細胞外ドメインであってもよい。この場合、免疫沈降は、標準試薬と共に、VEGFR2受容体またはVEGFが結合する部位とは別の、該受容体の細胞外ドメイン上のエピトープに対する抗体の存在を必要とする。本発明は、「好適な」形態の他のVEGF受容体、すなわち、Fc抗体部に関連した受容体の細胞外ドメインを提供する。このような受容体/Fc構造物は、プロテインAをベースにした組成物などの有効な免疫沈降組成物とともにインキュベートすることによって沈降させることができる。20

#### 【0089】

好適な受容体とは関係なく、免疫沈降または共沈アッセイは、対照を用いて実施することが好ましい。選択した受容体にVEGFが単独で結合できることは、抗VEGF抗体の非存在下で沈殿することで確認されなければならない。好ましくは、対照として作用する、公知の結合特性を有する抗体の有無で、インキュベートを並行して実施する。最も好ましくは、ブロッキング対照抗体および非ブロッキング対照抗体の両方を用いるアッセイを並行して行なう。30

#### 【0090】

任意に結合した免疫学的種は、例えば、プロテインA組成物またはプロテインAセファロースビーズなどの有効な免疫沈降組成物とインキュベートすることによって、その結果、免疫沈降する。沈殿物は、その後、VEGFが存在するか試験する。最初のインキュベートでのVEGFが、放射性標識したVEGFなどの検出可能な標識がされたVEGFである場合、免疫沈降物中のいかなるVEGFも直接検出ができる。免疫沈降物中の任意の非標識VEGFは、例えば、ゲル分離および抗VEGF抗体を用いた免疫検出などの他の好適手段により検出することができる。

#### 【0091】

このような共沈アッセイにおいて、ヒト抗体がVEGFR2などのVEGF受容体に対するVEGF結合を阻止できることは、定性的な結果も有益ではあるが、容易に定量化することができる。定量化は、標識VEGFの直接測定によって、または、例えば、免疫検出されたVEGFの濃度[densitometric]分析によって達成することができる。このように、VEGFR2に対するVEGF結合を再現性よく(すなわち、一貫して観察されて)阻害することができる抗体は検出することができ、そして有用な抗体は、上述した定量的基準に従って選択することができる。40

#### 【0092】

VEGF受容体のVEGFR1(F1t-1)に対するVEGF結合を有意に阻害しないヒト抗VEGF抗体も、VEGFR2よりむしろVEGFR1を用いる以外、上述した50

のような共沈アッセイを実施して容易に同定することができる。従って、VEGF受容体のVEGFR1(F1t-1)に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2(KDR/F1k-1)に対するVEGF結合を阻害する抗VEGF抗体も、このような方法を用いて容易に同定することができる。

#### 【0093】

本出願は、ヒト抗体がVEGF受容体のVEGFR2(KDR/F1k-1)に対するVEGF結合を有意に阻害することを同定および/または確認するための様々な機能分析も提供する。これらは通常、ある特定の生物学的反応の原因となる受容体としてのVEGFR2の同定に関連する。上述の競合型アッセイ(無細胞系で実施する)が最も再現性よく、信頼でき、労力を節約し、そして費用効率が高いにもかかわらず、以下のアッセイも本発明の文脈において有用である。

10

#### 【0094】

例えば、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、VEGFに媒介される血管内皮細胞増殖を阻害(VEGFのマイトジエン活性を阻害)できるか試験することで同定することができる。任意の好適な分析も、VEGF存在下の試験抗体の有無で、様々な血管内皮細胞のいずれかを用いて、利用することができる。好ましくは、例えば、VEGFなしのアッセイおよび特定の特性(ブロッキングおよび非ブロッキングの両方)を有する対照抗体を用いたアッセイなど、二重のアッセイを並行して実施する。内皮細胞増殖は、比色分析を含む、細胞数を測定する任意の許容し得る手段によって決定、好ましくは正確に定量化することができる。

20

#### 【0095】

VEGFに媒介される内皮細胞増殖を阻害することができるヒト抗体は、通常、約25%、30%、35%、40%、45%または50%程度の、VEGFに媒介される内皮細胞増殖の阻害が一貫して観察される。このような範囲の阻害は、抗体がインビボで血管新生を阻害するのに充分な特性を有することを示す。より有意な阻害活性を有する抗体も、本発明から排除されない。

20

#### 【0096】

本発明のヒト抗体を同定するさらなる機能分析は、VEGFに誘導されるリン酸化のブロッキングを試験するアッセイである。任意の好適なアッセイも、野生型または組換え型の、リン酸化可能なVEGFR2の任意の型を発現する様々な内皮細胞のいずれかを用いて、利用することができる。試験する抗体の有無で、細胞をVEGFとともに好適な時間インキュベートする。好ましくは、例えば、VEGFなしのアッセイおよび特定の特性(ブロッキングおよび非ブロッキングの両方)を有する対照抗体を用いたアッセイなど、二重のアッセイを並行して実施する。

30

#### 【0097】

VEGFに誘導される、VEGFR2のリン酸化は、任意の許容し得る手段によって決定、好ましくは正確に定量化することができる。通常、VEGFR2は、さらなる分析のために免疫沈降する。VEGFR2のリン酸化の度合いは直接決定することができ、例えば、細胞を<sup>32</sup>P標識ATPとともにインキュベートして、免疫沈降したVEGFR2中の<sup>32</sup>Pを直接定量化することができる。好ましくは、免疫沈降したVEGFR2は、例えば、ゲル分離およびリン酸化チロシン残基に結合する抗体を用いた免疫検出などの他の手段によって分析される。VEGFに誘導される、VEGFR2のリン酸化を阻害することができるヒト抗体は、通常、リン酸化されたVEGFR2のレベルの減少が一貫して観察される。

40

#### 【0098】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を同定するさらなる機能分析は、VEGFに誘導される血管透過性の阻害を試験するアッセイである。このような任意のアッセイを用いることができるにもかかわらず、特に好適なアッセイはマイルス[Miles]透過性アッセイであり、モルモットのような動物に染料(エバンスブルー色素など)を注射し、試験抗体の有無でVEGFを供給した後、その動物の皮膚に染料が現れること

50

で決定する。好ましくは、例えば、VEGFなしのアッセイおよび特定の特性（ブロッキングおよび非ブロッキングの両方）を有する対照抗体を用いたアッセイなどの研究を二重に並行して実施する。動物の皮膚における染料は、典型的には、動物の背部に青色の斑点などのように点の外観として現れ、撮影し測定することができる。

【0099】

VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、その阻害が低濃度で（例えば、該抗体のモル濃度がVEGFに対して約100倍または約1000倍過剰で与えられ場合など）一貫して観察されるように、VEGFに誘導される血管透過を阻害する。VEGFR2に対するVEGF結合を阻止しない抗体は、VEGFに誘導される血管透過のいかなる有意な阻害も示さない。通常、VEGFに誘導される透過性を高濃度（モル濃度がVEGFに対して10倍過剰など）のみで阻止する抗体は、本発明に従う特性を有する抗体ではない。

10

【0100】

血管新生および、それ故に、抗血管新生剤の広く許容し得る機能分析は、新血管形成の角膜マイクロポケットアッセイおよびニワトリ漿尿膜（CAM）アッセイである。角膜マイクロポケットアッセイおよびCAMアッセイが、極めて広い範囲の血管新生疾病の治療に用いるための薬剤を同定するために充分に予測することを示すために、米国特許第5,712,291号を参照により本明細書に特に援用される。

【0101】

CAMアッセイを記載するために、米国特許第5,001,116号も参照により本明細書に特に援用される。基本的に、受精したニワトリ胚を3または4日目に卵殻から取り除き、試験化合物を含むメチルセルロースディスクを漿尿膜上に挿入する。この胚を約48時間後に検査し、明瞭な無血管区域がメチルセルロースディスク周辺に現れる場合に、その区域の直径を測定する。このために参照により本明細書に特に援用される米国特許第5,712,291号に開示されているように、本発明の文脈において、いかなる無血管区域の出現も、抗血管新生抗体の証拠とするのに充分である。その区域がより大きいほど、この抗体はより有効である。

20

【0102】

新血管形成の角膜マイクロポケットアッセイは、ラットまたはウサギ角膜を用いて実施することができる。このインビボのモデルは、米国特許第5,712,291号および第5,871,723号（それぞれ証拠とするため、参照により本明細書に特に援用される）により証明されるように、臨床的有用性を予測するものとして広く受け入れられている。本発明と特に関連するとは考えられないことだが、角膜アッセイはCAMアッセイより好ましい。なぜなら通常、それ自体不活発であるが、代謝されて活性化合物を産生する化合物を認識するからである。

30

【0103】

本発明において、角膜マイクロポケットアッセイは、抗血管新生剤を同定するために用いられる。角膜内の血管数において、一貫して観察される減少、好ましくは著しい減少により表されるように、これは血管新生の有意な減少により証明される。検体と接触した場合、継続した増殖の証拠とはならない偶発的な発芽および/またはヘアピンループのみを示す角膜として、このような反応を定義することが好ましい。

40

【0104】

クレームされている本発明は、本明細書ならびに容易に利用できる技術的参考、ノウハウおよび出発材料に従い実施可能である。

【0105】

本発明の特定の好ましい態様は、従って、少なくとも第一の本発明のヒト抗VEGF抗体、またはその抗原結合断片を含む組成物である。

【0106】

VEGF受容体のVEGFR2（KDR/Flik-1）に対するVEGF結合を特異的に阻害するヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片；およびVEGF受容体のVEG

50

F R 1 ( F 1 t - 1 ) に対する V E G F 結合を有意に阻害することなく、 V E G F 受容体の V E G F R 2 ( K D R / F 1 k - 1 ) に対する V E G F 結合を阻害する抗 V E G F 抗体またはその抗原結合断片は、本発明の他の側面を形成する。

#### 【 0 1 0 7 】

特性の所望する組合せを有するヒト抗体は、上記の受容体競合、 E L I S A , 共沈および／または機能分析の 1 つ以上またはそれらの組合せによって容易に同定することができる。 V E G F R 2 に対する V E G F 結合を一貫して有意に減少させ、かつ V E G F R 1 に対する V E G F 結合を一貫して有意に阻害しない抗体の定量的評価に関するガイドンスは、上記の通りである。

#### 【 0 1 0 8 】

r 8 4 は、そのモル濃度が V E G F に対して 1 0 0 倍および 5 0 0 倍過剰で、それぞれ約 1 1 % および 2 % まで、 V E G F R 2 で被覆した E L I S A のウェルと結合した V E G F 量を減少させることを本明細書で示している。これらのデータは、それぞれ約 8 9 % および約 9 8 % の V E G F R 2 に結合する V E G F の減少と同等に見なされる。 r 8 4 は、そのモル濃度が V E G F に対して 1 0 0 倍および 5 0 0 倍過剰で、それぞれ約 9 4 % および 8 4 % で、 V E G F R 1 で被覆した E L I S A のウェルと結合した V E G F 量を維持することを本明細書で示している。モル濃度が V E G F に対して 1 0 0 0 倍過剰であっても、 r 8 4 は、約 6 5 % で V E G F R 1 に対する V E G F 結合を維持する。 V E G F R 2 に対する V E G F 結合をより実質的に阻害する抗体が、 V E G F R 1 に対する結合におけるより多くの減少を許容できるものと再び理解される。同様に、 V E G F R 2 に対する V E G F 結合が適度に減少する抗体を用いる場合、 V E G F R 1 に対する結合がより厳しく追求されるべきである。このように、 2 つの値の「相対的な」違いが重要であると認められる。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 0 9 】

本明細書で定義される本発明のヒト抗体もしくはその一部もしくは断片をコードする核酸配列を含む核酸分子、またはそれと実質的に相同な核酸分子は、本発明のさらなる側面を形成する。好ましい核酸分子は、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは配列番号 2 0 でコードされる配列）を含む。他の好ましい核酸分子は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する重鎖をコードする配列（好ましくは配列番号 2 2 でコードされる配列）および配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖をコードする配列（好ましくは配列番号 2 3 でコードされる配列）を含む。

#### 【 0 1 1 0 】

他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の I g G 型またはマウスのキメラ型、例えば、実施例 6 に記載される型をコードする配列を含む。

#### 【 0 1 1 1 】

上記のように、本発明に包含される他の核酸分子は、本発明のヒト抗体の一部もしくは断片をコードするもの、例えば、抗体の重鎖をコードするもの（例えば、配列番号 2 2 などのように、配列番号 2 4 をコードするもの）または抗体の軽鎖をコードするもの（例えば、配列番号 2 3 などのように、配列番号 2 5 をコードするもの）である。他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の V H 領域をコードするもの（例えば、配列番号 1 もしくは配列番号 2 6 などのように、配列番号 3 をコードするもの）である。他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の V L 領域をコードするもの（例えば、配列番号 2 もしくは配列番号 2 7 などのように、配列番号 4 をコードするもの）である。

#### 【 0 1 1 2 】

このように、本明細書で定義される本発明の抗体の断片、もしくはそれと実質的に相同な配列、またはこのような断片をコードする配列を含む核酸分子も、本発明のさらなる側面を形成する。

#### 【 0 1 1 3 】

都合の良いことに、本発明の抗体は、 I g G 型である場合、 V E G F に対して高い結合親和性を有し、すなわち、  $1 \times 1 0^{-8} M$  以下の範囲の K d を有する。重要なことに、この

のような親和性を有する抗体は、治療に有用であることを示され、実証された範囲にある。本発明の抗体は、IgG型である場合、好ましくは、20n, 15nMまたは10nM未満のKd、より好ましくは、10, 9.5, 9, 8.5, 8, 7.5, 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5または1nM未満のKdに対応する、VEGF（好ましくは、ヒトVEGF）に対する結合親和性を有する。例えば、本発明の抗体の結合親和性が、IgG型である場合、 $6.7 \times 10^{-9}$ M以下であってもよく、例えば、約 $7 \times 10^{-9}$ Mもしくは約 $6 \times 10^{-9}$ M、または $6.7 \times 10^{-9}$ Mなどである。Kdを決定する適切な任意の方法を用いることができる。しかしながら、Kdは、飽和曲線を規定する（例えば、ラインウェイバー-バーク方法を用い、好ましくは、Biacore 3000 Evaluationソフトウェアの1:1の結合モデルなどのような、市販の結合モデルソフトウェアを用いる）ためにインピトロで様々な濃度の抗原（VEGF）に対する試験抗体の様々な濃度を試験することによって決定することが好ましい。好適なアッセイは、説明のため実施例5に記載している。Kdは、固体担体（例えば、Biacoreチップ）上に抗原（VEGF）を固定し、抗原に対する抗体の結合を評価することで決定することが好ましい。結合親和性は、室温（例えば、25の温度）で評価することが好ましいが、他の温度、例えば37（例えば体温）で評価することもできる。

10

#### 【0114】

本明細書の他で述べられるように、本発明の好ましい抗体は、ヒトVEGFおよびマウスVEGFの両方に結合する。これは、前臨床研究から最も効率的に臨床使用に移行できる重要な利点である。例えば、本発明の抗体がヒトVEGFおよびマウスVEGFの両方に結合できることは、このような抗体が両方の同系腫瘍モデルおよび異種移植腫瘍モデルの両方を用いる前臨床研究で試験できることを意味する。マウスVEGFに結合しない抗体は、同系マウスモデルで用いることができない。

20

#### 【0115】

加えて、マウスおよびヒトVEGFの両方に結合できることは、異種移植マウスモデルでの本発明のこのような抗体により示される結果が、ヒト対象における抗体の活性を代表すると思われることを意味する。この理由は、マウスVEGFではなくヒトVEGFに結合できる抗体（例えば、アバストンや2C3など）が、マウスモデルのヒト腫瘍細胞により産生されたVEGFには結合するが、内因性マウスVEGFには結合することができないことによる。これは、腫瘍により産生されたVEGFおよび内因性VEGFが存在するヒト患者の状況とはもちろん異なる。

30

#### 【0116】

このような状況に欠点があるとすれば、マウスVEGFではなくヒトVEGFに結合する抗体がマウス異種移植モデルにおいては充分に実施することができるが、該抗体がさらに多くのVEGFが存在するヒト体の仕組みにおいては類似の実施によっても反映されないかもしれないことである。換言すれば、マウスVEGFではなくヒトVEGFに結合できる抗体を有するマウス異種移植系に見られる抗腫瘍効果は、臨床治療の現実より良好に見えるかもしれない。対照的に、あなたがヒトおよびマウスVEGFの両方に結合できる抗体とともに機能している場合、該抗体がヒトに入れられると、該抗体がマウスモデル系に存在するVEGFのすべての型に結合し、この状況をより代表しそうである。

40

#### 【0117】

本発明に従う、組成物、免疫抱合体、医薬、組み合わせ、カクテル、キット、第一および第二医薬用途ならびにすべての方法に係る以下の記載において、「抗体」および「免疫抱合体」という用語、または抗体結合領域もしくはその断片は、特に明記しない、または科学用語から明らかでない限り、特異的なr84抗体と同様にVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の範囲に言及する。

#### 【0118】

本明細書で用いられる、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含み、ヒト抗原結合領域を含む任意の免疫学的結合

50

剤または分子に広く言及する。重鎖の定常ドメインのタイプに応じて、抗体全体は、5つの主要なクラス：IgA, IgG, IgE, IgGおよびIgMのうちの1つに属する。これらのいくつかは、例えばIgG1, IgG2, IgG3, IgG4などのようなサブクラスまたはアイソタイプにさらに分けられる。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ<sup>10</sup>, <sup>20</sup>, <sup>30</sup>, <sup>40</sup>およびμと称される。免疫グロブリンの種々のクラスのサブユニット構造および3次元構成は周知である。

#### 【0119】

通常、抗原結合領域よりむしろ抗体全体が本発明で用いられる場合、IgGおよび/またはIgMが生理的状況において最も一般的な抗体であるから、それらが研究室環境において最も容易に作製できるから、IgGおよび/またはIgMが好ましい。

10

#### 【0120】

哺乳動物抗体の「軽鎖」は、2つの明瞭に異なったタイプ：カッパ(κ)およびラムダ(λ)のうちの1つに属し、定常ドメインのアミノ酸配列および可変ドメインのフレームワーク領域のいくつかのアミノ酸に基づく。本発明の抗体において、<sup>10</sup>または軽鎖定常領域を使用することは基本的に好まれるものではない。

#### 【0121】

当業者に理解されるように、「抗体」という用語で包含される免疫学的結合試薬は、抗体全体、二量体、三量体および多量体抗体；二重特異性抗体；キメラ抗体；組換え型抗体および改変抗体ならびにその断片を含む、すべてのヒト抗体および抗原結合断片に拡張される。<sup>20</sup>

20

#### 【0122】

「抗体」という用語は、このように、抗原結合領域を有する任意のヒト抗体様分子に言及するために用いられ、この用語は、例えば、Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>、単一ドメイン抗体[single domain antibody] (DAB), TandAb二量体, Fv, scFv(单鎖Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, 直線状抗体, minibody, diabodyまたは二重特異性抗体断片などの抗原結合領域を含む抗体断片を含む。

#### 【0123】

さまざまな抗体をベースとした構造物および断片を調製、使用する技術は、当該技術分野において周知である(Kabat et al., 1991を参照。この参照により本明細書に特別に援用される)。diabodyは、特に、EP 404,097およびWO 93/11161にさらに記載され；一方、直線状抗体はさらにZapata et al.(1995)に記載されている。<sup>30</sup>

30

#### 【0124】

抗体は、従来技術を用いて断片化できる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片は、抗体をペプシンで処理することで生成できる。その結果生じるF(ab')<sub>2</sub>断片は、ジスルフィド架橋を還元する処理をしてFab'を产生することができる。パパイン消化は、Fab断片を形成することができる。Fab, Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAb, TandAb, ds-scFv, 二量体, minibody, diabody, 二重特異性抗体断片ならびに他の断片も組換え技術により合成または化学合成することができる。抗体断片を作製する技術は、当該技術分野において周知かつ文書化されている。例えば、Beckman et al., 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall et al., 2004; Reff & Heard, 2001; Reiter et al., 1996; および Young et al., 1995のそれぞれでさらに記載され、有効な抗体断片の作製を可能にする。<sup>40</sup>

40

#### 【0125】

ヒト抗体または抗体断片は、天然に作製することも、全部または一部を化学的に作製することもできる。このように、抗体は、例えば組換え供給源などの任意の適切な供給源からであっても、および/またはトランスジェニック動物もしくはトランスジェニック植物、またはIgY技術を用いた卵で產生させてもよい。このように、抗体分子は、インビトロまたはインビボで作製することができる。

#### 【0126】

好ましくは、ヒト抗体または抗体断片は、3つのCDRドメインを含む抗体軽鎖可変領

50

域 ( $V_L$ ) および 3 つの CDR ドメインを含む抗体重鎖可変領域 ( $V_H$ ) を含む。該  $V_L$  および該  $V_H$  は、通常、抗原結合部位を形成する。

#### 【0127】

「Fv」断片は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小限の抗体断片である。この領域は、堅固だが共有結合ではない会合で 1 つの重鎖可変ドメインと 1 つの軽鎖可変ドメインとの二量体を有する。各可変ドメインの 3 つの超可変領域 (CDR) が  $V_H$  -  $V_L$  二量体表面上の抗原結合部位を規定するために相互作用することは、この立体配置にある。6 つの超可変領域 (CDR) は、共同で、抗体に対して抗原結合の特異性を与える。

#### 【0128】

しかしながら、抗体の軽鎖可変ドメインからの 3 つの CDR および重鎖可変ドメインからの 3 つの CDR が存在することは抗原結合のために必要でないことは、当該技術分野において、文書で充分に裏付けられている。このように、上記の古典的な抗体断片より小さい構造物が効果的なことは公知である。

#### 【0129】

例えば、ラクダ科の動物抗体 (Hamers-Casterman et al., 1993; Arbabi Ghahroudi et al., 1997) は、広範囲な抗原結合レパートリを有するが、軽鎖が欠けている。また、 $V_H$  ドメイン単独 (Ward et al., 1989; Davies および Riechmann, 1995) または  $V_L$  ドメイン単独 (van den Beucken et al., 2001) を含む单一領域抗体の結果は、これらのドメインが、許容し得る高い親和性で抗原に結合できることを示している。このように、3 つの CDR は効率的に抗原と結合できる。

#### 【0130】

単一の CDR または 2 つの CDR が効率的に抗原と結合できることも公知である。第一の例として、単一の CDR が異種タンパク質に挿入され、該異種タンパク質に抗原結合能を与えることができ、異種タンパク質 (GFP など) に挿入された  $V_H$  CDR 3 領域が該異種タンパク質に抗原結合能を与えることを示すことで実証されている (Kiss et al., 2006; Nicaise et al., 2004)。

#### 【0131】

2 つの CDR が効率的に抗原と結合することができ、親抗体が所有するより優れた特性を与えることすらさらに公知である。例えば、親抗体 ( $V_H$  CDR 1 および  $V_L$  CDR 3 領域) からの 2 つの CDR は、親分子の抗原認識特性を保持するが、親分子よりも腫瘍透過能に優れていることが示されている (Qiu et al., 2007)。野生型の親抗体と類似の方法で CDR の方向を合わせるために、これらの CDR ドメインを適切なリンカー配列で (例えば、 $V_H$  F R 2 から) 繋ぐことによって、さらにより良好な抗原認識を生じさせた。従って、親抗体で見出された配座を維持するために適切なフレームワーク領域によって方向を合わせた 2 つの CDR ドメイン (好ましくは、 $V_H$  ドメインから 1 つおよび  $V_L$  ドメインから 1 つ、より好ましくは、CDR 3 ドメインである 2 つの CDR ドメインのうち 1 つを有する) を含む抗原結合性抗体の模擬薬を構築することが可能であることは、当該分野において公知である。

#### 【0132】

このように、本発明の好ましい抗体が 6 つの CDR 領域 (軽鎖から 3 つおよび重鎖から 3 つ) を含んでもよいにもかかわらず、6 つ未満の CDR 領域を有する抗体、およびわずか 1 つのまたは 2 つの CDR 領域を有する抗体も本発明に包含される。加えて、重鎖または軽鎖のみからの CDR を有する抗体も考慮される。

#### 【0133】

$VEGF$  に結合する本発明の好ましい抗体は、3 つの CDR を含む重鎖可変領域の少なくとも 1 つおよび 3 つの CDR を含む軽鎖可変領域の少なくとも 1 つを含むものであり、該軽鎖可変領域は、下記 (a) ~ (c) :

(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同の配列を有する可変軽鎖 ( $V_L$ ) CDR 1,

10

20

30

40

50

(b) 配列番号9のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する  
VL CDR2, および

(c) 配列番号10のアミノ酸配列または該配列と実質的に相同的な配列を有する  
VL CDR3  
を含む。

**【0134】**

特異的な軽鎖CDR領域と組み合わせて用いる好ましい重鎖CDR領域は、本明細書の他で記載している。また一方で、本発明の軽鎖可変領域と組み合わせて用いる3つのCDRを含む他の重鎖可変領域も考慮する。本発明の軽鎖可変領域と組み合わせて用いることができ、かつVEGFと結合する抗体を生じさせるのに適切な重鎖可変領域は、当業者が容易に同定することができる。

10

**【0135】**

例えば、本発明の軽鎖可変領域は、単一の重鎖可変領域または重鎖可変領域のレパートリと組み合わせることができ、その結果得られた抗体をVEGFに結合するか試験する。種々の重鎖可変領域と本発明の軽鎖可変領域とのこのような組合せの妥当数が、VEGFとの結合能を保持すると期待される。このことは実際に、抗体のVLドメインが様々な異なるVHドメインと組み合わせられ、そしてVEGF結合能を依然として保持することが示されている、本発明の好ましい抗体(r84/PGN311)を用いて証明されている。これら実験において、r84抗体のVLドメインと組み合わせて試験された7つのうち3つのVHドメインがVEGFに有意に結合することが示された。これは、極めて合理的な比率であって、本発明の抗体の軽鎖可変領域がVEGF結合特異性の決定にとりわけ重要であること、また本発明の軽鎖可変領域と組み合わせることができ、かつVEGFと結合する抗体を生じさせる他の重鎖可変領域が容易に同定できることの証拠となる。本発明の抗体の軽鎖可変領域と組み合わせて用いられるのに好ましい重鎖可変領域は、VEGFに結合すると知られている抗体もしくは抗体断片から得られたものか、または由来するものである。

20

**【0136】**

本発明の好ましい重鎖可変領域と組み合わせて用いる別の軽鎖可変領域を同定するために、類似の方法を用いることができる。

30

**【0137】**

特定の態様において、抗体または抗体断片は、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgMまたはIgDの定常領域などの重鎖定常領域の全部または一部を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域またはその一部である。さらによくは、抗体もしくは抗体断片は、全体または一部のカッパ軽鎖定常領域もしくはラムダ軽鎖定常領域、あるいはそれらの一部を含むことができる。このような定常領域の全部または一部は、天然から得られたものであっても、全体的または部分的に合成されたものであってもよい。このような定常領域の適切な配列は、当該分野において周知かつ文書化されている。重鎖および軽鎖の定常領域のすべてが本発明の抗体に含まれる場合、このような抗体は本明細書において、「完全長」抗体または抗体「全部」として一般的に言及される。

40

**【0138】**

Fc領域がADC CおよびCDCなどのエフェクタ機能を媒介する場合に、Fc領域を含む抗体は、特定の用途、特にインビボでの治療用途に好ましい。

**【0139】**

アミノ酸配列または核酸配列に関連して本明細書で用いられる「実質的に相同な」という用語は、開示されたアミノ酸配列または核酸配列と少なくとも70%または75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%または99%の配列同一性を有する配列を含む。本発明の実質的に相同な配列は、本発明の該配列に対して、单一または複数の塩基もしくはアミノ酸改変(付加、置換、挿入または欠損)をこのように含む。本発明の配列を構成するフレームワーク領

50

域の1つ以上および／またはCDRの1つ以上において、アミノ酸レベルで好ましい実質的に相同な配列は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのみ、好ましくは1つ、2つまたは3つのみ、より好ましくは1つまたは2つのみ改変したアミノ酸を含む。該改変は、保存的または非保存的アミノ酸を伴うことができる。該改変は、保存的アミノ酸置換が好ましい。

#### 【0140】

少なくとも中程度に厳しいハイブリダイゼーション条件下で、開示された核酸配列（もしくはこれらの相補配列）とハイブリダイズする核酸配列、例えば、本発明の軽鎖もしくは重鎖のCDRの1つ以上、本発明の軽鎖もしくは重鎖可変領域、または本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列（もしくはこれらの相補配列）とハイブリダイズする核酸配列も、この実質的に相同的な核酸配列に含まれる。

10

#### 【0141】

「実質的に相同な」という用語は、本発明のタンパク質または核酸分子と、実質的に同じやり方で実質的に同じ機能を果たす本発明のアミノ酸配列および核酸配列を修飾したもの、または化学的に等価なものも包含する。例えば、任意の実質的に相同的な抗体（またはそれをコードする実質的に相同的な核酸）は、VEGFに対する上記の結合能を保持しなければならない。好ましくは、任意の実質的に相同的な結合タンパク質は、問題になっている結合タンパク質によって認識されるのと同じVEGFのエピトープに対する特異的な結合能を保持しなければならず、例えば、本明細書に記載されているのと同じ、本発明のCDRドメインまたは本発明のVHおよびVLドメインに認識されるエピトープなどである。同じエピトープ／抗原に対する結合は、例えば、競合アッセイ等の結合アッセイなどの、当該分野で周知かつ文書化されている方法によって容易に試験することができる。

20

#### 【0142】

このように、「実質的に相同な」抗体が本発明の抗体および抗体断片と同じ結合特異性を有するか試験するために、結合アッセイを用いることができるこことを当業者は理解する。例えば、ELISAアッセイやBiacoreアッセイなどの結合アッセイが、このような「実質的に相同な」抗体がVEGFに結合できるか立証するために容易に用いることができる。後述するように、競合結合アッセイは、「実質的に相同な」抗体が、本発明の抗体に認識されるのと実質的に同じVEGFのエピトープに対する特異的な結合能を保持するか試験するために用いることができる。後述する方法は、好適な競合アッセイの一例のみである。当業者は、他の好適な方法および改変を知っている。

30

#### 【0143】

競合アッセイの例として、その濃度を様々に変えた試験抗体（例えば、実質的に相同的な抗体）の存在下、VEGFに対する様々な有効濃度の本発明の抗体による結合を評価することが挙げられる。そして、試験抗体に誘導される結合の阻害量を評価することができる。増大させた濃度で本発明の抗体との競合が増大することを示す試験抗体（すなわち、試験抗体濃度の増大が、VEGFに結合する本発明の抗体量の減少に対応する結果となる）は、実質的に同じエピトープに結合する証拠となる。好ましくは、試験抗体はVEGFに結合する本発明の抗体量を有意に減少させる。好ましくは、試験抗体はVEGFに結合する本発明の抗体量を少なくとも約80%減少させる。ELISAアッセイは、このような競合アッセイにおける結合の阻害を評価することに適切ではあるが、他の好適な技術も当業者に周知であるだろう。

40

#### 【0144】

本発明のタンパク質の実質的に相同的な配列としては、保存的アミノ酸置換が挙げられるが、これに限定されず、例えば、抗体のVH、VLまたはCDRドメインに及ばない改変（例えば、種々のリンカー配列が用いられるscFv抗体や、タグ配列または他の成分（抗原の結合に寄与しない）が付加した抗体など）や、抗体分子もしくは断片の1つのタイプまたは型を抗体分子もしくは断片の他のタイプまたは型に転換（例えば、FabからscFvへの転換またはその逆の転換など）する改変や、抗体分子の特定のクラスまたはサブクラスの抗体分子への転換（例えば、抗体分子のIgGまたはそのサブクラス（IgG

50

1 や I g G 3 等)への転換)などである。

【0145】

本明細書で用いられる「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有する他のアミノ酸残基と置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野において定義されており、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンなど)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸など)、非荷電の極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインなど)、非極性側鎖(例えば、グリシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンなど)、- 分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシンなど)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンなど)が挙げられる。

【0146】

相同性は、任意の簡便な方法によって評価することができる。しかしながら、配列間の相同性の度合いを決定するためには、配列の複数のアライメントを作成するコンピュータプログラムが有用であり、例えば、クラスタルW(Thompson et al., 1994)などである。必要に応じて、クラスタルWのアルゴリズムは、BLOSUM 62スコアリング・マトリックス(Henikoff および Henikoff, 1992)ならびに10のギャップ・オープニング・ペナルティおよび0.1のギャップ・エクステンション・ペナルティとともに用いることができ、その結果、より高いオーダーのマッチが、アライメントに含まれる2つの配列間の、一方の配列の全長の少なくとも50%が得られる。配列をアライメントするために用いることができる他の方法は、Needleman および Wunsch (1970) のアライメント方法であり、後にSmith および Waterman (1981) により修正された。これによると、最も高いオーダーのマッチが2つの配列間から得られ、同一のアミノ酸数が2つの配列間から決定された。2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージを算出する他の方法は、通常、当該技術分野で認められており、例えば、Carillo および Lipton (1988) によって記載されたもの、およびComputational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects に記載されたものが挙げられる。

【0147】

通常、コンピュータプログラムは、このような算出に使用される。ALIGN (Myers and Miller, 1988), FASTA (Pearson および Lipman, 1988; Pearson, 1990) およびギャップドBLAST (Altschul et al., 1997), BLASTP, BLASTN, またはGCG (Devereux et al., 1984) のような、対の配列を比較しアライメントするプログラムもこの目的に有用である。さらにまた、欧州バイオインフォマティクス研究所のDaliサーバは、タンパク質配列の構造をベースとしたアライメントを提供する(Holm, 1993; 1995; 1998)。

【0148】

参照点を提供するために70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%または99%の相同性や配列同一性などを有する本発明の配列は、デフォルト・パラメータによるALIGNプログラム(例えば、GENESTREAMネットワーク・サーバ(IGH, モンペリエ, フランス)においてインターネットで利用可能)を用いて決定することができる。

【0149】

「少なくとも中程度に厳しいハイブリダイゼーション条件」とは、溶液中の2つの相補核酸分子間に選択的なハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全部または一部に起こることができる。ハイブリダイゼーションする部分は、通常、ヌクレオチド長さの少なくとも15(例えば、20, 25, 30, 40または50)ヌクレオチドである。核酸二本鎖またはハイブリッドの安定性はTmで決定され、ナトリウムを含む緩衝液中のTmは、ナトリウムイオン

10

20

30

40

50

濃度と温度との関数 ( $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G+C) - 600/1)$  または類似の方程式) であることを、当業者は認識する。従って、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件のパラメータは、ナトリウムイオン濃度および温度である。公知の核酸分子と類似しているが同一でない分子を同定するために、1%のミスマッチは、 $T_m$ における約1%の減少という結果として評価することができる。例えば、>95%の同一性を有する核酸分子を探る場合、最終の洗浄温度は約5%減少させる。これらの留意事項に基づき、当業者は、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができるだろう。他の好ましい態様では、厳しいハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、厳しいハイブリダイゼーションを達成するために、以下の条件を採用することができる：上記方程式に基づき、 $T_m - 5$ °での、5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)/5×デンハルト溶液/1.0%のSDSのハイブリダイゼーション、それに続いて、60°での0.2×SSC/0.1%のSDSの洗浄。中程度に厳しいハイブリダイゼーション条件は、42°の3×SSC中の洗浄段階を含む。さらなる例として、「ハイブリダイゼーションする」配列は、厳しくない（例えば、室温で6×SSC, 50%ホルムアルデヒド）条件下で結合（ハイブリダイゼーション）し、低い厳しさ（例えば、室温で2×SSC、好ましくは、42°で2×SSC）またはより高い厳しさ（例えば、65°で2×SSC）の条件下で洗浄する配列である（ここで、SSC=0.15MのNaCl, 0.015Mのクエン酸ナトリウム, pH 7.2）。

10

20

## 【0150】

しかしながら、代わりの緩衝液、塩および温度を用いて、等価な厳しさを達成することができることが理解されている。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなるガイドラインは、以下から見つけることができる：Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6 および Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol.3。

## 【0151】

一般的に言えば、高い厳しさの状態でハイブリダイゼーションした配列が好まれるのは、コードの縮退を除けば、高い厳しさの条件下でハイブリダイゼーションした配列であるからである。

## 【0152】

他の好ましい態様において、第二世代[second generation]抗体が提供され、該抗体は、r84などの、元のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体と比較して特性が強化されかつ優れている。例えば、第二世代抗体は、強い結合親和性、VEGFR2に対するVEGF結合のより有効なブロッキング、VEGFR2に対するVEGF結合のほとんどないブロッキング、内皮細胞の、VEGFに誘導される増殖および/または遊走に対する強化された阻害能、VEGFに誘導される血管透過に対する優れた阻害能、ならびに、好ましくは、インビボでのVEGFに誘導される血管新生に対する増強された阻害能および血管化腫瘍を含む血管新生疾病に対する増強された治癒力を有することができる。

30

## 【0153】

有効な第二世代抗体を同定するために比較することは、例えば、本明細書に詳述されている様々なアッセイの1つ以上を用いて、容易に実施され、定量化される。強化された生物学的特性、すなわちr84抗体に例示される本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体と比較して少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、好ましくは少なくとも約50倍の活性を有する第二世代抗体も本発明に包含される。

40

## 【0154】

本発明の抗体、結合タンパク質および核酸分子が、ヒトもしくは動物の体内またはヒトもしくは動物に由来する組織検体にインシテュで存在してもよい任意の成分と区別される限り、これらは通常「単離された」または「精製された」分子である。しかしながら、この配列は、ヒトまたは動物の身体で発見されたような配列に一致または実質的に相同であ

50

つてもよい。このように、核酸分子または配列およびタンパク質またはポリペプチド（例えば、抗体など）に関して、本明細書で用いられる「単離された」または「精製された」という用語は、自然環境から単離、精製もしくは実質的に遊離された（例えば、ヒトもしくは動物の体内から単離もしくは精製された（実際、それらが天然に存在している場合））場合の分子に言及するか、または技術的な方法により作製された分子（すなわち、組換え型分子および合成して作製された分子を含む）に言及する。

#### 【0155】

核酸分子に関連してこのように用いられる場合、このような用語は、他の核酸／遺伝子またはポリペプチドなどの、核酸が自然に結合している物質から遊離している核酸に言及する。これら用語は、組換えDNA技術で作製された場合、細胞性物質もしくは培地から実質的に遊離した核酸に、また化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質から実質的に遊離した核酸にも言及する。単離または精製された核酸もまた、該核酸が由来する核酸に天然に隣接している配列（すなわち、該核酸の5'および3'末端に位置する配列）、または例えば、遺伝子工学により、該核酸に隣接するように作製された配列（例えば、治癒的価値がないタグ配列や他の配列など）から実質的に遊離していくてもよい。

10

#### 【0156】

全長の抗体を含む、本発明の軽鎖CDR1，2および3、重鎖CDR1，2および3、軽鎖可変領域、重鎖可変領域ならびに結合タンパク質もしくは抗体などのようなタンパク質またはポリペプチド分子に関連してこのように用いられる場合、「単離された」または「精製された」という用語は、通常、そのタンパク質が由来する供給源からの細胞性物質または他のタンパク質から実質的に遊離しているタンパク質に言及する。いくつかの態様において、特にこのタンパク質がヒトまたは動物に投与されることになっている場合、このように単離されたまたは精製されたタンパク質は、組換え技術により作製された際の培地または化学的に合成された際の化学的前駆体もしくは他の化学物質から実質的に遊離している。このような単離されたまたは精製されたタンパク質は、単離された核酸分子について上記した隣接している配列からも遊離していくてもよい。

20

#### 【0157】

本明細書で用いられる「核酸配列」または「核酸分子」という用語は、天然に存在する塩基、糖および糖間（バックボーン）連結から成る一連のヌクレオシドモノマーまたはヌクレオチドモノマーに言及する。この用語は、天然には存在しないモノマーを含む修飾されたかもしくは置換された配列またはその一部も含む。本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）またはリボ核酸配列（RNA）でもあってもよく、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含む天然に存在する塩基を含むことができる。配列は、修飾塩基を含むこともできる。このような修飾塩基の例としては、アザおよびデアザ・アデニン、グアニン、シトシン、チミジンならびにウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸分子は、二本鎖でも、一本鎖でもよい。核酸分子は、全体的にまたは部分的に合成されてもいても組み換え型であってもよい。

30

#### 【0158】

抗体分子および結合タンパク質に関連して本明細書で用いられる「ヒト」という用語は、可変領域（例えば、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、CDRまたはFR領域）および、任意に、ヒトレパートリから単離もしくは由来するか、またはヒト（例えば、ヒトの生殖細胞系または体細胞）で発見された配列に由来もしくは一致する抗体の定常領域を有する抗体または結合タンパク質に最初に言及する。r84抗体は、その可変領域がヒトレパートリから単離された、このようなヒト抗体分子の例である。

40

#### 【0159】

本発明の「ヒト」抗体および結合タンパク質は、例えば、インビトロでのランダム突然変異または部位特異的突然変異によって導入された突然変異（例えば、インビトロでのクローニングまたはPCRによって導入された突然変異等）などの、ヒト配列にはコードされていないアミノ酸残基をさらに含む。このような突然変異の特定の例は、抗体または結

50

合タンパク質の少数の残基（例えば、抗体または結合タンパク質の5個、4個、3個、2個もしくは1個の残基、好ましくは、例えば、抗体または結合タンパク質の1つ以上のCDRを占める5個、4個、3個、2個もしくは1個の残基）における保存的置換を含む突然変異または他の突然変異である。このような「ヒト」抗体の特定の例は、潜在的な免疫原部位量を減らすために標準的な修飾技術が施された抗体および可変領域を含む。

#### 【0160】

このように、本発明の「ヒト」抗体は、ヒトで発見された配列に由来し、関連する配列を含むが、該配列は、インビオのヒト抗体生殖細胞系レパートリに天然に存在するものでなくともよい。加えて、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒト配列から同定されたヒトコンセンサス配列またはヒト配列と実質的に相同的な配列を含むタンパク質を含む。

10

#### 【0161】

加えて、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、それ自体がヒト抗体分子における組み合わせから発見されたV<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、CDRまたはFR領域の組み合わせに限定されない。このように、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒトの中に必ずしも天然に存在するものではないこのような領域の組合せを含むかまたは一致することができる。

#### 【0162】

好ましい態様において、ヒト抗体は、完全にヒト抗体である。本明細書で用いられる「完全にヒト」抗体は、実質的にヒト由来ではない抗体配列ではなく、またはいかなるヒト由来ではない抗体配列でもない、上記で定義したような、「ヒト」可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体である。例えば、「実質的にヒト由来ではない抗体配列ではない」ヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体は、たった約5つ、4つ、3つ、2つまたは1つのアミノ酸がヒト抗体配列にコードされていないアミノ酸である、抗体、ドメインおよび/またはCDRである。このように、「完全にヒト」抗体は、実質的にヒト由来ではない可変領域ドメイン、例えば、特定のアミノ酸が、通常ヒト抗体に存在するアミノ酸とより良く一致するために変えられたマウス可変領域ドメインに基づく、「ヒト化」抗体と区別される。

20

#### 【0163】

本発明の「完全にヒト」抗体は、単一鎖の抗体のような、他の任意の実質的な抗体配列のないヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRでもあってもよい。あるいは、本発明の「完全にヒト」抗体は、1つ以上のヒト抗体定常領域と一体となった、または動作可能に付着したヒト可変領域ドメインおよび/またはCDRであってもよい。特定の好ましい完全にヒト抗体は、IgG定常領域をすべて備えたIgG抗体である。

30

#### 【0164】

他の態様において、本発明の「ヒト」抗体は、一部がヒトのキメラ抗体である。本明細書で用いられる「一部がヒトのキメラ」抗体は、例えばラットやマウスなどのヒトではない種の定常領域と動作可能に付着した（または接合した）「ヒト」可変領域ドメインおよび/またはCDRを含む抗体である。このような一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、前臨床研究において使用することができ、ここで、その定常領域が、前臨床医学試験において用いる動物の種と同じことが好ましい。これらの一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、エックスピオの診断で使用することができ、ここで、ヒトではない種の定常領域が、付加的なオプションを抗体検出のために提供することができる。

40

#### 【0165】

本明細書で用いられる「断片」という用語は、例えば、抗原結合に寄与する断片（例えば、抗原結合部位の一部を形成する）および/またはVEGF抗原の機能の阻害もしくは減少に寄与する断片および/または天然リガンドであるVEGFR2と相互作用するVEGF抗原の防止に寄与する断片など、生物学的に関連のある断片に言及する。特定の好ましい断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>ドメイン）および/または軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>ドメイン）を含む。他の好ましい断片は、本発明の抗体の（または本発明のV<sub>H</sub>ドメインの）重鎖CDRの1つ以上、または本発明の抗体の（または本発明のV<sub>L</sub>ドメインの

50

) 軽鎖 C D R の 1 つ以上を含む。特定の好ましい断片は、少なくともアミノ酸 5 つの長さであり、少なくとも 1 つの C D R 領域、好ましくは C D R 3 領域、より好ましくは重鎖 C D R 3 領域を含む。

#### 【 0 1 6 6 】

本発明の抗体が、定義した任意の配列の断片を含む（例えば、本発明の  $V_H$  および / または  $V_L$  ドメインを含む抗体、または本発明の 1 つ以上の C D R を含む抗体もしくは結合タンパク質などの、配列番号 2 1 の断片を含む等）態様において、これらの領域 / ドメインそれがその生物学的機能を果たすことができるよう、そして抗原結合に対する寄与が保持されるように、これらの領域 / ドメインは通常、抗体または結合タンパク質内で離れて存在している。このように、 $V_H$  および  $V_L$  ドメインは、適切なスキヤフォールド配列 / リンカー配列によって離れているのが好ましく、C D R は、天然に存在する抗体および / または遺伝子操作された有効な抗体で発見されたものなどの、適切なフレームワーク領域によって離れているのが好ましい。このように、本発明の  $V_H$  ,  $V_L$  および個々の C D R 配列は、抗原結合を可能にするのに適切なフレームワークまたはスキヤフォールド内に提供または組み込まれることが好ましい。このようなフレームワーク配列または領域は、適切なスキヤフォールドを形成するのに適切なよう、天然に存在するフレームワーク領域である F R 1 , F R 2 , F R 3 および / または F R 4 に一致していてもよく、例えば、天然に存在する様々なフレームワーク領域を比較することによって同定した、コンセンサスフレームワーク領域に一致していてもよい。あるいは、非抗体スキヤフォールドまたはフレームワーク（例えば、T 細胞受容体フレームワーク）を用いることができる。

10

20

30

#### 【 0 1 6 7 】

フレームワーク領域に用いることができる適切な配列は、当該分野において周知かつ文書化されており、これらのいずれかを用いてもよい。フレームワーク領域の好ましい配列は、本発明の  $V_H$  および / または  $V_L$  ドメインを占める 1 つ以上のフレームワーク領域であって、すなわち、配列番号 2 1 もしくは表 1 に開示されている 1 つ以上のフレームワーク領域または該領域と実質的に相同なフレームワーク領域であり、例えば、実質的に同じ抗体または実質的に同じ 3 D 構造の抗体という結果となるフレームワーク領域などの、特に抗体特異性を維持できるフレームワーク領域である。特定の好ましい態様において、4 つすべての可変軽鎖（配列番号 1 5 , 1 6 , 1 7 および 1 8 ）および / または可変重鎖（配列番号 1 1 , 1 2 , 1 3 および 1 4 ）、あるいは適切であれば、配列番号 2 1 の F R 領域（表 1 にも示す）もしくは該領域と実質的に相同な F R 領域は、本発明の抗体中に発見される。

#### 【 0 1 6 8 】

加えて、本発明の好ましい抗体が本発明の  $V_H$  ,  $V_L$  または C D R を占めるにもかかわらず、本発明の抗体は、上述した本発明の抗体または結合タンパク質の V E G F 結合特性が依然として存在するという条件で、本発明ではない他の  $V_H$  ,  $V_L$  または C D R と組み合わせた本発明の 1 つ以上の  $V_H$  ,  $V_L$  または C D R も包含するものである。

#### 【 0 1 6 9 】

本明細書で用いられる「重鎖相補性決定領域」（「重鎖 C D R 」）という用語は、抗体分子の重鎖可変領域（ $V_H$  領域）内の超可変性領域に言及する。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、重鎖 C D R 1 , 重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 と称される 3 つの C D R を有する。重鎖可変領域は、4 つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端へ、F R 1 , F R 2 , F R 3 および F R 4 ）も有する。これらのフレームワーク領域が C D R を分離している。

40

#### 【 0 1 7 0 】

本明細書で用いられる「重鎖可変領域」（「 $V_H$  領域」）という用語は、抗体分子の重鎖の可変領域に言及する。

#### 【 0 1 7 1 】

本明細書で用いられる「軽鎖相補性決定領域」（「軽鎖 C D R 」）という用語は、抗体分子の軽鎖可変領域（ $V_L$  領域）内の超可変性領域に言及する。軽鎖可変領域は、アミノ

50

末端からカルボキシ末端へ、軽鎖 C D R 1 , 軽鎖 C D R 2 および軽鎖 C D R 3 と称される 3 つの C D R を有する。軽鎖可変領域は、4 つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端へ、F R 1 , F R 2 , F R 3 および F R 4 ）も有する。これらのフレームワーク領域が C D R を分離している。

【 0 1 7 2 】

本明細書で用いられる「軽鎖可変領域」（「V<sub>L</sub>領域」）という用語は、抗体分子の軽鎖の可変領域に言及する。

【 0 1 7 3 】

必要に応じて、C D R の位置決めを定義するために、カバット命名法が本明細書において適用される点に留意する必要がある（Kabat et al., 1991、これを参照により本明細書に特に援用される）。

10

【 0 1 7 4 】

本発明のタンパク質およびポリペプチド（例えば、軽鎖および重鎖 C D R , 軽鎖および重鎖可変領域、抗体、抗体断片、ならびに免疫抱合体）が、当該分野において周知かつ文書かれているいくつかの方法のうちのいずれかで調製することができるが、組換え法を用いて調製することが最も好ましいことを、当業者は理解する。

20

【 0 1 7 5 】

本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードする核酸断片は、任意の適切な方法（例えば、クローニングまたは合成）により得られるか、または作製できる。このような配列は、例えば、ヒト生殖細胞系遺伝子から適切な配列をクローニングした後、当該分野において周知かつ文書化されている方法を用いて、本発明の配列を得るために、生殖細胞系配列に対して必要な任意の修飾を施すことによって調製することができる。より効率的な代替法は、完全な配列を得るために、重複プライマーとして適切な軽鎖または重鎖可変領域配列を合成し、プライマー伸長を用いるものであるだろう。その後、この完全な配列は、さらなるクローニングおよび操作（例えば、適切な発現ベクターにクローニングする）のための適切な制限部位を含むプライマーを用いて P C R を介して増幅することができるだろう。重複プライマーは通常、可変領域当たり 5 ~ 7 個で充分であり、そのためこの技術は極めて効率的かつ正確なものとされている。

20

【 0 1 7 6 】

ひとたび本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードする核酸断片が得られると、これらの断片は、標準的な組換え D N A 技術（例えば、可変領域断片を、適切な定常領域ドメインを有する完全長抗体分子または本明細書の他で記載した特定の型の抗体断片（例えば、F a b 断片, s c F v 断片など）に変換すること）によってさらに操作することができる。通常、すなわち、このさらなる操作手順の一部として、本発明の抗体分子をコードする核酸断片は、一般的に、本発明の抗体の生産を容易にするために、適切な発現ベクターに組み込まれる。

30

【 0 1 7 7 】

可能な発現ベクターとしては、用いる宿主細胞に対して該ベクターが適合性を有する限りにおいて、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス（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）が挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に好適」であり、これは、発現ベクターが本発明の核酸分子および発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択される調節配列を含むことを意味し、該調節配列は核酸分子に動作可能に連結される。動作可能に連結されると、核酸が発現できる方法で核酸を調節配列に連結されることを意図する。

40

【 0 1 7 8 】

従って、本発明は、本発明の核酸分子、もしくはその断片、ならびに本発明の核酸分子にコードされるタンパク質配列の転写および翻訳に必要な調節配列を含む組換え発現ベクターを考慮している。

【 0 1 7 9 】

好適な調節配列は、細菌の、真菌の、ウイルスの、哺乳動物の、または昆虫の遺伝子を

50

含む様々な供給源に由来することができる（例えば、Goeddel, 1990 に記載の調節配列を参照）。適切な調節配列の選択は、後述の選ばれる宿主細胞に依存し、当業者が容易に達成することができる。このような調節配列の例としては、転写プロモータおよびエンハンサまたはRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合配列が挙げられ、翻訳開始シグナルも含まれる。加えて、選ばれる宿主細胞および用いるベクターに応じて、他の配列（例えば、複製開始点、付加したDNA制限部位、エンハンサ、および転写を誘導させるような配列）も発現ベクターに組み込むことができる。

#### 【0180】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の組換え分子を用いて形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にする選択可能なマーカー遺伝子も含むこともできる。選択可能なマーカー遺伝子の例は、特定の薬剤に対する耐性を付与するタンパク質（例えば、ネオマイシンおよびハイグロマイシン）、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ホタル・ルシフェラーゼ、または免疫グロブリンもしくはその一部（例えば、免疫グロブリン、好ましくはIgGのFc部分）をコードする遺伝子である。選択可能なマーカー遺伝子の転写は、選択可能なマーカータンパク質（例えば、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、またはホタル・ルシフェラーゼ）の濃度変化によって観測される。選択可能なマーカー遺伝子が抗生物質耐性（例えば、ネオマイシン耐性）を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換体細胞はG418により選択することができる。選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存し、一方、他の細胞は死ぬ。これによって、本発明の組換え発現ベクターの発現を視覚化しアッセイすることが可能となり、特に発現および表現型に対する突然変異の効果を決定できる。選択可能なマーカーを、興味のある核酸とは別のベクターに取り込むことは言うまでもない。

10

20

30

40

#### 【0181】

組換え発現ベクターは、組換え型タンパク質の発現を増加；組換え型タンパク質の溶解性を増加；およびアフィニティ精製のリガンド（例えば、精製および／または同定を可能にする適切な「タグ」が存在していてもよく、例として、Hisタグやmycタグなど）として作用することで標的組換え型タンパク質の精製を補助する融合部分をコードする遺伝子を含むこともできる。例えば、融合タンパクの精製に続いて融合部分から組換えタンパク質を分離することができるようになるため、タンパク分解的切断部位を標的組換え型タンパク質に加えることができる。標準的な融合発現ベクターとして、組換え型タンパク質にそれぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)，マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを融合させる、pGEX(Amrad社, メルボルン, オーストラリア), pMal(New England Biolabs, ベヴァリー, MA)およびpRIT5(ファルマシア, ピスカタウェイ, NJ)が挙げられる。

#### 【0182】

組換え発現ベクターは、形質転換した宿主細胞を作製するために、宿主細胞に導入することができる。「を用いて形質転換された」、「を用いてトランスフェクトされた」、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、当該分野において公知の可能な技術の多くのうちの1つによって、細胞に核酸（例えば、ベクター）の導入を包含することを意図している。本明細書で用いられる「形質転換された宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクターを用いて形質転換された、糖鎖を形成できる細胞を含むことを意図している。原核細胞は、例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウムに媒介される形質転換によって、核酸を用いて形質転換することができる。例えば、核酸は、従来技術（例えば、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウムの共沈, DEAE-デキストランに媒介されるトランスフェクション、リポフェクチン、エレクトロポレーションまたはマイクロ・インジェクション）を介して哺乳動物細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクションする好適な方法は、Sambrook et al., 1989および他の実験書から見出だすことができる。

#### 【0183】

50

好適な宿主細胞として、多種多様な真核生物宿主細胞および原核細胞が挙げられる。例えば、本発明のタンパク質は、酵母細胞または哺乳動物細胞に発現することができる。他の好適な宿主細胞は、Goeddel, 1990 から見出だすことができる。加えて、本発明のタンパク質は、エシェリキア・コリ (Zhang et al., 2004) などのような原核細胞で発現することができる。

#### 【0184】

本発明を実施するのに好適な酵母および菌類宿主細胞としては、サッカロマイセス・セレビシエに限定されず、ピキア属またはクリベロマイセス属および多様な種類のアスペルギルス属が挙げられる。酵母 S . セレビシエで発現させるためのベクターの例としては、p Y e p S e c 1 (Baldari. et al., 1987) , p M F a (Kurjan および Herskowitz, 1982) , p J R Y 8 8 (Schultz et al., 1987) , および p Y E S 2 (インビトロジェン社, サンディエゴ, CA) が挙げられる。酵母および菌類を形質転換させるためのプロトコルは当業者に周知である (Hinnen et al., 1978; Ito et al., 1983, および Cullen et al. 1987 を参照)。

#### 【0185】

本発明を実施するのに好適な哺乳動物細胞としては、とりわけ、C O S (例えば、ATCC No. CRL 1650 または 1651) , B H K (例えば、ATCC No. CRL 6281) , C H O (ATCC No. CCL 61) , H e L a (例えば、ATCC No. CCL 2) , 2 9 3 (ATCC No. 1573) および N S - 1 細胞が挙げられる。哺乳動物細胞での発現に向かわせるのに好適な発現ベクターは、一般に、他の転写および翻訳制御配列とともに、プロモータ (例えば、ポリオーマ, アデノウイルス 2 , サイトメガロウィルスおよびシミアン・ウイルス 4 0 などのウイルス材料に由来する) を含む。哺乳動物発現ベクターの例としては、p C D M 8 (Seed, B., 1987) および p M T 2 P C (Kaufman et al., 1987) が挙げられる。

#### 【0186】

本明細書に提供されている教示を鑑みて、プロモータ, ターミネータ, および適切なタイプの発現ベクターを植物, 鳥および昆虫の細胞に導入する方法も容易に得られる。例えば、一態様の中で、本発明のタンパク質は植物細胞から発現することができる (アグロバクテリウム・リゾゲネスのベクターの使用を概説するSinkar et al., 1987 を参照; とりわけ、P A P S 2 0 2 2 , P A P S 2 0 2 3 , および P A P S 2 0 3 4 を含む植物細胞用発現ベクターの使用を記載したZambryski et al., 1984 も参照)。

#### 【0187】

本発明を実施するのに好適な昆虫細胞としては、カイコガ属, T r i c h o p l u s i a 属またはスピドテラ属の種に由来する細胞および株化細胞が挙げられる。培養昆虫細胞 (S F 9 細胞) でのタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターとしては、p A c シリーズ (Smith et al., 1983) および p V L シリーズ (Luckow and Summers 1989) が挙げられる。本発明の組換え型タンパク質の発現に好適な、いくつかのバキュロウイルス - 昆虫細胞発現系は、PCT/US/02442に記載されている。

#### 【0188】

あるいは、本発明のタンパク質は、ラット, ウサギ, ヒツジおよびブタなどの、ヒトではないトランスジェニック動物で発現することもできる (Hammer et al. 1985; Palmiter et al. 1983; Brinster et al. 1985; Palmiter および Brinster 1985, ならびに U.S. Patent No. 4,736,866)。

#### 【0189】

本発明のタンパク質は、固相合成 (Merrifield (1964); Frische et al., 1996) または均質溶液中の合成 (Houbenweyl, 1987) などのような、タンパク質の化学に係る周知の技術を用いた化学合成によって調製することもできる。

#### 【0190】

他の分子 (タンパク質等) に接合された本発明の抗体およびタンパク質を含む N 末端または C 末端融合タンパクは、組換え技術により融合させることで調製することができる。その結果得られた融合タンパクは、選択されたタンパク質もしくはマーカータンパク質、

10

20

30

40

50

または本明細書に記載のタグタンパク質に融合させた本発明の抗体またはタンパク質を含む。本発明の抗体およびタンパク質は、公知技術によって他のタンパク質に接合することもできる。例えば、該タンパク質は、WO 90/10457 に記載のヘテロ二官能性チオール含有リンカー、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ - プロピオネート) または N - スクシンイミジル - 5 チオアセテートを用いてカップリングすることができる。融合タンパクまたは接合体の調製に用いることができるタンパク質の例としては、免疫グロブリン、ホルモン、増殖因子、レクチン、インスリン、低密度リポタンパク質、グルカゴン、エンドルフィン、トランスフェリン、ポンベシン、アシアログライコプロテイン、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、血球凝集素 (HA) および切り詰められた myc などのような細胞結合タンパク質が挙げられる。

10

## 【0191】

第1の VEGFR2 - ブロッキング、抗 VEGF 抗体核酸セグメントの調製法にかかわらず、さらに好適な抗体核酸セグメントは、標準的な分子生物学的技術によって容易に調製することができる。任意の変異株[variant]、突然変異体[mutant]または第二世代の VEGFR2 - ブロッキング、抗 VEGF 抗体核酸セグメントが本発明の用途に好適であるか確認するために、該核酸セグメントは、本発明の VEGFR2 - ブロッキング、抗 VEGF 抗体の発現を確認するために試験する。好ましくは、変異株、突然変異体または第二世代核酸セグメントは、標準条件下で、より好ましくは、標準的に厳しいハイブリダイゼーション条件下で、ハイブリダイゼーションを確認するためにも試験する。好適なハイブリダイゼーション条件の例としては、約 50 °で、約 7 % のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、約 0.5 M の NaPO<sub>4</sub> および約 1 mM の EDTA 中でハイブリダイゼーションし；そして約 42 °で約 1 % の SDS で洗浄することが挙げられる。

20

## 【0192】

様々なヒト抗体が容易に調製することができることから、本発明の治療方法は、患者において、少なくとも第1の本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体の生物学的に有効な量を発現する、少なくとも第1の核酸セグメントまたは分子を、動物または患者に提供することで実施することができる。「VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体を発現する核酸セグメントまたは分子」は、一般に、少なくとも発現構造物またはベクターの形であり、ウイルスまたは組換え宿主細胞の中に含まれる発現構造物またはベクターの形であってもよい。本発明の好ましい遺伝子治療ベクターは、通常、組換え型のレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、サイトメガロウイルス (CMV) などの中に含まれるような、ウイルスベクターである。

30

## 【0193】

このように、本発明は、本発明の抗体をコードする核酸配列を含む核酸セグメントまたは分子を、さらに提供する。このような配列に実質的に相同な核酸分子も含まれる。好ましい核酸分子は、配列番号 21 に提示されたアミノ酸配列をコードする。より好ましい核酸分子は、配列番号 20 に定義した核酸配列または該配列と実質的に相同な配列を含む。

## 【0194】

さらなる側面は、本発明の 1 つ以上の核酸セグメントまたは分子を含む発現構造物または発現ベクターを提供する。好ましくは、発現構造物またはベクターは組換え型である。好ましくは、該構造物またはベクターは、本発明の核酸分子にコードされたタンパク質配列の転写および翻訳に必要な調節配列をさらに含む。

40

## 【0195】

さらなる側面は、本発明の 1 つ以上の発現構造物または発現ベクターを含む宿主細胞またはウイルスを提供する。本発明の核酸分子の 1 つ以上を含む宿主細胞またはウイルスも提供する。本発明の抗体を発現している宿主細胞またはウイルスは、さらなる側面を形成する。

## 【0196】

本発明のさらなる側面は、本発明の宿主細胞を培養する段階を含む、本発明の抗体を製

50

造する方法を提供する。好適な方法は、コードされた抗体またはタンパク質の発現に好適な条件下で、本発明の組換え型発現ベクターの1つ以上または核酸配列の1つ以上を含む宿主細胞を培養する段階(i)；および任意に、宿主細胞または増殖培養液／上澄から抗体またはタンパク質を単離する段階(ii)を含む。このような製造方法は、抗体またはタンパク質産物を精製する段階および／または少なくとも1つの添加成分(薬学的に許容し得る担体または賦形剤など)を含む組成物に抗体または産物を処方する段階も含むことができる。

#### 【0197】

本発明の抗体またはタンパク質が複数のポリペプチド鎖(例えば、Fab断片などのような特定の断片)を占める場合の態様において、すべてのポリペプチドは好ましくは、同じまたは異なる発現ベクターのいずれかから宿主細胞中で発現され、その結果、完全タンパク質(例えば、本発明の結合タンパク質)が宿主細胞中で会合し、そこから単離または精製することができる。

10

#### 【0198】

本発明の抗体は、VEGFと結合するさらなる抗体を製造するのに用いることもできる。このような用途としては、例えば、新規抗体を形成するために、親抗体のアミノ酸配列における1つ以上のアミノ酸の付加、欠損、置換または挿入が挙げられ(ここで該親抗体とは本明細書の他で定義される本発明の抗体の1つである)、およびその結果得られた新規抗体を、VEGFに特異的な抗体であるかを同定するために試験することが挙げられる。このような方法は、VEGFと結合することができるかすべて試験することができる複数の新規な抗体を形成するために用いることができる。好ましくは、1つ以上のアミノ酸の付加、欠損、置換または挿入は、CDRドメインの1つ以上で起こる。

20

#### 【0199】

親抗体に対するこのような修飾または突然変異は、例えば、ランダム変異導入法や部位特異的突然変異誘発法などを実施することによって、当該分野において周知かつ文書化されている技術を用いた任意の適切な方法によって実施することができる。定方向突然変異誘発を用いることになっている場合、突然変異誘発に適切な残基を同定する戦略の1つは、抗原結合に関するキーとなる残基を同定するために、結合タンパク質-抗原複合体(例えば、Ab-Ag複合体)の結晶構造の分解能を利用することである(DaviesおよびCohen, 1996)。続いて、これらの残基を、相互作用を強化するために突然変異させることができる。あるいは、単に、1つ以上のアミノ酸残基を定方向突然変異誘発に対する標的とすることができ、そして腫瘍細胞への結合に対する効果を評価できる。

30

#### 【0200】

ランダム変異導入は、例えば、変異性PCR、チェイン・シャフリング[chain shuffling]または突然変異誘発E.コリ株によって、任意の適切な方法において実施することができる。

#### 【0201】

このように、本発明のV<sub>H</sub>ドメインの1つ以上は、任意の適切な供給源に由来する单一のV<sub>L</sub>ドメインまたはV<sub>L</sub>ドメインのレパートリと組み合わせることができ、その結果得られた新規抗体を、VEGFに特異的な抗体であるか同定するために試験する。逆に言えば、本発明のV<sub>L</sub>ドメインの1つ以上は、任意の適切な供給源に由来する单一のV<sub>H</sub>ドメインまたはV<sub>H</sub>ドメインのレパートリと組み合わせることができ、その結果得られた新規抗体を、VEGFに特異的な抗体であるか同定するために試験する。例えば、上記のように、本発明の好ましい抗体(r84/PGN311)のV<sub>L</sub>ドメインは、種々のV<sub>H</sub>ドメインと結合することができ、VEGFと結合する能力を依然として保持できることを示している。

40

#### 【0202】

同様に、本発明のV<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub>ドメインのCDRのうち1つ以上、好ましくは3つすべてが、適切であれば、单一のV<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub>ドメインあるいはV<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub>ドメインのレパートリに接合することができ、その結果得られた新規抗体を

50

、 V E G F に特異的な抗体であるか同定するために試験する。

【 0 2 0 3 】

C D R (特に軽鎖および / または重鎖の C D R 3 ) における標的とされた突然変異は、抗体親和性を増加させるのに有効な技術であることが示されているものであり、好ましい。 C D R 3 の 3 ~ 4 個のアミノ酸からなるブロックまたは「ホットスポット」と呼ばれる特異的な領域が、突然変異生成の標的となることが好ましい。

【 0 2 0 4 】

「ホットスポット」は、体細胞超変異がインビオで起こる配列である (Neuberger および Milstein, 1995)。ホットスポット配列は、特定のコドンのコンセンサス核酸配列として定義することができる。コンセンサス配列は、テトラヌクレオチドである R G Y W であり、R は A または G のいずれか、Y は C または T 、W は A または T のいずれかである (Neuberger および Milstein, 1995)。加えて、ヌクレオチド A G Y にコードされるセリン残基は、潜在的ホットスポット配列に対応する T C N にコードされるそれよりも、可変ドメインの C D R 領域に圧倒的に存在している (Wagner et al., 1995)。

10

【 0 2 0 5 】

このように、本発明の各抗体の重鎖および軽鎖の C D R の核酸配列に対して、ホットスポット配列および A G Y コドンが存在するか調べることができる。その上、軽鎖および重鎖の C D R 領域の同定されたホットスポットは、 International Immunogenetics Database (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) を用いて、重鎖および軽鎖の胚の配列と任意に比較することができる (Davies et al., 1990)。生殖細胞系と同一の配列は、体細胞変異が発生しなかったことを示唆し；従つて、インビオで起こる体性事象を模倣して、ランダムな突然変異を誘導することができ、または、代わりに、例えば、ホットスポットおよび / または A G Y コドンなどで、部位特異的突然変異誘発を実施することができる。対照的に、異なる配列は、いくつかの体細胞突変異が既に発生したことを見ている。インビオでの体細胞変異が最適なものであるかどうか確認できないままである。

20

【 0 2 0 6 】

突然変異の好ましいホットスポットは、露出したアミノ酸をコードするもの、好ましくは抗原結合部位の一部を形成するアミノ酸をコードするものである。突然変異の他の好ましいホットスポットは、非保存的アミノ酸をコードするものである。 C D R 内の埋もれた、または保存されたアミノ酸をコードするホットスポットは、好ましくは突然変異を起こさない。これらの残基は通常、構造全体わたり重大であり、またこれらは埋もれているので抗原とは相互作用しそうにない。

30

【 0 2 0 7 】

アミノ酸およびタンパク質ドメインに対して上記操作を実施する方法は、当業者に周知である。例えば、該操作は、核酸レベルでの遺伝子工学によって都合良く実施することができ、ここで、適切な結合タンパク質およびそのドメインをコードする核酸分子は、発現して得られたタンパク質のアミノ酸配列が次々にその結果として修飾されるように、適切な方法で修飾される。

40

【 0 2 0 8 】

新規抗体の 1 つ以上が V E G F に特異的に結合できるか試験することは、任意の適切な方法で実施することができ、該方法は当該分野において周知かつ文書化されている。 V E G F 検体は広く利用でき (実施例を参照) 、これら検体は、例えば、 E L I S A や親和性クロマトグラフィーなどの従来法によって結合をアッセイするのに容易に用いることができる。

【 0 2 0 9 】

これらの方法によって製造できる新規抗体は、親抗体と比較して、 V E G F に対してより高いか強化された親和性 (または少なくとも同等の親和性) を有することが好ましく、本明細書の他で記載の本発明の抗体と同様の方法で取り扱い、用いることができる (例えば、治療、診断、組成物中など)。

50

**【 0 2 1 0 】**

これらの方針によって作製された、得られた、または得られる新規抗体は、本発明のさらなる側面を形成する。

**【 0 2 1 1 】**

本発明は、本発明の少なくとも1つのヒト抗体または抗体断片を含む組成物（任意に希釈剤を含む）をさらに提供する。このような組成物は、薬学的に許容し得る組成物であっても、実験室での研究に用いられる組成物であってもよい。医薬組成物に関して、これらは、静脈内投与などの非経口投与、または眼投与で好ましく処方することができる。

**【 0 2 1 2 】**

本発明は、本発明のヒト抗体および抗体断片の、多くの方法および用途を提供する。すべての方法に関して、「a」および「an」の用語は、特に明記した場合を除いて、列挙した方法における「少なくとも1つ」、「少なくとも第1」、「1つ以上」または「複数 [a plurality]」の段階を意味するために用いられる。これは治療法の投与段階に特に関連する。このように、多くの異なる用量が本発明に用いることができるのみならず、異なる用量数（例えば、注射）が複数回の注射を含むまで用いることができる。抗VEGF治療抗体の投与前、後または投与中に、併合した治療法を用いることができる。

10

**【 0 2 1 3 】**

本発明の抗体の、様々な有用なインビトロの方法および用途が提供され、重要な生物学的意味を有する。最初に提供するものは、VEGF（好ましくは遊離の（受容体に結合していない）VEGF）を含む組成物を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体またはその抗原結合断片に、効果的に接触させることを一般的に含む、VEGFと結合する方法および用途である。

20

**【 0 2 1 4 】**

VEGFを検出する方法および用途が提供され、それらは、VEGF / 抗体複合体が効率的に形成でき、そのように形成した該複合体を検出する条件下で、VEGFを含むと疑われる組成物を、少なくとも第1の本発明のヒト抗体またはその抗原結合断片と接触させることを一般的に含む。検査法および用途は、例えば、血管新生および腫瘍の診断において、生物学的検体に関連して用いることができ、それらに基づく診断キットも提供される。

30

**【 0 2 1 5 】**

本発明は、VEGF受容体のVEGFR2に対するVEGF結合を阻害するのに効果的な条件で、VEGFR2（KDR / F1k - 1）を発現する内皮細胞を含む細胞の集団または組織を、VEGF存在下、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の生物学的に有効な量を含んでいる組成物と接触させることを一般的に含む、VEGF受容体のVEGFR2に対するVEGF結合を選択的にまたは特異的に阻害する方法および用途を提供する。

**【 0 2 1 6 】**

VEGF受容体のVEGFR1に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2に対するVEGF結合を有意に阻害する方法および用途を提供する。これらの方法は、VEGF受容体のVEGFR1に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2に対するVEGF結合を阻害するのに効果的な条件で、VEGF存在下、VEGFR2（KDR / F1k - 1）およびVEGFR1（F1t - 1）を発現する内皮細胞の集団を含む細胞の集団または組織を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物と接触させることを含む。

40

**【 0 2 1 7 】**

本発明のさらなる方法および用途は、VEGFR2およびVEGFR1と称するVEGF受容体の生物学的役割を分析することにあって、次の段階を含む：

(a) VEGFR2（KDR / F1k - 1）およびVEGFR1（F1t - 1）受容体を発現する細胞の集団およびVEGFを含む生物学的組成物または組織を、少なく

50

とも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させること；ならびに

(b) 本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体の、VEGFに対する少なくとも第1の生物学的反応の効果を測定すること；ここで：

(i) 本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体存在下の生物学的反応における変更は、VEGFR2受容体に媒介される反応を表し；および

(ii) 本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体存在下の生物学的反応の維持は、VEGFR1受容体に媒介される反応を表す。

#### 【0218】

増殖を阻害する方法および用途を提供し、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走を特異的に阻害する方法および用途を含み、VEGFに誘導される細胞増殖および/または遊走を阻害するのに効果的な条件で、内皮細胞の集団およびVEGFを含む細胞の集団または組織を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを一般的に含む。10

#### 【0219】

VEGFR2に誘導されるマクロファージ機能を阻害する方法および用途も提供され、VEGFR2に誘導されるマクロファージ機能を阻害するのに効果的な条件で、マクロファージおよびVEGFを含む細胞の集団または組織を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または抗VEGF抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを一般的に含む。20

#### 【0220】

上述の方法は、腫瘍の治療に好ましく適用され、該方法はVEGFR2に誘導されるマクロファージ機能を阻害し、それによって、腫瘍浸潤性マクロファージ(VEGFR2を発現する)の、腫瘍発達および/または転移の促進能を減少させる。

#### 【0221】

破骨細胞または軟骨吸収細胞の、VEGFR1に媒介される刺激を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走、ならびに任意に血管新生を阻害する方法および用途をさらに提供する。この方法は、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGFR1に媒介される刺激を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走あるいは血管新生を阻害するのに効果的な条件で、破骨細胞または軟骨吸収細胞の少なくとも1つおよび内皮細胞を含む細胞の集団または組織を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または該抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを一般的に含む。30

#### 【0222】

上述の方法および用途は、インビトロおよびインビボで実施することができ、後者の場合、組織または細胞は動物内にあり、ヒト抗VEGF抗体は該動物に投与される。いずれの場合においても、上記方法および用途は、血管新生を阻害する方法および用途になり、血管新生を阻害するのに効果的な条件で、血管新生の血管もしくは潜在的に血管新生の血管を含む組織またはその集団(すなわち、VEGFに曝露される血管または潜在的にVEGFに曝露される血管)を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む抗血管新生組成物に接触させることを含む。40

#### 【0223】

潜在的血管新生の血管の集団がエックスビボで維持されている場合、本発明は創薬プログラムの実用性を有する。信頼できる陽性対照および陰性対照を有する、インビトロでのスクリーニングアッセイは、血管新生過程のさらなる情報の描写におけるのと同様に、血管新生を阻害または促進する薬の開発における最初の段階として有用である。潜在的血管新生の血管の集団が動物または患者の体内にある場合、抗血管新生組成物は治療の形態50

として該動物に投与される。

【0224】

従って、上述の阻害方法の各々に関して、「生物学的に有効な量」は、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走を阻害する; VEGFR1に誘導される細胞内事象を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走を阻害する; 破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGFR1刺激を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される内皮細胞の増殖および/または遊走あるいは血管新生を阻害する; 全体的に見て、血管の成長または血管新生を阻害するのに効果的な方法で血管内皮細胞の増殖および/または遊走を減らすのに有効な、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の量である。

10

【0225】

このように、本発明は、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される血管新生を阻害する、好ましくは血管新生疾病を治療する方法および用途を提供する。この方法は、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGFに誘導される血管新生を阻害し、かつ血管新生疾病を治療するのに有効な条件で、破骨細胞または軟骨吸収細胞の少なくとも1つおよび内皮細胞を含む細胞の集団または組織を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または該抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを一般的に含む。

20

【0226】

骨代謝における有意な副作用を引き起こすことなく、VEGFに誘導される血管新生を阻害する、好ましくは血管新生疾病を治療する方法および用途をさらに提供する。この方法は、破骨細胞または軟骨吸収細胞の活性を有意に損なわないことによって骨代謝における有意な副作用を引き起こすことなく、VEGFに誘導される血管新生を阻害し血管新生の疾病を治療するのに有効な条件で、破骨細胞または軟骨吸収細胞の少なくとも1つおよび血管内皮細胞を含む組織または血管新生の血管の集団を、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または該抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを一般的に含む。

30

【0227】

望ましくなく、不適切で、異常で、過剰なおよび/または病理学的な血管新生によって特徴づけられる、任意の疾患または障害を有するまたは発症する危険性がある動物および患者に関して、抗血管新生薬剤スクリーニング(インビトロ)および治療(インビボ)が提供される。異常な血管新生は広範囲にわたる疾患および障害で起こるので、所定の抗血管新生治療が、任意の許容し得るモデル系で有効なことが示されれば、血管新生と関連がある疾患および障害の全範囲を治療するために用いることができることは、当業者に周知である。

【0228】

本発明の方法および用途は、任意の型の血管化腫瘍；加齢性黄斑変性症を含む黄斑変性症；リウマチ性関節炎を含む関節炎；アテローム性動脈硬化症およびアテローム動脈硬化性斑；糖尿病性網膜症および他の網膜症；グレーブス病を含む甲状腺過形成；血管腫；血管新生線内障；ならびに乾癬を有するまたは発症する危険性がある動物および患者に用いることを特に意図している。

40

【0229】

本発明の方法および用途は、動静脈奇形(AVM)，髄膜腫，および血管形成術後の再狭窄を含む血管再狭窄を有するまたは発症する危険性がある動物および患者の治療をさらに意図している。治療法および用途の他の標的は、血管線維腫，皮膚炎，子宮内膜症，血友病性関節，過形成性瘢痕，炎症性疾患および障害，化膿の肉芽腫，強皮症，滑膜炎，トランコーマならびに血管の癒着を有するまたは発症する危険性がある動物および患者である。

【0230】

50

米国特許第5,712,291号および第6,524,583号（それぞれ参照により本明細書に特に援用される）で開示されているように、上記のそれぞれのいくらか好ましい治療群は、本発明により治療されるべき疾患の型を網羅したものではまったくない。米国特許第5,712,291号および第6,524,583号はそれぞれ、抗血管新生治療により効果的に治療できる他の疾患の多くを同定する目的；血管新生阻害化合物の定義されたカテゴリが開示されクレームされた場合（この場合、本発明のVEGFR2-プロッキング、ヒト抗VEGF抗体）血管新生疾患すべての治療が統一概念を表すことを示す目的；ならびに、血管新生疾患すべての治療が単一のモデル系のみのデータによって可能となることを示す目的を含む、ある特定の目的で参照により本明細書に援用されるものである。

10

### 【0231】

さらなる側面において、米国特許第5,712,291号および第6,524,583号（それぞれ参照により本明細書に援用される）で開示されているように、本発明の方法および用途は、維管束組織の異常増殖、赤鼻、後天性免疫不全症候群、動脈閉塞、アトピー性角膜炎、細菌性潰瘍、Bechets疾病、血液感染性の腫瘍、頸動脈閉塞性疾病、化学火傷、脈絡膜血管新生、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性vitritis、コンタクトレンズの長期装着、角膜移植後拒絶反応、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、クローン病、Eales疾病、流行性角結膜炎、菌類性の潰瘍、単純ヘルペス感染症、帯状疱疹感染症、過粘着性症候群、カポシ肉腫、白血病、脂質退化、ライム疾病、外縁角質溶解、モーレン潰瘍、ライ病以外のマイコバクテリア感染症、近視、眼の血管新生に係る疾病、視覚穴、オスラー-ウェーバー症候群（オスラー-ウェーバー-ランデュ）、変形関節炎、Pagets疾病、扁平部炎、類天疱瘡、phylectenulosis、多発性動脈炎、ポスト・レーザー合併症、原生動物による感染症、弾性線維偽黄色腫、鰓乾燥角膜炎、放射状角膜切開術、網膜血管新生、未熟児網膜症、後水晶体線維増殖、類肉腫、強膜炎、鎌状赤血球貧血、Sogren's症候群、固形腫瘍、Stargardt's疾病、スティーブンのジョンソン疾病、上位辺縁角膜炎、梅毒、全身性狼瘡、テリアン辺縁変性、トキソプラズマ病、外傷、ユーイング肉腫の腫瘍、神経芽細胞腫の腫瘍、骨肉腫の腫瘍、網膜芽細胞腫の腫瘍、横紋筋肉腫の腫瘍、ulcerative大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠乏症およびWegener's多臓器肉芽腫性疾患有するまたは発症する危険性がある動物および患者の治療を意図している。

20

### 【0232】

本発明は、米国特許第5,753,230号（参照により本明細書に特に援用される）に記載の免疫学的薬剤を用いる関節炎の治療と同様に、関節炎を有するまたは発症する危険性がある動物および患者の治療に対する方法および用途をさらに提供する。糖尿病、寄生病、異常な癒傷、手術後の肥厚、火傷、損傷または外傷、発毛の阻害、排卵および黄体形成の阻害、着床の阻害ならびに子宮内の胚発生の阻害に関する望ましくない血管新生の治療に対する抗血管新生の戦略の応用をさらに例示するために、米国特許第5,972,922号も参照により本明細書に特に援用される。従って、上述の条件すべては、本発明を方法および用途による治療のために意図されている。

30

### 【0233】

移植片拒絶の一般療法に対する抗血管新生の戦略の使用を例示するために、さらに米国特許第5,639,757号を参照により本明細書に特に援用される。VEGF阻害に基づく抗血管新生の戦略を用いる、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、心膜炎と関連した浸出などの心外膜液、および胸水の治療は、WO 98/45331に記載されており、参照により本明細書に特に援用される。従って、任意の上述した疾患有するまたは発症する危険性がある動物および患者は、本発明の方法および用途によって治療されることを意図している。

40

### 【0234】

WO 98/16551（参照により本明細書に特に援用される）で開示されているように、VEGF機能を中和する生体分子も、望ましくない血管透過によって特徴づけられる疾患有

50

び障害の治療に用いることに好適である。従って、本発明の VEGF 中和抗体、方法および用途は、望ましくない血管透過（例えば、脳腫瘍に伴う水腫、悪性腫瘍に伴う腹水、メイグスの症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心外膜液および胸水など）によって特徴づけられる疾病および障害を有するまたは発症する危険性がある動物および患者の治療に適用できる。

#### 【0235】

上述の疾病すべてに対する治療が本発明の統一された発明の範囲内で可能であるが、本発明の方法および用途の特に好ましい側面は、原発腫瘍からの血管化固形腫瘍、転移性腫瘍または転移を有するまたは発症する危険性がある動物および患者に対する、抗血管新生の治療への応用である。

10

#### 【0236】

破骨細胞または軟骨吸収細胞の VEGF 刺激を有意に阻害することなく、VEGF に誘導される血管新生を阻害する、好ましくは抗腫瘍効果または改善された抗腫瘍効果を発揮する方法および用途をさらに提供する。この方法は、破骨細胞または軟骨吸収細胞の VEGF 刺激を有意に阻害することなく、VEGF に誘導される血管新生を阻害し抗腫瘍効果または改善された抗腫瘍効果を発揮するのに効果的な条件で、マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞の少なくとも 1 つおよび血管内皮細胞を含む血管形成の血管の集団、腫瘍環境または組織を、少なくとも第 1 の本発明の VEGFR2 - ブロックング、ヒト抗 VEGF 抗体または該抗体の抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む組成物に接触させることを含む。

20

#### 【0237】

このように、本発明は、血管新生に関連した疾病（血管新生に伴うすべての型の癌を含む）を治療する方法および用途をさらに提供するものであり、このような疾病または癌を患う動物または患者に、本発明の VEGFR2 - ブロックング、ヒト抗 VEGF 抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗 VEGF 抗体の免疫抱合体を含む少なくとも第 1 の医薬組成物の治療上有効な量を投与することも含む。

#### 【0238】

加えて、本発明の方法および用途は、リンパ管形成を阻害する方法および用途を含むものであり、リンパ管形成を阻害するのに効果的な条件下で、リンパ管 [lymphatic vessel]（「リンパ管 [lymphatics]」）を含む組織またはその集団、特に VEGF に曝露されるもしくは潜在的に曝露されるリンパ管を、少なくとも第 1 の本発明の VEGFR2 - ブロックング、ヒト抗 VEGF 抗体もしくはその抗原結合断片の生物学的に有効な量を含む抗血管新生の組成物に接触させることを含む。

30

#### 【0239】

リンパ管群がエックスビオで維持される場合に、本発明は、創薬プログラムの実用性を有する。リンパ管群が動物または患者の体内にある場合、本発明の組成物は治療の形態として動物に投与される。

#### 【0240】

リンパ管形成を阻害する観点から、「生物学的に有効な量」は、VEGF に誘導されるリンパ管形成（すなわち、VEGFR2 によって誘導される、VEGF-A に刺激されたリンパ管形成）を阻害するのに有効な本発明の VEGFR2 - ブロックング、ヒト抗 VEGF 抗体の量である。VEGFR1 に刺激された事象（破骨細胞または軟骨吸収細胞の刺激など）を有意に阻害することなく、VEGF に誘導されるリンパ管形成が誘導されることが好ましい。

40

#### 【0241】

このように、本発明は、リンパ管形成を伴う疾病（リンパ管形成を伴う癌のすべての型を含む）を治療する方法および用途を含み、このような疾病もしくは癌を患う動物または患者に、本発明の VEGFR2 - ブロックング、ヒト抗 VEGF 抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗 VEGF 抗体の免疫抱合体を含む少なくとも第 1 の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含む。

50

**【 0 2 4 2 】**

本発明のさらなる側面は、治療、イメージングまたは診断に用いる組成物または医薬の製造における、本発明のヒト抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗体の免疫抱合体の使用を提供する。

**【 0 2 4 3 】**

さらなる側面は、治療、イメージングまたは診断に使用するための本発明のヒト抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗体の免疫抱合体を提供する。

**【 0 2 4 4 】**

加えて、本発明は、1つ以上の薬学的に許容し得る賦形剤、担体、希釈剤、緩衝剤または安定化剤とともに、本発明のヒト抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗体の免疫抱合体を含む組成物を提供する。

10

**【 0 2 4 5 】**

本明細書に記載のインビポでの方法は、通常、哺乳動物に対して実施する。例えば、ヒトおよび任意の家畜類[livestock]、家畜[domestic animal]または実験動物などの、任意の哺乳動物を治療することができる。具体例として、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシおよびサルが挙げられる。しかしながら、哺乳動物はヒトが好ましい。

**【 0 2 4 6 】**

このように、本明細書で用いられる「動物」または「患者」という用語は、例えば、ヒトおよび任意の家畜類、家畜または実験動物などの、任意の哺乳動物を含む。具体例として、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシおよびサルが挙げられる。しかしながら、動物または患者はヒトの対象が好ましい。

20

**【 0 2 4 7 】**

本発明は、接合していないまたは裸の抗体およびその断片を用いる抗血管新生方法と、本発明のヒト抗体またはその抗原結合断片が治療薬に動作可能に付着した免疫抱合体を用いる血管標的的方法との両方を結び付けている。従って、特に明記しないまたは科学用語から明らかでない限り、本明細書で用いられる「抗体および断片」は、「接合していないまたは裸の」ヒト抗体または断片を意味し、他の薬剤、特に治療薬または診断薬に付着していない。これらの定義は、例としてにすぎないが、生物学的半減期、親和性[affinity]、親和性[avidity]もしくは抗体の他の特性を改善する修飾などの、該抗体の修飾、または該抗体と他のエフェクタとの組合せを排除しない。

30

**【 0 2 4 8 】**

本発明の抗血管新生の治療法および用途は、接合していないまたは裸の抗体と免疫抱合体との両方の使用も包含する。免疫抱合体に基づく抗血管新生の治療法において、本発明のヒト抗体またはその抗原結合断片は、第2の抗血管新生剤（第1の抗血管新生剤である、抗VEGF抗体それ自体）に動作可能に付着していることが好ましい。この付着した抗血管新生剤は、直接的または間接的な抗血管新生効果を有するものであってもよい。

**【 0 2 4 9 】**

抗血管新生の治療法および用途は、血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を含む、少なくとも第1の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含む。同様に、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

40

**【 0 2 5 0 】**

転移癌を治療する方法および用途は、転移癌を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を含む、少なくとも第1の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含む。さらなる方法において、この投与された抗体は第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

**【 0 2 5 1 】**

50

原発癌からの転移を減少させる方法および用途は、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を含む、少なくとも第1の医薬組成物の治療上有効な量を、原発癌を有するまたは原発癌を治療した動物または患者に投与することを含む。同様に、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

#### 【0252】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療する方法および用途は、このような疾病（例えば、血管化腫瘍）を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を、この疾病部位または血管化腫瘍内の血管新生を阻害するのに有効な量で投与することをさらに含む。同様に、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

10

#### 【0253】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療する方法および用途は、このような疾病または癌を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を阻害するのに有効な量で投与し、その結果、この疾病部位または血管化腫瘍内の血管新生を阻害することをさらに含む。代わりに、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

20

#### 【0254】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療する方法および用途は、血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することをさらに含む；ここで、抗VEGF抗体は、VEGF受容体のVEGFR1（F1t-1）に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を実質的に阻害する。同様に、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

30

#### 【0255】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療するさらなる方法および用途は、このような疾病、癌もしくは血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む；ここで、抗VEGF抗体は、VEGF受容体のVEGFR1（F1t-1）に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を実質的に阻害し、その結果、該動物におけるVEGFR1に媒介される事象を有意に損なうことなく、疾病部位、癌または血管化腫瘍内の血管新生を阻害する。また、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

#### 【0256】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療するさらなる方法および用途は、このような疾病、癌もしくは血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む；ここで、抗VEGF抗体は、VEGF受容体のVEGFR1（F1t-1）に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2（KDR/F1k-1）に対するVEGF結合を実質的に阻害し、その結果、疾病部位、癌または血管化腫瘍内の血管新生を阻害し、さらに該疾病部位のVEGFR2発現マクロファージ（特に、VEGFR2を発現している、腫瘍浸潤性のマクロファージ）を阻害する。また、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてもよい。

40

50

## 【0257】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療するさらなる方法および用途は、このような疾病、癌もしくは血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片の治療上有効な量を投与することを含む；ここで、抗VEGF抗体は、VEGF受容体のVEGFR1(F1t-1)に対するVEGF結合を有意に阻害することなく、VEGF受容体のVEGFR2(KDR/F1k-1)に対するVEGF結合を実質的に阻害し、その結果、該動物の破骨細胞および/または軟骨吸収細胞活性を有意に損なうことなく、疾病部位、癌または血管化腫瘍内の血管新生を阻害する。同様に、この投与された抗体は、第2の抗血管新生剤と動作可能に結合していてよい。

10

## 【0258】

血管新生を伴う疾病（血管新生を伴う癌のすべての型を含む）を治療する方法および用途は、このような疾病（例えば、血管化腫瘍）を患う動物または患者に、少なくとも第1の接合していないもしくは裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を、骨代謝に有意な副作用を及ぼさずに疾病部位または血管化腫瘍内の血管新生を阻害するのに有効な量で投与することをさらに含む。

## 【0259】

上述した抗血管新生の治療法および用途は、通常、薬学的に有効な組成物を、動物または患者に対して全身的に（経皮的、筋肉内、静脈内注射などによって）投与することを含む。しかしながら、腫瘍もしくは腫瘍内血管内皮細胞を含む血管新生部位に治療薬が局在化できる任意の投与ルートも許容し得る。従って、他の好適な送達ルートとして、経口、直腸、鼻、局所的、腔が挙げられる。米国特許第5,712,291号が、血管新生の疾患または障害の治療に関連して含むことができる投与のさまざまなルートをさらに記載するために、参照により本明細書に特に援用される。

20

## 【0260】

関節炎を治療するための使用および方法において、参考により本明細書に援用される米国特許第5,753,230号に他の免疫学的薬剤のために記載されているように、例えば、滑液囊内投与を用いることができる。目に関連した疾患において、眼の処方および投与が考慮される。

30

## 【0261】

本明細書に用いられる「投与」は、抗血管新生および/または抗腫瘍効果を及ぼすのに有効な量および時間での、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を供給または送達する薬物療法を意味する。タンパク様薬剤の受動的投与は、通常、一つには、その単純性および再現性のために好まれる。

## 【0262】

しかしながら、「投与」という用語は、本発明のVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体が腫瘍血管系に送達されるかまたは別の方法で供給される、任意のおよびすべての手段に言及するため本明細書に用いられる。従って、「投与」は、腫瘍に送達するという結果となるのに有効な方法で本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を産生する細胞を供給することを含む。このような態様において、選択的に浸透する膜、構造または移植可能デバイス（一般に治療を中止するために取り除くことができるもの）に細胞を処方するかまたは詰めることができ望ましい。この用量が綿密に観測、制御できる非侵襲性の方法であるから、外因性の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体が一般的に今もなお好まれる。

40

## 【0263】

本発明の治療法および用途は、腫瘍の周辺に発現または腫瘍に局在するという結果となるのに有効な方法で、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体をコードする核酸を供給することにも拡張される。患者の細胞のエックスビボでの操作を含む、裸のDNAの送達、組換え遺伝子およびベクター、細胞に基づく送達などの任意の遺伝子

50

治療技術を用いることができる。

【0264】

さらなる態様において、本発明は、疾病に伴う血管新生の血管に、選択された治療薬または診断薬を送達する方法および用途を提供する。このような態様は、選択された治療薬または診断薬を、腫瘍または腫瘍内血管系または間質に送達するために用いることが好ましく、血管化腫瘍を患う動物または患者に、診断薬または治療薬が本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体またはその抗原結合断片に動作可能に付着した少なくとも第 1 の免疫抱合体を含む組成物の生物学的に有効な量を投与することを含む。

【0265】

本発明が標的とする態様が内在する作用機構を理解することが、このような態様を実施するために必要なことではないが、本発明の抗体が、血管新生および腫瘍血管系に発現される VEGFR1 と結合した VEGF に対して結合することによって、付着した薬剤を血管新生および腫瘍血管系に送達すると考えられる。このように、本発明のこれらの方 10 法および用途は、選択された治療薬または診断薬を、血管新生の血管、腫瘍または腫瘍内血管系に送達することに関係し、そして治療を要する動物または患者に、診断薬または治療薬が少なくとも第 1 の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体またはその抗原結合断片に動作可能に付着した免疫抱合体を含む組成物の生物学的に有効な量を、血管新生の血管、腫瘍または腫瘍内血管系に発現、過剰発現または上方制御された VEGFR1 に結合した VEGF に対して該抗体が結合できるのに有効な方法で、投与すること、従って、診断薬または治療薬を血管新生の血管、腫瘍または腫瘍内血管系の VEGF - VEGFR1 に送達することを含む。

【0266】

選択された治療薬を腫瘍または腫瘍血管系または間質に送達することは、血流を抑える、特に腫瘍血管系の血流を抑え；破壊する、特に腫瘍血管系を破壊し；および壞死、特に腫瘍の壞死を誘導するよう作用する。このように、これらの方 20 法および用途は、血管化腫瘍を有する動物または患者を治療する方法として集約することができ、該動物または患者に、動作可能に治療薬に付着した、本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体またはその抗原結合断片を含む少なくとも第 1 の免疫抱合体を含む少なくとも第 1 の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含む。

【0267】

本発明に用いられる「治療上有効な量」は、選択する動物または患者に投与すると、腫瘍または腫瘍内血管内皮細胞の少なくとも一部を特異的に殺す；腫瘍または腫瘍内血管内皮細胞の少なくとも一部でアポトーシスを特異的に誘導する；腫瘍または腫瘍内血管の少なくとも一部で凝固を特異的に促進する；腫瘍の血液を輸送する血管の少なくとも一部を特異的に閉塞または破壊する；腫瘍の少なくとも一部で壞死を特異的に誘導する；および / または腫瘍退縮または寛解を誘発するのに有効な、本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体もしくはその免疫抱合体の量である。このような効果は、正常で健康な組織の血管内皮細胞にほとんど結合しないかもしくはまったく結合しないこと、またはそれをほとんど殺さないかもしくはまったく殺さないこと；健康で正常な組織の血管をほとんど凝固、閉塞、破壊しないかもしくはまったく凝固、閉塞、破壊しないことを示し；また、動物または患者の正常で健康な組織に対しては無視できるか管理できる程度の副作用を及ぼしながらも、達成される。

【0268】

腫瘍血管系での凝固もしくはその破壊を促進すること、および / または腫瘍間質に結合するおよび / または腫瘍壞死を引き起こすことに照らして、本明細書で用いられる「選択的に」および「特異的に」という用語は、腫瘍間質、血管系および腫瘍部位に実質的に限定され、動物または対象の正常で健康な組織での凝固、破壊および / または組織の壞死を引き起こすまでには実質的に拡張されない、間質結合、凝固、破壊および / または腫瘍壞死を達成する本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体またはその免疫抱合体の機能を意味する。従って、健康な細胞および組織の構造ならびに機能は、本発明

10

20

30

40

50

の実施に実質的に損なわれずに維持される。

【0269】

本発明の抗体がVEGFR1に関連するVEGFに結合することによって血管新生および腫瘍血管系に薬剤を効果的に送達するにもかかわらず、他の方法および用途は、治療薬を腫瘍間質に送達することに基づいて作用し、これによって、近接する血管に治療効果が及ぼされる。これらの方法および用途は、血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片に動作可能に付着した治療薬を含む免疫抱合体を、腫瘍間質内の受容体に結合していないVEGFに該免疫抱合体が結合するのに有効な量で、投与することを含む。

【0270】

これらの方法および用途は、血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片に動作可能に付着した治療薬を含む免疫抱合体を、付着した治療薬が周囲の腫瘍血管系および/または腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果を及ぼすように、腫瘍間質内の免疫抱合体が局在化するのに有効な量で、投与することを含む。

【0271】

このように、本発明の方法および用途と同様に、本発明の抗体および組成物は、少なくとも第1の治療薬または診断薬（特に、第1の「別個のまたは外因性の」治療薬）に付着した、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を含む、VEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体を含む組成物に拡張される。この点に関しては、この「VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体」それ自体が、「第1の治療薬」と称することができる。従って、任意の付着した治療薬は、第1の「別個のまたは外因性の治療薬」と称することができ、それは治療薬でもあるが、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体とは異なり、かつそれに付着していることを意味する。このような接合体に相当する用語は、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を、少なくとも「第2の、別個の」治療薬または診断薬に動作可能に付着したものとして記載することである。

【0272】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または治療用接合体は、放射性治療薬、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、チューブリン阻害薬、抗細胞薬剤もしくは細胞毒性剤または凝固剤（凝固因子）の1つ以上に連結することが好ましい。

【0273】

このように、本発明は、ヒト抗体が少なくとも第1の治療薬または診断薬に動作可能に付着した、幅広い接合抗体およびその断片を提供する。「免疫抱合体」という用語は、該抗体が他の有効な薬剤と動作可能に結び付いたものと定義するために広範に用いられ、任意の型の動作可能な連結のみに言及する意図はなく、特に化学的な「接合」に限定されてない。組換え融合タンパクを特に意図している。送達するまたは標的とする薬剤が標的に結合でき、治療薬または診断薬が送達されるのに充分機能的である限り、その付着の様式は好適である。

【0274】

抗体上の糖質部分を介した役割の付着も考慮される。糖鎖形成（O-連結およびN-連結の両方）は抗体で自然に起こる。組換え抗体は、必要に応じて、付加的な糖鎖形成部位を再形成または形成するために修飾することができ、それは、該抗体の一次配列に、適切なアミノ酸配列（Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser, またはThrなど）を遺伝子操作して入れることによって容易に達成される。

【0275】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または治療用接合体に用いられる、目下好ましい薬剤ならびに関連した方法および用途は、該抗体の効果を補完もしくは強化するもの、および/または特定の腫瘍タイプまたは患者のために選択されたもの

10

20

30

40

50

である。「抗体の効果を補完または強化する治療薬」として、放射性治療薬、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤およびチューブリン阻害薬が挙げられ、それらのうちいずれか1つ以上が該抗体とともに用いるのに好ましい。

#### 【0276】

好ましい薬剤と、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体との付着または結合が「免疫抱合体」を生じ、このような免疫抱合体は、多くの場合、強化されかつさらに相乗的な抗腫瘍特性を有する。この方法に用いられる、目下好ましい抗血管新生剤は、アンジオスタチン、エンドスタチン、アンジオポエチンのいずれか1つ、バスキュロスタチン[vasculostatin]、カンスタチン[canstatin]およびマスピン[maspin]である。  
目下好ましいチューブリン阻害薬として、コルヒチン、タキソール、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン[vindescine]および1つ以上のコンプレタスタチンが挙げられる。

10

#### 【0277】

凝固因子の使用が、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または「凝固リガンド[coaguligand]」をもたらすのに対して、抗細胞薬剤および細胞毒性剤の使用は、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体「抗毒素」をもたらす。放射性治療薬、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、チューブリン阻害薬、抗細胞薬剤および細胞毒性剤ならびに凝固因子の1つ以上からなる組合せなど、少なくとも2つの治療薬の使用も意図している。

20

#### 【0278】

特定の応用において、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体である薬物療法は、血管内皮細胞の増殖もしくは細胞分裂を絶つかまたは抑制することができる、細胞毒性の、細胞増殖抑制性のまたは別の抗細胞性の薬剤に、動作可能に付着する。好適な抗細胞剤として、細胞毒および細胞増殖抑制性剤と同様に、化学療法剤が挙げられる。好ましくは細胞が細胞周期から外れるように、細胞増殖抑制性剤は通常、標的細胞の自然な細胞周期を妨げるものである。

20

#### 【0279】

化学療法剤の例として、ステロイド；サイトカイン；シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトレキサートまたはアミノブテリンなどの代謝拮抗薬；アンスラサイクリン；マイトイシンC；ビンカアルカロイド；抗生物質；デメコルチニ；エトポシド；ミトラマイシン；およびクロランブシルまたはメルファランなどの抗腫瘍アルキル化剤が挙げられる。実際、表C中の本明細書で開示した任意の薬剤を用いることができる。特定の好ましい抗細胞剤は、ダウノルビシン、ドキソルビシン／アドリアマイシンなどのDNA合成阻害剤である。全体的に見て、タキソール／パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタビン、コンプレタスタチンおよびドキソルビシン／アドリアマイシンが目下好ましい抗癌剤である。

30

#### 【0280】

サイトカインおよびケモカインのうち、目下好ましい薬剤は、IL-2, IL-12, TNF-, インターフェロン- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、およびLSEC(肝臓で発現するケモカイン)である。サリシリハラミド、コンカナマイシンまたはバフィロマイシンなどのV型ATPアーゼ阻害剤も目下好ましく、ブシムベリン、ペデリン、イルシニアスタチンAなどのタンパク合成阻害剤も好ましい。

40

#### 【0281】

特定の治療への応用において、他の潜在的な薬剤と比較して、多くの毒素が極めて甚大な殺細胞効果をもたらすことができるため、毒素部分が好ましい。従って、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体構造物にとっての特定の好ましい抗細胞剤は、植物、真菌または細菌に由来する毒素である。毒素の例として、エピポドフィロトキシン；菌体内毒素または菌体内毒素のリピッドA部分；サポリンまたはゲロニンなどのリボソーム不活性化タンパク質； $\alpha$ -サルシン[sarcin]；アスペルギリン；レストリクトシン；胎盤リボヌクレアーゼなどのリボヌクレアーゼ；ジフテリアトキシンおよびシュード

50

モナス菌外毒素が挙げられる。目下好ましい例は、リシン，ゲロニン，アブリン，ジフテリア，シードモナス菌および百日咳毒素である。

【0282】

特定の好ましい毒素は、リシンA鎖などのような、A鎖毒素である。最も好ましい毒素部分は、多くの場合、糖鎖残基を修飾または除去する処理を施したリシンA鎖、いわゆる「脱グリコシル化したA鎖」(d g A)である。脱グリコシル化したリシンA鎖は、その極度の効能、より長い半減期、ならびにこれを臨床上の等級および規模に製造することが経済的に実施可能なことから、好ましい。組換え型および／または切り詰められたリシンA鎖も用いることができる。

【0283】

抗毒素を用いて腫瘍を標的にするおよび治療することにおいて、以下の特許が、抗細胞剤および細胞毒性薬剤に関して本発明の教示をさらに補充するために、参照により本明細書に特に援用される：米国特許第6,004,554号、第5,855,866号、第5,965,132号、第5,776,427号、第5,863,538号、第5,660,827および第6,051,230号。

10

【0284】

本発明のVEGF R2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、チューブリン阻害薬に連結することができる。本明細書で用いられる「チューブリン阻害薬」は、好ましくは細胞有糸分裂に必要なチューブリン活性（好ましくはチューブリン重合または脱重合）を直接的または間接的に阻害することによって、細胞有糸分裂を阻害する、任意の薬剤、薬物、プロドラッグまたはその組合せを意味する。

20

【0285】

これとともに用いる目下好ましいチューブリン阻害薬は、コルヒチン；タキソール、ドセタキセルおよびパクリタキセルなどのタキサン；ビンプラスチン、ビンクリスチンおよびビンデシンなどのビンカアルカロイド；ならびにコンプレタスタチンである。コンプレタスタチンの例としては、A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, B-1, B-2, B-3, B-4, D-1およびD-2ならびにそのプロドラッグの形態を含む、コンプレタスタチンA, Bおよび／またはDである。

【0286】

本発明のVEGF R2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体薬物療法は、凝固を促進できる成分（すなわち、凝固剤）を含むことができる。ここで、標的抗体は、直接的または間接的（例えば、他の抗体を介して）に、直接的または間接的に凝固を促進する因子に連結することができる。

30

【0287】

このような用途に好ましい凝固因子は、切り詰められたTF(tTF)，二量体、三量体、重合体／多量体TF，第VII因子の活性化能が欠損した変異体TFなどの組織因子(TF)およびTF誘導体である。他の好適な凝固因子としては、第II/Ia因子、第VII/VIIa因子、第IX/Xa因子および第X/Xa因子などのビタミンK依存性凝固剤；Gla修飾がないビタミンK依存性凝固因子；ラッセルクサリヘビ蛇毒第X因子活性剤；トロンボキサンA<sub>2</sub>およびトロンボキサンA<sub>2</sub>シンターゼなどの血小板活性化化合物；ならびに2-抗プラスミンなどのフィブリン溶解阻害剤が挙げられる。全体的に見て、切り詰められた組織因子(tTF)が目下好ましい。

40

【0288】

凝固リガンドを用いて腫瘍を標的にするまたは治療することは、以下の特許に記載されており、凝固リガンドおよび凝固因子に関して本発明の教示をさらに補充するために、各自参照により本明細書に特に援用される：米国特許第5,855,866号；第5,965,132号；第6,093,399号；第6,004,555号；第5,877,289号；および第6,036,955号。

【0289】

免疫抱合体および抗毒素の調製は、通常、当該分野において周知である（例えば、米国

50

特許第4,340,535号を参照)。以下のそれぞれの特許は、抗毒素の生成、精製および使用に関して本発明の教示をさらに補充するために、参考により本願明細書にさらに援用される:米国特許第6,004,554号;第5,855,866号;第5,965,132号;第5,776,427号;第5,863,538号;第5,660,827号;および第6,051,230号。

#### 【0290】

免疫抱合体および抗毒素の調製における利点は、特定のリンカーを用いることにより達成することができる点である。例えば、立体的に「込み合った[hindered]」ジスルフィド結合を含むリンカーが多くの場合好ましいが、それは、インビボでの安定性がより大きく、その結果、作用部位で結合する前に毒素部位が放出されるのを防止するためである。通常、所望の作用部位を除く体中のいたるところで見出される条件下で、そのままの状態を保っている接合体を有することが望ましく、その所望の作用部位においては該接合体が良好な「放出」特性を有することが望ましい。

10

#### 【0291】

使用する特定の毒素化合物に応じて、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および毒素化合物に動作可能に付着しているペプチド・スペーサを提供することが必要になることがある。ここで、該ペプチド・スペーサは、ジスルフィド結合したループ構造に畳み込むことができる。ループ内のタンパク分解性開裂の結果、抗体および毒素化合物が単一のジスルフィド結合のみで連結しているヘテロ二量体ポリペプチドが生じるだろう。

20

#### 【0292】

特定の他の毒素化合物を利用する場合、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および毒素化合物に動作可能に付着させるために、開裂できないペプチド・スペーサを提供することができる。開裂できないペプチド・スペーサに関連して用いることができる毒素は、それ自体、タンパク分解性開裂によって細胞毒性ジスルフィド結合形態に転換することができるものである。このような毒素化合物の例は、シードモナス菌外毒素化合物である。

20

#### 【0293】

様々な化学療法剤および他の薬物は、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体薬物療法に、首尾よく接合することもできる。抗体に接合している抗悪性腫瘍薬剤の例として、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサートおよびビンプラスチンが挙げられる。さらに、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモンおよび-アマニチンなどの他の薬剤に付着することについて文書化されている(米国特許第5,660,827号;第5,855,866号;および第5,965,132号を参照;それぞれ本明細書に援用される)。

30

#### 【0294】

凝固リガンドの調製も容易に実施する。1つ以上の凝固因子が本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体と動作可能に連結することは、直接的な連結であってもよく、例えば、抗毒素について上記したものなどである。あるいは、動作可能な連結は間接的な連結であってもよく、例えば、凝固因子に結合する二次結合領域(好ましくは抗体、または抗体の抗原結合領域)に抗体が動作可能に付着する場合などである。凝固因子は、その凝固に機能的な部位(特に、分子と連結するために共有結合が用いられるところ)とは異なる部位で、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に付着しなければならない。

40

#### 【0295】

間接的に連結した凝固リガンドは、多くの場合、二重特異性抗体に基づく。二重特異性抗体の調製も、当該分野において周知である。調製法の1つとして、一方で標的腫瘍成分に特異性を有する抗体を、他方で凝固剤を別々に調製する方法が挙げられる。2つの選択した抗体に由来するペプシンのF(ab')<sub>2</sub>断片を生成した後、それに続いて、分かれたF(ab')<sub>2</sub>断片を提供するためにそれぞれを還元する。カップリングするべき2つ

50

のパートナーのうち 1 つにある S H 基は、その後、 o - フェニレンジマレイミドなどの架橋試薬でアルキル化し、 1 つのパートナー上に遊離マレイミド基を付与する。このパートナーは、その後、チオエーテル結合によってもう一方に接合することができ、所望する F ( a b ' )<sub>2</sub> ヘテロ接合体を与える (Glennie et al., 1987) 。 S P D P またはプロテイン A との架橋などの他の方法も実施することができる。

#### 【 0 2 9 6 】

免疫抱合体、抗毒素および凝固リガンドの調製において、組換え発現を用いることができる。選択した本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体をコードする核酸配列および治療薬、毒素または凝固剤は、発現ベクターのイン・フレームに付着させる。このように、組換え発現は、核酸の翻訳をもたらし、所望の免疫抱合体を產生する。化学架橋剤およびアビシン：ビオチン橋も、治療薬を本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に連結することができる。

10

#### 【 0 2 9 7 】

以下の特許は、二重特異性抗体凝固リガンドを含む、凝固リガンドの調製、精製および使用に関して本発明の教示をさらに補充するために、各々参照により本明細書に援用される：米国特許第 5 , 855 , 866 号；第 5 , 965 , 132 号；第 6 , 093 , 399 号；第 6 , 004 , 555 号；第 5 , 877 , 289 号；および第 6 , 036 , 955 号。

20

#### 【 0 2 9 8 】

放射性治療薬、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、チューブリン阻害薬、毒素および凝固剤を用いた免疫抱合体が、化学接合または組換え発現により調製されたものであろうとなかろうと、生物学的に放出可能な結合および / または選択的に開裂可能なスペーサもしくはリンカーを用いることができる。このような組成物は、血中を循環している間、適度に安定であることが好ましく、疾病または腫瘍部位に送達されると選択的または特異的に放出される。

20

#### 【 0 2 9 9 】

特定の好ましい例は、酸感受性スペーサであり、ここで、コルヒチンまたはドキソルビシンに連結した本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体を特に考慮している。他の好ましい例は、腫瘍環境などの疾病部位内に特異的または選択的に存在しました活性化しているペプチダーゼおよび / またはプロテイナーゼの開裂部位を含むペプチド・リンカーである。疾病または腫瘍部位への免疫抱合体の送達は、開裂そして凝固因子の比較的特異的な放出という結果となる。

30

#### 【 0 3 0 0 】

ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノーゲン、 T G F  $\beta$  、スタフィロキナーゼ、トロンビン、第 I X a 因子、第 X a 因子またはメタロプロティナーゼ (MMP) (間質性のコラゲナーゼ、ゼラチナーゼもしくはストロメリシンなど) の開裂部位を含むペプチド・リンカーが特に好ましく、米国特許第 5 , 877 , 289 号および第 6 , 342 , 221 号 (このような目的で参照により本明細書にそれぞれ援用される) に記載され、実施できる。

40

#### 【 0 3 0 1 】

本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、生物学的に放出可能な結合を介して治療薬を付着できる官能基を導入するために誘導体化することもできる。このように、標的抗体は、側鎖の末端にヒドラジド基、ヒドラジン基、第一級アミン基または第二級アミン基を導入するために誘導体化することができる。治療薬は、シップ塩基連結、ヒドラゾンもしくはアシルヒドラゾン結合またはヒドラジド・リンカーを介して接合することができる (米国特許第 5 , 474 , 765 号および第 5 , 762 , 918 号) 。

#### 【 0 3 0 2 】

抗血管新生または血管標的に本来基づくものであろうとなかろうと、本発明の組成物および方法は、他の薬物療法および診断法と組み合わせて用いることができる。本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体と「組み合わせて」用いる生物学的薬剤

50

(好ましくは診断薬または治療薬)に関して、「組み合わせて」という用語は、幅広い態様をカバーするために簡潔に用いる。このように、「組み合わせて」という用語は、特に明記しない、または科学用語から明らかでない限り、複合した組成物、医薬、カクテル、キット、ならびに一次および二次医薬用途の様々な形態に適用する。

#### 【0303】

このように、本発明の「複合の」態様としては、例えば、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGFが裸の抗体であり、それに動作可能に付着していない薬剤または治療薬と組み合わせて用いる場合などが挙げられる。このような場合、薬剤または治療薬は、標的としない型または標的とする型で用いることができる。「標的としない型」において、薬剤(特に治療薬)は、通常、当該分野におけるそれらの標準的な使用法に従って用いられる。「標的とする型」において、薬剤は、通常、薬剤または治療薬を血管新生疾病部位または腫瘍に送達する別の抗体または標的領域に動作可能に付着している。生物学的薬剤のこのように標的とする型の使用(診断法および薬物療法の両方)も、当該分野において、まったく標準的である。

10

#### 【0304】

本発明の他の「複合の」態様において、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、免疫抱合体であり、ここで、該抗体それ自体に、薬剤または治療薬が動作可能に連結または複合している。動作可能な付着は直接的または間接的な付着のすべての型を含み、本明細書または当該分野において文書化されている。

20

#### 【0305】

「複合の」用途も、特に治療薬と結合する本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に関して、複合した組成物、医薬、カクテル、キット、方法、ならびに治療薬がプロドラッグの形態である一次および二次医薬用途を含む。このような態様において、プロドラッグを薬の機能的な形態に変換することができる活性化成分は、先の場合と同様に、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体と動作可能に連結することができる。

30

#### 【0306】

特定の好ましい態様において、治療組成物、組合せ、医薬、カクテル、キット、方法、ならびに第一および第二医薬用途は、「プロドラッグの組合せ」である。当業者により理解されるように、「プロドラッグの組合せ」という用語は、特に明記しない限り、本発明の抗体が、プロドラッグ自体に付着するのではなく、プロドラッグを活性薬に変換できる成分に動作可能に付着することを意味する。しかしながら、本発明のプロドラッグ態様がプロドラッグの組合せとして用いることを必要とすることは要求されていない。したがって、プロドラッグは、それらが当該分野において用いられる任意の様式(ADEPトおよびその他の形態を含む)で用いることができる。

30

#### 【0307】

このように、好ましくは診断薬、より好ましくは治療薬に関して、複合した組成物、医薬、カクテル、キット、方法、ならびに第一および第二医薬用途が記載されている場合、接合または非接合のある形態において、ある形態の抗体およびある形態の生物学的な診断薬もしくは治療用薬の全体的な提供を達成する限り、この組合せは、裸の抗体であるVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および免疫抱合体を含み、ここで、本発明のインビボでの態様の実施は、裸の抗体もしくは免疫抱合体および生物学的な診断薬もしくは治療薬の、前、同時または後の投与を含む。

40

#### 【0308】

本発明の特に好ましい複合した組成物、方法および用途は、本発明のVEGFR2-ブロッキングヒト抗VEGF抗体およびエンドスタチン(米国特許第5,854,205号)を含むものである。これらは、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体が裸の抗体または免疫抱合体である場合を含み；免疫抱合体であるとき、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、任意にアンジオスタチンとともに、エンドスタチンに連結する；ここで、複合の治療法または用途が、任意にアンジオスタチ

50

ンとともに、エンドスタチンの、前、同時または後の投与を含み；接合または非接合のある形態において、抗体、エンドスタチンおよび任意にアンジオスタチンの全体的な提供が達成される場合に限る。コラゲナーゼが、腫瘍に特異的に送達される場合、インシテュでエンドスタチンを產生し、同じ利点が得られることから、コラゲナーゼと動作可能に連結した本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体も提供される。

#### 【 0 3 0 9 】

本発明の腫瘍に対する効果について上述のそして他の説明は、作用の複合様式や付着した薬剤のタイプなどを説明するために単純になされる。この記述方法は、本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の有益な特性の、控え目な表現としてでも、過度の単純化としても解釈すべきではない。従って、このような抗体自体が抗血管新生特性および V E G F 中和特性（V E G F の生存機能を中和するなど）を有すること、このような抗体の免疫抱合体がこれらの特性を維持し、付着した薬剤の特性とそれらを組み合わせること、そして、さらに、抗体と任意の付着した薬剤との複合効果が概して強化および／または拡大されることが理解される。

10

#### 【 0 3 1 0 】

従って、本発明は、任意に少なくとも第 1 の組成物または容器中に、少なくとも第 1 の本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体もしくは抗原結合断片またはこのような抗 V E G F 抗体の免疫抱合体の生物学的に有効な量；および少なくとも第 2 の生物学的薬剤、成分またはシステムの生物学的に有効な量を含む、組成物、医薬組成物、治療キットおよび医薬のカクテルを提供する。

20

#### 【 0 3 1 1 】

「少なくとも第 2 の生物学的薬剤、成分またはシステム」は、多くの場合、治療薬または診断薬、成分またはシステムであるが、第 1 ではない。例えば、少なくとも第 2 の生物学的薬剤、成分またはシステムは、抗体の修飾のためのおよび／または他の薬剤を該抗体に付着させるための成分を含むことができる。特定の好ましい第 2 の生物学的薬剤、成分またはシステムは、プロドラッグまたはプロドラッグを作製および使用するための成分であり、プロドラッグそれ自体を作製する成分およびこのようなプロドラッグ態様または A D E P T 態様における機能に本発明の抗体を適応させるための成分を含む。

30

#### 【 0 3 1 2 】

治療薬または診断薬が少なくとも第 2 の生物学的薬剤、成分またはシステムとして含まれる場合、このような治療および／または診断は、概して、血管新生疾病に関連して用いるものである。このような薬剤は、米国特許第 5,712,291 号、第 5,753,230 号、第 5,972,922 号、5,639,757 号、WO 98/45331 および WO 98/16551（それぞれ参照により本明細書に特に援用される）のいずれか 1 つに開示されている疾患もしくは障害の治療または診断に用いるのに好適なものである。

40

#### 【 0 3 1 3 】

治療されるべき疾病が癌である場合、「少なくとも第 2 の抗癌剤」は、治療キットまたはカクテルに含まれる。「少なくとも第 2 の抗癌剤」という用語は、第 1 の抗癌剤である本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体を基準として選択される。このように、本発明の抗体は、化学療法剤、放射性治療薬、サイトカイン、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤または抗癌抗毒素または凝固リガンドと複合化することができる。

#### 【 0 3 1 4 】

本明細書で用いられる「化学療法剤」は、悪性腫瘍の治療に用いられる典型的な化学療法剤または薬物に言及する。この用語は、化学療法剤が抗癌効果を及ぼすという点で、他の化合物が化学療法剤として技術的に記述される事実にもかかわらず単純にするために用いられる。しかしながら、「化学療法剤」は、当該分野において異なる意味を有するようになり、この標準的な意味に従って使われている。化学療法剤の多くの例が、本明細書に記載されている。本発明と組み合わせて用いられる場合、用量は減るかもしれないが、当業者は化学療法剤の使用法および適切な用量を容易に理解する。

#### 【 0 3 1 5 】

50

「化学療法剤」とも称することができる薬物の新規クラスは、アポトーシスを誘導する薬剤である。遺伝子、ベクター、アンチセンス構造物およびリボザイムを含むこのような薬物の任意の1つ以上は、適切であれば、本発明と組み合わせて用いることもできる。目下好ましい第2の薬剤は、アンジオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスピンなどの抗血管新生剤である。

#### 【0316】

抗癌剤の他の例としては、ネオマイシン、ポドフィロトキシン、TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$ -インターフェロン、カルシウムイオノホア、カルシウム流出を誘導する薬剤、およびこれらの任意の誘導体またはプロドラッグが挙げられる。目下好ましいチューブリン阻害薬としては、コルヒチン、タキソール、ピンプラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、コンプレタスタンまたはこれらの誘導体もしくはプロドラッグが挙げられる。

10

#### 【0317】

抗癌抗毒素または凝固リガンドは、さらに適切な抗癌剤である。「抗癌抗毒素または凝固リガンド」または標的薬剤/治療薬剤の構造物は、腫瘍細胞、腫瘍血管系もしくは腫瘍間質の標的可能なまたは接近可能な成分に結合し、そして治療薬剤（細胞毒性薬剤（抗毒素）および凝固因子（凝固リガンド）を含む）に動作可能に付着している標的薬剤（抗体またはその抗原結合断片を含む）に基づく。細胞質抗原および/または核腫瘍細胞抗原を含む、壊死性さもなくば傷害性の腫瘍細胞または血管内皮細胞から放出された成分を標的にすることもできるが、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍間質の「標的可能なまたは接近可能な成分」は、表面に発現した成分、表面に接近可能な成分または表面に局在化した成分が好ましい。

20

#### 【0318】

VEGFおよびFGFなどの増殖因子；腫瘍血管系に特異的に結合する、R-G-Dのトリペプチドを含むペプチド；ならびに、アネキシンおよび関連するリガンドなどの他の標的成分を含む、抗体標的薬剤および非抗体標的薬剤を用いることができる。

#### 【0319】

抗腫瘍細胞抗毒素または凝固リガンドは、B3(ATCC HB 10573)、260F9(ATCC HB 8488)、D612(ATCC HB 9796)およびKS1/4と称される抗体からなる群に例示される抗体を含むことができ、該KS1/4抗体は、pGK C2310(NRRL B-18356)ベクターまたはpG2A52(NRRL B-18357)ベクターを含む細胞から得られる。

30

#### 【0320】

壊死した腫瘍細胞から放出された細胞内成分に結合する、抗体またはその抗原結合領域を含む抗腫瘍細胞標的薬剤も考慮されている。このような抗体は、浸潤されることを誘導され得る細胞内、または実質的にすべての新生物および正常細胞の細胞ゴースト[cell ghost]内に存在するが、哺乳動物の正常な生細胞の外側に存在しないか接近できない不溶性細胞内抗原に結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であることが好ましい。

#### 【0321】

米国特許第5,019,368号、第4,861,581号および第5,882,626号（それぞれ、アラン・エブスタインおよび同僚が公表）は、インビボで悪性細胞から接近可能になる細胞内抗原に特異的な抗体の作製法をより使用法をさらに記載および教示するために、それぞれ参照により本明細書により特に援用される。記載の抗体は、哺乳動物の悪性細胞の内部細胞成分に充分特異的であるが、外部細胞成分には充分特異的ではない。標的の例として、ヒストンが挙げられるが、壊死した腫瘍細胞から特異的に放出される細胞内成分のすべてが含まれる。

40

#### 【0322】

血管化腫瘍を患った動物または患者に投与すると、インビボで発生し、少なくとも一部の悪性腫瘍細胞を壊死させる腫瘍リモデリングの過程のために、血管化腫瘍が壊死した腫瘍細胞を天然に含んでいるという事実によって、このような抗体は、悪性腫瘍細胞に局在化する。加えて、腫瘍壊死を強化する他の治療法と組み合わせたこのような抗体の使用は

50

、標的およびそれに続く治療の効果を強化するのに役立つ。

【0323】

本明細書にも一般的に開示されているように、抗体のこれらタイプは、直接的または間接的にアンジオポエチンに関連し、血管化腫瘍内の壞死した悪性腫瘍細胞にアンジオポエチンを投与するためにこのように用いることができる。

【0324】

米国特許第5,019,368号、第4,861,581号および第5,882,626号（それぞれ参照により本明細書に援用される）にも開示されているように、これらの抗体は、複合診断法（下記を参照）で、および抗腫瘍治療の効果を決定するための方法で用いることができる。このような方法は一般的に、標識バージョンの抗体の調製および投与、および壞死組織内に選択的に結合した内部細胞成分標的への該標識抗体の結合の測定を含む。このことにより、この方法は、壞死組織を画像化し、ここで、抗体の局在的な濃度は腫瘍細胞の存在を示すものであり、抗腫瘍治療により殺されたおよび細胞ゴーストの存在を示す。

10

【0325】

抗腫瘍間質抗毒素または凝固リガンドは、通常、結合組織成分、基底膜成分または活性血小板成分に結合する（例としては、フィブリン、RIBSまたはLIBSに対する結合）抗体を含む。

【0326】

抗腫瘍血管系抗毒素または凝固リガンドは、血管化腫瘍の血液を輸送する血管（好ましくは腫瘍内血管）の表面に発現した、表面に接近可能なまたは表面に局在化した成分に結合する、リガンド、抗体またはその断片を含むことができる。このような抗体は、エンドグリーン（TEC-4およびTEC-11抗体）、TGF受容体、E-セレクチン、P-セレクチン、VCAM-1、ICAM-1、PSMA、VEGF/VPF受容体、FGF受容体、TIE、 $\alpha_3$ インテグリン、プライトロビン、エンドシアリンおよびMHCクラスIタンパク質などの腫瘍内血管系の細胞表面受容体を含む、血管化腫瘍の腫瘍内血管の表面に発現した成分に結合するものを含む。この抗体は、腫瘍内血管の、サイトカインで誘導されうるまたは凝固剤で誘導されうる成分にも結合することもできる。特定の好ましい薬剤は、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミンなどの、アミノホスホリピドに結合する。

20

【0327】

他の抗腫瘍血管系抗毒素または凝固リガンドは、腫瘍内血管系の細胞表面受容体に結合するリガンドまたは増殖因子に結合する、抗体またはその断片を含むことができる。このような抗体は、VEGF/VPF（GV39およびGV97抗体）、FGF、TGF、TIEに結合するリガンド、腫瘍に関連したフィブロネクチンのアイソフォーム、細胞分散因子[scatter factor]／肝細胞増殖因子（HGF）、血小板第4因子（PF4）、PDGFおよびTIMPに結合するものを含む。抗体またはその断片は、リガンド：受容体複合体または増殖因子：受容体複合体にも結合するが、そのリガンドもしくは増殖因子または受容体がリガンド：受容体複合体または増殖因子：受容体複合体の状態には、リガンドもしくは増殖因子またはその受容体には結合しない。

30

【0328】

抗腫瘍細胞、抗腫瘍間質または抗腫瘍血管系抗体-治療薬の構造物は、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、チューブリン阻害薬、細胞毒性剤（植物由来、真菌由来または細菌由来の毒素など）を含むことができる。リシンA鎖および脱グリコシル化リシンA鎖が、多くの場合好ましい。抗腫瘍細胞、抗腫瘍間質または抗腫瘍血管系抗体-治療薬の構造物は、凝固剤（直接的および間接的に作用する凝固因子）または凝固因子に結合する二次抗体結合領域を含むことができる。組織因子または切り詰められた組織因子などの組織因子誘導体との動作可能な付着は、多くの場合好ましい。

40

【0329】

本発明の組成物、キットおよび/または医薬に関して、治療薬の複合した有効量は、单

50

一の容器もしくは容器手段[container means]内に含まれてもよく、別個の容器または容器手段内に含まれてもよい。カクテルは、通常、複合使用のために一緒に混ぜられる。静脈内投与のために処方される薬剤が、多くの場合好ましい。イメージング成分も含むことができる。キットは、含まれている少なくとも第1の抗体および1つ以上の他の生物学的薬剤を使用するための取扱説明書も含むことができる。

### 【0330】

一般的に言えば、少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体と実質的に同時に（単一の医薬組成物から、またはともに近接して投与される2つの医薬組成物から）投与することができる。

### 【0331】

あるいは、少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の投与から連続した時点で投与することができる。本明細書に用いられる「連続した時点」は、少なくとも第2の抗癌剤が動物または患者に、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の投与とは別の時点で投与するように、「時間をずらして」を意味する。通常、2つの薬剤がそれぞれの治療効果を発揮できるように効果的に相隔たれた時点で投与される、すなわち2つの薬剤は「生物学的に有効な時間的間隔」で投与される。少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体よりも生物学的に有効な時間早く、またはその薬剤よりも生物学的に有効な時間後で、投与することができる。

### 【0332】

したがって、本発明は、下記(a)、(b)を含む、血管化腫瘍を患う動物または患者を治療する方法を提供する：

(a) 全身腫瘍組織量を実質的に減少させる第1の治療に、動物または患者を供すること；および

(b) それに続いて、少なくとも第1の抗血管新生剤を、動物または患者に、生存している任意の腫瘍細胞からの転移を阻害するのに有効な量で投与すること；ここで、第1の抗血管新生剤が、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片であり；任意に、該抗体または断片が第2の抗血管新生剤に動作可能に付着している。

### 【0333】

好ましい第1の治療は、外科的な切除および化学療法の介在を含む。複合的な抗血管新生剤も用いることができる。

### 【0334】

血管化腫瘍を患う動物または患者の治療する他の方法は、下記(a)、(b)を含む：

(a) 第1の抗体-治療薬の構造物を、動物または患者に、実質的な腫瘍壊死を誘導するのに有効な量で投与すること；ここで、第1の抗体-治療薬構造物が、腫瘍細胞、腫瘍血管系もしくは腫瘍間質の、表面に発現した、表面に接近可能なまたは表面に局在化した成分に結合する第1の抗体またはその抗原結合断片に動作可能に連結した治療薬を含む；ならびに

(b) それに続いて、第2の抗体を、動物または患者に、生存している任意の腫瘍細胞からの転移を阻害するのに有効な量で投与すること；ここで、第2の抗体が、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片であり；さらに任意に、該抗体または断片が第2の抗血管新生剤に動作可能に付着している。

### 【0335】

特に好ましい態様において、本発明のヒトVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体は、プロドラッグおよびADEPトとの組合せの使用に提供される。このような、組成物、組合せ、医薬、キット、方法および用途において、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその断片は、変換能力もしくは酵素能力を提供するよう修飾される、または少なくとも1つのプロドラッグを薬物の活性化型に変換することができる。

10

20

30

40

50

できる少なくとも第1の変換剤または酵素と動作可能に付着する（好ましくは共有結合で連結する、または接合する）。

【0336】

酵素または酵素が複合化した抗体もしくは断片は、最初に別個に処方した「プロドラッグ」と組み合わせる。プロドラッグは、酵素能力、変換機能または本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGFに付着した酵素との接触を介して薬物の活性化型に変換される、薬物の不活性化または弱く活性化した型である。

【0337】

したがって、好ましくは別個の組成物および／または容器内に、下記(a)、(b)を含むキットが提供される：

(a) 酵素機能を有する、本発明の少なくとも第1のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその断片の生物学的に有効な量（好ましくは、該抗体または断片が、少なくとも第1の酵素に、動作可能に付着、共有結合で連結または接合している）；ならびに

(b) VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または断片の酵素機能、またはそれに付着、連結もしくは接合した酵素によって、実質的に活性な薬物に変換される、少なくとも第1の実質的に不活性なプロドラッグの生物学的な有効量。

【0338】

本発明は、下記(a)、(b)を含む、好都合な方法および用途をさらに提供する：

(a) 血管化腫瘍を患う動物または患者に、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片を含む、少なくとも第1の医薬組成物の生物学的に有効な量を投与することであり、ここで、該抗体または断片が酵素機能を有し、好ましくは該抗体または断片が、少なくとも第1の酵素に動作可能に付着、共有結合で連結もしくは接合している；ここで、投与後、該抗体または断片が、血管系、腫瘍内血管系または血管化腫瘍の間質に局在する；ならびに

(b) それに続いて、動物または患者に、有効な時間が経過した後、少なくとも1つの実質的に不活性なプロドラッグの生物学的に有効な量を含む、少なくとも第2の医薬組成物の生物学的な有効量を投与すること；ここで、該プロドラッグが、血管系、腫瘍内血管系または血管化腫瘍の間質に局在する、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその断片の酵素機能、またはそれに付着、連結もしくは接合した酵素によって、実質的に活性な薬物に変換される。

【0339】

特定の他の態様において、本発明の抗体および免疫抱合体は、1つ以上の診断薬、通常は、血管新生疾病に関連して用いる診断薬と組み合わせることができる。このように、様々な診断組成物、キットおよび方法は、本発明の範囲内に包含される。

【0340】

さらなる側面は、本明細書で定義されるように本発明のヒト抗体または他のタンパク質の適切な量を対象に投与すること、ならびに対象の体内において本発明の抗体または他のタンパク質の存在および／または量および／または位置を検出することを含む、対象の診断またはイメージングの方法である。

【0341】

上記用途および方法に従ってイメージングまたは診断されるべき適切な疾病は、本明細書の他で記載した血管新生に関連した任意の疾病も含む。

【0342】

一つの態様において、本発明は、下記(a)の段階を含む、哺乳動物における血管新生に関連した疾病を診断する方法を提供する：

(a) 該哺乳動物から採取した試験検体を本発明の1つ以上の任意の抗体に接触させること。

【0343】

さらなる態様において、本発明は、下記(a)～(c)の段階を含む、哺乳動物におけ

10

20

30

40

50

る血管新生に関連した疾病を診断する方法を提供する：

(a) 該哺乳動物から採取した試験検体を本発明の1以上の抗体に接触させること；

(b) 該試験検体中の抗体-抗原複合体の存在および/または量および/または位置を測定すること；ならびに、任意に

(c) 該試験検体中の抗体-抗原複合体の存在および/または量を対照と比較すること。

#### 【0344】

上記方法において、該接触段階は、抗体-抗原複合体が形成できる条件下で実施する。適切な条件は、当業者が容易に決定することができる。

10

#### 【0345】

上記方法において、例えば、疾病または組織切片に影響されると疑われる生検細胞、組織または器官などの、適切な任意の試験検体を用いることができる。

#### 【0346】

特定の上記方法において、試験検体中の抗体-抗原複合体がいかなる量で存在しても、疾病が存在することを示すだろう。好ましくは、陽性との診断がなされる場合、試験検体中の抗体-抗原複合体の量が、適切な対照検体で見出される量より多い（好ましくは有意に多い）。より好ましくは、有意に多いレベルが統計学的に有意であり、好ましくは<0.05の確率値を有する。統計的有意差を決定する適切な方法は、当該分野において周知かつ文書化されており、これらのいずれかを用いることができる。

20

#### 【0347】

適切な対照検体は、当業者が容易に選択することができ、例えば、特定の疾病を診断する場合、適切な対照はその疾病を有しなかった対象からの検体だろう。適切な対照の「値」も、例えば、当該分野において公知の正常な対象に係る範囲を参照することによって、あらゆる試験において対照「検体」を行なうことなく、容易に決定できるだろう。

#### 【0348】

診断またはイメージングに適用する場合、本発明の抗体は、<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>1</sup><sub>23</sub>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>Iなどの放射線不透過物または放射性同位元素；放射性エミッタ（例えば、<sup>1</sup>，もしくはエミッタ等）；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリンなどの蛍光（蛍光団）または化学発光（発色団）化合物；アルカリホスファターゼ、ペータ-ガラクトシダーゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素；イメージング剤；または金属イオン；あるいは特定の同種の検出可能な部分（例えば、標識したアビジン/ストレプトアビジン等）に結合することによって検出できる、ビオチンなどの化学部分といった、検出可能なマーカーにより標識することができる。抗体または抗体断片などの結合タンパク質に標識を付着する方法は、当該分野において公知である。このような検出可能なマーカーによって、試験検体中の結合タンパク質-抗原複合体の存在、量または位置を試験することができる。

30

#### 【0349】

インビボで用いる好ましい検出可能なマーカーとしては、ビスマス（III），金（I I I），ランタン（III）もしくは鉛（II）などのX線検出可能な化合物；銅<sup>67</sup>，ガリウム<sup>67</sup>，ガリウム<sup>68</sup>，インジウム<sup>111</sup>，インジウム<sup>113</sup>，ヨウ素<sup>123</sup>，ヨウ素<sup>125</sup>，ヨウ素<sup>131</sup>，水銀<sup>197</sup>，水銀<sup>203</sup>，レニウム<sup>186</sup>，レニウム<sup>188</sup>，ルビジウム<sup>97</sup>，ルビジウム<sup>103</sup>，テクネチウム<sup>99m</sup>もしくはイットリウム<sup>90</sup>などの放射性イオン；コバルト（I I），銅（II），クロミウム（III），ジスプロシウム（III），エルビウム（III），ガドリニウム（III），ホルミウム（III），鉄（II），鉄（III），マンガン（II），ネオジム（III），ニッケル（II），サマリウム（III），テルビウム（III），バナジウム、IIもしくはイッテルビウム（III）などの核磁気スピン共鳴同位元素；あるいはローダミンまたはフルオレセインが挙げられる。

40

#### 【0350】

本発明は、直接的または間接的に、検出可能なシグナルを出す標識に付着した本発明の

50

抗体を含む、診断薬またはイメージング剤も含む。適切な標識は、本明細書の他で記載している。

### 【0351】

本発明は、本発明の1以上の抗体もしくは組成物または本発明の抗体をコードする1以上の核酸分子、あるいは本発明の核酸配列を含む1以上の組換え発現ベクター、あるいは本発明の組換え発現ベクターもしくは核酸配列を含む1以上の宿主細胞またはウイルスを含むキットをさらに含む。好ましくは、該キットは、本明細書に記載の方法および用途（例えば、本明細書に記載の治療法、診断法もしくはイメージング法など）に用いられるか、または本明細書に記載のインビトロでのアッセイもしくは方法に用いられる。このようなキットにおける抗体は、好ましくは本明細書の他で記載の抗体接合体であってもよく、例えば、検出可能部分に接合させていてもよく、免疫抱合体であってもよい。好ましくは、該キットは、例えば、診断において、キットの構成要素を使用するための取扱説明書を含む。好ましくは、該キットは、血管新生を伴う疾病を診断するためのものであり、任意に、このような疾病を診断するためにキットの構成要素を使用するための取扱説明書を含む。

10

### 【0352】

本明細書で定義される本発明の抗体は、インビトロまたはインビボでの応用およびアッセイのための分子ツールとして用いることもできる。抗体が抗原結合部位を有するため、これらの抗体は特定の結合対のメンバーとして機能でき、これら分子は、特定の結合対メンバーが必要とされる場合、任意のアッセイにおいて用いることができる。

20

### 【0353】

このように、本発明のさらなる側面は、本明細書で定義される本発明の抗体を含む試薬および、例えば、インビトロまたはインビボでのアッセイの分子ツールとしての、このような抗体の用途を提供する。

30

### 【0354】

癌の診断および治療に関して、本発明の診断およびイメージングの組成物、キットおよび方法は、インビボおよびインビトロでの診断を含む。例えば、血管化腫瘍は、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍間質の接近可能な成分に結合する少なくとも第1の領域であって、インビボでの診断用イメージング剤に動作可能に付着したものを含む腫瘍診断用成分の、診断上有効な量を用いてイメージングすることができる。

### 【0355】

腫瘍イメージングは、好ましくは、腫瘍細胞、腫瘍血管系または腫瘍間質の接近可能な成分に結合する少なくとも第1の結合領域を含む診断成分を用いて血管化腫瘍の間質および/または血管系の画像を提供するために実施する。治療用構造物に関して上記したものなどのような、任意の適切な結合領域または抗体を用いることができる。特定の効果は、検出可能に標識された本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の構造物を用いて提供され、ここで、得られた画像から、用いるべき治療の結合部位を予測する。

### 【0356】

検出可能に標識されたインビボでの腫瘍診断（好ましくは、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体）は、ビスマス（III），金（III），ランタン（III）もしくは鉛（II）などのようなX線検出可能な化合物；銅<sup>67</sup>，ガリウム<sup>67</sup>，ガリウム<sup>68</sup>，インジウム<sup>111</sup>，インジウム<sup>113</sup>，ヨウ素<sup>123</sup>，ヨウ素<sup>125</sup>，ヨウ素<sup>131</sup>，水銀<sup>197</sup>，水銀<sup>203</sup>，レニウム<sup>186</sup>，レニウム<sup>188</sup>，ルビジウム<sup>97</sup>，ルビジウム<sup>103</sup>，テクネチウム<sup>99</sup><sup>m</sup>もしくはイットリウム<sup>90</sup>などのような放射性イオン；コバルト（II），銅（II），クロミウム（III），ジスプロシウム（III），エルビウム（III），ガドリニウム（III），ホルミウム（III），鉄（II），鉄（III），マンガン（II），ネオジム（III），ニッケル（II），サマリウム（III），テルビウム（III），バナジウム、（II）もしくはイッテルビウム（III）などのような核磁気スピン共鳴同位元素；あるいはローダミンまたはフルオレセインを含む。

40

50

## 【0357】

腫瘍治療前のプレイミングは、下記（a）, (b)により実施することができる：(a)動物または患者に、腫瘍細胞、腫瘍血管系（好ましくは）または腫瘍間質（好ましくは）の接近可能な成分に結合する、少なくとも第1の領域に動作可能に付着した診断薬（本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の構造物に動作可能に付着した診断薬を含む）を含む医薬組成物の、診断上有効な量を投与すること；ならびに

(b)それに続いて、腫瘍細胞、腫瘍血管系（好ましくは）または腫瘍間質（好ましくは）に結合した検出可能に標識された第1の結合領域（または本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体）を検出すること；それによって、腫瘍、腫瘍血管系および/または腫瘍間質の画像を得ること。

10

## 【0358】

癌治療は、下記（a）, (b)により実施することもできる：

(a)血管化腫瘍を有する動物または患者に、腫瘍結合剤または本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の構造物に動作可能に付着した診断薬を含む、少なくとも第1の検出可能に標識された腫瘍結合剤（好ましくは、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の構造物）の、診断上の最小量を投与することによって、血管化腫瘍の画像を得ること、それによって、腫瘍、腫瘍血管系（好ましくは）または腫瘍間質（好ましくは）の検出可能な画像を得ること；ならびに

(b)それに続いて、同じ動物または患者に、少なくとも裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または該抗体を用いた治療用抗原-抗体構造物の、治療上の最適量を、続けて投与すること、これによって、抗腫瘍効果が発揮されること。

20

## 【0359】

このように、イメージングおよび治療の処方または医薬を提供し、それは通常、下記（a）, (b)を含む：

(a)腫瘍結合剤または本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に動作可能に付着した検出可能な薬剤を含む、検出可能に標識された腫瘍結合剤（好ましくは、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の構造物）の、診断上有効な量を含む、第1の医薬組成物；ならびに

(b)少なくとも1つの裸の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または、このような抗体を用いた治療用抗原-抗体構造物の、治療上有効な量を含む、第2の医薬組成物。

30

## 【0360】

本発明は、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその抗原結合断片に動作可能に連結した少なくとも1つの診断薬の生物学的に有効な量を含む、少なくとも第1の組成物または医薬組成物を含む、インピトロでの診断キットも提供する。

## 【0361】

本発明は、診断薬が体外で（好ましくは、動物または患者から得られた生体検体に実施される試験に関連して）用いることを意図している複合キットをさらに提供する。このように、本発明は、少なくとも第1の本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体もしくは抗原結合断片またはこの抗VEGF抗体の免疫抱合体の生物学的に有効な量；およびインピトロで用いる少なくとも1つの診断薬、成分またはシステムの生物学的に有効な量を含む、少なくとも第1の組成物、医薬組成物または医薬カクテルを、通常少なくとも2つの別個の容器の中に含むキットを提供する。

40

## 【0362】

「インピトロで用いる診断用薬剤、成分またはシステム」は、血管新生成分を有する1以上の疾患の診断を可能にする任意の診断薬または薬剤の組合せである。このように、インピトロでの診断は、米国特許第5,712,291号、第5,753,230号、第5,972,922号、第5,639,757号、WO 98/45331およびWO 98/16551（それぞ

50

れ参照により本明細書に特に援用される)のいずれか1つに開示したような疾病または障害に関して、診断のまたは予後の情報を生み出すのに好適に用いるものを含む。

### 【0363】

癌の診断および治療に関して、インビトロでの診断は、インビトロでの診断試験によって直接的または間接的に検出可能な「検出可能な薬剤またはレポータ薬剤」に動作可能に付着した、腫瘍細胞、腫瘍血管系(好ましくは)または腫瘍間質(好ましくは)の接近可能な成分に結合する少なくとも第1の結合領域を含む診断成分を含むことが好ましい。インビトロで直接的に検出可能な「検出可能な薬剤またはレポータ薬剤」は、放射標識および免疫蛍光法によって検出可能なレポータ薬剤などのようなものを含む。

### 【0364】

インビトロで間接的に検出可能な「検出可能な薬剤またはレポータ薬剤」は、発色性基質に接触して色のついた生成物を産生する検出可能な酵素などのような、さらなる外因性の薬剤と併用して機能するものを含む。インビトロでの間接的な検出は、第1の結合領域に免疫特異性を有する少なくとも1つの検出用抗体と組み合わせて、腫瘍細胞、腫瘍血管系(好ましくは)または腫瘍間質(好ましくは)の接近可能な成分に結合する第1の結合領域を含む検出可能な成分またはレポータ成分またはシステムにも拡張される。「検出用抗体」は、放射標識または酵素などの、直接的または間接的に検出可能な薬剤に付着する「二次抗体」が好ましい。あるいは、第1の検出用抗体に免疫特異性を有する第2の検出用抗体と組み合わせて、第1の結合領域に免疫特異性を有する第1の検出用抗体を含む、「二次および三次抗体検出システム」を用いることができ、第2の検出用抗体は、直接的または間接的に検出可能な薬剤と付着している。

### 【図面の簡単な説明】

### 【0365】

以下の図面は、本明細書の一部を形成するものであり、本発明の特定の態様をさらに示すために包含されるものである。本発明は、本明細書に示される特定の側面の詳細な記載とともに1以上のこれら図面を参考することによって、より良く理解することができる。

### 【0366】

図1は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)クローンのscFv型の重鎖(VH)および軽鎖(VL)可変領域のスクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。ScFvは、NcoI/NotI部位を介してpHOG21(3.7Kb)にクローニングした。最初のクローンニングに用いた制限部位(NcoI, HindIII, MluIおよびNotI)は、イタリック体で表示され、下線が引かれている。VHとVLとの間のリンカー配列は、イタリック体で表示されている。

### 【0367】

図2は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvクローンがVEGFと結合することを示す。図2は、塗布したVEGF-Aに対する、EJ173/112-C11(r84)クローン、その母クローンおよび陽性対照抗体(マウスB9)の結合を評価するためのELISAアッセイの結果を示す。EJ173/112-C11(r84)クローンが、最も高い結合のシグナルおよびそれ故、最も高い親和性を示した。

### 【0368】

図3は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvクローンがVEGFへの結合をめぐって2C3抗体と効果的に競合することを示し、それは競合ELISAアッセイの結果により示される。EJ173/112-C11(r84)クローンがVEGFへの結合をめぐって2C3抗体と効果的に競合することから、EJ173/112-C11(r84)クローンが、マウス2C3抗VEGF抗体と実質的に同じエピトープに結合することを示す。

### 【0369】

図4は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvクローンがマウスVEGFおよびヒトVEGFの両方と結合することを示す。

### 【0370】

10

20

30

40

50

図5は、固定化VEGF-Aに対する様々なscFv抗体の結合親和性を評価するために用いるBiacoreアッセイの結果を示す。結合曲線は図5に示され、そこから、EJ173/112-C11(r84/PGN311)のscFv型が母クローンの単鎖型(m)より顕著に高い結合親和性を有することが分かる。他に示される曲線は、v41, r68, r3およびr26と標識されている。

#### 【0371】

図6は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)IgGが、VEGFに媒介される細胞内の細胞情報伝達を、VEGFR2を介して阻害することを示し、それは、EJ173/112-C11(r84)IgGがErk1/2のリン酸化を阻害することを示す、インビボでの細胞アッセイの結果により示されるものである。

10

#### 【0372】

図7は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)クローンがVEGFの切り詰められた121アイソフォーム(VEGF121)を認識することを示し、それはELISAアッセイから得られた結果により示される。

#### 【0373】

図8Aおよび図8Bはともに、r84/PGN311はVEGFR2とVEGFとの相互作用を実質的に阻止するが、VEGFR1とVEGFとの相互作用を実質的に阻止しないことを示す。示される抗体の有無におけるVEGF-ビオチンを、可溶性VEGFR1(図8A)またはVEGFR2(図8B)で覆われたELISAプレートのウェル中、インキュベートした。VEGF単独(VEGF)または示された抗体存在下のVEGFのシグナルを、VEGF単独(100%)に対して標準化した。平均+/-SEMを示す。N=12(各処理それぞれ3回復実施した4枚の同一のプレート)。50%未満のシグナルは、結合の、有意かつ実質的な阻害と考えられる。シナジス[Synagis]は、陰性対照として用いるヒト抗RSV抗体である。比較のため、アバスチン(ベバシズマブ)(Prestat et al., 1997)抗体を用いた結果も提示し、それはアバスチンがVEGFR2およびVEGFR1の両方とVEGFとの相互作用を実質的に阻止することを示す。

20

#### 【0374】

図9Aおよび図9Bは、scFv発現ベクターを示す。図9Aは、scFv発現ベクターであるpHOG21を示す。ApRは、アンピシリン耐性遺伝子; ColE1は、DNAの複製起点; fIIGは、f1ファージの遺伝子間領域; c-myocは、モノクローナル抗体9E10に認識されるエピトープ; His6は、6つのヒスチジン残基; pelBは、細菌性ペクチン酸リアーゼのシグナルペプチド; P/Oは、野生型ラックプロモータオペレータである。図9Bは、C末端コード領域のヌクレオチド配列(配列番号28)およびアミノ酸配列(配列番号29)を示す。

30

#### 【0375】

図10A, 図10Bおよび図10Cは、腫瘍関連マクロファージがVEGFR2を発現することを示す。図10Aは、対照で処理または2C3で処理した動物からの腫瘍切片における染色からT014(VEGFR2抗体)およびF4/80(マクロファージのマーカー)が共局在化していることを示す。図10Aは、2C3がマクロファージの浸潤を減少させることを示す。しかしながら、対照群および2C3群の両方とも、VEGFR2およびマクロファージマーカーの共局在化を示している。図10Bは、3つの異なるマクロファージマーカーのうちの1つおよびVEGFR2が二重陽性である細胞数を示す。図10Cは、担癌動物からの腹腔マクロファージがVEGFR2を発現することを示すために、VEGFR2に対する2つの異なる抗体を用いる。

40

#### 【0376】

図11は、r84/PGN311がMDA-MB-231腫瘍の増殖を阻害することを示す。図11は、インビボの(マウス)MDA-MB-231乳癌腫瘍モデルを用いた研究から得られた結果および腫瘍容積に対するr84, アバスチンまたは生理食塩水(対照)の効果を示す。平均腫瘍容積の+/-SEMを示す。アバスチンおよびr84で処理したマウスは、対照で処理した動物より有意に小さい腫瘍容積を有する。

50

## 【0377】

図12は、各群における個々の動物の腫瘍重量／体重の比率を示す以外は図11に示したのと同じ研究から得られた結果を示す。アバスチンおよびr84/PGN311で処理したマウスは、対照で処理した動物より有意に小さい腫瘍重量／体重の比率を有する。

## 【0378】

図13は、r84/PGN311がA673腫瘍の増殖を阻害することを示す。図13は、インビボの（マウス）A673腫瘍モデルを用いた研究から得られた結果、および腫瘍容積に対するr84, 2C3または対照抗体（シナジス・ヒト抗RSV）の効果を示す。平均腫瘍容積の+/-SEMを示す。2C3およびr84で処理したマウスは、対照で処理した動物より有意に小さい腫瘍容積を有する。このように、2C3およびr84は、A673腫瘍の増殖を抑制する点で効果的である。10

## 【0379】

図14は、r84/PGN311が腫瘍関連マクロファージの浸潤を有意に減少させることを示す。腫瘍は、MDA-MB-231腫瘍細胞を有するマウスから採取し、切片化し、マクロファージのマーカー（Mac-3）に対する抗体で染色した。対照動物からの3つの腫瘍およびr84および2C3で処理した動物それからの3つの腫瘍を分析し、各腫瘍からの5つの画像を研究した。図14は、r84および2C3で処理した動物からの腫瘍がマクロファージマーカーであるMac-3の発現を有意に減少させたことを示し、またr84が2C3より顕著な効果を有する（r84の場合、p < 0.01）ことを示す。20

## 【0380】

図15は、r84/PGN311がMDA-MB-231動物モデル腫瘍の微小血管密度を有意に低下させることを示す。腫瘍は、MDA-MB-231腫瘍細胞を有するマウスから採取し、切片化し、マウス内皮細胞（MECA-32）に対する抗体で染色した。対照動物からの3つの腫瘍およびr84および2C3で処理した動物それからの3つの腫瘍を分析し、各腫瘍からの5つの画像を研究した。図15は、r84および2C3で処理した動物からの腫瘍において血管数／高倍率視野が有意に減少した（MECA-32, p < 0.0001）ことを示す。

## 【0381】

図16Aおよび図16Bは、r84/PGN311がVEGFR2経路を選択的に阻止することを示す。図16Aは、r84/PGN311が、VEGFR2発現細胞（HDMEC）表面のErk1/2（pERK1/2）およびPLC-（pPLC-）の、VEGF刺激された（+VEGF）リン酸化を阻害することを示す。陽性対照であるアバスチンも、Erk1/2およびPLC-に対する、VEGF刺激されたリン酸化を阻害する。図16Bは、陽性対照（アバスチン）がVEGFR1のリン酸化を阻害するのに対して、r84/PGN311がVEGFR1発現細胞（PAE-F1t）表面のVEGFR1に対する、VEGF刺激されたリン酸化を阻害しないことを示す。30

## 【0382】

図17A, 図17B, 図17Cおよび図17Dは、r84/PGN311が、非小細胞肺癌株化細胞によって生じる腫瘍の増殖を有意に減少させることを示す。図17A, 図17B, 図17Cおよび図17Dは、インビボのマウスモデルならびに4つの異なる非小細胞肺癌株化細胞であるH460（図17A）, H1299（図17B）, H358（図17C）およびA549（図17D）を用いた研究から得られた結果を示す。腫瘍重量に対するr84/PGN311, アバスチンまたは対照抗体（シナジスまたはXTL）の効果を示す（腫瘍の平均重量の+/-SEMを示す）。r84/PGN311およびアバスチンで処理したマウスは、対照で処理した動物より有意に低い平均腫瘍重量を有する。このように、r84/PGN311およびアバスチンは、非小細胞肺癌株化細胞の増殖を抑制することに効果的である。r84/PGN311は、少なくともH460（図17A）, H1299（図17B）およびA549（図17D）モデルにおいてアバスチンより良好に機能する。r84は、A549モデル（図17D）においてアバスチンより有意に良好4050

である。

### 【0383】

図18A, 図18Bおよび図18Cは、r84で処理した腫瘍のリンパ管密度が対照腫瘍より有意に低いことを示す。図18A(6つのパネル)は、対照(上のパネル)およびr84(下のパネル)で処理した腫瘍における、リンパマーカー、ポドプラニン(緑), Prox1(赤)および合成の画像を示す、凍結したMDA-MB-231腫瘍切片の免疫蛍光染色である。図18B(2つのパネル)は、対照(上のパネル)およびr84(下のパネル)で処理した腫瘍においてLYVE-1を染色したMDA-MB-231腫瘍切片を示す。LYVE-1染色のパターン(図18B)は、ポドプラニンおよびProx1のもの(図18A)と類似している。LYVE-1で染色した各腫瘍切片の全域を低い倍率で試験し、LYVE-1陽性領域のパーセントを、NIS-Elementsイメージング・ソフトウェアを用いて視野ごとにごとに決定した(図18C)。最も高いLYVE-1陽性パーセント領域を有する10の視野を合わせて平均化し、腫瘍ごとの最終スコアを得て、対応のないt検定[unpaired student's t-test]により群の平均の有意差を試験した。対照腫瘍のLYVE-1陽性領域のパーセント( $7.03 \pm 1.013$ ; n=6)は、r84処理腫瘍( $2.23 \pm 0.986$ ; n=5)より、P=0.0042で有意に大きかった。

10

### 【0384】

図19は、完全にヒトおよびマウスのキメラIgG型のr84がマウスVEGFおよびヒトVEGFの両方に結合することを示す。ヒトVEGF( $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , R&D)またはマウスVEGF( $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma)を、96ウェルプレートの底部にコーティングした。ウェルを塞ぎ、それからヒトr84(青の線)またはマウス・キメラr84(緑の線)の示された濃度でインキュベートした。ウェルに結合した抗体は、抗ヒトFc抗体または抗マウスHRP接合抗体とともにインキュベートすることによって検出した。平均吸光度を示す。

20

### 【0385】

図20Aおよび図20Bは、r84/PGN311が、VEGFR2を発現している内皮細胞の、VEGFに誘導される遊走を強く阻害することを示す。HDMEC(図20A)およびPAE-KDRを発現している細胞(図20B)を、トランスウェル・アッセイで用いた。細胞をVEGFで刺激しない(NS)か、または遊走を刺激するために $100 \text{ ng}/\text{mL}$ のVEGFに曝露する(VEGF)かし、そして500倍のモル過剰のr84, アバスチン(Avastin)または対照(Cnt1)抗体(IgG型)が、VEGFに誘導される遊走を阻害できるか試験した。VEGFは、刺激しなかった細胞と比較して、遊走を誘導する( $p < 0.01$ )。r84およびアバスチンは、VEGFに誘導される遊走を阻害する(\*\*\*,  $p < 0.0001$ , 対VEGF単独)。

30

### 【0386】

図21は、r84/PGN311が、VEGFR1を発現している内皮細胞の、VEGFに誘導される遊走を阻害しないことを示す。PAE-F1t1を発現している細胞をVEGFで刺激しない(NS)か、または遊走(VEGF)を刺激するためにVEGFに曝露する(VEGF)かし、そしてr84, アバスチン(Avastin)または対照(Cnt1)抗体(IgG型)が、VEGFに誘導される遊走を阻害できるか試験した。VEGFは、刺激しなかった細胞と比較して遊走を誘導する。アバスチンは、VEGFに誘導された遊走を有意に阻害するが、r84はそうしない。このように、図21は、r84/PGN311が、VEGFR1を発現している内皮細胞の、VEGFに誘導される遊走を阻害しないことを示す。PAE-F1t1(VEGFR1のみを発現する内皮細胞)は、24時間血清飢餓培養した後、トランスウェル挿入部分の無血清培地中に播種した( $8 \mu\text{M}$ 孔, 5,000細胞/挿入部分)。膜の下側への遊走は、挿入部分の下のウェルに下記を加えることにより刺激した:無血清培地(NS); VEGF( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ ); VEGF+対照IgG(Cnt1); VEGF+アバスチン(アバスチン); VEGF+r84(r84)。細胞は、膜が取り除かれた時点から24時間、遊走することができ、細胞を膜

40

50

の上表面から取り除き、固定化し、D A P Iで染色した。その後、膜の下側の、D A P Iで染色した核を、蛍光顕微鏡により計数し、ソフトウェア（E l e m e n t s , ニコン）を用いて定量化した。\*は、 $p < 0 . 0 5$ , r 8 4 対アバスチン；\*\*は、 $p < 0 . 0 1$ , アバスチン対対照。

#### 【0 3 8 7】

図22は、r 8 4 / P G N 3 1 1が、マウスにおいて膵臓腫瘍細胞であるP a n c 1の増殖を顕著に減少させることを示す。膵臓腺癌細胞であるP a n c 1担持マウスは、r 8 4 / P G N 3 1 1のI g Gまたはシナジス（陰性対照）のいずれかを与えた。腫瘍容積は、処理の時間経過を通して表す。このように、図22は、r 8 4 / P G N 3 1 1が皮下ヒト膵臓腫瘍異種移植片の増殖を減らすことを示す。P a n c 1腫瘍細胞は、0日目にS C I Dマウス（ $2 \times 10^6$ 細胞／動物）の皮下に注射した。マウスは、開始1日目から、500 μgの対照I g G（シナジス）またはr 8 4を2回／一週間で処理した。腫瘍容積は、測径器を用いて時間とともに観測した。平均（S E M）腫瘍容積（n = 5／群）対腫瘍細胞注射（T C I）後の日数を示す。

10

#### 【0 3 8 8】

図23は、r 8 4 / P G N 3 1 1のマウス・キメラ・バージョンが、同系4 T 1乳房腫瘍担持マウスの生存を延長することを示す。マウス4 T 1腫瘍は、B a l b / Cマウス（群当たりn = 8マウス）に正所的に注射された。r 8 4 / P G N 3 1 1のマウス・キメラ・バージョン（m c r 8 4 , 赤い線）または対照（対照, 黒い線）抗体のいずれかを、12日目から開始し週2回i . p . 注射により投与し、3週間継続した。r 8 4 / P G N 3 1 1は、対照と比較して生存を延長した。

20

#### 【0 3 8 9】

図24は、対照I g G, アバスチン, 2 C 3またはr 8 4（示されているとおり）で処理した腫瘍担持マウスからの血清中のマウスV E G Fのレベルを示す。血清を回収し、R & Dシステムのキットを用いてマウスV E G FのレベルをE L I S Aでアッセイした。加えて、r 8 4処理マウスからの血清のアリコートを、プロテインGビーズで前精製した。プロテインGで精製した血清からの上澄（r 8 4 s u p e）も試験した。

20

#### 【0 3 9 0】

図25は、r 8 4およびより少ない程度でアバスチン（b e v）が、インビボでのM D A - M B - 2 3 1腫瘍への、C D 1 1 b + / G r 1 +細胞の浸潤を減少させるが、2 C 3はそうしないことを示す。r 8 4についての減少は、3 9 %である。一元配置分散分析[A NOVA]は、r 8 4処理動物（2 C 3またはアバスチン（b e v）処理動物ではない）に観察される減少した浸潤が対照処理動物と統計学的に差がある（\*\*と表示,  $p < 0 . 0 1$ ）ことを示す。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0 3 9 1】

固体腫瘍および上皮性悪性腫瘍は、ヒトにおけるすべての癌のうち9 0 %以上に上る。モノクローナル抗体および抗毒素の使用は、リンパ腫および白血病の治療において調査されているものの、これらの薬剤は、残念ながら、上皮性悪性腫瘍および他の固体腫瘍に対する臨床的試行においては効果的ではなかった（AbramsおよびOldham, 1985）。抗体に基づく治療の効果がないことの主な理由は、この高分子が容易に固体腫瘍に輸送されないとある。いったん腫瘍塊に入ればなおさら、これらの分子は、腫瘍細胞間のタイトジャンクション、線維性間質、間質における圧力の勾配および結合部位の障壁の存在によって均一に分散することはない（Dvorak et al., 1991a）。

40

#### 【0 3 9 2】

固体腫瘍を治療するための新規戦略を発展させるに当たり、腫瘍細胞よりもむしろ、腫瘍の血管系を標的化することに関する方法が際立った優位性を与える。腫瘍血管の効果的な破壊または阻止は、腫瘍内の血流を阻んで、結果として雪崩のような腫瘍の細胞死に至る。抗体 - 毒物および抗体 - 凝固剤構造物は、特定の標的化および腫瘍血管の破壊において既に効果的に使用されており、腫瘍の壞死をもたらしている（Burrows et al., 1992;

50

Burrows および Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; 米国特許第5,855,866号; 第5,877,289号; 第5,965,132号; 第6,051,230号; 第6,004,555号; 第6,093,399号)。

### 【0393】

抗体、増殖因子またはその他の結合リガンドが、腫瘍血管系へ凝固剤を特異的に送達させるために使用される場合、このような薬剤は、「凝固リガンド」と称される。凝固リガンドにおける使用のための目下好適な凝固剤は切り詰められた組織因子(tTF)(Huang et al., 1997; WO 96/01653; 米国特許番号. 5, 877, 289)である。TFは、血液凝固作用における主要なイニシエーターである。損傷部位において、血中の第VII / VIIa因子は、血管周囲組織における細胞上のTFに接触して結合する。このTF:VII複合体は、リン脂質界面の存在下で、第IXおよびX因子を活性化させる。このことは、順々に、トロンビンおよびフィブリノゲンの形成、最終的には血栓の形成に至る。  
10

### 【0394】

およそ通常の内皮には存在しないが、腫瘍の内皮上にて利用できる、幅広い適当な標的分子は、文書化されているものである。例えば、エンドグリン、E-セレクチン、P-セレクチン、VCAM-I、ICAM-I、PSMA、TIE、LAM-1との半応性を有するリガンド、VEGF/VPF受容体、FGF受容体、 $\text{v}_3$ インテグリン、プライオトロピンまたはエンドシアリンのような、発現された標的が使用され得る(米国特許第5,855,866号; 第5,877,289号および第6,004,555号; Burrows et al., 1992; Burrows および Thorpe, 1993; Huang et al., 1997; 何れも参照により本明細書に援用される)。  
20

### 【0395】

米国特許第5,776,427号および第6,036,955号(何れも参照により本明細書に援用される)において記載されているように、天然の腫瘍環境または以下の人的介入によって誘導可能なその他の標的も、標的可能な存在である。正常組織および腫瘍血管の誘導における先だっての抑制に関連して使用される場合、MHCクラスII抗原も標的として使用され得る(米国特許第5,776,427号; 第6,004,554号および第6,036,955号; 何れも参照により本明細書に援用される)。

### 【0396】

吸着した標的是、VEGF、FGF、TGF、HGF、PF4、PDGF、TIMP、TIEに結合するリガンドまたは腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム(米国特許第5,877,289号および第5,965,132号; 何れも参照により本願明細書に援用される)のような、別の適当な群である。フィブロネクチンアイソフォームは、受容体としてのインテグリンファミリーに結合するリガンドである。腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームは、腫瘍血管系および腫瘍間質の両方において標的化できる構成成分である。  
30

### 【0397】

臨床的な標的化適用のための目下好適なマーカーは、VEGF関連受容体である。事実、VEGF:受容体複合体のアセンブリは、現在までに観察された腫瘍血管系マーカーのうち最も特的なものの一つである。(米国特許第5,877,289号; 第5,965,132号および第6,051,230号; Lin-Ke et al., 1996; Dvorak et al., 1991b)。  
40

VEGF:受容体複合体は、腫瘍内皮への薬剤またはその他のエフェクタの特異的な送達のための魅力的な標的を提示する。なぜならば、腫瘍ではサイトカインおよび増殖因子が豊富であり、ほとんどの固形腫瘍に見られる低酸素条件下ではVEGF受容体は上方制御されているからである(Mazure et al., 1996; Forsythe et al., 1996; Waltenberger et al., 1996; Gerber et al., 1997; Kremer et al., 1997)。腫瘍内微小環境において特異的である、リガンドとその受容体との両方の上方制御は、正常組織における内皮と比べると、腫瘍血管の内皮における占有された受容体の高濃度化に至る(米国特許第5,877,289号および第5,965,132号)。Dvorak および同僚も、VEG  
50

FのN末端に対して指向するウサギポリクローナル抗体は、同系腫瘍担持マウスへの注入後、選択的に腫瘍血管を染色することを示した(Lin-Ke et al., 1996)。

### 【0398】

臨床的介入のための標的としてのVEGFの役割は、抗毒素または凝固リガンドの治療に限定されるものではない。事実、VEGFは、固体腫瘍の血管新生に関するカギとなる因子の1つであり(Ferrara, 1995; Potgens et al., 1995)、有力な透過性薬剤(Senger et al., 1983; Senger et al., 1990; Senger et al., 1986)でも内皮細胞マイトイエン(Keck et al., 1989; Connolly et al., 1989; Thomas, 1996)もある。VEGFと血管新生との間の関連性は、VEGF介入を目的とした種々の治療戦略を提起することとなった(Siemeister et al., 1998)。

10

#### A. VEGFおよびVEGF受容体

血管内皮増殖因子アイソフォームA(VEGF-A、本出願においては、単に「VEG」と称される。)は、低酸素および発癌突然変異によって誘導される多機能性サイトカインである。VEGFは、胚発生における血管網の発生および維持の主要な刺激因子である。VEGFは、有力な透過性誘導性薬剤、内皮細胞の走化性物質、内皮生存因子、および内皮細胞増殖因子として機能する(Thomas, 1996; Neufeld et al., 1999)。VEGFの1アレルまたは両アレルの標的化された欠損は、結果として胚性致死に至るよう(Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995)、この活性は、正常な胚発生に求められるものである(Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996)。

20

### 【0399】

VEGFは、創傷治癒(Frank et al., 1995; Burke et al., 1995)、糖尿病性網膜症(Alon et al., 1995; Malecaze et al., 1994)、乾癬(Detmar et al., 1994)、アテローム性動脈硬化(Inoue et al., 1998)、リウマチ性関節炎(Harada et al., 1998; Nagashima et al., 1999)、固体腫瘍の増殖(Plate et al., 1994; Claffey et al., 1996)を含む無数の生理学的および病理学的過程における血管新生または脈管形成を促進する重要な因子である。

20

### 【0400】

幅広い種類の細胞および組織がVEGFを産生し、VEGFは少なくとも、同一の遺伝子でコードされたスプライス変異である5つのアイソフォーム(121個、145個、165個、189個および206個のアミノ酸)として存在している(Houck et al., 1991; Ferrara et al., 1991; Tischer et al., 1991)。121個および165個のアミノ酸からなる2つの小さなアイソフォームは、細胞から分泌される(Houck et al., 1991; Anthony et al., 1994)。分泌型のVEGFは、2つのジスルフィド結合によってモノマーが結合された、38~46kDa間の強制的な二量体である。

30

### 【0401】

VEGF二量体は、2つのよく特性が調べられた受容体であって、内皮細胞に選択的に発現されるものである、VEGFR1(FLT-1)およびVEGFR2(KDR/F1k-1)に高い親和性で結合する(FLT-1およびF1k-1はマウスホモログである)。VEGFR1、VEGFR2に対するVEGFの結合のK<sub>d</sub>は、それぞれ、15~100pM、400~800pMである(Terman et al., 1994)。近年同定された第3の細胞表面タンパク質である、ニューロフィリン-1も、高い親和性でVEGFに結合する(Olander et al., 1991; De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992; Soker et al., 1998)。

40

### 【0402】

VEGFR1およびVEGFR2は、7つの細胞外IgG様リピート、単一の膜貫通ドメイン、および細胞内開裂チロシンキナーゼを特徴とする、ドメインIII型受容体チロシンキナーゼ(RTKIII)ファミリーのメンバーである(MustonenおよびAlitalo, 1995)。つい最近まで、VEGFR1およびVEGFR2は、内皮細胞にほとんど限定的に発現しているものと考えられてきた(MustonenおよびAlitalo, 1995)。VEGFR1およびVEGFR2は、内皮細胞の増殖、遊走および分化の促進に関して、異なる機

50

能を有することが報告されているが (Waltenberger et al., 1994; Guo et al., 1995) 、各受容体が VEGF の生物学的事象および内皮細胞のホメオスタシスにおいて担う正確な役割は、本発明の前には明確に解明されていなかった。

#### 【 0 4 0 3 】

ノックアウトマウスを用いた近年の研究は、VEGF、VEGFR1 および VEGFR2 のそれぞれが、脈管形成、血管新生および胚発生に必須であることを示した (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998)。致死性のノックアウトの研究において、各受容体の欠損に関連した表現型は異なっていた。標的化された VEGFR2 破壊は、内皮細胞の分化を欠損し、卵黄嚢の血島を形成できない、あるいは脈管形成に至らなかった胚をもたらした (Shalaby et al., 1995)。VEGFR1 ヌル変異体は、不完全な脈管形成、内皮細胞の無秩序なアセンブリおよび拡張された血管を示した (Fong et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998)。VEGFR1 は明らかに、極めて重要な生物学的役割を有する。

10

#### 【 0 4 0 4 】

VEGFR1 は、VEGFR2 よりも、チロシンキナーゼ活性は低いが、VEGF に対して高い親和性を有する。このことは、VEGFR1 の細胞外ドメインは特に重要であることを唆す。この仮説は、VEGF 結合ドメインがインタクトのままである一方、VEGFR1 のチロシンキナーゼドメインが欠損したノックアウトマウスにおける研究からの結果に強く裏付けられている (Hiratsuka et al., 1998)。VEGFR1 チロシンキナーゼ欠損胚は、正常な血管を発生させて、出産まで生存していた (Hiratsuka et al., 1998)。

20

#### 【 0 4 0 5 】

先だってのノックアウト (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995) に加えて、Hiratsuka (1998) の研究は、VEGFR1 が極めて重要な生物学的役割を有することを示している。しかしながら、チロシンキナーゼシグナル伝達は、決定的な因子でないようと思われる。興味深いことに、VEGFR1 ノックアウトマウス由来のマクロファージは、VEGF に誘導される走化性を示さないので (Hiratsuka et al., 1998 ; 参照により本明細書に援用される)、VEGFR1 が、VEGF に対するこの重要な生物学的応答を介在することを担う受容体に関係しているものとされる。

30

#### 【 0 4 0 6 】

あるグループは、VEGFR2 が VEGF 誘導性の有糸分裂および透過性における主要なシグナル伝達受容体であることを報告している (Waltenberger et al., 1994; Zachary, 1998; Korpelainen および Alitalo, 1998)。マクロファージの遊走および走化性における機能は、上で議論した Hiratsuka (1998) の研究によって文書化されているが、内皮細胞の機能における VEGFR1 の役割はかなり不明確である。

#### 【 0 4 0 7 】

Clauss ら (1996 ; 参照により本明細書に援用される) も、VEGFR1 が単核白血球の活性化および走化性において重要な役割を担うということを報告している。事実、マクロファージ / 単核白血球系統の細胞は、VEGFR1 のみを発現しており、この VEGFR1 は受容体は単核白血球の動員およびプロ凝固剤活性を介在することを担っている (Clauss et al., 1996)。単核白血球およびマクロファージにおける、VEGFR1 への VEGF の結合も、細胞内カルシウムの上昇およびチロシンリン酸化の誘導によって作用する (Clauss et al., 1996)。

40

#### 【 0 4 0 8 】

VEGF 受容体への VEGF 二量体の結合は、受容体の二量体化を誘導すると考えられている。受容体の二量体化は、それぞれ VEGFR2 、 VEGFR1 の細胞内側における特定のチロシン残基、Y801 および Y1175 、 Y1213 および Y1333 の自己トランスリン酸化を引き起こす。これは、ホスホリパーゼ C (PLC) およびホスホファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (PI3K) の活性化と、細胞内カルシウムイオンの増加とを含む、シグナル伝達カスケードに至る (Hood および Meininger, 1998; Hood et

50

al., 1998; Kroll および Waltenberger, 1998)。

【0409】

多数のグループが、VEGFR2のVEGF活性化の後において、酸化窒素(NO)が生成すること示しているが(Hood および Meininger, 1998; Hood et al., 1998; Kroll および Waltenberger, 1998)、VEGF誘導性のシグナル伝達に下流における細胞内の現象はあまり明確ではない。VEGFによる、VEGFR1ではなく、VEGFR2の活性化が、MAPキナーゼ、ERK1およびERK2を含む、SrcおよびRas-MAPキナーゼカスケードを活性化することが示されている(Waltenberger et al., 1994, 1996; Kroll および Waltenberger, 1997)。

【0410】

特に、Fitt-Iチロシンキナーゼ欠損マウスが生存し、正常な血管を発生させていることから、内皮細胞機能におけるVEGFR1の役割は、かなり不明確なものである(Hiratsuka et al., 1998)。内皮におけるVEGFR1の主要な生物学的役割は、非シグナル性のリガンド結合分子としてのもの、あるいは、VEGFをVEGFR2に提供するために必要な「デコイ」受容体としてのものであることが示唆されている。

【0411】

VEGFと病理学的な血管新生の状態との関連性は、VEGF活性を阻止する種々の試行を促している。これらには、VEGFに対する特定の中和抗体のが含まれる(Kim et al., 1992; Presta et al., 1997; Sioussat et al., 1993; Kondo et al., 1993; Asano et al., 1995)。VEGF受容体に対する抗体も、米国特許第5,840,301号および第5,874,542号や、本発明に続く、WO 99/40118においても記載されている。実際、米国特許第5,840,301号および第5,874,542号は、VEGFそのものよりもむしろ、VEGF受容体を阻止することが種々の理由により有利であることを示唆している。

【0412】

VEGFまたはVEGF受容体に対する、可溶型受容体構成物(Kendall および Thomas, 1993; Aiello et al., 1995; Lin et al., 1998; Millauer et al., 1996)、チロシンキナーゼ阻害剤(Siemeister et al., 1998)、アンチセンス戦略、RNAアプタマーおよびリボザイムも報告されている(Saleh et al., 1996; Cheng et al., 1996; 何れも参照により本明細書に援用される)。

【0413】

B. 抗VEGF抗体

B1. 抗体特性

種々の阻害方法の適用が、VEGFシグナル伝達を干渉することにより、血管形成の阻止および/または腫瘍増殖の抑制において、少なくともある程度効果的であることが示されている。事実、VEGFに対するモノクローナル抗体がマウスにおけるヒト腫瘍移植植物の増殖および腹水産生を阻害することが示されている(Kim et al., 1993; Asano et al., 1995; 1998; Mesiano et al., 1998; Luo et al., 1998a; 1998b; Borgstrom et al., 1996; 1998)。

【0414】

抗体A4.6.1は、VEGFR1とVEGFR2との両方へのVEGFの結合を阻止することができる、親和性の高い抗VEGF抗体である(Kim et al., 1992; Wiesmann et al., 1997; Muller et al., 1998)。A4.6.1のFabフラグメントが結合したVEGFのアラニンスキャニング変異導入およびX線結晶解析は、A4.6.1が結合するVEGF上のエピトープは、アミノ酸89~94付近を中心にしていていることを示した。この構造的なデータは、A4.6.1は、VEGFがVEGFR2に結合することを競合的に阻害するが、VEGFがVEGFR1に結合することを、おそらく立体障害によって阻害していることを実証するものである(Muller et al., 1998; Keyt et al., 1996; 何れも参照により本明細書に援用される)。

【0415】

10

20

30

40

50

A 4 . 6 . 1 は、今まで、文献においては、最も集中的に利用された中和性の抗 V E G F 抗体である。この抗体は、マウス中の種々のヒト腫瘍の増殖および V E G F 誘導性の血管透過性を阻害することが示されている (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997; Mordenti et al., 1998; Borgstrom et al., 1999; Ryan et al., 1999; Lin et al., 1999; それぞれ参照により本明細書に特に援用される)。A 4 . 6 . 1 は、よく特性が調べられたヒト卵巣上皮性悪性腫瘍マウスモデルにおける、腹水産生および、転移マウスモデルにおける腫瘍播種を阻害する。A 4 . 6 . 1 は、一価ファージディスプレイ技術によってヒト化されている (Brem, 1998; Baca et al., 1997; Presta et al., 1997; 何れも参照により本明細書に援用される)。得られたヒト化抗体は、アバスチン (ベバシズマブ) と称され、臨床的使用について認可されている (Hurwitz et al., 2004)。

10

#### 【 0 4 1 6 】

V E G F に対する中和抗体で、本技術分野における成功があるにも関わらず、本発明者は、新規の抗体、特に、V E G F R 1 ( F L T - I ) および / または V E G F R 2 ( K D R / F 1 k - 1 ) との相互作用における、より正確に限定された様式を有する抗体は、様々な理由において有益なものであろうと理解した。たとえば、2つのV E G F 受容体のうち1つだけとのV E G F 相互作用を選択的に阻止する抗 V E G F 抗体の開発は、V E G F R 1 と V E G F R 2 との両方を発現する細胞における V E G F によって活性化される経路のより正確な解析を可能にさせる。

#### 【 0 4 1 7 】

本発明者は、V E G F の1つだけの受容体への結合を阻止する、限定されたエピトープ特異性を有する抗体は、臨床的な利点を有するものと考えた。H i r a t s u k a ら ( 1 9 9 8 ) のノックアウトマウス研究は、V E G F R と V E G F R 2 との両方も重要な生物学的役割を有することを示している。本発明に先立って、2つのうち1つの受容体のみを介してのV E G F 介在効果を阻害することを目的とされた治療介入のための現実的な機会は、ヒト投与のための、効果的かつ適合した阻害剤の欠乏によって妨げられた

20

血管形成を阻止する、治療のための特異的なヒト抗体の必要な場合、特異的かつ実質的に、V E G F 受容体 2 ( V E G F R 2 , K D R / F 1 k - 1 ) との相互作用を阻止するが、実質的に、V E G F 受容体 1 ( V E G F R 1 5 F I t - I ) との相互作用を阻止しない、V E G F 上のエピトープに対して反応性があるヒト抗体が同定された。

#### 【 0 4 1 8 】

本発明者らは、最初に、V E G F に結合性を有するマウス抗体 2 C 3 に対して拮抗する、様々な全長のヒト抗 V E G F 抗体を開発した。V E G F に対する高い親和性を示し、V E G F と V E G F R 1 との間の相互作用ではなく、V E G F と V E G F R 2 との間の相互作用の選択的な欠損を示す、多くの抗体クローニングが、更なる分析のために選択された。結局のところ、これらのクローニングの1つが、「母クローニング」と称され、成熟に供されて、その後、マウス V E G F とヒト V E G F の両方へのよりよい結合親和性、血清中の高い安定性、s c F v フォーマットにおける凝集を形成する傾向の低減のような、更なる重要な優位な改善を示す新規のクローニングが選択された。この抗体は、r 8 4 ( および P G N 3 1 1 ) と呼ばれ、ヒト治療においては効果的であることが示された範囲内にある、I g G フォーマットにおける 7 n M 以下のオーダーの K <sub>d</sub> を有する V E G F への優れた結合親和性を示す。

30

#### 【 0 4 1 9 】

更には、r 8 4 抗体は、幾つかの人工的に収容されたインビボ腫瘍モデルにおいて腫瘍容積 / 腫瘍増殖を優位に低減することを本明細書にて示されるものである ( 特には、A 6 7 3 横紋筋肉腫瘍モデル、M D A - M B 2 3 1 乳癌細胞腫瘍モデル、様々なヒト非小細胞肺がんモデル、脾臓癌細胞腫瘍モデル、および 4 T 1 哺乳類腫瘍モデル ) 。とりわけ、r 8 4 での結果は、少なくとも、アバスチンと称され、臨床的使用について認可されているヒト化抗 V E G F 抗体と同様であった。r 8 4 のような全長のヒト抗体は、市販のヒト化抗体を上回る有利性を提供する。さらに、r 8 4 はマウス V E G F およびヒト V E G F に結合するという有利な特性を有する。r 8 4 抗体が、2 C 3 およびアバスチンを上回

40

50

って示す、マウス VEGF に結合する能力は重要な有利性である。さらには、MDA-MB-231 腫瘍モデルからの結果も、現在、癌発生および癌転移において積極的な役割を有し、患者に有害であることが知られている腫瘍関連のマクロファージの侵入を、r84 は優位に低減することを示している。この点に関して、r84 は有意に ( $p < 0.01$ ) マクロファージマーカー Mac-3 の発現を低減したことが示された。さらには、MDA-MB-231 腫瘍モデルからの結果は、r84 は有意に ( $p < 0.0001$ ) 、腫瘍中の血管数を低減し、そのために、腫瘍中の微小血管密度 (MVD) を優位に低減することが示された。

#### 【0420】

r84 は、有意に、VEGFR2 発現細胞の、VEGF 誘導性の遊走を有意に低減すること、および腫瘍中のリンパ管密度を有意に低減することも示された。リンパ管密度における効果は、リンパ管形成を阻害する本発明のヒト抗体の使用を裏付けるものである。

10

#### 【0421】

r84 によって示される更なる有利な特性は、腫瘍中へ、ミエロイド由来抑制細胞、特に CD11b+ / Gr1+ 細胞の侵入を有意に低減する能力である。さらには、この特性は、2C3 抗体により示されるものではなく、アバスチンによるより低減レベルにおけるものだけである。このように、MDA-MB-231 腫瘍担持マウスにおける更なる研究は、有意にすくない CD11b / Gr1 二重陽性細胞しか、対照に対して、r84 処理動物中の腫瘍に侵入しなかったことを示した。比較研究においては、アバスチン処理動物においては、いくつかの低減が測定可能であったものの、2C3 抗体もアバスチンも何れも、統計学的に有意な CD11b+ / Gr1+ の侵入の減少を示さなかった。r84 / PGN311 処置動物にて観察され二重陽性細胞の個数の低減は 39% である (図 25)。

20

#### 【0422】

両マーカーを発現する細胞は、抗 VEGF 治療に対して耐性がある腫瘍の媒介に関連しているように (Shojaeiら, 2007) 、ミエロイド由来抑制細胞 CD11b+ / Gr1+ の低減化された侵入は、特に興味深いものである。ミエロイド由来抑制細胞 (CD11b+ Gr1+) は、腫瘍の進行における重要な寄与因子である。腫瘍内微小環境においては、これらの細胞は免疫抑制性メディエーターを分泌し、T リンパ球不全を誘導する (Gabrilovichら, 2001; Serafiniら, 2004)。

30

#### 【0423】

CD11b+ / Gr1+ 細胞は、抗 VEGF 治療に対して耐性を有する腫瘍に関連し、腫瘍の進行に寄与するので、これらの細胞の腫瘍への侵入または動員を低減する r84 / PGN311 の効果は、r84 の治療的応用に、特に癌を含む血管新生疾患の治療に関連した治療的応用に有望な重要性を有するものである。

30

#### 【0424】

実際、本明細書における結果は、CD11b+ / Gr1+ 細胞の腫瘍侵入が、r84 / PGN311 で処置された動物において、少なくも顕著に / 有意に低いことを示しているので、r84 での治療は、VEGF を標的化するその他の薬剤、たとえば抗 VEGF 抗体での治療よりも、抗 VEGF 治療に対する薬剤耐性すなわち不応性の発達に至らない傾向が見込まれることが示唆されている。

40

#### 【0425】

さらに、腫瘍の進行中に、CD11b+ / Gr1+ 細胞の提案された役割を考慮すれば、腫瘍へのこれらの細胞の侵入または動員を低減する r84 / PGN311 の能力は、抗腫瘍活性に関する機構、たとえば r84 / PGN311 による腫瘍増殖の阻害の一部を形成するであろう。

#### 【0426】

r84 / PGN311 の長期的な投与は、マウスにおいて毒性を誘導しないことも示されている。

#### 【0427】

これらは、r84 抗体の治療への可能性を肯定的に示すものである。。

50

## 【0428】

B2. VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体

ELISA、受容体結合アッセイおよび受容体活性化試験を用いて確認された、本発明の重要な点は、本発明の抗体は、VEGFのVEGFR2 (KDR/Flik-1)との相互作用を選択的に阻止し、VEGFR1 (FLT-I)との相互作用は阻止しないことである。該抗体は、VEGFR2におけるVEGF誘導性のリン酸化を阻害して、VEGFR2を介したシグナル伝達を阻害する。該抗体は、また、有力な抗腫瘍活性を有し、ヒト癌が人工的に収容された動物モデルにおいて、構築されたヒト固体腫瘍の増殖を阻止する。さらに、本発明のヒト抗体は、抗血管新生特性を有し、腫瘍に中の微小血管密度を低減するものである。

10

## 【0429】

VEGFR1とVEGFR2との両方を発現する細胞において、VEGFによって活性化される経路を詳細に分析すること、および腫瘍増殖および腫瘍生存の過程におけるVEGFR2活性の重要性を説明することに、これらの特性が抗体の有用であることを示す。さらに重要なことに、これらは、ヒト抗体の治療的介入のユニークな様式を提供し、破骨細胞や軟骨吸収細胞の機能のような、VEGFR1介在性の現象の同時阻害なしに、VEGFR2誘導性の血管形成の特定の阻害を可能にする。

## 【0430】

本発明の抗体は、単に「VEGFR2 - 阻止性ヒト抗VEGF抗体」と称し、本分野における発展に寄与するものであり、非接合型すなわち「裸の」形態での使用についても、接合型すなわち他の治療薬剤を伴う場合についても、両方とも無数の有利性を提供するものである。

20

## 【0431】

本発明におけるインビトロでの結合研究は、ヒト抗体は、VEGFR2へのVEGFの結合を阻止するが、VEGFR1へのVEGFの結合は阻害しないことを実証するものである。

## 【0432】

本発明のヒト抗体はこのように、マウスA4.6.1抗体およびそのヒト化相当物、アバスチン(ベブシジマブ)を含めた他のVEGFへの阻止性の抗体に対して、有意に改善されたものである。A4.6.1およびアバスチン抗VEGF抗体は、両VEGF受容体にVEGFの結合を阻止するものである。結晶学的研究および突然変異研究は、VEGFR2およびVEGFR1に対する結合エピトープは、VEGF二量体の2つの対称的な柱構造に対して集中している(Wiesmannら, 1997; Mullerら, 1997)。2つの受容体と相互作用するVEGF上の結合決定因子は、部分的に重複しており。二量体表面を横切る4つの異なるセグメントに分配されている(Mullerら, 1998)。抗体4.6.1は、両受容体の受容体結合領域内でVEGFの領域に結合する(Mullerら, 1998)。

30

## 【0433】

受容体におけるVEGF誘導性のリン酸化についての、本発明のヒト抗体の効果に関する研究は、該抗体はVEGFR2におけるVEGF誘導性のリン酸化を阻止することを示した。該研究では、本発明のヒト抗体がVEGFR2を介した細胞シグナル伝達を阻害することが示された。たとえば、該抗体は、インビトロアッセイで、Erk1/2およびPLC-のリン酸化を阻害することが示された。

40

## 【0434】

本発明のヒト抗体は、インビオでヒト腫瘍の増殖を阻害するものである。該ヒト抗体による腫瘍増殖抑制の程度は、アバスチンを含めた異なる抗VEGF中和抗体を用いた場合と同様である。これらのヒト抗体の有効性は、他の研究者が異なる抗VEGF中和抗体を用いて見出したことと類似するものであるが、更に、腫瘍の血管形成および腫瘍増殖におけるVEGFの役割を証明するものである。しかしながら、本発明のヒト抗体は、本明細書にて議論された特異的な阻害特性に基づくとともに全長のヒト抗体であることと照らし

50

合わせて、より安全な治療を提供すべきものである。

【0435】

腫瘍の静止よりもむしろ退行が達成され得るという事実は、VEGFが、腫瘍の内皮のための単なる血管形成性のシグナル以上のものを提供していることを示唆するものである。Benjaminiら(1999)は近年、腫瘍は、内皮周辺細胞との接触が確立されていない、大部分の未成熟の血管を含むこと、およびこれらの血管は生存のためにVEGFに依存することを報告した。

【0436】

VEGFの中和は、これらの未成熟の血管にアポトーシスを引き起こして、腫瘍における既存の血管網を低減させることができある。また、腫瘍中において、血管形成および血管退行の両方に関与する血管リモデリングの動的な過程が発生すること、およびVEGFの中和によって、血管形成が、血管退行に対して実質的な変化に至らしめる血管形成を防止することも可能である。

10

【0437】

本発明のヒト抗体は、アバスチンと同じくらい完全に(少なくともそれ位)の腫瘍増殖を抑制するという知見は、腫瘍の血管形成におけるVEGFR2の主要な役割であることを示している。血管形成の多段階の過程は、内皮細胞の走化性、メタロプロテイナーゼ産生、浸潤、増殖および分化を必要とする。VEGFR1は、これらの過程においては役割を有していないかも知れないし、あるいは、VEGFの結合およびシグナル伝達受容体VEGFR2へのその提示によって該過程を補助するものなのかも知れない。

20

【0438】

腫瘍治療における本発明のヒト抗体とアバスチンに対する比較可能な数値は、非常に関連性がある。本発明のヒト抗体は、VEGFR1ではなくVEGFR2へのVEGFの結合のみを阻害するものであるが、少なくともアバスチンと同じくらい効果的なものである。ゆえに、本研究は、VEGFR1がVEGF-介在の腫瘍の血管形成において目立った役割を担うものではないことを指し、さらには、VEGFR1の特異的な阻害剤は、腫瘍の血管形成に影響しないかも知れないことを示唆するものである。これらの結果は、本発明のヒト抗体は、アバスチンと同等な、あるいはより効果的なものであり、その一方で、引き起こされる副作用はより低いことを意味する。

30

【0439】

VEGFR1ではなく、VEGFR2へのVEGFの結合およびVEGFR2の活性化を特異的に阻止する能力は、臨床的な重要性を有する。本発明のヒト抗体は、VEGFの血管形成活性を阻止するが、VEGFR1を媒介としたVEGFにおけるその他の有益な作用を、たとえば特定の免疫細胞および骨細胞におけるものを阻害しない。臨床的な重要性の一局面は、破骨細胞および軟骨吸収細胞の有益な作用を阻害することなく、インビボで機能する、本発明のヒト抗体の能力に関するものである。このことは、本VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療の使用は、骨および/または軟骨に関連するものではないことを意味する。

40

【0440】

インビボでの研究は、VEGFが軟骨内の骨形成における、肥大軟骨のリモデリング、骨化および血管形成に結びつくものであり、軟骨リモデリングに必須のものであることを示している(Gerberら、1999; 参照により本明細書に特に援用される)。可溶型VEGFR1受容体キメラタンパク質(Flt-(1-3)-IgG)の投与による、VEGFR1を介したVEGFシグナル伝達の不活性化が、軟骨吸収細胞の動員および/または分化の減少による、骨梁の骨形成および肥大軟骨細胞帯の肥大化を損なうことが示されている(Gerberら、1999)。

40

【0441】

VEGFは、インビボで破骨細胞の機能の支援の下、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の代わりになり得ることが更に示されている(Niidaら、1999; 参照により本明細書に特に援用される)。破骨細胞を欠乏する骨硬化症(op/op)マ

50

ウスを用いた研究において、M-CSF 遺伝子における変異導入からの結果、組換えヒト M-CSF (rhM-CSF) の注入は、破骨細胞の動員および生存を可能にし、近年の研究では、組換えヒト VEGF の単独注入は、同様に、op/opマウスにおける破骨細胞の動員を誘導し得ることが示された (Niidaら, 1999)。

#### 【0442】

Niidaら (1999) は、破骨細胞は優先的にVEGFR1を発現し、破骨細胞の動員による組換えヒト胎盤成長因子1の活性は、rhVEGFの活性に匹敵し、骨硬化症 (op/op) マウスにおけるVEGFシグナル伝達の有益な効果は、VEGF受容体1 (VEGFR-I) を介在することを報告した。これらの著者は、さらに、(VEGFR1受容体キメラタンパク質を用いて) VEGFが阻害された後にタンパク質rhM-CSF誘導性破骨細胞は死滅するが、このような効果は、rhM-CSFまたは内在性のVEGFによって支持される破骨細胞は、インビロでの活性において有意な差異を示さなかった (Niidaら, 1999)。

10

#### 【0443】

op/op変異体マウスは、破骨細胞数の増加に伴う大理石病の加齢性消失を経る。Niidaら (1999) の研究においては、抗VEGF抗体の注入後、ほとんどの破骨細胞が消失し、内在的に産生されたVEGFは、破骨細胞の出現を担うものであることを実証している。さらに、rhVEGFは、インビトロでの破骨細胞の分化の支持において、rhM-CSFに置き換わるものであった。これらの結果は、M-CSFおよびVEGFは、破骨細胞の機能の支持における重複する機能を有し、VEGFは、VEGFR-1受容体を介して作用することを実証するものである (Niidaら, 1999)。

20

#### 【0444】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、VEGFをVEGFR1に結合および活性化することを阻止するが、VEGFR2に結合および活性化することを阻止しないということが結論付けられる。このようなVEGFR2阻害の抗腫瘍効果は、明らかに実証されている。これらの結果は、VEGFR2が、透過性を介在し、腫瘍の血管形成に重要な役割を有するVEGF受容体であることを示している。

#### 【0445】

ゆえに、本発明は、固形腫瘍の治療のための治療法として、VEGFの阻害を有効にする。さらに重要なことには、本発明は、幅広い治療介入のための、特に、腫瘍および他の疾患における血管形成を阻害するための安全かつ有効な、新規のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を提供する。

30

#### 【0446】

本発明の利点は、副作用を有さないことに限定されるものではない。これらは、有効な利点、特に、骨疾患有する小児および患者における利点を有する重要な特徴であるものの、本発明の抗体は、無数のその他の有利性を有する。

#### 【0447】

例えば、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、腫瘍関連のマクロファージの有害な作用を阻害する、重要な有利性を有する。公知の腫瘍関連のマクロファージは、腫瘍の進行における初期発生段階も転移も両方とも癌において重要な役割を有する。以下に詳述するように、本発明のヒト抗体は、これらのマクロファージの有害な効果を低減させるのに理想的に適するものである。

40

#### 【0448】

腫瘍の血管系の形成および/または宿主の血管系へ接近は、悪性腫瘍の発生において、重要な工程となる。事実、高密度血管網の形成は、「血管形成スイッチ」と称されるが、悪性化への移行に近接に関与している (HanahanおよびFolkman, 1996)。初期の腫瘍に関連する公知のマクロファージは、血管形成スイッチと悪性化の進行との両方において鍵となる役割を担う (Linnら, 2006)。さらには、マクロファージの腫瘍への侵入を阻害することは、血管形成スイッチおよび悪性化への移行を遅延させる

50

ことが示されている（Linら，2006）。

【0449】

癌を有する多くの患者においては、転移は、死亡の究極の原因である。初期腫瘍からの周囲にある結合組織および血管への腫瘍細胞の侵入は、転移過程における鍵となる工程である。マクロファージは、腫瘍の進行および転移に関連することが早くに報告されていた（Linら，2001）。その後の研究は、腫瘍細胞とマクロファージとの間の相互作用が初期腫瘍における上皮性悪性腫瘍細胞の遊走を促進すること、およびこの過程は、パラクラインループ[paracrine loop]に関与することを示している（Wyckoffら，2004；Goswamiら，2005）。

【0450】

さらには、腫瘍侵入性または腫瘍関連のマクロファージは、進入域、基質域および血管周囲域、血管域および血管周辺域を含めた種々の腫瘍内微小環境において、顕著なものであることが知られている。これらの各腫瘍内微小環境におけるマクロファージの作用は、癌細胞の運動性、転移および血管形成をそれぞれ促すことによって、腫瘍の進行および転移を促進する（LewisおよびPollard，2006）。それゆえに、マクロファージは近年、癌に対する戦いにおける重要な標的になりつつある（CondeelisおよびPollard，2006）。

10

【0451】

この点に関して、本発明のヒト抗体は、VEGFR2の活性化を阻害し、腫瘍へのマクロファージの侵入を低減し、悪性化への移行、腫瘍の進行および／または転移を低減することができるので、重要な有利性を有している。このことは、腫瘍関連のマクロファージがVEGFR2を発現し、VEGFR2は、これらの細胞のVEGF誘導性の走化性を介在することを示す、本明細書にて提示された動物研究の結果によって確証されている。本明細書にて、本発明のヒト抗体によって引き起こされる選択的な阻止が有力な抗癌効果を発揮することも示されている。この抗癌効果は、腫瘍へのマクロファージの侵入の低減に伴うものであり、ホストマクロファージにおけるVEGF-VEGFR2の相互作用を選択的に阻止することは、目に見える治療効果に寄与するものである。

20

【0452】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、腫瘍におけるリンパ管密度を低減することに関する有利性を有する。腫瘍血管への腫瘍細胞の出現に加えて、転移はリンパ管形成、すなわち、既存の血管から、新規な腫瘍内リンパ管または腫瘍周辺リンパ管の増殖によって促進される。事実、乳癌を含めた、幾つかの種類の癌においては、リンパ系を介した腫瘍細胞の脱出は、初期の腫瘍由来の悪性細胞が遠位の部位に播種される優先的な手段であると考えられている。

30

【0453】

数年間、リンパ管の血管形成は主にVEGF-Cおよび／またはVEGF-Dによって誘導されるものが考えられた。しかしながら、今では、リンパ管形成におけるVEGF-Aの関与と結びついている証拠の主要部が蓄積されている。さらには、近年の研究は、VEGF-Aに対するマウス抗体が、インビボでの腫瘍のリンパ管形成および転移を阻害するのに効果的であることを示している（Whitehurstら，2007）。

40

【0454】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体が、実際に、腫瘍のリンパ管密度を低減することを示す結果は、本明細書に提示されている（図18A、図18Bおよび図18C）。本発明のヒト抗体は、ゆえに、腫瘍のリンパ管血管形成を阻害し、腫瘍の血管を介した血管形成および浸潤による脱離を阻害するとともに、リンパ経路を介した転移を低減する利点も提供するものである。それゆえに、本発明のヒト抗体は、幾つかの介入点を介して、転移または浸潤の発生を低減する能力を有することを示すことができる。

【0455】

さらには、図18Aにおけるデータは、本発明の抗体は、ポドプラニンおよびPROX

50

1における減少によって測定されるような腫瘍のリンパ管密度を限定することを示している。ポドプラニンは、軟骨肉腫のような柔組織の癌および毛囊樹状細胞肉腫のようなリンパ腫癌に対するマーカーなので(Xieら, 2008)、またPROX1は直腸がんの侵入を予知することを示唆するものなので(Petrovováら, 2008)、このことは、これらの特定の疾患兆候を治療するための、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の使用を強調するものである。

#### 【0456】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体によって示される更なる有利な特性は、ミエロイド由来抑制細胞の、特にCD11b+/Gr1+細胞の、腫瘍への侵入または動員を有意に低減する能力である。10

#### 【0457】

さらに、この特性は、2C3抗体およびより低減されたレベルにすぎないアバスチンによって示されるものではない。本発明の好適な抗体は、対照レベル(たとえば、未処置の腫瘍または対照抗体で処置された腫瘍)に比べて、32%、34%、36%、38%またはそれより多く、CD11b+/Gr1+細胞の腫瘍への侵入または動員を低減することができる。

#### 【0458】

このように、MDA-MB-231腫瘍担持マウスについての更なる研究は、CD11b/Gr1二重陽性細胞は、r84-処置動物における腫瘍に、対照に対して、あまり有意には侵入しないことを示した。対照研究においては、一部の低減がアバスチン処置動物において測定可能であるものの、2C3抗体もアバスチンも統計学的に有意なCD11b+/Gr1+の侵入の減少を示さなかった。この、観察された二重陽性細胞の数における低減は39%である(図25)。20

#### 【0459】

ミエロイド由来抑制細胞CD11b+/Gr1+の侵入の低減は、両マーカーを発現する細胞が近年、抗VEGF治療に対する腫瘍の治療抵抗性の介在に関連があるとされているため、特に興味深いことである(Shojaeiら, 2007)。ミエロイド由来抑制細胞(CD11b+Gr1+)も、腫瘍の進行への重要な寄与因子である。腫瘍内微小環境においては、これらの細胞は免疫抑制メディエーターを分泌し、Tリンパ球不全を誘導する(Gabrilovichら, 2001; Serafiniら, 2004)。30  
CD11b+/Gr1+細胞は、抗VEGF治療に対する腫瘍の治療抵抗性および腫瘍の進行の寄与に関与しているので、これらの細胞の腫瘍への侵入を低減する本発明の抗体の効果は、明らかに、本発明の抗体の治療的適用に、特に、癌を含めた血管新生疾患の治療に関与する治療的適用に有望な重要性を有するものである。

#### 【0460】

実際に、本明細書における結果は、CD11b+/Gr1+細胞の腫瘍侵入が、本発明の抗体で処置された動物において、最も顕著でない/有意に低いことを示しているので、本発明の抗体での治療は、その他のVEGF標的化薬剤での治療、たとえばその他の抗VEGF抗体での治療よりも、抗VEGF治療に対する薬剤耐性または不応性が進展する傾向にあまりないものである。さらに、腫瘍の進行におけるCD11b+/Gr1+細胞の提示された役割を考慮すれば、本発明の抗体の、このような細胞の腫瘍内への侵入または動員を減少させる能力は、抗腫瘍活性、たとえば、本発明の抗体によって示されるような腫瘍増殖の阻害に関与する機能の一部をおそらく形成するのであろう。40

#### 【0461】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、インビボのマウスモデルにおいて長期的に投与された場合、毒性を誘導しないことも示された。

#### 【0462】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、好ましくは、マウスVEGFおよびヒトVEGFに結合するという有利な特性を有する。マウスVEGFを結合する能力は、抗体である2C3およびアバスチンを超えた重要な利点である。50

## 【0463】

さらには、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に基づく抗体接合体は、治療薬剤を腫瘍環境へ送達さえることに使用され得るが、一方で多くのその他の抗VEGF抗体はそのようにできない。本発明のヒト抗体は、インビボでの投与で、腫瘍血管系と腫瘍間質との両方に結合するが、正常器官または正常組織における血管系または結合組織には結合しないものである。本ヒト抗体に基づく治療構造物は、一つの分子内に2つの機能、つまり、抗体およびそのフラグメントの抗血管新生特性と、付着させるための選択された治療薬剤の特性を結合させることができるという利点を有する。要するに、本発明のヒト抗体は、抗血管新生剤と血管への標的化薬剤との両方として使用され得る一方で、先行技術の多くの抗VEGF抗体は、血管への標的化能力において使用することはできない。

10

## 【0464】

VEGFR2は、内皮において鍵となる受容体であるので、VEGFのVEGFR2への結合を阻止することは、抗血管新生効果に必須なものである。VEGFR1は、内皮において発現されているものの、この場合においては、VEGFR1は非シグナル伝達的であるもの、あるいは活動的でないものである。ゆえに、VEGFR1へのVEGFの結合を阻止する本発明のヒト抗体の能力がなければ、抗血管新生および抗腫瘍の薬剤としての有効性がある結果とはならないものである。事実、VEGFR1へのVEGFの結合を阻害することは、むしろ、従来技術におけるブロッキング抗体では起きていたことであるが、本ヒト抗体のVEGFへ結合し、実質的にVEGF-VEGFR1相互作用を実質的に妨げることがない能力は、これらの新規抗体の、薬剤輸送特性を向上させるものである。

20

## 【0465】

本発明者は、上記ブロッキング抗体が、受容体には結合しない、腫瘍に局在化したVEGFに結合することで、腫瘍環境に治療薬剤を輸送することを機能することが予期される旨を見出した。具体的には、本発明者は、このようなヒト抗体が、腫瘍間質にてVEGFへ結合し、腫瘍間質に治療薬剤を輸送することを理解した。このことは、内皮周辺において薬剤の抗免疫種[reservoir]を提供し、血管内皮細胞において細胞毒性またはその他の破壊的な効果を引き起こして抗腫瘍効果を発揮するものである。

30

## 【0466】

間質または結合組織に関連するVEGFは、古典的な意味でのVEGF受容体に、すなわち細胞表面受容体に結合しない。むしろ、VEGFは、VEGFの塩基性領域を介して、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのようなプロテリオグリカンを含めた1種以上の結合組織の構成成分に結合する。これらの配列（およびそれをコードするエクソン）は、VEGFR121タンパク質（および基となるDNA）において欠失しているものであり、そのため、このアイソフォームは、有意な量で間質中にて存在しないはずである。腫瘍間質におけるVEGFは、腫瘍内にて局在しているが、しばしば「フリー」と称される、なので「フリー」は本質的に受容体に結合していないものであることを意味する。

## 【0467】

本発明者は、2つではなく1つの受容体へのVEGFの結合を阻止するヒト抗体は、血管系において受容体に結合したVEGFへの結合によって、治療用薬剤を腫瘍環境へ輸送できるであろうことを推定した。このことは、本発明の有利な特徴の一つ、つまり、VEGFR2へのVEGFの結合を阻止し、それゆえにVEGFからの血管新生シグナルを阻害するが、VEGFR1へのVEGFの結合を阻止しない抗体を提供することである。その他の細胞および組織における、VEGFR1を介したVEGFシグナル伝達を維持することによって全身性の副作用を低減することに加えて、これらのヒト抗体は、腫瘍血管系におけるVEGF-VEGFR1複合体に局在化し、該複合体に直接、治療薬を送達させることができる。

40

## 【0468】

VEGFR1とVEGFR2との両方は、正常組織における内皮細胞とは対照的に、腫

50

瘍において上方制御される。VEGFR 1は、腫瘍の血管内皮で非常に発現され、本発明の目的する態様を特に効果的なものにする。事実、VEGFR 1は、内皮では「非シグナル伝達」であるが、より高いレベルではないとしても、少なくともVEGFR 2と同じようなレベルで発現される。この現象の根底にある要因は、VEGFR 1は、低酸素とVEGFとの両方に応答して上方制御されるものであり、一方VEGFR 2は、VEGFとの応答によってのみ上方制御され、低酸素によって影響されるものではないということである。

#### 【0469】

内皮におけるVEGFR 1の役割は依然として確定的なものではないが、VEGFR 1は、VEGFを「捕捉」し、シグナル伝達受容体であるVEGFR 2上にリガンドを渡すためのデコイ受容体として作用しているかもしれない。これが本当ならば、デコイ受容体にシグナル伝達受容体よりもVEGFに対してより高い親和性を付与することが予期されるが、これは紛れもない事実である。この点に照らし合わせると、おそらく、向上した発現レベルのために、本発明のVEGFR 2 - ブロッキング、非VEGFR 1 - ブロッキングヒト抗体は、腫瘍の治療にとって理想的な送達薬剤である。これらの抗体の治療用接合体は、VEGF - VEGFR 1受容体複合体へ治療薬剤を輸送することによって、VEGFR 2を介した血管形成および依存の血管系血管新生を同時に阻害できる。

10

#### 【0470】

本発明者らは、本ヒト抗体の有益な抗血管新生および腫瘍局在化の特性の説明としての、上述の科学的理由に決して束縛されるものではない。本発明の利用性は自明であり、実施するために根拠となる理論はまったく必要ないものであるが、本発明者らは、VEGFR 2 - ブロッキング、VEGFR 1 - 非ブロッキングヒト抗体が効果的かつ特異的に腫瘍の血管系に局在化し得る別の機構を考えている。

20

#### 【0471】

このようなヒト抗体は、別の公知のまたは未だ特性が知られていないVEGF結合タンパク質に関するVEGFに結合し得るか、あるいは、内皮細胞表面におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合されるVEGFに結合し得る。抗体の局在化は、VEGFファミリーのタンパク質のメンバー、つまり、可能性は低いものの血管と関連するVEGF - B、VEGF - C、VEGF - Dに結合することによっても向上するかもしれない。

30

本発明のVEGFR 2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の別の有利な特性は、これらの抗体が、VEGFの生存シグナルまたはVEGFR 2を介在する「保護効果」を中和することである。ヒト抗体をさらに効果的なものにすることに加えて、この特性は、該抗体を、VEGFの生存機能によって妨げられる他の薬剤との組み合わせに、特に有用であるものとする。

#### 【0472】

例えば、VEGFは、放射線治療から内皮を保護する。そのため、本発明の裸の抗体および免疫抱合体は、放射性治療との組み合わせでの使用のために理想的なものである。放射線治療剤へ付加されたこのようなヒト抗体の使用によって、更なる利点も提供される。この型の構造物は、(1)抗体部分を介して抗血管新生効果を発揮すること、(2)放射線治療剤の送達を介して腫瘍の血管系の破壊を発揮すること、(3)VEGFの典型的な生存シグナルが放射線治療の効果に対して反対に作用することを防ぐこと、の3重の有利性を有する。

40

#### 【0473】

同様な相乗効果を有する別の構成体は、抗チューブリン剤やそのプロドラッグ、抗アポトーシス剤およびその他の抗血管新生剤と関連するである。アポトーシスを引き起こす該剤または薬剤の作用は、VEGFによって相殺される。それゆえに、本発明はVEGFを中和することで、このような薬剤の効果を改善するものである。VEGF生存シグナルは、エンドスタチンに対抗するものであり、この治療に限定される。それゆえに、エンドスタチチンと組み合わせた使用において、本発明のVEGFR 2 - ブロッキング、ヒト抗V

50

EGF抗体は、VEGFを中和し、エンドスタチンの抗腫瘍効果を増幅する。VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、腫瘍へ特異的にコラゲナーゼを輸送することに使用されてもよく、ここでコラゲナーゼは、インサイチュでエンドスタチンを生成して、類似の利点を達成する。

#### 【0474】

向上的または相乗的であるこのような組合せ全てにおいて、ヒト抗体および他の薬剤は別個に投与されてもよいし、特異的な送達（つまり、VEGFR1への標的化された輸送）のために第2の薬剤がヒト抗体に連結されていてもよい。エンドスタチンとの組み合わせにおいて、化学的な接合体または組換え融合タンパク質は、目下有望なエンドスタチン治療の制限となっているエンドスタチンの短い半減期の影響を少なくするため、好適である。組織プラスミノーゲンアクチベーターとの組合せまたは標的化形態も使用してもよい。

10

#### 【0475】

本発明のヒト治療の更なる有利性としては、間質圧を低下させる能力が挙げられる。VEGFR介在による透過性の上昇は間質圧に寄与しするため、VEGFR2を介したシグナル伝達の低下は、透過性および間質圧を両方とも低下させる。このことは、順々に、全腫瘍組織を行き来する薬剤の障壁を低下させて、血管系から離れた腫瘍細胞も殺傷されることになる。本組成物は全く免疫原性を有さない、あるいは無視できる程度のまたは低い免疫原性を有するので、延長治療も達成され得る。

20

#### 【0476】

##### B3. 抗体CDR配列

抗体について言及するに当たって本明細書にて使用される「可変」との用語は、抗体間で配列が十分に相違する可変ドメインにおける特定の部位を意味し、特定の抗体それぞれの特定の抗原に対する特異性および結合において使用されるものである。しかしながら、この可変性は、抗体の可変ドメイン中に均等に分布いるものではない。この可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメイン両方の、「超可変領域」と称される3つのセグメント中に集中している。

#### 【0477】

可変ドメインにおけるより高度に保存させた部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、何れも4つのFR（それぞれFR1, FR2, FR3およびFR4）を含み、これらは大まかには - シートの立体構造を採り、3つの超可変領域によって連結されており、その超可変領域は、連結し、時としてシート構造の一部分を形成しているループを形成している。

30

#### 【0478】

各鎖の超可変領域は、FRによって緊密に結合され、もう一方の鎖に由来する超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatら, 1991, 参照により本明細書に特に援用される）。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接的には関与しないが、種々のエフェクタ機能を、たとえば抗体依存性細胞毒性における抗体の集合化などを示す。

40

#### 【0479】

本明細書にて使用される「超可変領域」との用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」（つまり、軽鎖可変ドメインにおける残基24-34（L1）、50-56（L2）および89-97（L3）、ならびに重鎖可変ドメインにおける残基31-35（H1），50-56（H2）および95-102（H3）；Kabatら, 1991, 参照により本明細書に特に援用される）に由来するアミノ酸残基および/または「超可変ループ」からの残基（つまり、軽鎖可変ドメインにおける残基26-32（L1），50-52（L2）および91-96（L3）、ならびに重鎖可変ドメインにおける残基26-32（H1），53-55（H2）および96-101（H3））に由来するアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」すなわち「FR」の残基は、本明細書にて定義された超可変領域残基を除く可変ドメイン残

50

基である。

【0480】

r 84 ScFv フラグメントに VH 鎖および VL 鎖の DNA 配列および推定アミノ酸配列は、本明細書において、配列番号 1 (VH, 核酸)、配列番号 2 (VL, 核酸)、配列番号 3 (VH, アミノ酸) および配列番号 4 (VL, アミノ酸) として提供される。r 84 全長 IgG における VH 鎖および VL 鎖の DNA 配列は、本明細書にて、配列番号 26 (VH, 核酸) および配列番号 27 (VL, 核酸) として提供される。これらの配列は、上記抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の CDR 1 ~ 3 を包含している。

【0481】

本明細書 (C7 項) に記載されるように、生物学的分子の構造および機能の情報があれば、様々な均等物または更に改善された分子を生成し得る。これは、r 84 抗体により例示されるような、本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体に適用される。抗体の抗原結合およびその他の機能的特性は保存されなければならないが、標準となる抗体が提供されれば、本技術分野には、均等な抗体および更に改善された抗体を作製するにあたってのかなり高い程度の知識が存在する。このような技術的知識は、配列および本明細書にて提供される情報に照らし合わせて、同様な、改善された、あるいは望ましい、特性を有する抗体の產生に適用されうる。

10

【0482】

均等な抗体のために、特定のアミノ酸は、抗体の定常ドメインまたは可変ドメインのフレームワークにおいて、相互作用する結合能の相当の喪失を伴うことなく、他のアミノ酸で置換することができる。そのような変更は、抗体部分をコードする DNA 配列において生じ、該変更は、事実上は保存されているものであることが好ましい (C7 の項を参照、表 A におけるコドン情報および部位特異的変異についての裏付けられた技術的詳細)。当然、なされるべき変更の数には制限があるが、このことは当業者に知られることとなる。

20

【0483】

変異体のその他の種類は、その変異体が創出された親抗体に対して改善された生物学的特性を有する抗体である。このような変異体、すなわち、第 2 世代化合物は、典型的には、1 以上置換された親抗体の超可変領域の残基を含む置換変異体である。このような置換変異体を創出する簡便な方法は、ファージディスプレイを用いるアフィニティ 成熟である。

30

【0484】

ファージディスプレイを用いるアフィニティ 成熟において、いくつかの超可変領域部位 (たとえば、6 ~ 7 部位) が変異させて、各部位にて全て可能性がある置換を創出する。創出された抗体変異体は、各粒子内に封入された M13 の遺伝子 I II 生成物に融合されたものとして、フィラメント状のファージ粒子から 1 個の状態で提示される。ファージディスプレイされた変異体は、本明細書で開示されているように、生物学的活性 (たとえば結合親和性) に基づいてスクリーニングされる。改変のための超可変領域の候補を同定するために、アラニンスキャニング変異導入を実施して、抗原結合に寄与する超可変領域の残基を同定することができる。

40

【0485】

代わりに、あるいは追加で、抗原抗体複合体の結晶構造が描画および分析されて、抗体と VEGF との間の接触部分を同定することが考慮される。このような接触残基および近接する残基は、置換の候補となる。このような変異が生じると、変異体のパネルは、本明細書に記載されたような、スクリーニングに供され、類似するものではあるが、関連する 1 以上のアッセイで異なるあるいは更に優れている抗体が、更なる発展のために選択される。

【0486】

本発明の更なる側面は、本発明における VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体の重鎖および軽鎖の、たとえば、r 84 重鎖および軽鎖の CDR 領域をコードする、単離されたまたは精製された DNA セグメントおよび組換えベクターと、DNA 技術の適

50

用を介して、たとえば C D R 領域を発現する組換え宿主細胞の創出および使用とに関する。

**【 0 4 8 7 】**

本発明は、全ゲノム D N A から遊離した、本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の重鎖および / または軽鎖の、たとえば r 8 4 重鎖および / または軽鎖の、C D R 領域を発現することができる、ヒトのまたは合成された D N A セグメントに関する。本明細書にて使用される「D N A セグメント」とは、特定種の全ゲノム D N A から遊離して単離または精製された D N A 分子を指す。D N A セグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片 [fragment]、ならびに、たとえばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む組換えベクターも、「D N A セグメント」との用語の範囲に含まれる。

10

**【 0 4 8 8 】**

同様に、コードするセグメント、すなわち、単離または精製された、本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の重鎖および / または軽鎖の、たとえば r 8 4 重鎖および / または軽鎖の遺伝子部分を含む D N A セグメントは、コード配列と、特定の局面では制御配列を含み、他の天然に生じた遺伝子またはタンパク質のコード配列から実質的に離れて単離または精製されたものを指す。この点において、「遺伝子」との用語は、便宜上、機能性のあるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードしている単位を指すのに使用される。当業者に知られるように、この機能的な用語は、好適な抗原結合タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを発現するあるいは発現するよう調整されうる、天然の抗体コード配列およびより小さな操作されたセグメントを包含する。

20

**【 0 4 8 9 】**

「他のコード配列から実質的に離れて単離または精製された」とは、コードしているセグメントすなわち目的の単離された遺伝子部分が、その D N A セグメントのコード領域の主要な部分を形成していること、そして、その D N A セグメントが、天然に生じたコードしている D N A 、たとえば大きな染色体断片や、他の機能的遺伝子または c D N A コード領域を含まないことを意味する。もちろん、このことは、元々単離されたような D N A セグメントを指し、そのセグメントに人工的に後ほど追加された遺伝子またはコード領域を排除するものではない。

30

**【 0 4 9 0 】**

特定の実施態様においては、本発明は、単離または精製されたコードセグメント、すなわち、単離または精製された遺伝子部分および発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の重鎖および / または軽鎖の、たとえば r 8 4 重鎖および / または軽鎖の C D R 領域をコードする D N A 配列を含む組換えベクターであって、配列番号 3 または配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも約 7 5 %、好ましくは少なくとも約 8 0 %、より好ましくは少なくとも約 8 5 %、更に好ましくは少なくとも約 9 0 %、最も好ましくは約 9 5 % 程度のアミノ酸配列同一性のアミノ酸領域を含む第1の配列領域を少なくとも有する単離または精製されたコードセグメントに関する。ここで、該 C D R 領域は、配列番号 3 または配列番号 4 のアミノ酸配列 C D R 領域の生物学的特性を少なくとも実質的に維持するものである。

40

**【 0 4 9 1 】**

本明細書にて開示されているように、配列は、特定の生物学的には機能上均等なアミノ酸、すなわち「保存的置換」を含んでいてもよい。その他の配列は、当業者にて知られ、本明細書に記載されたように、C D R または C D R を含む抗体の特性を改善するために故意に操作された、機能上非均等なアミノ酸、すなわち「非保存的置換」を含んでいてもよい。

**【 0 4 9 2 】**

アミノ酸配列および核酸配列は、更なる残基を、たとえば、追加 N 末端または追加 C 末端アミノ酸、すなわち 5' または 3' 配列を含み、好ましくは、タンパク質発現に関する、生物学的タンパク質活性の維持または改善を含み、これらの配列が上記にて説明された

50

基準に合致している限り、本発明の配列に相当するものであると理解される。末端配列の付加は、コード領域の 5' または 3' の何れかの部位の横に位置している非コード配列および制御領域を含む。

#### 【0493】

本発明の核酸セグメントは、全長がかなり変更され得るように、その他の DNA 配列と、たとえば、プロモータ、ポリアデニン化シグナル、更なる制限酵素部位、マルチクローニング部位、その他のコード化されたセグメントなどと組み合わされてもよい。そのために、好ましくは、調製の容易さおよび意図する組換え DNA プロトコールによって制限されている全長で、ほとんどの長さの核酸フラグメントは採用される。

#### 【0494】

それゆえ、組換えベクターは本発明のさらなる側面を形成するものである。特に有用なベクターは、DNA セグメントのコード部分がプロモータの制御下に置かれているベクターが考慮される。一般的に、限定するものではないが、天然の環境では、プロモータは通常コード配列に付随していないので、組換えの、すなわち異種のプロモータが採用されることになる。このようなプロモータとしては、プロモータが効果的に、発現のために選択された細胞の種類、生物、さらには動物における DNA セグメントの発現を発揮させるかぎり、バクテリアの、ウイルスの、真核生物の、および哺乳類のプロモータが挙げられる。

#### 【0495】

タンパク質を発現するための、プロモータの使用および細胞種の組み合わせは、分子生物学における当業者に知られていることである。使用するプロモーターは、構造的なものか、または誘導的なものであり、さらには適切な条件下で使用され、組換えタンパク質またはペプチドの大規模産生において有利であるような、導入した DNA セグメントの高いレベルの発現を発揮せるものである。

#### 【0496】

本願発明の核酸配列の発現は、当業者に知られた技術および、更に本明細書に記載された 1 以上の技術によって簡便に達成されてもよい。たとえば、融合タンパク質の組換えに関する後の記載は、同様に、核酸レベルでのその他のコード配列に動作可能に付随していない抗体および抗体断片に適用する。

#### 【0497】

##### B4. プラスミドライブラー由来の抗体

組換え技術は、今や、様々な抗体をコードする組換え遺伝子から所望の特異性を有する抗体の調製を可能にしている (Van Dijkら, 1989; 参照により本明細書に援用される)。特定の組換え技術は、免疫動物の脾臓由来で単離された RNA から調製されたコンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラーにおける免疫学的スクリーニングによって、抗体遺伝子の単離を含むものである (Morrisonら, 1986; Winter および Milstein, 1991; 何れも参照により本明細書に援用される)。

#### 【0498】

このような方法のために、コンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラーは、免疫動物の脾臓から単離された RNA から調製され、適切な抗体を発現するファージミドは、抗原を発現する細胞および対照細胞を用いたパンニング [panning] によって選択される。典型的なハイブリドーマに対してこの方法の有意性は、約  $10^4$  倍の抗体数を產生でき、一回でスクリーニングできることと、新規の特異性が H鎖および L鎖の組み合わせによって生み出され、更に創出される適切な抗体の割合が増加することである。

#### 【0499】

バクテリアにおける、多くのレパートリーの多様な抗体分子を創出する方法は、ベクターとして、バクテリオファージラムダを利用する (Huseら, 1989; 参照により本明細書に援用される)。ラムダベクターを用いた抗体の產生は、DNA 配列の重鎖および軽鎖集団を分離された開始ベクター内にクローニングすることを含む。ベクターは、その

10

20

30

40

50

御ランダムに組み込まれ、重鎖および軽鎖の共発現を発揮させる单一のベクターを形成して、抗体断片を形成する。重鎖DNA配列および軽鎖DNA配列は、選択された抗原を免疫された動物に由来する脾臓細胞（またはそのハイブリドーマ）から単利されたmRNAの増幅によって、好ましくはPCR<sup>TM</sup>または関連した増幅技術によって得られる。重鎖配列および軽鎖配列は、典型的には、開始ベクター内への重鎖セグメントおよび軽鎖セグメントのクローニングを容易にするために、増幅されたDNAセグメントに制限部位を組み込んだプライマーで増幅される。

#### 【0500】

全部にまたは部分的に合成された、抗体の結合部位すなわちパラトープの大きなライブラリーの調製およびスクリーニングの別 の方法は、纖維状ファージに由来するディスプレイベクターを、たとえば、M13, f1またはfdを利用するものである。10

#### 【0501】

これらの纖維状ファージのディスプレイベクターは、『ファージミド』と称されており、多様かつ新規な免疫特異性を有するモノクローナル抗体の大きなライブラリーを調製するものである。この技術は、纖維状ファージの複製のアセンブリ段階において遺伝子産物および遺伝子を連結するための手段として、纖維状ファージのコートタンパク質膜アンカードメインを使用するものであり、コンビナトリアルライブラリーからの抗体のクローニングおよび発現に使用される（Kangら，1991；Barbasら，1991；何れも参照により本明細書に援用される）。

#### 【0502】

纖維状ファージディスプレイのための一般的なこの技術は、参考により本明細書に援用される米国特許第5,658,727号に記載されている。最も一般的な意味では、この方法は、単一のベクター系を用いて、同時にクローニングして、抗体遺伝子レパートリーからの、予め選択されたリガンドに対する結合特異性をスクリーニングする系を提供する。予め選択されたリガンドに対する結合能のための、ライブラリーの単離メンバーのスクリーニングは、簡便な手段で発現抗体分子の結合能との相関関係を確認せしめ、ライブラリーからメンバーをコードする遺伝子を単離するものである。20

#### 【0503】

発現およびスクリーニングのリンクエージ解析は、バクテリア細胞のペリプラズム内に融合ポリペプチドを指向させ、機能的な抗体のアセンブリを可能にすることと、目的のライブラリーメンバーの簡便なスクリーニングを考慮して、ファージアセンブリの間、纖維状ファージ粒子の被膜表の融合ポリペプチドの指向との組み合わせによって達成される。ペリプラズムへの標的化は、融合ポリペプチドにおける分泌シグナルドメインの存在によって提供されるものである。ファージ粒子への標的化は、融合ポリペプチドにおける纖維状ファージのコートタンパク質膜アンカードメイン（例えば、c p I I I 由来またはc p V I I I 由来の膜アンカードメイン）の存在によって提供されるものである。30

#### 【0504】

纖維状ファージに基づくコンビナトリアルな抗体ライブラリーの多様性は、重鎖および軽鎖の遺伝子のシャッフリング、ライブラリーにおけるクローン化された重鎖遺伝子の1以上の相補性決定領域の改変、または、エラーブローンポリメラーゼ連鎖反応によるライブラリー内にランダム遺伝子変異を導入することによって大きくなり得る。ファージミドライブラリーをスクリーニング更なる方法は、何れも参考により本明細書に援用される米国特許第5,580,717号；第5,427,908号；第5,403,484号；および第5,223,409号において記載されている。40

#### 【0505】

別の、大きいコンビナトリアルな抗体ライブラリーのスクリーニングする方法は、纖維状バクテリオファージ、たとえば、M13, f1またはfd（米国特許番号.5,698,426；参考により本明細書に援用される）の表面にて、多様な重鎖および軽鎖配列の集団の発現を利用して発展された。多様な重鎖（Hc）および軽鎖（Lc）配列の2集団を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR<sup>TM</sup>）で合成する。これらの集団は、発現のため50

に必要な要素を含む、別のM13に基づくベクターにクローニングされる。重鎖ベクターは、重鎖配列の翻訳がgVII - Hc融合タンパク質を产生するように、遺伝子VII (gVII)コートタンパク質配列を含む。2種類のベクターの集団は、HcおよびLc配列を含む単一のベクター部分が単一の環状ベクターに連結されるように、ランダムに組み合わされる。

#### 【0506】

組み合わされたベクターは、2つのポリペプチドのアセンブリのためにHc配列およびLc配列の両方を共発現させて、M13の表面にて発現させる(米国特許第5,698,426号; 参照により本明細書に援用される)。組合せ段階は、2つの異なる多様な集団の中でランダムに異なるHcおよびLcをコードする配列を会わせて単一のベクターを形成する。それぞれ独立したベクターから提供された該ベクター配列は、生存しているファージの產生を必要としている。更に、2つの開始ベクターのうち1つにおいても、疑似gVII配列が含まれていると、このベクター配列が、単一のベクターにおいて連結しているまでは、Lcに伴うgVII - Hc融合タンパク質として機能的な抗体断片の共発現は、ファージ表面で達成されない。

10

#### 【0507】

抗体ライブラリーの表面発現は、アンバー抑制系統において実施される。Hc配列とgVII配列との間のアンバー停止コドンは、非抑制系統においては、2つの構成を連結していない。非抑制系統から產生されたファージを単離することおよび、上記抑制系統を感染させることは、発現中において、Hc配列をgVII配列に連結することになる。感染後抑制系統を培養することは、gVII融合タンパク質(gVII - Fab融合タンパク質)として、ライブラリー内で全抗体種のM13の表面に共発現させることを可能にする。代わりに、このDNAを、非抑制系統から単離し、次いで、同様の効果を達成できる抑制系統に導入することも可能である。

20

#### 【0508】

表面発現ライブラリーは、標準的な親和性単離の手順によって予め選択された分子に結合する、特定のFabフラグメントのためにスクリーニングするものである。このような方法としては、たとえば、パンニング(ParmleyおよびSmith, 1988; 参照により本明細書に援用される)、アフィニティークロマトグラフィーおよび固相プロットティング法が挙げられる。高い力価のファージが容易、迅速かつ低量でスクリーニングされ得るので、パンニングは好適なものである。さらには、この手法は、集団からマイナーなFabフラグメント種を選択できるが、この集団は検出不可能なものであったが、実質的に同質な集団から増幅される。選択されたFabフラグメントは、ファージ集団の増幅後、ポリペプチドをコードする核酸を配列決定することで特徴づけられる。

30

#### 【0509】

多様な抗体ライブラリーを調製し、所望の結合特異性のためにスクリーニングする方法は、何れも参照により本明細書に援用される米国特許第5,667,988号および第5,759,817号において記載されている。この方法は、免疫グロブリン可変重鎖および軽鎖可変ドメインのCDR領域に縮合を組み込むために縮合オリゴヌクレオチドおよびプライマーの伸長反応を用いるファージミドライブラリーの形態におけるヘテロ二量体型免疫グロブリン分子ライブラリーの調製と、ファージミド表面における変異を導入されたポリペプチドのディスプレイとを含むものである。その後、提示タンパク質は、予め選択された抗原に結合する能力のためにスクリーニングされる。

40

#### 【0510】

ヘテロ二量体型免疫グロブリン分子を生成する方法は、一般的に(1)目的の重鎖または軽鎖V領域をコードする遺伝子を、ファージミドディスプレイベクターに導入すること;(2)ファージミドの表面提示タンパク質に提示された可能性がある異なる結合部位を発現するディスプレイベクターの大集団を形成するために、V領域遺伝子のCDRに相同性がある領域を含むオリゴヌクレオチド、およびランダム化されたコード配列を生成するための縮合領域を含むオリゴヌクレオチドとともにプライマー伸長によって、ランダム化

50

された結合サイトをファージミドディスプレイベクターに導入すること；(3) 繊維状ファージ粒子の表面において、提示タンパク質および結合部位を発現されること；および(4)アフィニティ 技術を、たとえば、予め選択された抗原に対するファージ粒子のパンニングを用いて、表面発現されたファージ粒子を単離(スクリーニング)して、予め選択された抗原に結合する結合部位を有する提示タンパク質を含むファージミド1種類以上を単離すること、を含む。

#### 【0511】

多様な抗体ライブラリーを調製し、所望の結合特異性のためにスクリーニングする方法は、何れも参照により本明細書に援用される米国特許第5,702,892号に記載されている。この方法は、重鎖配列のみが用いられ、CDRIまたはCDRII超可変領域の何れかをコードする全ての核酸部位でランダム化されるものであり、CDRにおける遺伝的な可変は生物学的な過程に依存しないで形成される。10

#### 【0512】

該方法においては、2つのライブラリーが、操作されて、重鎖遺伝子構造のフレームワーク内におけるオリゴヌクレオチドモチーフを遺伝的にシャッフルするものである。CDRIまたはCDRIIの何れかのランダム変異を通じて、重鎖遺伝子の超可変領域は再構成されて、結果として非常に多様性のある配列の集合になった。変異が導入された遺伝子の集団によってコードされた重鎖タンパク質は、免疫グロブリンの結合特性を全て有する可能性があるが、それは2つの免疫グロブリン鎖うち1つだけを求めるものである。20

#### 【0513】

特に、この方法は、免疫グロブリン軽鎖タンパク質の不在下で実行されるものである。改変された重鎖タンパク質をファージディスプレイするライブラリーは、固定化リガンドとともにインキュベートされて、固定化リガンドに特定的に結合する組換えタンパク質をコードするクローニングを選択する。結合されたファージは、その後、固定化リガンドから解離され、バクテリアの宿主細胞における増殖によって増幅される。それぞれのファージのプラークは、それぞれ異なる組換えタンパク質を発現するものであるが、拡大され、それぞれのクローニングは、結合活性のためにアッセイに供され得る。20

#### 【0514】

##### B5. ヒト抗体ライブラリーを含むトランスジェニックマウス

組換え技術は、今や、抗体の調製に利用されている。上記にて開示したコンビナトリアルな免疫グロブリンファージ発現ライブラリーに加えて、別の分子クローニング法は、ヒト抗体ライブラリーを含むトランスジェニックマウスからの抗体を調製することである。このような技術は、参照により本明細書に援用される米国特許第5,545,807号に記載されている。30

#### 【0515】

最も一般的な意味では、これらの方法は、ヒト由来の少なくとも一部の免疫グロブリンをコードした、あるいは再編成されて、免疫グロブリンのレパートリをコードできる、生殖細胞系列の遺伝物質に挿入されたトランスジェニック動物の生産を含む。

#### 【0516】

挿入された遺伝物質は、ヒトの供給源から生産されてもよいし、合成的に生産されてもよい。この物質は、少なくとも公知の免疫グロブリンの一部をコードするものであってもよいし、改変されて、改変された免疫グロブリンの少なくとも一部をコードするものであってもよい。40

#### 【0517】

挿入された遺伝物質は、トランスジェニック動物において発現され、結果として、挿入されたヒト免疫グロブリンの遺伝物質に、少なくとも一部由来する免疫グロブリンの產生に至る。遺伝物質はトランスジェニック動物において再編成され、挿入された遺伝物質が、間違った部位あるいは間違った配置で、生殖細胞系列に組み込まれた場合であっても、挿入された遺伝物質に由来する部分的な免疫グロブリンのレパートリが產生されうることが知られている。50

## 【0518】

挿入された遺伝物質は、プラスミドおよび／またはコスミドのような原核生物のベクターにクローニングされたDNAの形態であってもよい。より大きいDNAフラグメントは、酵母人工染色体ベクター（Burkeら, 1987；参照により本明細書に援用される）を用いて、または染色体フラグメントの導入（RicherおよびLo, 1989；参照により本明細書に援用される）によって、挿入される。挿入された遺伝物質は、典型的な方法で、たとえばインジェクションまたは、受精卵または胚性幹細胞内にその他の手法で、宿主に導入されてもよい。

## 【0519】

好ましい側面においては、免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝物質を元々保持しない宿主動物が利用され、得られたトランスジェニック動物は、免疫グロブリンを產生するに当たって挿入されたヒト遺伝物質のみを使用することになる。これは、関連する遺伝物質を欠損した天然の変異を有する宿主を使用することか、あるいは、人工的に、変異を作ること、たとえば、完全に細胞系列において関連する遺伝物質が取り除かれた宿主を創出することの何れかで達成され得る。

10

## 【0520】

宿主動物が免疫グロブリンの定常領域をコードする遺伝物質を保有する場合、トランスジェニック動物は、既存の遺伝物質と挿入された遺伝物質とを有し、既存の遺伝物質と、挿入された遺伝物質と、遺伝物質の両方の型の混合とに由来する免疫グロブリンを產生する。この場合、所望の免疫グロブリンは、トランスジェニック動物に由来するハイブリドーマのスクリーニングにより、たとえば、抗体遺伝子発現の対立遺伝子排除または異なる染色体消失の減少を利用することにより、得られ得る。

20

## 【0521】

適当なトランスジェニック動物が調製されたら、該動物は、所望の免疫原で簡単に免疫される。挿入された物質の性状に依存するが、該動物は、キメラ免疫グロブリンを、たとえば、マウス／ヒト起源の混合されたものであって免疫グロブリンの一部のみをコードする外来起源のものを產生し得るか、あるいは、該動物は、完全に外来免疫グロブリンを、たとえば、ヒト由來のもの全体のものであって、外来由來の遺伝物質が免疫グロブリン全体をコードしているものを產生してもよい。

30

## 【0522】

ポリクローナル抗血清は、免疫付与を経たトランスジェニック動物から產生されてもよい。免疫グロブリン產生細胞は、目的の免疫グロブリンを產生する動物から除去されてもよい。好ましくは、モノクローナル抗体は、たとえば、動物由來の脾臓細胞をミエローマと融合させ、生じたハイブリドーマをスクリーニングして、所望の抗体を產生するものを選択することによって、トランスジェニック動物から產生される。このような工程に対する適当な技術は、本明細書に記載されている。

40

## 【0523】

別の方法においては、遺伝物質は、所望の抗体が動物の体液に、たとえば、血清、あるいは、乳、初乳または唾液のような外分泌中に產生されるように、動物中に組込まれてもよい。たとえば、インビトロでヒト免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする遺伝物質を乳タンパク質をコードする哺乳類の遺伝子に挿入し、該遺伝子を哺乳類の受精卵に、たとえばインジェクションによって導入することで、該卵は、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝物質の少なくとも一部に由来する免疫グロブリンを含む乳を產生する成体のメスの哺乳類になり得る。また、所望の抗体は、該乳から回収することができる。このような工程を実施するための適当な技術は当御者に知られているものである。

## 【0524】

前述のトランスジェニック動物は、通常、単一のアイソタイプのヒト抗体、より具体的には、B細胞の成熟に必須のアイソタイプ、たとえば、IgMや、おそらくはIgDを產生するために使用される。ヒト抗VEGF抗体を產生するための別の好適な方法は、それぞれ参照として含まれる米国特許第5,545,806号；第5,569,825号；第

50

5, 625, 126号；第5, 633, 425号；第5, 661, 016号；および第5, 770, 429号に記載された技術を使用することであり、B細胞の分化に必要なアイソタイプからその他のアイソタイプへスイッチすることができるトランスジェニック動物が記載されている。

#### 【0525】

Bリンパ球の分化においては、該細胞は、元々、生産的に再編成されたVHおよびVL領域によって決定された結合特異性を有するIgMを産生する。次に、各B細胞およびその子孫細胞は、同一のL鎖およびH鎖のV領域を有するが、それらは、H鎖のアイソタイプを変更し得る。ミューまたはデルタの定常領域の使用は、概して、可変的スプライシングによって決定され、IgMおよびIgDを単一の細胞内で共発現することを可能にする。その他の重鎖アイソタイプ（ガンマ、アルファ、およびイプシロン）のみが、ネイティブに発現されているが、遺伝子再編成のイベントは、CミューおよびCデルタのエクソンを削除する。この遺伝子再編成は、アイソタイプスイッチングと呼ばれるものであり、典型的には、各重鎖遺伝子（デルタを除く）のすぐ上流に位置する、いわゆるスイッチセグメント間で組換えが発生する。個々のスイッチセグメントは、2kbと10kbとの間の長さであり、主に短い繰返し配列からなる。

#### 【0526】

これらの理由のために、導入遺伝子は、アイソタイプのスイッチングに利用される各スイッチ領域の約1-2kb上流にて、転写制御配列を含むことが好ましい。これらの転写制御配列は好ましくは、プロモーターエレメントおよびエンハンサー要素を含み、より好ましくは、スイッチ領域と自然に関連する（つまり、生殖系列構成で生じる）5'フランкиング（すなわち上流）領域を含む。1つのスイッチ領域からの5'フランкиング配列は、導入遺伝子構造物には操作可能に、異なるスイッチ領域に連結され、いくつかの実施態様においては、導入遺伝子に組み込まれた各スイッチ領域が、天然の生殖系列構成においてしばしば上流域にて存在する5'フランкиング領域を有することが好ましい。免疫グロブリンにおけるスイッチ領域配列に関する配列情報は知られている（Millsら, 1990; Siderasら, 1989; 何れも参照により本明細書に援用される）。

#### 【0527】

米国特許第5, 545, 806号；第5, 569, 825号；第5, 625, 126号；第5, 633, 425号；第5, 661, 016号；および第5, 770, 429号に記載された方法においては、トランスジェニック動物に含まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の経路を通じて正常に機能し、アイソタイプのスイッチングに至る。つまり、この方法においては、これらの導入遺伝子は、構築されて、スイッチングしたアイソタイプおよび以下の1以上を生じせしめる：（1）高いレベルかつ細胞型特異的な発現、（2）機能遺伝子の再編成、（3）対立遺伝子排除の活性化および応答（4）十分な一次レパートリーの発現、（5）シグナル伝達、（6）体細胞超変異および（7）免疫応答時における導入遺伝子の抗体遺伝子座の優性化。

#### 【0528】

導入遺伝子の機能における重要な要件は、幅広い抗原に対して二次免疫応答を引き起こすのに十分に多様である初期の抗体レパートリーの創出である。再編成された重鎖遺伝子は、シグナルペプチドエクソン、可変領域エクソンおよびマルチドメイン定常領域のタンデムアレイからなり、それぞれ、幾つかのエクソンによってコードされている。定常領域遺伝子のそれぞれは、免疫グロブリンの異なるクラスの定常部分をコードする。B細胞分化において、定常領域に近接したV領域は削除され、新規の重鎖クラスの発現に至る。各重鎖クラスにとって、RNAスプライシングの可変的パターンは、膜貫通型免疫グロブリンも分泌型免疫グロブリンを生じせしめる。

#### 【0529】

ヒト重鎖遺伝子座は、およそ200個の、2Mbに亘るV遺伝子セグメントと、およそ30個の、約40kbに亘るD遺伝子セグメントと、6個の、3kbの範囲内でクラスター化したJセグメントと、9個の、約300kbに亘って広がっている定常領域遺伝子セ

グメントとからなる。この遺伝子座全体は、染色体 14 の長腕の遠位部の約 2.5 Mb におよぶ。公知の VD および J 遺伝子フラグメント、ミュー、デルタ、ガンマ 3、ガンマ 1 およびアルファ 1 定常領域を含む重鎖導入遺伝子フラグメントが知られている (Berm anら, 1988; 参照により本明細書に援用される)。ヒト軽鎖遺伝子座に由来する、必要な遺伝子セグメントおよび制御配列の全てを含むゲノムフラグメントは、同様に構築される。

問題なく再編成された免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子の発現は、通常、トランスジェニック非ヒト動物において、内在的な免疫グロブリン遺伝子の再編成を抑制することで、優位な効果を有している。しかしながら、ある実施態様においては、ヒト可変領域および非ヒト（たとえば、マウス）定常領域を含むハイブリッド免疫グロブリン鎖が形成され得ないようにするために、たとえば、導入遺伝子と内在的な Ig 配列との間でのトランススイッチングによって内在性の Ig 遺伝子座の完全な不活性化を作用させることが望ましい。胚性幹細胞技術および相同組換えを用いた場合、内在的な免疫グロブリンレパートリーは容易に除かれ得る。さらに、内在的な Ig 遺伝子の抑制も、様々な技術を、たとえばアンチセンス技術を用いて達成される。

#### 【0530】

本発明のその他の側面においては、トランススイッチングされた免疫グロブリンを產生することが望ましい。キメラトランススイッチされた免疫グロブリンを含む抗体は、たとえば、宿主においてエフェクター機能を保持するために、非ヒト（たとえば、マウス）定常領域を有することが望ましい、幅広い用途に使用され得る。

#### 【0531】

マウス定常領域の存在は、ヒト定常領域に対しても、たとえば、このようなキメラ抗体がマウス疾患モデルにおいて試験されてもよいためにマウスのエフェクター機能を提供する（たとえば、ADCC, マウス補体結合）のような有利性をもたらす。動物試験の後に、配列をコードするヒト可変領域が、たとえば、供給体（ハイブリドーマクローン）から PCR™増幅または cDNA クローニングによって単離されてもよく、ヒトの治療的使用により適切なヒト配列抗体をコードする所望のヒト定常領域をコードする配列にスプライスされてもよい。

#### 【0532】

##### B6. PCR™による変異導入

部位特異的変異は、基となる DNA の特異的な変異導入を通じた個々の抗体の調製において有用な技術である。この技術は、さらに、上述の 1 以上の考察と組み合わせて、ヒト化しようとそうでなかろうと、DNA に 1 以上のヌクレオチド配列の変化を導入することで、配列変異体の調製および試験が迅速にできるようになる。

#### 【0533】

多くの方法が変異導入における使用に適切なものであるが、今は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR™) の使用が一般的に好ましい。この技術は、所望の変異を所定の DNA 配列に導入する迅速かつ効率的な方法である。以下の記述は、所定の配列によってコードされたアミノ酸を変更するのに使用されるように、特に点変異を配列に導入するための PCR™の使用を説明するものである。

#### 【0534】

この方法の適用は、DNA 分子内に制限酵素部位を導入するのにも適している。

#### 【0535】

この方法では、増幅セグメントの一端に点変異を組み込むために、合成オリゴヌクレオチドが設計される。PCR™に従って、増幅されたフラグメントは、クレノーフラグメントでの処理により平滑末端化され、この平滑末端フラグメントは次いでライゲーションされ、ベクターにサブクローニングされる。

#### 【0536】

変異導入することを望むテンプレート DNA を調製するために、該 DNA は、多コピー

10

20

30

40

50

数ベクターに、たとえば、pUC19に、変異導入されるべき箇所の横に位置する制限酵素部位を用いて、サブクローニングされる。テンプレートDNAは、その後、プラスミドミニプレップ法を用いて調製される。親配列に基づくが、所望の点変異を含み、制限酵素部位の側の5'末端の横に位置する適切なオリゴヌクレオチドプライマーは、自動合成器を用いて合成される。このプライマーは、一般的に、テンプレートDNAと約15塩基程度が相同であることが要求される。プライマーは、PCR<sup>TM</sup>における使用には必ずしも必要ないが、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製されてもよい。そのとき、オリゴヌクレオチドの5'末端はリン酸化されるべきである。

#### 【0537】

テンプレートDNAは、所望の点変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR<sup>TM</sup>によって増幅されるべきである。増幅緩衝液中のMgCl<sub>2</sub>の濃度は、一般的に約15mMである。一般的にPCR<sup>TM</sup>の約20~25サイクルが以下のように実施されるべきである：変性、95°、35秒；ハイブリダイゼーション、50°、2分；および伸長、72°、2分。PCR<sup>TM</sup>は、一般的に、最終サイクルにおける、72°、約10分の伸長を含むこととなる。最終伸長段階の後、約5単位のクレノーフラグメントを反応混合液に加えて、15分間、約30°でインキュベートする。クレノーフラグメントのエクソヌクレアーゼ活性は、末端を平坦化し、平滑末端クローニングに適したものにするために必要である。

#### 【0538】

得られた反応混合物は、該増幅が所期の生成物を得たことを検証するために、一般的に、未変性アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析される。大部分のミネラルオイルを除去し、クロロホルムで抽出して残存するオイルを除去し、緩衝化されたフェノールで抽出して、その後、100%エタノールで濃縮することで、反応混合液を処理する。次いで、増幅フラグメントの約半量を、オリゴヌクレオチドにおいて使用されたフランкиング配列を切断する制限酵素で消化する。消化されたフラグメントは、低ゲル化／低融解アガロースゲル上で精製される。

#### 【0539】

フラグメントをサブクローニングして、点変異を確認するために、平滑末端ライゲーションによって、2つの増幅フラグメントを適切に消化されたベクターにサブクローニングする。これは、E.coliを形質転換するために使用され、その後、ここから、ミニプレップ法を使用してプラスミドDNAを調製することができるだろう。その後、正しい点変異が生じたことを確認するために、プラスミドDNAの増幅部分はDNAシークエンシングによって分析されるだろう。これは、TaqポリメラーゼはDNAフラグメントに追加的な変異を導入してしまう可能性があるので、重要である。

#### 【0540】

点変異の導入は、一連のPCR<sup>TM</sup>工程を用いて実行され得る。この手順においては、変異を包含する2つのフラグメントが、それぞれアニーリングされて、相互的なプライム合成によって伸長させられる。そして、このフラグメントは、2番目のPCR<sup>TM</sup>工程によって増幅されて、これによって、上述のプロトコールで必要とされる平滑末端ライゲーションを回避することができる。この方法においては、テンプレートDNAの調製、オリゴヌクレオチドプライマーの創出、および最初のPCR<sup>TM</sup>増幅は上述のように実施される。しかしながら、この工程において、選択されたオリゴヌクレオチドは、テンプレートDNAに対して、約15と約20塩基との間ににおいては相同性があるべきであり、互いに約10塩基以上で重複もしていなければならない。

#### 【0541】

2番目のPCR<sup>TM</sup>増幅においては、各増幅フラグメントおよび各フランキング配列のプライマーを使用し、上述のような条件を用いて、約20と約25との間のサイクルでPCR<sup>TM</sup>を実施する。再度、フラグメントをサブクローニングし、上記にて概説したような工程を用いることで点変異が正しいものであることを確認する。

#### 【0542】

10

20

30

40

50

上述の何れかの方法を用いるに当たり、できるだけ小さなフラグメントを増幅することで、変異を導入することが好ましい。もちろん、概してに G C 含量およびオリゴの長さが影響することとなる、オリゴヌクレオチドの融点のようなパラメーターも注意深く考慮するべきである。これらの方法の実行および、必要ならば最適化は、当業者に知られているものであり、さらには種々の出版物、たとえば、「Current Protocols in molecular biology」(1995, 参照により本明細書に援用される)に記載されている。

## 【0543】

部位特異的変異を実施する場合、表 A を参考にすることができる。

## 【0544】

## 【表 A】

TABLE A

アミノ酸			コドン						
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
システイン	Cys	C	UGC	UGU					
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU					
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG					
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU					
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU	20		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU					
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
リジン	Lys	K	AAA	AAG					
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	30
メチオニン	Met	M	AUG						
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU					
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG					
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
バリン	Val	V	GUU	GUC	GUG	GUU			
トリプトファン	Trp	W	UGG						
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU					

## 【0545】

## B 7 . 抗体断片および誘導体

本発明の元の V E G F R 2 - ブロックング , ヒト抗 V E G F 抗体の供給源には関係なく

、インタクト抗体、抗体多量体または多様な機能性を有する抗体の何れであっても、本発明ではその抗体の抗原結合領域を用いることができる。典型的な機能領域としては、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $F(ab')_2$ 、単一ドメイン抗体(DAbs)、TandAbs二量体、 $Fv$ 、 $scFv$ (单鎖 $Fv$ )、 $dsFv$ 、 $ds-scFv$ 、 $Fd$ 、直線状抗体、minibody、diabody、二重特異性抗体断片等のような、抗原結合ドメインを有する抗体断片が挙げられる。このような構造物を調製する技術は、本技術分野における者にはよく知られたものであり、さらに本明細書にて説明される。

#### 【0546】

抗体構造物の選択は、種々の要因に影響され得る。たとえば、延長された半減期は、腎臓でのインタクト抗体の活発な再吸収に、すなわち、免疫グロブリンの $Fc$ 片の特性に起因し得る。 $IgG$ に基づく抗体は、そのため、 $Fab'$ 対照物よりも、より遅い血中クリアランスを示すことが予期される。しかしながら、 $Fab'$ フラグメントに基づく組成物は、一般的に、良好な組織透過能を示す。

10

#### 【0547】

所望ならば、長寿を賦与するために特定の $Fc$ 領域を選択してもよい。たとえば、WO 99/43713を参照されたい。かかる文献は、 $Fc$ 受容体、 $Fc RI$ 、 $Fc RII$ および $Fc RIII$ への実質的に低下された結合性によって達成された、向上された循環の半減期を有する定常ドメインに関するものである(Fridman, 1991)。さらには、米国特許第7,083,784号は、 $FcRn$ (新生児の $Fc$ 受容体)に対する親和性を向上させる改変に起因する、向上されたインビボでの半減期を有する改変定常ドメインに関するものである。米国特許第7,083,784号の技術は、実質的なエフェクター機能を伴う、または伴わない、より良好な寿命を有する抗体を創出するために適用されてもよい。

20

#### 【0548】

抗体断片は、非特異的なチオールプロテアーゼ、パパインによる、ヒト免疫グロブリン全体のタンパク質分解によって得られ得る。パパイン消化は、「 $Fab$ フラグメント」と称され、それぞれ、单一の抗原結合部位を伴う2つの同一な抗原結合フラグメントと、残余の「 $Fc$ フラグメント」とを生み出す。

#### 【0549】

パパインは、初めに、システイン、2-メルカプトエタノールまたはジチオトレイトルで活性化部位中のスルフヒドリル基を還元することで活性化されなければならない。ストックされた酵素中の重金属は、EDTA(2 mM)でのキレート化で除去して、最大酵素活性を確実なものとするべきである。酵素と基質とは、通常1:100の重量比で混合される。インキュベーションの後、ヨードアセタミドでのチオール基の不可逆的なアルキル化、あるいは単に透析によって、反応を停止することができる。消化の完全性は、SDS-PAGEや、プロテインA-セファロースまたはイオン交換クロマトグラフィーにより分離される様々な画分でモニタリングされるべきである。

30

#### 【0550】

ヒト由来の $IgG$ からの $F(ab')_2$ 断片の調製のための通常の手順は、酵素ペプシンによるタンパク質分解に限定される。この条件は、pH 4.5、37°の酢酸緩衝液中で100×抗体過剰量w/wであり、抗体が重鎖内部のジスルフィド結合のC末端側で開裂されることを示唆している。マウス $IgG$ の消化速度はサブクラスによって変動しうるものであり、優位な量の完全に消化された $IgG$ が著しい量となることを避けるよう、条件を選択すべきである。特に、 $IgG_{2b}$ は完全消化を受けやすい。その他のサブクラスは、最適な結果を出すためには異なるインキュベーション条件を必要とするが、このこと全ては本技術分野では知られていることである。

40

#### 【0551】

インタクト抗体のペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、かつ依然として抗原に架橋結合することができる、 $F(ab')_2$ フラグメントを生み出す。ペプシンによる $IgG$ の消化の典型的な条件は、0.1 M 酢酸緩衝液中、pH 4.5での透析と、次いで1

50

% w / w ペプシンで 4 時間のインキュベーションを含む条件が求められる。最初に、0.1 M ギ酸緩衝液に対して、pH 2.8、4°で、16時間透析し、その後酢酸緩衝液に対して透析された場合、IgG<sub>1</sub> および IgG<sub>2a</sub> 消化が改善される。IgG<sub>2b</sub> は、リン酸ナトリウム緩衝液中スタフィロコッカス V8 プロテアーゼ (3% w / w) 中で、0.1 M pH 7.8、37°で 4 時間のインキュベーションで、より一貫性がある結果を与える。

#### 【0552】

Fab 断片も、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン (CH1) を含む。Fab' フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの 1 以上のシステインを含む CH1 ドメインのカルボキシル末端での数残基が追加されている点で、Fab フラグメントと異なっている。F(ab')<sub>2</sub> 抗体断片は、元々、断片間にヒンジシステインを有する Fab' 断片のペアとして產生される。抗体断片のその他の化学的なカップリングも知られている。

10

#### 【0553】

「Fv」フラグメントは、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体である。この領域は、緊密かつ非共有的な結合状態にある、1つの重鎖ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。3つの各可変ドメインの超可変領域 (CDR) が相互作用して、V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> 二量体の表面上の抗原結合部位を定めているのは、この立体構造においてである。6つの超可変領域 (CDR) がまとまって、抗体に抗原結合特異性を付与している。しかしながら、単一の可変ドメイン（または、抗原に特異的な超可変領域 (CDR) を3つだけ含む Fv の半分）であっても、抗原を認識して結合する能力を有する。

20

#### 【0554】

「单鎖 Fv」もしくは「scFv」または「scFcFv」抗体断片は、抗体の V<sub>H</sub> ドメインおよび V<sub>L</sub> ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在している。一般的に、Fv ポリペプチドは、さらに、scFv が抗原結合のための所望の構造を形成できるようにする、V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ドメインとの間にポリペプチドリンクを含む。

#### 【0555】

以下の特許文献は、抗 VEGF 抗体の scFv、Fv、Fab'、Fab および F(ab')<sub>2</sub> 断片を含む、抗体における機能的な抗原結合領域の調製および使用に関して、本明細書の教示をさらに補足する目的で、参照により本明細書に特に援用される：米国特許第 5,855,866 号；第 5,965,132 号；第 6,051,230 号；第 6,004,555 号；第 5,877,289 号；および第 6,093,399 号。WO 98/45331 もまた、抗体の可変領域、超可変領域および相補決定領域 (CDR) の調製の説明および教示を含める目的で参照により本明細書に援用される。

30

#### 【0556】

「diobody」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一のペプチド鎖 (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>) において軽鎖可変ドメイン (V<sub>L</sub>) につながれた重鎖可変ドメイン (V<sub>H</sub>) を含む。同一の鎖において2つのドメイン間をペア化するには短すぎるリンクを用いることで、該ドメインを強制的に別の鎖の相補ドメインとペア化して、2つの抗原結合部位を創出することができる。diobody は、EP 404,097 および WO 93/11161 に記載されている。「直線状抗体」は、二重特異性または単一特異性であることができ、Zapata (1995) に記載されているように、2つの抗原結合領域を形成するペアのタンデム Fd セグメント (V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub> - C<sub>H</sub>1) を含む。

40

#### 【0557】

抗体の Fab' または抗原結合断片を使用する場合、組織浸透において付随する利点があれば、半減期を上昇させるための断片の修飾から、追加的な利点が得られ得る。多様な技術が、たとえば、抗体分子自体の操作または修飾および不活性担体への接合が用いられてもよい。半減期を上昇させるという单一の目的のための接合は、薬剤を標的に送達されることよりもむしろ、Fab' およびその他のフラグメントが組織に浸透するために選択

50

される点において、入念に着手されるべきである。それでも、PEGなどのような非蛋白ポリマーへの接合が考慮される。

#### 【0558】

接合以外の修飾は、該フラグメントをより安定的にさせる、および／または体内での代謝速度を低減するために、抗体断片の構造を修飾することに基づくものである。このような修飾の1つの機構は、L-アミノ酸の代わりにD-アミノ酸を使用することである。当業者ならば、このような修飾の導入の後には、得られた分子が、依然として所望の生物学的特性を保持していることを確実にするための、綿密な試験を行う必要があることを理解するであろう。更なる安定化の改変としては、N末端もしくはC末端またはその両方に安定化させるための部分を追加することを用いることが挙げられ、これは一般的に、生物学的分子の半減期を延長するのに使用されるものである。単なる例示として、アシル化またはアミノ化で末端を修飾する事が望まれ得る。

10

#### 【0559】

本発明との使用のための、適切な接合型の修飾としては、サルベージ受容体結合エピトープを抗体断片に組込むことが挙げられる。これを達成する技術としては、抗体断片の適切な領域の変異導入または、抗体断片に付着されたペプチドタグとしてのエピトープの組込みが挙げられる。WO 96/32478は、このような技術をさらに例示する目的で参考により本明細書に特に援用される。サルベージ受容体結合エピトープは、典型的には、抗体断片上の類似した位置に移送される、Fcの1または2つのループに由来する3つ以上のアミノ酸の領域である。WO 98/45331のサルベージ受容体結合エピトープは、本発明との使用のために、参考により本明細書に援用される。

20

#### 【0560】

##### B8. 結合アッセイおよび機能アッセイ

本発明は、動物およびヒトの治療計画において優位な利用性を有するものであるが、多くのインビトロでの使用を含む、多くのその他の実用的な使用も有する。これらの使用の特定のものは、ヒト抗体または免疫抱合体の特異的な結合特性に関する。本発明の化合物は、少なくとも1つのVEGF結合要素を含むという点で、これらは、実際、抗VEGF抗体が使用され得る結合の実施態様の全てにおいて使用されてもよい。

30

#### 【0561】

関連する場合、付着した薬剤の存在は、有利な特性を提供するものであるが、いかなる結合アッセイにおいても、ヒト抗体領域の利用を妨げない。好適には、有用な結合アッセイは、本技術分野で一般的に使用されるものであり、たとえば、本明細書に記載されたような、免疫プロット、ウエスタンプロット、ドットプロット、RIA、ELISA、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取（FACS）、免疫沈降、アフィニティクロマトグラフィー等が挙げられる。

40

#### 【0562】

ある標準的な結合アッセイは、抗原が固体の支持マトリックス上に、たとえば、ニトロセルロース、ナイロン、これらの組み合わせ上に固定化されたものであり、たとえば、免疫プロット、ウエスタンプロットおよび関連アッセイにおけるものである。その他の重要なアッセイは、ELISAである。このようなアッセイ全では、血管新生疾患の診断において適用されてもよいように、VEGFの検出における使用に容易に適用され得る。免疫組織化学；蛍光標識細胞分取、フローサイトメトリーまたはフロー微量蛍光定量法；免疫沈降；二重特異性抗体の場合に1以上の抗原を同時に一工程で迅速に精製することさえ含まれる、アフィニティクロマトグラフィーのような、抗原精製の態様；および、本明細書に提示した情報があれば当業者に知られるものとなる多くのその他の結合アッセイにおいて、本発明の薬剤は、未乾燥での凍結の、およびホルマリン固定の、パラフィン包埋組織ブロックと関連づけて使用してもよい。

#### 【0563】

本ヒト抗体の更なる実用的な使用は、機能アッセイにおける対照としてのものである。このようなものとしては、動物モデル研究と同様に、多くのインビトロやエックスビボで

50

のアッセイおよび系が挙げられる。本発明のヒト抗体の結合特性および機能特性は特に特異的なものであるので、すなわち、該抗体は、VEGFの、VEGFR2への結合およびそれを介したシグナル伝達を阻害するが、VEGFR1のこれらには阻害しないので、このような「対照」の使用は、実際上、極めて価値がある。本発明のこのような実用的な適用から利点が得られるアッセイとしては、たとえば、血管新生の角膜マイクロポケットアッセイおよび鶏胚漿尿膜アッセイ(CAM)アッセイとともに、VEGF介在の内皮細胞増殖、VEGF誘導性のリン酸化およびVEGF誘導性の血管の透過性に関するアッセイが挙げられる。これらのアッセイ系は、インビトロまたはエックスビオでの薬剤スクリーニングアッセイに展開され得、そこでは明確な特性を有する生物学的物質の本提供が特に重要である。

10

#### 【0564】

##### C . 免疫抱合体

本発明は、抗血管新生の方法において使用するための、驚くほど効果的な裸の、すなわち非接合体型のヒト抗体を提供するが、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の免疫抱合体、抗毒素および凝固リガンドも提供される。VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療用接合体における使用にとって目下好適な薬剤は、放射線治療用の薬剤(診断の本明細書で開示された放射線診断にて例示されたような)、化学治療用の薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、抗チュープリン剤、抗細胞または細胞毒性薬、サイトカイン、ケモカイン、V - 型ATPアーゼ阻害剤および凝固剤(凝固因子)である。

20

#### 【0565】

免疫抱合体、抗毒素および凝固リガンドを生成するためには、当業者に知られ、本明細書にて開示されているように、融合タンパク質を創出するために、組換え発現を使用してもよい。同じように、免疫抱合体、抗毒素および凝固リガンドは、アビジン・ビオチンブリッジまたは抗体接合体を参照して展開される化学的接合技術およびクロスリンカー技術を用いて生成されてもよい。

#### 【0566】

##### C 1 . 毒性薬剤および抗細胞活性剤

特定の用途にとって、治療薬剤は細胞毒または薬学的な薬剤であり、特に、殺傷するか、あるいは内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制する能力を有する細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤または抗細胞活性剤である。一般的に、本発明のこれらの側面は、本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に接合され、標的内皮に、活性化した形態において送達され得る薬学的な薬剤の使用を考慮している。

30

#### 【0567】

典型的な抗細胞活性剤には、細胞毒素とともに化学療法剤も含まれる。使用してもよい化学療法剤としては、ステロイドなどのホルモン；シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノブテリンのような代謝拮抗薬；アントラサイクリン類；マイトマイシンC；ピンカアルカロイド類；デメコルチニン；エトポシド；ミトラマイシン；クロラムブシリルまたはメルファランなどの抗腫瘍アルキル化剤が挙げられる。その他の実施態様は、サイトカインのような薬剤を含んでいてもよい。基本的には、いかなる抗細胞活性剤も、標的内皮細胞の部位に対して、標的化、内在化、血液成分への放出および/または提示を可能にするよう、問題なく抗体に接合または付随する限り、使用してよい。

40

#### 【0568】

標的抗原が投与経路によって内在化しないような、毒性物質による効率的な毒性化に整合性がある状況があり得るが、この場合、抗腫瘍薬剤、サイトカイン、代謝拮抗薬、アルキル化剤、ホルモン等のような化学療法剤を標的化することが望まれよう。多様な化学療法剤やそのほかの薬理学的な薬剤は、問題なく、抗体に接合化され、薬理学的に機能することが示され、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ピンプラスチン、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモンおよび - アマニチンが含まれる。

50

## 【0569】

別の状況においては、細胞毒素に基づく治療からの可能性がある副作用は、ダウノルビン、ドキソルビン、アドリアマイシン等のようなDNA合成阻害剤の使用によって除去されてもよい。これらの薬剤は、本発明における使用のための抗細胞活性剤の好適例である。細胞増殖抑制剤に関しては、このような化合物は、一般的に、通常の標的細胞の細胞周期を妨げる、好ましくは、その細胞が細胞周期から外れるように妨げる。

## 【0570】

VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に接合し得る幅広い細胞毒性薬が知られている。細胞毒性薬の例は、無数の有用な植物、真菌またはバクテリア由来の毒物を含み、さらに、これらの例としては、数例挙げると、種々のA鎖毒素、特にリシンA鎖；ポーリンまたはゲロニンのようなリボソーム不活性タンパク質； - サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン；胎盤リボヌクレアーゼのようなリボヌクレアーゼ；ジフテリア毒；シュードモナスエクソトキシン。

10

## 【0571】

周知の、1992年の毒物に関する書籍である「Genetically Engineered Toxins」は、Arthur E. Frankelによって編集されたものであるが、付属的記載を含めて、多数の毒物の一次アミノ酸配列が挙げられている。かかる書籍は、標的化された構造物においての毒物の使用を説明および可能にする目的で参照により本明細書に特に援用される。

20

## 【0572】

上記毒物のうち、ゲロニンおよびリシンA鎖が好ましい。ここでの使用のために最も好適な毒物構成部分は、炭水化物残基を改変または除去するように処理された、A鎖毒素、いわゆる脱グリコシル化A鎖(dgA)である。極めて高い有効性かつより長い半減期のため、および臨床的品質および臨床的規模において製造することが経済的に実行可能であるために、脱グリコシル化リシンA鎖が好ましい。

## 【0573】

薬学的観点からは、やはり適切な生物学的応答を提供する、できるだけ低分子を採用することが望ましい。十分な抗細胞応答を提供する、より小さな鎖ペプチドを採用することが望ましい。この目的を達成するために、リシンA鎖は、ナガラーゼ(Sigma)によって30個のN末端アミノ酸を除いて、「切り詰める」ことができ、依然として十分な毒性の活性を保持するということが発見されている。所望の場合、この切除されたA鎖は、本発明に準じて接合体中において用いられてもよいことが提案される。

30

## 【0574】

代わりに、A鎖毒素の構成部分に対する組換えDNA技術の利用も、本発明に準拠して追加的な利点を提供できることがわかる。生物学的に活性なリシンA鎖のクローニングおよび発現が達成されているという点においては、現在、より小さい、すなわち変異ペプチドを同定し、調製することが可能であり、やはり適切な毒性活性を示す。さらには、リシンA鎖が今やクローニングされているという事実は、部位特異的変異導入の適用を可能にするものであり、それを通じてA鎖由来のペプチドを容易に調製およびスクリーニングし、本発明に関連した使用のために有用な部分をさらに得ることができる。

40

## 【0575】

## C2. 凝固因子

本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、直接的または間接的に凝固作用を促進できる構成と連結され、凝固リガンドを形成するものであってもよい。ここでは、該抗体は、凝固剤すなわち凝固因子に直接的に連結されてもよいし、あるいは、凝固剤すなわち凝固因子を結合し、放出する第2の結合領域に連結されていてもよい。本明細書にて使用される「凝固剤」および「凝固因子」との用語は、それぞれ、適切な条件下において、好ましくは、特定のインビオでの環境にて、例えば腫瘍の血管系にて提供された場合において、直接的または間接的に凝固作用を促進できる構成を指す。

## 【0576】

50

好適な凝固因子は、組織因子組成物であり、たとえば、切り詰められたTF(tTF)、二量体型、多量体型、および変異型のTF分子である。「切り詰められたTF」(tTF)は、十分な量の、特性の変化をもたらすアミノ酸配列の除去によって、膜結合性の欠損に至ったTF構造物を指す。

#### 【0577】

この文脈における「十分な量」とは、膜内のTF分子に入るのに、あるいはTFタンパク質の機能的な膜結合性を介在するのに十分な元々の膜貫通アミノ酸配列の量を指す。このような「膜貫通配列の十分な量」の除去は、切り詰められた組織因子タンパク質すなわち、リン脂質膜への結合能を欠損したポリペプチドを創出し、該タンパク質は、リン脂質膜への優位な結合はしない実質的に可溶型タンパク質である。切り詰められたTFは、標準的なTFアッセイにおいて、実質的に、第VII因子を第VIIa因子に変換することはなく、さらには、第VIIa因子の存在下で第X因子を活性化することを含めた、いわゆる触媒活性を保持している。

#### 【0578】

米国特許第5,504,067は、このような切り詰められた組織因子タンパク質を更に説明する目的で、参考により本明細書に特に援用される。好ましくは、本発明のこれらの態様における使用のための組織因子は、一般的には、該タンパク質の膜貫通および細胞質領域(アミノ酸220~263)を欠いている。しかしながら、切り詰められたTF分子は、正確な長さの219アミノ酸の分子に限定される必要はない。

#### 【0579】

組織因子組成物は、二量体としても有用である。切り詰められた、変異型または他の組織因子構造物の何れも、本発明における使用のために、二量体形態にて調製されてもよい。当業者には知られているように、このようなTF二量体は、2つのコード領域を、インフレームで調製し、発現ベクターから発現させる、分子生物学および組換え発現の標準的な技術を採用することにより調製されてもよい。同様に、種々の化学的接合技術も、TF二量体の調製に関連して、使用されてもよい。個々のTFモノマーは、接合に先立つて誘導体化されてもよい。このような技術全ては当業者には容易に知られているものである。

#### 【0580】

所望ならば、組織因子二量体または多量体は、生物学的に放出可能な結合を、たとえば、選択的に開裂可能なリンカーまたはアミノ酸配列を介して連結されていてもよい。たとえば、腫瘍環境内において、優先的に局在化しているか、活性である酵素の開裂部位を含むペプチドリンカーが考慮される。このようなペプチドリンカーの典型的な形態は、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子、またはコラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメリシンなどのメタロプロテイナーゼによって開裂されるものである。

#### 【0581】

特定の態様においては、組織因子二量体は、更に、特定の限定条件においてのみ、後ほど、組織因子とリン脂質膜との機能的な結合を促進するための、妨害された疎水性膜内挿入の構成部位を含んでもよい。切り詰められた組織因子の内容に記載されているように、疎水的膜結合配列は、一般的に、自身の疎水的な性状のために、リン脂質環境で結合を促進する一続きのアミノ酸である。同様に、脂肪酸は、可能性がある膜内挿入の構成部位を提供するために使用されてもよい。

#### 【0582】

このような膜内挿入配列は、この付加がTF構造物の機能的な特性を妨害しないものである限り、TF分子のN末端あるいはC末端の何れかに位置させるか、あるいは、一般的に該分子の別の部位にて付加されてもよい。妨害された挿入構成部位の意図は、TF構造物が腫瘍環境内に局在化するまでは、非機能性のものに留め、疎水性の付加物を、接近可能なようにして、さらに膜との物理的な結合を促進させることである。更に、生物学的に放出可能な結合および選択的に開裂性配列は腫瘍環境内での局在にて、開裂または改変さ

10

20

30

40

50

れる結合または配列、および特定の酵素または生理活性分子への曝露とともに、特に、この点に関しては有用であることが考慮される。

【0583】

別の実施態様においては、tTF構造物は、多量体型またはポリマー型であってもよい。この文脈においては、「ポリマー型構造物」は、3つ以上の組織因子構造物を含む。「多量体型またはポリマー型のTF構造物」は、少なくとも第2のおよび第3のTF分子または誘導体に操作的に付加された第一のTF分子または誘導体を含む。多量体型は、約3と約20との間のこのようなTF分子を含む。多量体またはポリマー内における個々のTF単位は、所望のものとして選択的に開裂可能なペプチドリンカーで連結されていてよいし、その他の生物学的に放出可能な結合に連結されていてよい。さらに、TF二量体について上記にて議論されたように、該構造物は、容易に組換え操作および組換え発現か、あるいは標準的な合成化学を用いて作製されてもよい。

10

【0584】

本発明において有用なさらなるTF構造物は、第VII因子を活性化する能力を欠損した変異体である。このような、「第VII因子活性変異体」は、本明細書においては、機能的な第VII/VIIa因子に結合し、タンパク質分解的に第X因子を活性化するが、タンパク質分解的に第VII因子を活性化する能力が実質的でないTF変異体として一般的に定義される。したがって、このような構造物は、第VII因子活性化の活性を欠くTF変異体である。

20

【0585】

腫瘍特異的な凝固作用の促進を機能とする、このような第VII因子活性変異体の能力は、腫瘍の血管系への特異的な送達および血漿中での低レベルでの第VII因子の存在の根拠となるものである。このような第VII因子活性変異体の接合体が投与されると、該変異体は、血管が形成された腫瘍における血管系内に局在化するであろう。この局在化に先立って、TF変異体は、第VII因子を第VIIa因子に変換する能力がないことにより、一般的に、他の体の部位においては凝固作用を促進できない。しかしながら、腫瘍領域内での局在化および蓄積時には、該変異体は、外因性の凝固作用経路を開始するのに十分な細胞質からの第VIIa因子に出会い、腫瘍特異的な血栓形成に至る。外因性の第VIIa因子も患者に投与することができるだろう。

30

【0586】

1以上の多様な第VII因子活性変異体は、本発明に関連して調製され、使用されてもよい。TF分子の第VII/VIIa因子に対する認識部位に関して、顕著な量の科学的知見がある。第VII因子活性化領域は、一般的に、アミノ酸157位とアミノ酸167位との間に存在することが理解されよう。しかしながら、この領域外の残基も、第VII因子活性化の活性に関連しているかもしれないことが証明されることが考慮され、したがって、一般的にTF配列のアミノ酸約106位とアミノ酸約209位との間に位置する1以上の残基に変異を導入することが考えられる(WO94/07515; WO94/28017; 何れも参照により本明細書に援用される)。

40

【0587】

以下に説明されるような薬剤に例示されるような、多様なその他の凝固因子は本発明に関連して使用されてもよい。トロンビン、第V/Va因子およびその誘導体、第VII/VIIa因子およびその誘導体、第IX/XIa因子およびその誘導体、第XII/XIa因子およびその誘導体、第X因子アクチベーターおよび第V因子アクチベーターが本発明において使用されてもよい。

【0588】

ラッセルクサリヘビ蛇毒第X因子アクチベーターは、本発明における使用について考慮される。ラッセルクサリヘビ蛇毒に存在する第X因子アクチベーターに特異的なモノクローナル抗体も産生されており、特異的に二重特異性結合リガンドの一部として薬剤を送達するために使用され得る。

50

【0589】

トロンボキサンA<sub>2</sub>は、血小板のミクロソーム中において、酵素シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンシンテターゼの一連の作用によりエンドペルオキシド類から形成される。トロンボキサンA<sub>2</sub>は、血小板から容易に合成され、血小板凝集を生成する能力のために、有力な血管収縮剤である。トロンボキサンA<sub>2</sub>もこの活性類似体も両方とも、本発明における使用が考慮されるものである。

#### 【0590】

ここでの文脈において、血小板を活性化性させるプロスタグランジンを合成する、トロンボキサンシンテターゼおよびその他の酵素も、「凝固剤」として使用されてもよい。トロンボキサンシンテターゼに対するモノクローナル抗体や、その免疫アフィニティ精製も知られており、それはヒトトロンボキサンシンテターゼのcDNAである。

10

#### 【0591】

2-アンチプラスミンまたは2-プラスミン阻害剤は、プラスミノ-ゲンアクチベーターにより誘導されたフィブリリン栓の分解を十分に阻害するための機能する、ヒト血漿中に天然に存在するタンパク質分解酵素阻害剤である。2-アンチプラスミンは特に有力な阻害剤であり、本発明における使用が考慮されるものである。

#### 【0592】

2-アンチプラスミンのcDNA配列は利用可であるので、組換え発現および/または融合タンパク質は好適なものである。2-アンチプラスミンに対するモノクローナル抗体も利用可能であり、二重特異性の結合リガンドの実施態様において使用されてもよい。これらの抗体は、外来の2-アンチプラスミンを標的部位に送達するためにまたは標的領域に内に内在性の2-アンチプラスミンを集めて、集中されるために使用され得る。

20

#### 【0593】

##### C3. 抗チューブリン剤

様々な薬剤が、チューブリン活性に干渉することを介した効果を発揮する。チューブリンの機能は、有糸分裂および細胞の生存に必須なので、特定の「抗チューブリン剤」は強力な化学療法剤である。本明細書で用いられる「チューブリン阻害薬」は、好ましくは細胞有糸分裂に必要なチューブリン活性（好ましくはチューブリン重合または脱重合）を直接的または間接的に阻害することによって、細胞有糸分裂を阻害する、任意の薬剤、薬物、プロドラッグまたはその組合せを意味する。

30

#### 【0594】

本発明との使用のための、よりよく知られかつ現時点では好適な一部の抗チューブリン剤は、コルヒチン；タキソール（パクリタキセル）およびドセタキセルなどのタキサン；ピンプラスチン、ピンクリスチンおよびピンデシンなどのピンカアルカロイド；ならびにコンプレタスタチンである。その他の適当な抗チューブリン剤は、サイトカラシン類（B、J、Eを含む。）、ドラスタチン、アウリストチンPE、パクリタキセル、ウスチロキシンD、リゾキシン、1069C85、コルセミド、アルベンダゾール、アザトキシンおよびノコダゾールである。

#### 【0595】

米国特許第5,892,069号、第5,504,074号および第5,661,143号において記載されているように、コンプレタスタチンは、一般的に細胞の有糸分裂を阻害するエストラジオール誘導体である。本発明に関連して使用されてもよい典型的なコンプレタスタチンとしては、コンプレタスタチンA、Bおよび/またはDに基づくものが挙げられ、これらは、米国特許第5,892,069号、第5,504,074号および第5,661,143号において記載されている。コンプレタスタチンA-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、B-I、B-2、B-3およびB-4は、上述の種類の典型的なものである。

40

#### 【0596】

米国特許第5,569,786号および第5,409,953号は、コンプレタスタチンA-1、A-2、A-3、B-I、B-2、B-3およびB-4、それぞれの単離、構

50

造、特性および合成と、腫瘍増殖を治療するための、このようなコンプレタスタチンを用いた方法を説明するものである。このようなコンプレタスタチン1種以上は、本発明に関連して使用されてもよい。

#### 【0597】

米国特許第5,892,069号、第5,504,074号、第5,661,143号および第4,996,237号において記載されているように、コンプレタスタチンA-4をここで使用してもよい。米国特許第5,561,122号は、更に、適当なコンプレタスタチンA-4プロドラッグを説明するもので、本発明と組み合わせての使用が考慮される。

#### 【0598】

米国特許第4,940,726号は特に、コンプレタスタチンD-1およびコンプレタスタチンD-2と命名された大環状ラクトンを説明するものであり、これらは、それぞれ、本発明の組成物および方法と組み合わせて使用してもよい。米国特許第5,430,062号は、本発明と組み合わせて使用してもよい、抗癌活性を有するスチルベン誘導体およびコンプレタスタチン類似体に関するものである。

#### 【0599】

##### C 4 . 抗血管新生剤

本発明は、特に、組み合わされた抗血管新生剤を提供する。本発明のヒト抗体は、アンジオポエチン1(Ang-1)、アンジオポエチン2(Ang-2)、アンジオポエチン3(マウス)またはアンジオポエチン4(ヒト)(Valenzuelaら、1999; Kimら、1999)などのアンジオポエチン(DavisおよびYancopoulous、1999; Holashら、1999; 参照により本明細書に援用される)に結合されていてもよい。

#### 【0600】

ここでの使用のための典型的な抗血管新生としては、アンジオスタチンおよびエンドスタチンが挙げられる。アンジオスタチンは、米国特許第5,776,704号；第5,639,725号および第5,733,876号に開示され、これらは何れも参照により本明細書に援用される。

#### 【0601】

アンジオスタチンは、還元性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で決定されるように、約38kDと約45kDとの間の分子量を有するタンパク質であり、およそ、プラスミノーゲン分子のKringle領域1~4を含む。アンジオスタチンは、一般的に、インタクトなマウスプラスミノーゲン分子のアミノ酸番号98から始まるマウスプラスミノーゲンのフラグメントのものと実質的に類似しているアミノ酸配列を有する。

#### 【0602】

アンジオスタチンのアミノ酸配列は、種間において若干異なってくる。例えば、活性化ヒトアンジオスタチン配列は、インタクトなヒトプラスミノーゲンアミノ酸配列のアミノ酸番号97または99から開始するものであるが、ヒトアンジオスタチンは、アミノ酸配列が実質的に上述のマウスプラスミノーゲンフラグメントに類似している。更に、ヒトプラスミノーゲンは、マウス腫瘍モデルにて示されるように、抗血管形成活性を有するものとして使用してもよい。

#### 【0603】

アンジオスタチンおよびエンドスタチンは、研究の焦点となっており、これらは、マウスにおいて、腫瘍の増殖だけではなく、腫瘍退行も引き起こす能力を示す腫瘍の最初の血管形成阻害剤である。プラスミノーゲンからアンジオスタチンを産生することが示された、エラスターーゼ、マクロファージメタロエラスターーゼ(MME)、マトリシン(MMP-7)および92kDaゼラチナーゼB/IV型コラゲナーゼのような多重プロテアーゼがある。

#### 【0604】

MMEは、腫瘍においてはプラスミノーゲンからアンジオスタチンを生成することがで

き、顆粒球単球コロニー刺激因子（G M C S F）は、マクロファージによってM M Eの発現を上方制御し、アンジオスタチンの産生を誘導する。アンジオスタチン生成におけるM M Eの役割は、M M Eは、実際、患者に由来する肝細胞上皮性悪性腫瘍の臨床的試料にて発現しているという知見に裏付けられている。アンジオスタチンを生成することができると考えられる別のプロテアーゼは、ストロメリシン-1（M M P - 3）である。M M P - 3は、インビトロで、プラスミノ-ゲンからアンジオスタチン様フラグメントを生成することが示されている。アンジオスタチンに対する作用の機構は現時点では明確ではなく、M M P - 3は内皮細胞上における未同定の細胞表面の受容体に結合し、プログラム細胞死または有糸分裂停止を経るという仮説が立てられる。

## 【0605】

エンドスタチンは、更に強力な抗血管形成剤および抗腫瘍剤であるように思われ、特にV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体に結合されていることが好ましい。エンドスタチンは、マウスにおける数多くの腫瘍モデルにおいて、腫瘍の退行を引き起こすのに効果的なものである。腫瘍は、エンドスタチンに対する耐性は向上しないので、治療の複数のサイクル後、腫瘍は休眠状態に入り、容積の増加はなくなる。この休眠状態においては、アポトーシスを経る腫瘍細胞の割合は増加され、原則的に同様の大きさに留まる集団を生み出すものである。

## 【0606】

参照により本明細書に特に援用される、Folkman and O'Reillyによる米国特許第5,854,205号は、エンドスタチンと、その内皮細胞増殖および血管形成の阻害剤としての使用に関するものである。米国特許第5,854,205号は、エンドスタチントンパク質は、X V型コラーゲン、B O V M P E 1前胃エステラーゼのC末端フラグメントに相当し、様々な供給源から該タンパク質は単離され得る。

## 【0607】

その他の抗血管新生タンパク質、特にアンジオスタチンとエンドスタチンとの組み合わせも、血管形成依存的な腫瘍の重量を効果的に退行させることができる旨が、米国特許第5,854,205号に記載されている。

## 【0608】

エンドスタチンおよびアンジオスタチンは、特にエンドスタチンは、本発明に基づいた腫瘍への送達に好ましい薬剤である。バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマプシンも好適な薬剤である。参照により本明細書に援用される米国特許第6,342,221号において記載されているようにエンドスタチン融合タンパク質は好ましいものである。種々の化学的に結合されたエンドスタチン構成の形態は、再度言うと、米国特許第6,342,221号に例示されているように調製されているものである。

## 【0609】

## C 5 . アポトーシス誘導剤

本発明は、腫瘍細胞および腫瘍の血管内皮細胞を含めた腫瘍内での細胞内においてアポトーシスを誘導する薬剤を送達するために使用されてもよい。多くの抗癌剤は、作用機構の一部として、アポトーシス誘導効果を有しているが、ある薬剤は、後述するように、初期的機構として、アポトーシス誘導効果とともに発見、設計、選択されている。

## 【0610】

癌の多くの形態には、p 5 3などの癌抑制遺伝子における変異の報告がある。p 5 3の不活性化は、結果として、アポトーシス促進の破綻になる。かかる破綻があると、細胞死運が予定付けられるよりもむしろ、腫瘍形成における癌細胞が進行する。このように、腫瘍抑制遺伝子の送達も、細胞死を促進するために、本発明における使用に考慮されるものである。典型的な癌抑制遺伝子としては、限定されないが、p 5 3、網膜芽腫遺伝子（R b）、ウィリムス腫瘍（W T 1）、b a x 、インターロイキン-1 b - 変換酵素およびそのファミリー、M E N - 1 遺伝子、神経纖維腫、1型（N F 1）、c d k インヒビター p 1 6、結直腸癌遺伝子（D C C）、家族性大腸ポリポーラス遺伝子（F A P）、多重性腫瘍抑制遺伝子（M T S - 1）、B R C A 1 およびB R C A 2 が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0611】

p 53 (米国特許第5,747,469号；第5,677,178号；および第5,756,455号；何れも参照により本明細書に援用される)、網膜芽細胞腫、B R C A 1 (米国特許第5,750,400号；第5,654,155号；第5,710,001号；第5,756,294号；第5,709,999号；第5,693,473号；第5,753,441号；第5,622,829号；および第5,747,282号；何れも参照により本明細書に援用される)、M E N - 1 (G e n B a n k アクセッション番号U 9 3 2 3 6 ) およびアデノウイルスE 1 A 遺伝子(米国特許第5,776,743；参照により本明細書に援用される)が、使用に好ましい。

## 【0612】

V E G F R 2 - プロッキング、ヒト抗V E G F 抗体によって送達されてもよいその他の成分は、T R A I Lと称されるリガンド、およびT R A I Lポリペプチド(米国特許第5,763,223；参照により本明細書に援用される)；米国特許第5,605,826(参照により本明細書に援用される)の24kDアポトーシス関連プロテアーゼ；F a s 関連因子1、F A F 1(米国特許第5,750,653号；参照により本明細書に援用される)に誘導されるアポトーシスに関連した腫瘍壞死因子をコードする遺伝子を含む。本発明のこれらの態様における使用について、インターロイキン-1 変換酵素およびそのファミリーメンバーの提供も考慮され、これらはアポトーシスを促進することが報告されている。

## 【0613】

カルボスチリル誘導体(米国特許第5,672,603号；および第5,464,833号；何れも参照により本明細書に援用される)；分枝アポトーシス誘導性ペプチド(米国特許第5,591,717；参照により本明細書に援用される)；ホスホチロシン阻害剤および加水分解性ホスホチロシン類似体(米国特許第5,565,491号；および第5,693,627号；何れも参照により本明細書に援用される)；R X R レチノイド受容体のアゴニスト(米国特許第5,399,586；参照により本明細書に援用されるも。)；さらに抗酸化剤(米国特許第5,571,523；参照により本明細書に援用される)のような化合物も使用されてもよい。ゲニステインのようなチロシンキナーゼ阻害剤も、細胞表面受容体V E G F R 1を指向した、本発明の薬剤に結合されてもよい(米国特許第5,587,459号により裏付けられている；参照により本明細書に援用される)。

## 【0614】

D I A B L Oとして知られている「二次ミトコンドリア由来カスパーーゼ活性化因子」(S M A C)も、アポトーシスの間、ミトコンドリアから放出されるタンパク質であり、「アポトーシス阻害タンパク質」(I A P)と称されるタンパク質のファミリーに結合する。I A P 発現レベルは、多くのヒトの腫瘍において増加されている。それゆえに、I A P アンタゴニストまたはS M A C 模倣薬は、抗癌剤として開発されている。これらは、接合体として、および混合療法において、本発明に関連して使用されてもよい。

## 【0615】

典型的なL A P 阻害剤としては、X - 結合型I A P (X I A P、B I R C 4 としても知られている。)のB I R 3 ドメインでのS M A Cと、構造に基づいた方法を用いて設計された一価および二価I A P アンタゴニスト(V i n c eら、2 0 0 7 ; V a r f o l o m e e v ら、2 0 0 7 )との相互作用の結晶構造に基づいて開発されたものが挙げられる。X I A PのB I R 3 ドメイン(P e t e r s e n ら、2 0 0 7 )と相互作用するS M A C のN末端アミノ酸に類似するように設計されたS M A C 模倣薬も使用されてもよい。S M A C 模倣薬は、単独の薬剤でも、腫瘍がないままである処置された動物の40%で感受性が高いヒト肺癌移植の退行を引き起こす事ができる(P e t e r s e n ら、2 0 0 7 )。

## 【0616】

C 6 . サイトカイン

サイトカインおよびケモカインの特定の例は、本発明のV E G F R 2 - プロッキング，

10

20

30

40

50

ヒト抗 V E G F 抗体に結合するものである。広範囲のサイトカインが使用されてもよく、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 11、IL - 13、TGF - 、M - CSF、G - CSF、TNF - 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、IFN - 、およびIFN - が含まれる。より好適なサイトカインとしては、IL - 1、IL - 1 、IL - 2、IL - 6、IL - 10、GM - CSF、IFN - 、単球走化性タンパク質 - 1 (MCP - 1 )、血小板由来増殖因子 - BB (PDGF - BB) およびC反応性蛋白 (CRP) 等が挙げられる。特に好適な例としては、TNF - 、TNF インデュサー、IL - 2、IL - 12、LIFN - 、IFN - 、LIFN - およびLECが挙げられる。

## 【0617】

10

IL - 12は、例えば、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に結合されてもよく、宿主防御に変更されて、腫瘍の血管に攻撃するものであってもよい。ケモカイン LEC (NCC - 4、HCC - 4、またはLMCとして知られている肝臓発現性のケモカイン) も好ましい成分である (Giavarelliら、2000)。LECは樹状細胞、单核白血球、T細胞、NK細胞、好中球に走化性があり、そのため、宿主を介在した抗腫瘍応答を改善することができる。

## 【0618】

20

## C7. 生物学的に機能性を有する等価物

本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の等価物、あるいは改善物ですら、今や作製することができる。修飾や変化をこのような抗体の構造中に生じさせて、同様のまたは所望の特性を有する分子を得られる。例えば、特定のアミノ酸は、相互作用的な結合能の相当の欠損なく、タンパク質構造中にその他のアミノ酸に置換されうる。これらの考察は、毒物、抗血管新生剤、アポトーシス誘導剤、凝固剤等にも適用するものである。

## 【0619】

30

タンパク質の生物学的機能活性を規定するのはタンパク質の相互作用能および性状であるから、特定のアミノ酸配列の置換を、タンパク質配列（または、もちろん、その基となるDNA配列）に生じさせ、それでもなお、同様の（アゴニスト性の）特性を有するタンパク質を得ることができる。このように、種々の変化を、生物学的利用性または活性の相当な欠失することなく、抗体または治療薬剤の配列（あるいはその基となるDNA配列）に生じさせてもよい。基となるDNA配列に変異を導入することから作製される生物学的機能上の等価物は、本明細書の表Aで提供されるコドン情報、および部位特異的変異についての裏付けとなる技術的説明を用いて作製することができる。

## 【0620】

40

当業者には、「生物学的に機能性を有する等価な」タンパク質またはペプチドにおける固有の定義は、分子の所定部分内において生じ、かつ結果として、等価な生物学的活性の許容できるレベルを有する分子になる変化の数には限りがあるという概念である、ということが十分に理解されている。生物学的に機能性を有する等価なタンパク質およびペプチドは、特定の、それもほとんどまたは全てではない、アミノ酸が置換され得るタンパク質およびペプチドとして、本明細書にて定義される。もちろん、異なる置換を有する複数の異なるタンパク質 / ペプチドは本発明に準拠して容易に作製されて使用され得るものである。このような「生物学的に機能性を有する等価な」ペプチドは、本明細書に記載されたように、「実質的に相同な」配列の例とみなされ得る。

## 【0621】

50

アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖の置換基の相対的な類似性に、例えば、疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づく。アミノ酸側鎖の置換基の大きさ、形状および種類の分析によって、アルギニン、リジン、およびヒスチジンは、全て正に帯電した残基であること；アラニン、グリシン、およびセリンは全て類似したサイズであること；フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは全て、概して類似した形状を有していることが明らかにしている。それゆえに、これらの考察に基づいて、アルギニン、リジンおよび

ヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、生物学的に機能性を有する等価物として、本明細書にて提示される。

#### 【0622】

より等価な変化を生じさせる際には、アミノ酸のハイドロパシー値が考慮されてもよい。各アミノ酸は、疎水性および電荷特性に基づいた、ハイドロパシー値を与えられ、これらは、イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

10

#### 【0623】

タンパク質における相互作用的な生物学的機能を付与するにあたっての、ハイドロパシー-アミノ酸値の重要性は、一般的に本技術分野において理解されている(KytleおよびDoolittle, 1982, 参照により本明細書に援用される)。特定のアミノ酸は、類似したハイドロパシー値またはスコアを有するアミノ酸と置換されてもよく、依然、生物学的活性を保持することが知られている。ハイドロパシー値に基づいて変化を生じさせるあたっては、ハイドロパシー値が±2以下であるアミノ酸の置換が好まし、±1以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であるものが、更に一層、特に好ましい。

20

#### 【0624】

したがって、上記アミノ酸は類似の親水性値を有する別のものに置換され、生物学的に等価なタンパク質を得ることができることが理解される。米国特許第4,554,101号(参照により本明細書に援用される)に詳述されたように、以下の親水性値は、アミノ酸残基に与えられているものである:アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。

30

#### 【0625】

親水性値に基づく変化を生じさせるにあたっては、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、±0.5以内であるものが、更に一層、特に好ましい。

#### 【0626】

##### C8. 融合タンパク質および組換え発現

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体は、分子生物学的技術を用いて、容易に融合タンパク質として調製され得る。どの融合タンパク質も、本明細書に開示された治療薬および本技術分野で知られている治療薬の何れかを使用しながら、設計および作製してよい。融合タンパク質技術は、容易に適用できて、2つの部分が選択的に開裂可能なペプチド配列によって連結されている融合タンパク質を調製できる。いかなる治療薬も、抗体の末端またはCDRとは異なる部位にて付着しうる。治療薬は「一体的に」調製されてもよく、該治療薬は、好ましくは選択的に開裂可能なペプチドで結合され、指向到達後にこの治療薬が放出されるようにする。

40

#### 【0627】

このような目的を達成するための組換えDNA技術の使用は、今や、当業者には標準的な操作である。これらの方法としては、例えば、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術およびインビボでの組換え／遺伝子組み換えが挙げられる。DNAおよびRNA合成は自動合成機を用いて、追加的に、実施してもよい(例えば、Sambrookら、19

50

8 9 に記載の技術的記載を参照、参照により本明細書に援用される)。

【 0 6 2 8 】

このような融合タンパク質の調製には、一般的に、領域をコードする第1のDNAおよび第2のDNAの調製、フレーム内での、このような領域の機能的ライゲーションまたは連結を含み、所望の融合タンパク質をコードする単一のコーディング領域を調製する。本文脈において、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体のDNA配列は、フレーム内で、治療薬をコードするDNA配列と結合させられる。この構造物の部分が、N末端領域またはC末端領域の何れとして調製されるのかは特に関連ないと、一般的には考えられている。

【 0 6 2 9 】

所望のコーディング領域が調製されると、発現ベクターが構築される。発現ベクターは、DNAの転写を促進し、それによりコードされた組換えタンパク質の発現を促進するために作用する、1以上のプロモータを挿入したDNA領域の上流に含む。これが「組換え発現」の意味である。

【 0 6 3 0 】

本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体またはその免疫抱合体のいわゆる「組換え」体を得るために、該組換え体は組換え細胞内で発現する。原核生物または真核生物の系における発現のためのDNAセグメントの取り扱いは、組換え発現における技術を有する者に一般に知られている技術によって実施されうる。VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体構造物の発現において、実際は、どんな発現系が用いられてもよいと考えられる。

【 0 6 3 1 】

このようなタンパク質は問題なく、真核生物発現系で、例えばCHO細胞で発現され得るが、E.coli pQE-60のような細菌発現系は、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体の大量の調製およびそれに続く精製に特に便利である。cDNAも細菌系で発現され、-ガラクトシダーゼ、ユビキチン、Schistosoma japonicumグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等との融合として、コード化されたタンパク質が発現されてもよい。使用の容易さおよび得られる物質量の点からは、細菌による発現は真核生物による発現よりも有利であると考えられている。

【 0 6 3 2 】

微生物による発現に関しては、米国特許第5,583,013号；第5,221,619号；第4,785,420号；第4,704,362号；および第4,366,246号は、組換え宿主細胞における遺伝子発現に関する本明細書の開示を補足すること目的として、参照により本明細書に援用される。

【 0 6 3 3 】

組換えて產生されたVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体免疫抱合体は、精製されてヒト投与のために処方されてもよい。代わりに、免疫抱合体をコードする核酸が遺伝子治療を介して送達されてもよい。裸の組換えDNAまたはプラスミドを使用してもよいが、リポソームまたはベクターの使用が好ましい。エンドサイトーシスを介した受容体により細胞に侵入し、宿主細胞のゲノムと一体化して安定的かつ効率的にウイルス遺伝子を発現する特定のウイルスの能力により、そのようなウイルスは、外来遺伝子を哺乳類細胞に導入する有望な候補となった。本発明における使用のための好ましい遺伝子治療ベクターは、一般的にウイルスベクターである。

【 0 6 3 4 】

レトロウイルスは、宿主ゲノム内に自己の遺伝子を一体化する能力の点で、遺伝子送達ベクターとして信頼性を維持しており、大量の外来遺伝子物質を移送し、種および細胞のタイプにおける幅広いスペクトルで感染し、特定の株化細胞内では封入化される。アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)および米国特許第5,139,941号(参照により本明細書に援用される)に記載されたアデノ隨伴ウイルス(AAV)のような、他のウイルスも遺伝子移送のためのベクターとし

10

20

30

40

50

て供される様に取り扱ってもよい。

【0635】

外来遺伝子物質を受け入れ得る一部のウイルスは、適合できるヌクレオチド数およびウイルスが感染する細胞の種類に制限があるが、これらのウイルスはうまく遺伝子発現をすることが実証されている。しかしながら、アデノウイルスは、自身の遺伝子物質を宿主ゲノムに一体化せず、それゆえに、遺伝子発現のために宿主の複製を必要としていないので、急速かつ効率的な異種遺伝子の発現に理想的に適するものとなっている。複製欠損の感染性ウイルスを調製するための技術は本技術分野ではよく知られている。

【0636】

更に特定の実施態様においては、遺伝子治療用ベクターはHSVとされる。HSVが有望なベクターである要因は、サイズおよびゲノムへの融合にある。HSVは大きいので、複数の遺伝子または発現力セットの組込みが、他のより小さなウイルスよりは問題となることが少ない。さらに、様々な特性（例えば、一時的でかつ強い）を有する異なるウイルス制御配列が利用可能であることで、他の系よりもより大きい程度で発現を制御することができる。ウイルスは相対的にスプライシングされた情報内容はほとんどなく、遺伝子操作を容易なものとすることも有利である。HSVも相対的に操作しやすく、高い力値で増殖することができる。

10

【0637】

もちろん、ウイルス送達系を使用する場合、そのベクター構造物を受けた細胞、動物、個人に有害な反応を引き起こさないようにするために、ウイルス粒子を十分に精製して、本質的に、不完全干渉ウイルス粒子またはエンドトキシン、発熱原のような望まれない混合物を含まないようにすることが望まれることとなる。ベクターを精製する好ましい手段は、塩化セシウム勾配遠心のような浮遊密度勾配の使用に関するものである。

20

【0638】

C 9 . 抗体接合体

VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、抗細胞薬または細胞毒性約に接合して、「抗毒素」を調製したり細胞凝固作用を直接的または間接的に促進する構成成分に動作可能に結合させて、「凝固リガンド」を形成したりしてもよい。凝固リガンドにおいては、上記抗体は、直接的なまたは間接的な凝固因子に、直接連結されていてもよいし、直接的なまたは間接的な凝固因子を結びつけて放出する第2の結合領域に連結されてもよい。「第2の結合領域」の方法では、一般的に、凝固剤結合抗体が第2の結合領域として使用され、結果として、二重特異性抗体構造物となる。二重特異性抗体の調製および使用は、一般的に、本技術分野においてはよく知られているもので、本明細書にて更に開示されるものである。

30

【0639】

抗毒素、凝固リガンドおよび二重特異性抗体の調製においては、組換え発現を用いてよい。選択された抗体をコードする核酸配列は、フレーム内において、選択された毒素、凝固剤、第2の結合領域のコードする核酸配列に付加して、発現単位すなわちベクターを創出する。組換え発現は、結果として、新規の核酸の翻訳に至り、所望のタンパク質生成物を生み出すことになる。タンパク質結合リガンドよりはむしろ、抗体をコードする核酸が採用されるものの、組換え法は、上述に記載されたものと本質的には同じである。

40

【0640】

接合技術に再度戻ってみると、抗毒素の調製は一般的に本技術分野においてはよく知られているものである。しかしながら、特定の利点が、特定の好適技術の適用を通じて、抗毒素の調製とその後の臨床的投与のためのその精製との両方において、達成され得る。例えば、IgGに基づく抗毒素は、Fab'の対応部分よりも、典型的には、より良好な結合能およびより遅い血中クリアランスを示すものの、Fab'フラグメントに基づく抗毒素は、一般的に、IgGに基づく抗毒素に比べて、より良好な組織透過能を示す。

【0641】

更には、毒素構成部分をVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体に接合する

50

ために問題なく用いられ得る、無数のジスルフィド結合含有リンカーの種類が、知られているが、あるリンカーは、異なる薬学的特性および薬学的能力に基づくと、一般的に、他のリンカーに対して好適なものである。例えば、立体的に、「妨害する」ジスルフィド結合を有するリンカーは、インビボでのより高い安定性および、作用部位での結合に先立つて毒性の構成部分の放出を阻止することのため、好ましいものである。

#### 【0642】

V E G F R 2 - プロッキング、ヒト抗V E G F 抗体に接合されてもよい、植物、真菌およびバクテリア由来の毒素を含めた、例えばリシンA鎖または脱グリコシル化A鎖のような、幅広い細胞毒性薬が知られている。A鎖毒素の架橋化は、特定の場合においては、ジスルフィド結合を示す架橋剤を必要とする。この点についての理由は不明であるが、薬剤が標的細胞に毒素を「送達」すると、抗体が容易に放出することができるため、特定の毒素構造部分が必要としているためであると思われる。10

#### 【0643】

架橋剤の各種類は、どのように架橋化が実施されるかと同時に、得られる接合体の薬物動態を変化させやすい。究極には、放出可能な毒物が考慮される場合、意図された作用部位を除いて、体内のどの部位でも見られる条件下ではインタクトのままであるが、作用部位においては、該接合体が良好な「放出」特性を有することが望ましい。それゆえに、特に、使用される特定の架橋試薬および架橋された構造を含め、特定の架橋のスキームが部分的に重要になる。20

.

融合タンパク質の一部分として使用される特定の毒素化合物によるが、抗体と毒素化合物とを操作的に付着させる、ジスルフィド結合化したループ構造をフォールディングすることが可能なペプチド・スペーサを提供する必要があり得る。該ループ内におけるタンパク質分解性の開裂は、ヘテロ二量体型ポリペプチドを生み出すものであって、この抗体および毒素化合物は、単一のジスルフィド結合のみで連結される。このような毒素の例は、リシンA鎖毒素である。20

#### 【0644】

特定のその他の毒素化合物が利用される場合、V E G F R 2 - プロッキング、ヒト抗V E G F 抗体と融合タンパク質の毒素化合物とを動作可能に付着させるために、非開裂性のペプチド・スペーサが提供されてもよい。非開裂性のペプチド・スペーサに関して使用されてもよい毒素は、それ自身が、タンパク質分解性の開裂によって、細胞毒性があるジスルフィド結合化した形態に変更され得るものである。このような毒素の例は、シュードモナスエクソトキシン化合物である。30

#### 【0645】

標的抗原が投与経路によって内在化しないような、毒性物質による効率的な毒性化に整合性がある状況があり得るが、この場合、抗腫瘍薬剤、サイトカイン、代謝拮抗薬、アルキル化剤、ホルモン等のような化学治療用薬剤を標的化することが望まれよう。多様な化学療法剤やそのほかの薬理学的な薬剤は、問題なく、抗体に接合され、薬理学的に機能することが示されている。

#### 【0646】

検討されている典型的な抗悪性腫瘍性薬剤としては、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンプラスチンおよびその他のものが挙げられる。さらには、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモンおよびアマニチンのようなその他の薬剤の付着も記載される。40

#### 【0647】

凝固因子が本発明に関連して使用される場合、抗体への共有結合的ないかなる連結も、機能的な凝集部位とは異なる部位にて作製されるべきである。この成分は、各領域が、著しい不具合がなく、意図された機能を発揮することができるようにする、任意の操作様式において「連結」される。このため、該抗体はV E G F に結合し、凝固因子が血液凝固を促進する。50

【 0 6 4 8 】

C 1 0 . 生化学的架橋剤

上記にて提供された一般的な情報に加えて、 V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、特定の好ましい生化学的架橋剤を用いて、 1 つ以上の治療薬剤に接合されてもよい。架橋試薬は、 2 つの異なる分子の官能基を繋ぎ合せる分子ブリッジを形成するために使用される。ステップワイズ方式で 2 つの異なるタンパク質を連結するためには、望まれないホモポリマーの形成を除去するヘテロ二官能性架橋剤が使用され得る。典型的なヘテロ二官能性架橋剤は、表 B を参照されたい。

【 0 6 4 9 】

## 【表B】

TABLE B

ヘテロ二官能性架橋剤

リンカー	反応性の対象	利点および応用	架橋後のスペーサーアームの長さ
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	比較的高い安定性	11.2 Å
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	チオール化 開裂可能な架橋	6.8 Å
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	長いスペーサーアーム	15.6 Å
スルホ-LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	長いスペーサーアーム 水溶性	15.6 Å
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定的なマレイミド反応性基 酵素-抗体抱合体 ハプテン-キャリアタンパク質抱合体	11.6 Å
スルホ-SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定的なマレイミド反応性基 水溶性 酵素-抗体抱合体	11.6 Å
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	酵素抗体抱合体 ハプテン-キャリアタンパク質抱合体	9.9 Å
スルホ-MBS	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	9.9 Å
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	酵素-抗体抱合体	10.6 Å
スルホ-SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	10.6 Å
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	長いスペーサーアーム 酵素-抗体抱合体	14.5 Å
スルホ-SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	長いスペーサーアーム 水溶性	14.5 Å
EDC/スルホ-NHS	第一級アミン カルボキシル基	ハプテン-キャリア抱合体	0
ABH	炭化水素 非選択的	糖基と反応	11.9 Å

10

20

30

40

50

## 【0650】

ヘテロ二官能性架橋剤は、2つの反応性基：1つは、一般的に第一級アミン基と反応する基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）、およびもう1つは、一般的にチオール基と反応する基（例えば、ピリミジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲン等）を含む。

、上記架橋剤は、第一級アミン反応性基を介してタンパク質（例えば、選択された抗体またはフラグメント）のリジン残基（残基群）と反応し、チオール反応性基を介して、上記架橋剤は、既に上記タンパク質に繋ぎ合わされたものであるが、別のタンパク質（例えば、凝固剤）のシステイン残基（遊離スルヒドリル基）と反応する。

#### 【0651】

ゆえに、この成分は一般的に、架橋目的で利用される官能基を有するか、あるいは誘導体化して有するものである。この要件は、幅広い基が同様にして使用され得る点で、限定的なものと考慮されない。例えば、第一級または第二級アミン基、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシアルコール基、リン酸基もしくはアルキル化基も、結合または架橋のために使用されてもよい。

10

#### 【0652】

架橋剤における2つの反応性基の間のスペーサームは、様々な長さおよび化学的組成を有してもよい。長いスペーサームは、接合体構成成分のよりよい柔軟性を可能にし、ブリッジにおける一部の特定の構成成分（ベンゼン基）は、追加的な安定性を反応性基、あるいは化学結合の、様々な態様における作用に対する向上された耐性を与える。ペプチド・スペーサ、例えばL-L e u - L - A l a - L - L e u - L - A l aの使用も考慮されるものである。

#### 【0653】

血中における適度の安定性を有する架橋剤を用いることも好ましい。抗体および毒素または凝固剤に接合するのに問題なく使用され得る、ジスルフィド結合を含む無数の種類のリンカーが知られている。立体的に妨害するジスルフィド結合を含むリンカーは、インビボでのより高い安定性と、作用部位での結合に先立っての、該薬剤の放出を防止することを与えることを示すものである。なお、これらのリンカーは、結合剤の1つの好適な群である。

20

#### 【0654】

抗毒素における使用のための最も好適な架橋試薬の1つは、S M P Tであり、これは、近接するベンゼン環およびメチル基によって「立体的に込み合った」ジスルフィド結合を含む二官能性の架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、チオールアミン、例えば組織および血液中に存在し得るグルタチオンによる攻撃から上記結合を保護する機能を供するもので、その結果、腫瘍部位に付加された薬剤の送達に先立った接合体のデカップリングを棒するのに役立っていることが考えられている。S M P T薬剤は、本発明の二重特異性リガンドに関連して、使用されてもよいことが考慮される。

30

#### 【0655】

S M P T架橋試薬は、その他の多くの公知の架橋試薬でもあるように、官能基を、例えば、システインのS Hまたは第一級アミン（例えば、リジンのイプシロンアミノ基）を架橋する能力に役立つ。その他の可能な架橋剤の種類としては、開裂可能なジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性の光反応性フェニルアザイド、例えば、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリシルアミノ)エチル-1,3'-ジチオプロピオナートが挙げられる。N-ヒドロキシル-スクシンイミジル基は、第一級アミノ基と反応し、フェニルアザイド（光分解において）は、非選択的にいかなるアミノ酸残基とも反応する。

40

#### 【0656】

込み合った架橋剤に加えて、込み合っていない[non-hindered]リンカーも、本明細書に従って使用され得る。保護されたジスルフィドを含むことまたは生成することが想定されない、その他の有用な架橋剤としては、S A T A、S P D Pおよび2-イミノチオランが挙げられる。このような架橋剤の使用は、本技術分野においてはよく理解されているものである。

#### 【0657】

一旦、接合されれば、接合体は、接合していない標的化された治療薬やその他の混入物から分離される。非常に多くの精製技術が、臨床的使用を可能にするために十分な精製程度の接合体を提供する際の使用に利用される。サイズ排除に基づく精製方法、例えば、

50

ゲル濾過、ゲルパーミエーション、高性能液体クロマトグラフィーが一般的に最も有用である。その他のクロマトグラフィー技術、例えばブルーセファロース分離法も使用されてよい。

#### 【0658】

##### C 11. 生物学的に放出可能なリンカー

構成部分のどのような架橋化も、血中において相応の安定性を有し、特定の態様においては、疾患部位または腫瘍部位を標的として到達する前に、付加された薬剤の実質的な放出を防止することは好適なものであるが、生物学的に放出可能な結合および／または選択的に開裂可能なスペーサまたはリンカーも考慮される。「生物学的に放出可能な結合」および「選択的に開裂可能なスペーサまたはリンカー」は、循環中においては依然相応の安定性を有するものである。10

#### 【0659】

本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、生物学的に放出可能な結合を介して、1以上の治療薬に結合されていてもよい。特定の態様においては、ScFv断片が好適であるが、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体のいかなる形態も、インタクトな抗体を含めて、使用されてもよい。

#### 【0660】

「生物学的に放出可能な結合」または「選択的に加水分解可能な結合」は、特定の条件下だけで、あるいはそこで優先的に、放出可能、開裂可能または加水分解可能である、結合全てを含むものである。これには、それぞれ参照により本明細書に特に援用される米国特許第5,474,765号および第5,762,918号に記載されているような、ジスルフィド結合およびビススルフィド結合や、酸に不安定な結合が含まれる。20

#### 【0661】

本発明の抗体への治療薬または薬剤の付加のための酸感受性スペーサーの使用が特に考慮されるものである。このような実施態様において、治療薬または薬剤は、細胞内部の酸性のコンパートメント内で放出される。酸感受性の放出は細胞外において、しかし特定の標的化された後、好ましくは腫瘍部位にて、生じ得ることが考慮される。特定の目下好ましい例としては、酸感受性スペーサを介してコルヒチンまたはドキソルビシンに連結されたヒト抗体が挙げられる。上記抗体の炭水化物構造を介した付着も考慮される。このような実施態様においては、治療薬または薬剤は、細胞内部の酸性のコンパートメント内で放出される。30

#### 【0662】

ヒト抗VEGF抗体は、誘導体化され、生物学的に放出可能な結合を介して治療薬の付着を許容する官能基が導入されていてもよい。該ヒト抗体は、誘導体化されて、ヒドラジド、ヒドラジン、第一級アミンまたは第二級アミン基を末端とした側鎖が導入されていてもよい。治療薬は、シップ塩基結合、ヒドラゾンまたはアシリヒドラゾン結合またはヒドラジドリンカーを介して接合されてもよい(米国特許第5,474,765号および第5,762,918号、それぞれ参照により本明細書に特に援用される)。

#### 【0663】

また、それぞれ参照により本明細書に特に援用される米国特許第5,474,765号および第5,762,918号に記載されているように、ヒト抗VEGF抗体は、ペプチド結合、エステル、アミド、リン酸ジエステルおよびグリコシドを含む酵素感受性結合である1以上の生物学的に放出可能な結合を介して、治療薬に動作可能に付着していてよい。40

#### 【0664】

本発明の好適な態様は、疾病部位内、特に腫瘍環境内に優先的に局在化するペプチダーゼおよび／またはプロテイナーゼに対する第1の開裂部位を少なくとも含むペプチドリンカーの使用に関するものである。付着した治療薬の抗体介在型の送達は、疾病部位内または腫瘍環境内で特異的に開裂を生じさせ、結果として、活性薬剤の特異的な放出に至るものである。あるペプチドリンカーは、リモデリングに関与する1以上の酵素によって認識50

される開裂部位を含むこととなる。

【0665】

ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノーゲン、TGF、スタフィロキナーゼ、トロンビン、因子IXa、因子Xa、または間質性のコラゲナーゼ、ゼラチナーゼもしくはストロメリシンのようなメタロプロテアーゼに対する開裂部位を含むペプチドリンカーが特に好ましい。米国特許第6,004,555号、第5,877,289号、および第6,093,399号は、生物学的に放出可能な結合および選択的に開裂可能なリンカーまたはペプチドを含む標的化薬剤・治療薬の作製および使用方法をさらに説明および可能にする目的で参考により本明細書に特に援用される。米国特許第5,877,289号および第6,342,221号は、特に、腫瘍環境内において、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子または間質性のコラゲナーゼ、ゼラチナーゼもしくはストロメリシンのようなメタロプロテイナーゼによって、選択的に開裂可能なペプチドリンカーを含む抗体構造物の作製および使用方法を更に説明および可能にする目的で参考により本明細書に特に援用される。

10

【0666】

目下好ましい、選択的に開裂可能なペプチドリンカーとしては、プラスミンまたは、間質性のコラゲナーゼ、ゼラチナーゼもしくはストロメリシンのようなメタロプロテイナーゼ（「マトリックスメタロプロテイナーゼ」または「MMP」としても知られている。）が挙げられる。本発明に関連して有利に使用され得る更なるペプチドリンカーとしては、例えば、プロウロキナーゼ、TGF、プラスミノーゲン、スタフィロキナーゼ、ゼラチナーゼA、各種コラーゲン、 $\alpha_2$ M、PZP、 $\alpha_1$ M、 $\alpha_1$ I<sub>3</sub>(2J)および $\alpha_1$ I<sub>3</sub>(27J)からの開裂可能な配列であり、さらに、参考により本明細書に特に援用される米国特許第6,342,221に開示およびその請求項に記載された、これらの特定の配列も含まれる。

20

【0667】

C 12 . 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、凝固リガンドおよび組み合わされた抗血管形成性の態様において特に有用である。しかしながら、1つのアームがVEGFに結合するかぎり、一般的な二重特異性抗体を用いてもよく、その二重特異性抗体は、一般的に抗原結合部位とは異なる部位で、治療薬に付着する。

30

【0668】

一般的には、二重特異性抗体の調製は、本技術分野においてはよく知られている。ある方法は、標的抗原に特異性を有する抗体と、別の方法における凝固剤（本明細書のように）との別個の調製に関する。ペプシン消化のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、2つの選択された抗体から調製され、次いで、それぞれの還元を経て、別個のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを提供する。カップリングされる2つのパートナーのうち1つのSH基は、架橋試薬で、例えば、o-フェニレンジマレイミドでアルキル化されて、1つのパートナー上に遊離マレイミド基を提供する。このパートナーは、もう一方に、チオエーテル連結によって接合され、所望のF(ab')<sub>2</sub>ヘテロ接合を与える。その他の技術は、SPDまたはプロテインAとの架橋が実行されたり、あるいは三重特異性構造物が調製されたりものが知られている。

40

【0669】

D . 医薬組成物

本発明に係る医薬組成物は、一般的に、薬学的に許容し得る担体または水系媒体中に溶解または分散された、有効量の少なくとも1つのVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体を含む。

【0670】

複合治療も考慮され、上記と同じ種類の基となる医薬組成物は、単独医薬または複合医薬に用いられてもよい。

【0671】

50

「薬理学的にまたは薬学的に許容し得る」との文言は、適切に動物またはヒトに投与されたときに、有害な、アレルギー性の、またはその他の有害な反応を引き起こすことのない分子の構造または組成を指す。獣医学的使用も同じように本発明の範囲に含まれ、「薬学的に許容し得る」製剤は、臨床的および／または獣医学的な使用のための製剤を含む。

#### 【0672】

ここで使用されるように、「薬学的に許容し得る担体」は、任意のおよび全ての、溶媒、分散媒、被覆材、抗菌剤、抗真菌薬、等張化剤、吸収遅延化剤等を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、本技術分野でよく知られている。従来の媒体または薬剤が活性成分と不適合である場合を除いて、治療組成物におけるこれらの使用が考慮される。ヒトへの投与のためには、調製剤は、滅菌性、発熱性、一般的な安全性およびF D A事務局の生物学的基準によって要求される純度基準を満たすべきである。補助的な活性成分を上記組成物に取り込ませることも可能である。

10

#### 【0673】

「単位投与」製剤は、特定の時間規定がなされた送達に適合した投与される成分の投与量または副用量[sub-dose]を含む製剤である。例えば、典型的な「単位投与」製剤は、1日当たりの投与量もしくは単位または1日当たりの副用量、あるいは、1週間当たりの投与量もしくは単位または1週間当たりの副用量等を含む製剤である。

20

#### 【0674】

##### D 1 . 注射製剤

本願発明のV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体または免疫抱合体は、腫瘍部位または疾患部位に蠕動投与および直接的な滴下（腔内投与）を含めた、非経口投与のために、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮またはその他の経路を介しての注入のために処方される。

30

#### 【0675】

このような抗体または免疫抱合体を活性成分として含む水性組成物の調製は、本開示に照らし合わせれば、当業者にとって公知のものである。一般的に、このような組成物は、液体溶液または懸濁液の何れかのような注射物質として調製され得たり、注入に先立つての添加の際の液体溶液または懸濁液を調製するために使用される固体形態として調製され得たりして、さらに、これらの調製物はエマルジョン化され得る。

#### 【0676】

注射としての使用のために適當な薬学的形態としては、滅菌された水溶性溶液または水溶性分散体；胡麻油、ピーナッツオイルまたは水溶性のプロピレングリコールを含む製剤；および滅菌された注射可能な溶液または分散体の即時的な調製のための滅菌粉体が挙げられる。全ての場合において、この形態は滅菌され、注入可能性が存在する程度に流動性があるべきである。また、上記形態は、製造および保存の条件下では安定であるべきで、細菌または真菌のような微生物の汚染活性に対しても保存性を有するべきである。

40

#### 【0677】

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体または免疫抱合体組成物は、中性または塩の形態で、滅菌された水性組成物に調製され得る。遊離塩基または薬学的に許容し得る塩としての溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水中において調製され得る。ここで、薬学的に許容し得る塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成される。）、例えば塩酸またはリン酸のような無機酸、もしくは、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸で形成される塩が挙げられる。遊離カルボキシ基で形成される塩も、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等のような有機酸に由来するものである。

#### 【0678】

好適な担体としては、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロース、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコール）、これらの適当な混合液、およ

50

び植物油が挙げれら、多くの場合は、担体は、例えば、砂糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。例えば、レシチンのような被覆の使用や、分散体の場合においては粒子の維持、および／または界面活性剤の使用によって、適した流動性を維持することができる。

#### 【0679】

保存および使用の通常の条件下では、このような調製物全てには、微生物の増殖を防止するために保存剤が含まれるべきである。微生物における作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌薬によって、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール等によって達成される。注射可能な組成物の持続的吸収は、該組成物中ににおいて吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によって達成され得る。

10

#### 【0680】

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体は、処方に先立つて、またはその際にあいて、十分に透析して、望まない低分子量分子を除去したり、および／または、所望の賦形剤中により容易な製剤化のために凍結乾燥がなされるべきである。滅菌された注射溶液は、上記にて列挙された種々の他の成分とともに、適切な溶媒中において必要な量で適切な溶媒活性物質を含んで、望ましくは、次いでフィルター滅菌されて調製される。一般的に、分散体は、基本的な分散媒体および求められる上記にて列挙された他の成分を含む滅菌された賦形剤中にて種々の滅菌された活性成分を含めて調製される。

20

#### 【0681】

滅菌された注射溶液の調製のための滅菌粉体の場合においては、好ましい調製法は、活性成分の粉体を、さらには予め滅菌フィルターで処理済みの上記溶液からの追加された望ましい成分の粉体を生じさせる真空乾燥および凍結乾燥の技術である。

#### 【0682】

本発明に基づいた好適な医薬組成物は、一般的に、意図された使用に応じて、終濃度の範囲を与えるように、許容可能な薬学的な希釈剤または賦形剤と混合された V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体の適切な量を含む。調製技術は、本明細書で参考として含まれる「Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 編 . Mack Publishing Company, 1980」にて例示されるような、一般的に本技術分野において知られているものである。当然のことながら、エンドトキシンの汚染は、安全な基準値に、例えば、0.5 ng / mg タンパク質未満で最小限に維持される。さらには、ヒト投与のためには、上記調製物は、FDA 事務局の生物学的基準により要求されるような、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度基準を満たすべきである。製剤においては、上記抗体または免疫抱合体の溶液は、投与製剤に適合する手法および治療上効果的である量で投与される。

30

#### 【0683】

##### D 2 . 徐放性製剤

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体の溶液の製剤は、容易に、多様な投与形態で投与される。上述したような注射溶液のみならず、薬学的に許容し得る態様が、例えば錠剤、丸薬、カプセルまたはその他の経口投与のための固形物、坐薬、ペッサリー、点鼻液またはスプレー、エアロゾル、吸入抗原、局所製剤、リポソーム形状等が考慮される。投与の態様の種類は、治療される疾病または疾患に対応したものとなる。

40

#### 【0684】

薬学的に「徐放性」のカプセルまたは「持続放出性」の組成物もしくは調製物が使用されてもよく、これらは一般的に適用可能である。徐放性製剤は、一般的に拡張された時期に亘って一定の薬剤水準をもたらすよう設計されたものであり、本発明に準拠した V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体の送達に使用されてもよい。徐放性製剤は典型的には、疾病部位の近傍、例えば腫瘍部位に注入される。

50

## 【0685】

持続放出性調製物の適當な例としては、上記抗体または免疫抱合体を含む固体の疎水性ポリマー半透過性マトリックが挙げられ、このマトリックスは、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルといった、成形品の態様である。持続性マトリックスの例としては、ポリエステル；ハイドロゲル、例えばポリ(2-ヒドロキシメチルメタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)；ポリ乳酸、例えば、米国特許第3,773,919号；L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミンとのコポリマー；Lupron Depot<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマーから構成された注射可能な微小球と酢酸ロイプロリド)のような分解性乳酸-グルコン酸コポリマー；およびポリ-D-(−)-3-ヒドロキシブチル酸が挙げられる。

10

## 【0686】

エチレン-ビニルアセテートや乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日間に亘って分子を放出できる一方、特定のハイドロゲルはより短時間でタンパク質を放出する。カプセル化された抗体が長期間に亘って体内に保持される場合、抗体は、37度湿度状態での曝露の結果として変性または凝集して、生物学的活性を低下させたり、および/または、免疫原性を変化させたりしまうかもしれない。関連する機構に基づいた安定化するため、合理的な戦略が利用される。例えば、凝集機構が、チオ-ジスルフィド交換を介した分子内のS-S結合の形成に関連する場合、スルフヒドリル残基の改変、酸溶液からの凍結乾燥、湿度分の制御、適切な添加剤の使用、特定のポリマーマトリックス組成物の開発等で、この安定化が達成される。

20

## 【0687】

## D3. リポソームおよびナノ粒子

特定の態様においては、リポソームおよび/またはナノ粒子は、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体とともに用いられてもよい。リポソームの形成および使用は、以下に要約するように、当業者には一般的に知られている。

## 【0688】

リポソームは、水系媒体に分散され、自発的に多重膜性で同心円状の二重層小胞(多重膜小胞MLV)とも称される。)を形成するリン脂質から形成される。MLVは一般的に25nmから4μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、結果として、200から500に及ぶ直径を有し、コアに水性溶液を含む、小さな単層膜の小胞(SUV)を形成することになる。

30

## 【0689】

リン脂質は、水中に分散されるた場合、脂質と水とのモル比率に依存して、リポソーム以外の様々な構造物を形成し得る。低い比率では、リポソームは好ましい構造である。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度、および2価カチオンの存在に依存する。リポソームは、イオン性物質および極性物質に対しては低い透過性を示すが、上昇された温度においては、顕著に透過性が変化する相転移を経る。この相転移は、ゲル状態として知られている密に充填された秩序構造から、流動状態として知られている緩く充填された低秩序構造への変化に関与する。このことは、特徴的な相転移温度において生じ、結果として、イオン、糖類および薬剤に対する透過性を上昇させることになる。

40

## 【0690】

リポソームは、4つの異なる機構によって細胞と相互作用する：マクロファージマクロファージや好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水性または・親水性もしくは静電気的な力か、細胞表面の構成物との特異的な相互作用による、細胞表面への吸収；

細胞質へのリポソーム内容物の同時期の放出とともにプラズマ細胞の膜へのリポソームの脂質二重膜の挿入によるプラズマ細胞膜との融合；リポソーム内容物の付属を伴わない、細胞膜またはオルガネラ膜[subcellular membranes]へ、またはその逆へのリポソーム脂質の輸送。リポソーム製剤の改変は、1つ以上の機構が同時に作用することもあるが、どの機構が有効であるかで変更され得る。

50

## 【0691】

ナノカプセルは、一般的に、安定的かつ再現可能な方法にて、化合物を取り込むことができる。細胞内におけるポリマーの過負荷による副作用を避けるためには、上記の超微粒子（約0.1μmのサイズ）が設計されて、インビボで分解されることができるポリマーを使用するべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキル・シアノアクリレート製のナノ粒子は、本発明においての使用が考慮され、このような粒子は、容易に作製され得る。

## 【0692】

## D 4 . 点眼薬

血管由来の構造物を有する多くの疾病は目に関するものである。例えば、本発明にしたがって治療され得る角膜の血管形成に関連する疾病としては、限定されないが、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、角膜移植拒絶反応、血管新生性緑内症および後水晶体纖維増殖症、流行性角結膜炎、ビタミン欠乏症、コンタクトレンズの過剰装着、アトピー性角結膜炎、上輪部角結膜炎、乾燥性角結膜炎、シェーグレーン症候群、紅斑性座蒼、フィレクテヌローシス、梅毒、マイコバクテリウム感染症、脂質変性、化学火傷、バクテリア性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペス感染、帯状疱疹感染、原生動物感染、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン周辺角膜変性、辺縁潰瘍性角膜炎、外傷、リウマチ性関節炎、全身性紅班、結節性動脈周囲炎、ウェゲナーサルコイドーシス、強膜炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、放射状角膜切開術および角膜移植拒絶反応が挙げられる。

## 【0693】

本発明にしたがって治療され得る網膜／脈絡膜の血管形成に関連する疾病は、限定されないが、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、ページエット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性的ブドウ膜炎／硝子体炎、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟網膜症、イールス病、ベーチェット病、感染惹起性の網膜症または脈絡膜炎、推定眼ヒストプラスマ症候群、ベスト病、近眼、視窓、シュタルガルト病、扁平部炎、慢性的網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷およびポスト・レーザー合併症が挙げられる。

## 【0694】

本発明によって治療されることができる他の疾病としては、限定されないが、ルベオーシス（隅角における血管形成）に関連する疾患および、糖尿病に関連するもの、あるいはそうでないものを問わないで、増殖性硝子体網膜症全ての形態を含めた、線維血管または纖維組織の異常増殖によって引き起こされる疾病が挙げられる。

## 【0695】

本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および免疫抱合体は、有利に、単独の剤だけでもまたは他の目用の製剤または薬剤とともに硝子体内投与および／または前房内投与するためのものも含めた点眼液としての使用に適当な医薬組成物の調製において用いられてもよい。上述またはその他の疾病的何れの治療のためにも、本発明のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体組成物は、典型的な薬学的操作（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15編、1488～1501頁（Mack Publishing Co., Easton, PA）を参照）に準じて調製された点眼薬の形態における治療を必要としている対象の目に投与される。

## 【0696】

上記点眼薬、薬学的に許容し得る溶液、分散液または軟膏中に、約0.01～約1重量%、好ましくは約0.05～約0.5重量%の濃度で、少なくともVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を含む。濃度における幾つかの変更は、用いる特定の化合物、治療される対象の状態等によって、必然的に発生し、当該治療を担当する者であれば、個々の対象に最適な濃度を決定するであろう。上記点眼薬は、好ましくは、所望ならば追加成分、例えば、保存剤、緩衝剤、等張化剤、抗酸化剤、安定化剤、非イオン性の湿潤剤または洗浄剤、増粘剤等を含む滅菌された水溶液の形態であることが好ましいであろう。

10

20

30

40

50

## 【0697】

このような溶液に使用するための適当な保存剤としては、塩化ベンゼトニウム、クロロブタノール、チメロサール等が挙げられる。適当な緩衝剤は、約pH6とpH8との間、好ましくは約pH7とpH7.5との間のpHを維持する十分な量において、ホウ酸、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、酢酸ナトリウム、重リン酸ナトリウム等が含まれる。適当な等張化剤は、デキストラン40、デキストラン70、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、ポリエチレングリコール、塩化ナトリウム等であり、点眼液の塩化ナトリウム当量は、0.9±0.2%の範囲にあるようにする。

## 【0698】

適当な抗酸化剤および安定化剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ尿素等が挙げられる。適当な湿潤剤および洗浄剤としては、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリオキサマー282およびチロキサポールが挙げられる。適当な増粘剤としては、デキストラン40、デキストラン70、ゲラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ランドリン、メチルセルロース、ワセリン、ポリエチレングリコール、ポリビニアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース等が挙げられる。上記点眼薬は、典型的な方法、例えば、水滴の形態または点眼液中の洗眼によって、局所的に対象の目に投与される。

## 【0699】

D5. 局所製剤 20

最も広義の意味においては、局所投与のための製剤は、口(口腔)および皮膚を介した送達のためのものを含める。「局所送達系」とは、投与されるべき成分を含む経皮パッチを含む。皮膚を介した送達は、所望に応じて、イオン導入法または電気的輸送[electrotransport]によって、さらに達成され得る。

## 【0700】

口腔内における局所投与に適当な製剤としては、好ましい基材、通常はスクロース、アカシアゴムまたはトラガントゴム中に前記成分を含むトローチ剤；および、適当な液体担体において投与されるべき前記成分を含む洗口剤が挙げられる。

## 【0701】

皮膚への局所投与に適当な製剤としては、薬学的に許容し得る担体中に投与されべき成分を含む、軟膏、クリーム剤、ゲル剤およびペースト剤が挙げられる。クリーム剤、軟膏およびゲル剤におけるような、局所的使用のためのVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の製剤としては、当業者によく知られているような、油性または水溶性の軟膏基材の調製物が挙げられる。例えば、これらの組成物は、植物油、動物性脂質、より好ましくは、石油から得られる半固体の炭化水素を含んでいてもよい。特に使用される成分としては、白色軟膏、黄色軟膏、セチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブ油、パラフィン、ワセリン、白色ワセリン、鯨蠅、グリセリンデンプン、白色ワックス、黄色ワックス、ラノリン、脱水ラノリンおよびモノステアリン酸グリセリンが挙げられる。種々の水溶性軟膏基材も用いることができ、グリセロールエステル類およびその誘導体、ポリエチレングリコール類、ポリオキシル40ステアリレート、およびポリソルベート類が挙げられる。

## 【0702】

直腸投与のための製剤は、例えば、ココアバターまたはサリチル酸を含む好適な基材を用いた坐薬として提供されてもよい。腔内投与に好適な製剤は、本技術分野において適切なものとして知られているような担体などを、活性成分とともに含んだ、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤、スプレー剤として提供されてもよい。

## 【0703】

D6. 点鼻薬 50

鼻および呼吸経路を介しての局所的な送達は、様々な症状を治療するために考慮される

。これらの送達経路も、薬剤を全身の循環系に送達するのに適當なものである。ゆえに、鼻腔投与に好適な担体中の活性成分の製剤、例えば、点鼻液、点鼻スプレー、点鼻エアロゾルおよび点鼻用吸入剤も、本発明の範囲に含まれる。ここで、担体が固体である場合、上記製剤は、例えば20～500ミクロンの範囲における粒子サイズを有する粗粉末を含み、例えば、鼻までに近接した状態で固定された粉体の容器からの、鼻腔経路を介した急速な吸入によって投与される。

#### 【0704】

担体が液体である好適な製剤は、鼻腔投与において有用である。点鼻液は通常、水滴またはスプレーで鼻腔経路に投与されるよう設計され、多くの点で鼻汁と類似するように、さらに、通常の纖毛作用が維持されるように調製される。このように、水性点鼻薬は通常、等張であるか、幾分緩衝化されて5.5～6.5のpHに維持されている。さらに、点眼調製物に使用されたものに類似するが、抗菌性保存剤および適切な薬剤安定化剤が、必要に応じて、上記製剤に含まれ得る。種々の市販の点鼻調製物は公知であり、例えば、抗生素および抗ヒスタミン剤が含まれ、喘息予防に使用される。

10

#### 【0705】

吸入剤および吸入抗原は、薬剤または化合物を患者の呼吸樹に輸送するよう設計された医薬調製物である。気体またはミストは投与されると、作用する領域に達する。この経路も、全身の循環系へ薬剤を送達するために用いられる。吸入剤は、鼻または口の呼吸経路によって投与されてもよい。吸入剤溶液の投与は、ミストが細気管支に到達するように、ミストの水滴は十分に微細であり、サイズにおいて均一である場合において、効果的である。

20

#### 【0706】

吸入剤として知られ、まれに吹送剤と称される、その他の製品群も、微細に粉末化された薬剤または液体薬剤を含む。液化ガスの促進剤中における薬剤の溶液または分散を保持した、薬剤用のエアロゾルのような特別な送達系の使用によって、呼吸経路内に運ばれる。適当なバルブおよび口腔用アダプターを通じて放出された場合、計量された吸入剤の投与物は、患者の呼吸管に拡散される。調製物のこの型での投与においては、粒子サイズが最も重要なことである。肺胞への透過にとって最適な粒子サイズは、0.5～7μmの範囲である旨が報告されている。微細なミストは加圧されたエアロゾルにより製造され、それゆえに、利点がある場合に使用される。

30

#### 【0707】

##### E. 治療キット

本発明は、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体を含む、本治療方法に使用するための治療キットも提供する。このようなキットは一般的に、好適な容器手段により、少なくとも1つのVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体の薬学的に許容し得る製剤を含むものである。

40

#### 【0708】

本キットは、診断／画像化のため、あるいは複合治療のための他の薬学的に許容し得る製剤を含んでいてもよい。たとえば、このようなキットは、幅広い、化学療法剤または放射線治療薬剤；抗血管新生剤；抗腫瘍細胞抗体；および／または抗腫瘍血管系もしくは抗腫瘍間質の抗毒素もしくは凝固リガンドを1種類または複数種を含んでもよい。

#### 【0709】

本キットは、追加の構成成分とともにまたはそれを含まずに、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体を含む単一の容器（容器手段）を有していてもよいし、あるいは、各所望の薬剤のための個別の容器を有していてもよい。複合治療を提供する場合、単一の溶液は、モル等量の組み合わせで、あるいはある成分に対して他の成分を過剰な量で、予め混合されていてもよい。代わりに、本キットの、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体と、他の抗癌剤の構成成分とが、患者への投与に先立って、個別の容器内に、別々に維持されていてもよい。

#### 【0710】

50

本キットの構成成分が1種類以上の液体溶液で提供される場合、その液体溶液は好ましくは、水性溶液であり、滅菌された水性溶液は特に好ましい。しかしながら、本キットの構成成分は乾燥粉体として提供されてもよい。試薬または構成成分が乾燥粉体として提供される場合、該粉体は適当な溶媒の添加によって戻すことができる。その溶媒は別の容器で提供されてもよいことが考慮される。

#### 【0711】

本キットの容器としては、一般的には、少なくとも一つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたはその他の容器手段が挙げられ、これらの容器は、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体または免疫抱合体、およびその他の所望の薬剤が配置され、好ましくは、適切に分割されているものである。分離した構成成分が含まれる場合、本キットは、一般的には、それらを配置する第2のバイアルまたはその他の容器も含み、別々の目的の投与量での投与を可能にする。本キットは、滅菌された薬学的に許容し得る緩衝剤またはその他の希釈剤を収容するための第2 / 第3の容器手段を有していてもよい。

10

#### 【0712】

本キットは、例えば、1以上の針またはシリンジ、あるいは点眼装置、ピペットまたはそのような他の装置などの、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体または免疫抱合体を動物または患者に投与するための手段を含んでいてもよく、それから、製剤を動物に注射したり、体内の疾病部位に適用したりすることができる。本発明のキットは、また、典型的には、市販のための厳格な管理下においては、バイアルもしくはそのようなものおよびその他の構成要素を収容するための手段、たとえば、所望のバイアルおよび他の装置を配置して保持する、射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器のようなものを含むこととなる。

20

#### 【0713】

##### F . 抗血管新生治療

本発明は、単独治療あるいは混合療法で、幅広い疾病および疾患を招来する異常な血管新生について動物および患者を治療するために使用してもよい。

30

#### 【0714】

癌の治療の分野は別として、それの中でも最も蔓延しているものおよび / または臨床上最も重要なものとしては、関節炎、リウマチ性関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症、グレイヴィズ病、血管形成術後の再狭窄を含む血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、および新生血管線内症が挙げられる。その他の可能性がある介入のための対象としては、血管線維腫、動脈硬化巣、角膜移植による血管新生、血友病性関節、肥厚性瘢痕、オースラー - ウェーバー症候群、化膿症、肉芽腫性水晶体後線維増殖、強皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、種々のその他の炎症疾患および疾患、さらに子宮内膜症も挙げられる。さらに、本発明により治療可能な疾病および疾患で、血管新生に関連する疾患における共通性した根拠は、以下に説明される。

#### 【0715】

血管新生に関連する一つの疾患は、リウマチ性関節炎であって、関節の滑膜表層内の血管が血管形成を経るものである。新規の血管網の形成とともに、内皮細胞は、パンヌス成長および軟骨破壊に至らしめる因子および活性酸素種を放出する。血管新生に関する因子は、活性化して、リウマチ性関節炎における慢性的に炎症した部位に活性化するよう清、それを維持することを助ける。血管新生に関する因子は、骨関節炎にも役割を担つており、関節の破壊に寄与する。

40

#### 【0716】

Haradaら（1998，参照により本明細書に特に援用される）は、V E G F はリウマチ性関節炎の発病に関与すること、さらにはV E G F の血清濃度の測定は、リウマチ性関節炎の疾病活性をモニタリングするための、非侵襲性かつ有用な方法であることを示した。このことは、リウマチ性関節炎に関連した本発明の治療的使用および診断的使用の

50

根拠となるものである。

【0717】

Nagashimara (1999、参照により本明細書に特に援用される) は、培養されたリウマチ滑膜細胞におけるVEGFに対する抗リウマチ薬剤の阻害作用を説明している。VEGFは、リウマチ性関節炎の滑膜において構成的に発現されている。公知の抗リウマチ薬剤、ブシラミン (BUC) は、作用機序の範囲内では、滑膜細胞によるVEGF産生の阻害を含むことを示されている。このように、BUCの抗リウマチ作用は、滑膜細胞によるVEGF産生を介した関節炎性の滑膜における血管新生の抑制および滑膜増殖の抑制によって介在されるものである。本発明の抗関節炎治療としての使用は、この既存の治療におけるVEGF阻害作用を根拠とするものである。

10

【0718】

血管新生を介在した疾病の他の例としては、眼性の血管形成性疾患である。この疾患は、新規の血管が、網膜または角膜のような目の構造体に侵入することを特徴とする。このことは、失明の最も一般的な原因であり、約20種類の眼病に関与するものである。加齢性黄斑変性症においては、それに付随した視覚の問題が、網膜色素上皮下における毛細血管組織の増殖に関連するブルッフ膜における欠陥を介して、脈絡膜の毛細血管の内部成長に起因して生じる。血管新生の損傷も、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、角膜移植拒絶反応、血管形成性緑内症および水晶体後線維増殖症に伴うものである。

【0719】

角膜の血管形成に関連する他の疾患としては、限定されないが、流行性角結膜炎、ビタミンA欠乏症、コンタクトレンズの過着用、アトピー性角結膜炎、上輪部角結膜炎、乾燥性角結膜炎、シェーグレーン症候群、紅斑性座蒼、フィレクテヌローシス、梅毒、マイコバクテリウム感染症、脂質変性、化学火傷、バクテリア性潰瘍、真菌性潰瘍、単純ヘルペス感染、帯状疱疹感染、原生動物感染、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン周辺角膜変性、辺縁潰瘍性角膜炎、リウマチ性関節炎、全身性紅斑、結節性動脈周囲炎、外傷、ウェグナーサルコイドーシス、強膜炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、放射状角膜切開術および角膜グラフ拒絶が挙げられる。

20

【0720】

網膜／脈絡膜の血管形成に関連する疾患としては、限定されないが、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症 (AMD) を含む黄斑変性症、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、ページエット病、静脈閉塞、動脈閉塞、頸動脈閉塞性疾患、慢性的なブドウ膜炎／硝子体炎、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス、未熟網膜症、イールス病、ベーチェット病、感染惹起性網膜症または脈絡膜炎、推定眼ヒストプラズマ症候群、ベスト病、近眼、視窓、シュタルガルト病、扁平部炎、慢性的網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷およびポスト・レーザー合併症が挙げられる。

30

【0721】

黄斑変性症、AMDおよび他の眼病に関連するような、脈絡膜の血管形成においても、本発明におけるVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、治療における使用に特に適している。このことは、部分的には、VEGFR1へのVEGFの結合を実質的に阻止することなく、VEGFR2へのVEGFの結合を阻止し、この結果は、目において恩恵をもたらすものである (Nozakura, 2006) ためであり、例えばアバスチンおよび関連する製品、Lucentis (登録商標) のような、既存の抗VEGF治療を超える本発明のその他の利点を強く示すものである。

40

【0722】

その他の疾患としては、限定されないが、ルベオーシス (隅角における血管新生) に関連する疾患および増殖性硝子体網膜症の形成を含めた、毛細血管または線維性組織の異常増殖に起因する疾病があげられる。

【0723】

慢性的な炎症も、病理学的な血管新生に関連するものである。潰瘍性大腸炎およびクロ

50

ーン病のような、疾患の状態は、炎症した組織の中に新規の血管の内部成長において組織的な変化を示す。バルトネラ症は、南アフリカで発見された細菌性の感染であるが、結果として、血管内皮細胞の増殖に特徴付けられる慢性期になる。

#### 【0724】

その他の血管新生に関連する病理学的役割は、アテローム性動脈硬化において見られる。血管の内腔の中で形成される病巣は、血管新生の刺激活性を有することが示されている。ヒトの冠状動脈硬化病変におけるV E G F 発現は、Inoueら(1998, 参照により本明細書に特に援用される。)によって、実証された。このことは、閉塞性冠状動脈疾患における再疎通過程と同様に、ヒト冠状動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行における病理生理学的なV E G F の有意性を証明するものである。本発明は、このような状態のための効果的な治療を提供する。

#### 【0725】

頻発する小児における血管新生疾病の一つは、血管腫である。ほとんどの場合、この腫瘍は良性のものであり、治療介入なしでも退行する。重篤な場合においては、この腫瘍は大きな海綿状かつ浸潤性の形態に進展し、臨床的合併症を創出してしまう。血管腫の全身性の形態すなわち全身性血管腫症は、高い死亡率を有する。現在使用されている治療では治療され得ない治療抵抗性の血管腫も存在する。

#### 【0726】

血管新生は、オースラー - ウェーバー - ランデュ病または遺伝性出血性毛細管拡張症のような遺伝性疾病において見られる損傷にも関与する。これは、複数の小さな血管腫、血管またはリンパ管の腫瘍を特徴とする遺伝病である。血管腫は、しばしば、鼻出血(鼻血)または胃腸出血を伴い、さらには稀に肺または肝臓における動脈フィステルとともに、皮膚および粘膜において見られる。

#### 【0727】

血管新生は、生殖および創傷治癒のような正常な生理学的過程にも関与する。血管新生は、排卵や受精後の胞胎の着床における重要なステップである。血管新生の防止は、無月経を惹起したり、排卵を阻止したり、または胞胎の着床を防止するために利用され得る。

#### 【0728】

創傷治癒においては、過剰な修復すなわち線維増殖症は、外科的手順における有害な副作用となり得、血管新生により発生し、または悪化する可能性がある。癒着は、外科的手術において頻発する合併症であり、小腸閉塞のような問題に至る。

#### 【0729】

望まない血管の透過性を特徴とする疾病および疾患は、本発明によって治療され得る。これらは、参照により本明細書に特に援用される、WO 98 / 16551に開示されているように、脳腫瘍に関連する浮腫、悪性腫瘍、メーグス症候群、肺炎、ネフローゼ症候群、心外膜液および胸膜滲出に関連する腹水が挙げられる。

#### 【0730】

全ての腫瘍の種類とともに、上述の疾病および疾患は、それぞれ、以下の項目において記載されているように、たとえば米国特許第5,712,291号(参照により本明細書に援用される)において開示されているような本技術分野における知識に準拠して、本発明によって効果的に治療され得、共通する効用が、結果として血管新生疾病的治療に対する抗血管新生戦略の適用から得られる。さらには、米国特許第6,524,583号は、抗V E G F 抗体を使用した疾病および疾患の幅広い治療を説明および可能にすることを含める目的で、参照により本明細書に特に援用される。

#### 【0731】

本発明のヒト抗体および/または免疫抱合体は、最も好ましくは、腫瘍の治療において利用されることである。血管新生が重要である腫瘍としては、聴神経腫、神経纖維腫、トロコーマおよび化膿性肉芽腫のような悪性腫瘍および良性腫瘍が挙げられる。血管新生は、特に固形腫瘍の形成および転移において顕著である。しかしながら、血管新生は、白血病および白血球の無制御の増殖が、通常は貧血、異常な血液凝固および、リンパ節、肝臓

および脾臓の肥大化を伴って、生じている骨髄における種々の急性または慢性的な腫瘍性疾病のような、血液によって運ばれる腫瘍性疾病にも関連する。また、血管新生は、白血病様腫瘍を惹起する骨髄における異常性に関与するものである。

#### 【0732】

血管新生は、腫瘍転移の二つの段階において重要である。原発性腫瘍の血管脈の形成においては、血管新生は細胞に血流中に入り、体内全体を循環することを可能にする。腫瘍細胞は原発性部位から去り、二次性の転移部位に転入した後、新規の腫瘍が増殖および拡大できるようになる前に、血管新生が発生しなければならない。それゆえに、血管新生の防止は、腫瘍の転移を防止することができ、原発性部位における腫瘍の増殖を防いで、その他の治療、特に、治療薬 - 指向性薬剤の構成体（以下参照）による治療を可能にする。

10

#### 【0733】

本発明によって提供される、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体の方法は、このように幅広く、血管構成物を有する悪性腫瘍の治療に適用可能なものである。本発明の抗体および／または免疫抱合体の、腫瘍の治療における使用、特に血管が形成された悪性腫瘍の治療における使用においては、この薬剤は単独で使用してもよいし、たとえば化学療法剤、放射線治療薬剤、アポトーシス剤、抗血管新生剤および／または抗毒素もしくは凝固リガンドとの組み合わせで使用してもよい。

20

#### 【0734】

治療されるべき典型的な血管が形成された腫瘍は、固体腫瘍であり、特に、上皮性悪性腫瘍であり、これらは、酸素および栄養物の供給のために血管構成物を必要としている。本発明を使用して治療されてもよい典型的な固体腫瘍は、特に限定されないが、肺、乳房、卵巣、胃、脾臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺胆道、結腸、直腸、頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、胆のう、前立腺、甲状腺、扁平上皮細胞 上皮性悪性腫瘍、アデノ上皮性悪性腫瘍、小細胞上皮性悪性腫瘍、メラノーマ、神経膠腫、グリア芽腫、経芽細胞腫等が挙げられる。WO98/45331は、本明細書にて参考として含まれており、抗VEGF抗体を使用して有效地に治療され得る腫瘍の種類がさらに例示されている。

20

#### 【0735】

腫瘍の維持および転移における血管新生の役割に関する知見は、乳癌のような癌の予後指標になり得る。原発性腫瘍に見られる血管形成の量は、侵襲性乳上皮性悪性腫瘍にて最も密な血管形成の部位における微小血管密度によって測定される。微小血管密度の高いレベルは、腫瘍再発に相関性があることが見られる。本発明の治療による血管新生の制御は、このような腫瘍の再発を低減または無効にする。

30

#### 【0736】

本発明は、固体腫瘍を呈する患者の治療における使用が考慮される。VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体組成物の特徴的な物性に照らし合わせて、本発明の治療は副作用を低減する。この特徴的な利点は、結果として、腫瘍に対する宿主応答の維持または向上、および骨組織における副作用の消失に繋がる。本発明は、小児癌治療や骨粗鬆症およびその他の骨欠損を有する患者またはリスクがある患者の治療の選択肢としての抗血管新生治療になろう。

40

#### 【0737】

全ての悪性腫瘍細胞および固体腫瘍は本発明によって治療されてもよいが、本発明における、接合していないVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、特に、より血管新生性が大きい腫瘍を伴う患者または転移のリスクがある患者における使用が考慮される。

#### 【0738】

本発明も、防止性または予防的治療が意図される。本発明のこれらの態様は、浸潤性の腫瘍または浸潤性の腫瘍播種である早期段階の腫瘍細胞を呈される患者を治療する本発明の性能を含む。抗血管新生戦略としては、本発明は、予後テストおよび／または遺伝性の癌を罹患する近接した親類に基づいた中程度のリスクまたは高リスクの対象における、腫瘍の発達を防止するために使用されてもよい。

50

**【 0 7 3 9 】**

本発明の V E G F R 2 - ブロッキング , ヒト抗 V E G F 抗体における接合型の形態または抗毒素型の形態は、特に、破壊性またはデバルキング性の固形腫瘍においての使用が考慮される。本発明のこれらの態様は、結合していない本発明の抗血管新生抗体とともに、あるいは、他の抗血管新生手段とともに使用されてもよい。

**【 0 7 4 0 】**

本治療方法における免疫抱合体の形態およびプロドラッグの形態は、抗体の元来備わった抗血管新生特性および、付随した治療上の特性（たとえば、細胞毒性、凝集性、アポトーシス誘導性など）という、2つの特性を有する単一の治療薬を提供することの異なった利点があることは、当業者であれば容易に理解される。このように、本抗体の接合型の形態およびプロドラッグの形態は、癌治療の分野において、予期し難いほどの幅広い利用性を有している。

**【 0 7 4 1 】**

本発明の異なる態様に関連した使用により適した患者に関する、本明細書にて提供されるガイダンスは、特定の患者のプロファイルが、本発明によって治療される患者の選択を補助するものであってもよい旨を教示するものとして意図されている。特定の患者または患者の分類の予備的な選択は、上述の血管が形成された腫瘍や血管形成性の疾患を有する患者全ての貯血に関連した本発明の有用性を否定するものである。さらに考察されることとしては、本発明によって提供される腫瘍における攻撃は、事後的治療が、結果として全面的な相乗効果ならしめたり、あるいは全体的な緩和または治癒に至らしめたりするために、さらなる治療的処置の前に、腫瘍に前処理を行うことも許容されるということである。

**【 0 7 4 2 】**

いかなる特定の種類の腫瘍も本発明を使用した治療から除外されるべきではないと考えられる。しかしながら、この種類の腫瘍細胞は、他の治療薬、特に化学療法剤および抗腫瘍細胞の免疫毒物とともに組み合わせての使用に関連するのかもしれない。本治療の、非接合型および接合型のどちらの態様も、腫瘍の血管系の増殖を阻害する抗血管新生効果が含まれよう。接合体およびプロドラッグの治療態様は腫瘍の血管系さらに破壊または閉塞される。血管系は実質的にまたは完全に固形腫瘍全てにおいて共通であるので、本発明の方法は、特定の表現型または遺伝子型に關係なく、幅広くまたは完全に全ての固形腫瘍の治療に適用可能であろう。

**【 0 7 4 3 】**

V E G F R 2 - ブロッキング , ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体の構成体の治療状有効な投与量は、たとえば、本明細書での詳細な研究にて示されるように、動物モデルからのデータを用いて容易に決定される。固形腫瘍を有する実験動物は、臨床環境に改変するに先だって、適切な治療のための投与量に最適化するために汎用される。

**【 0 7 4 4 】**

このようなモデルは、有効な抗癌戦略を予想するにあたって、非常に信頼性があるものと知られている。たとえば、固形腫瘍を有するマウスは、本実施例にて使用されているように、幅広く、臨床前の試験において使用されている。本発明者らは、人工的に許容されたマウスモデルを用いて、最少の毒性で有益な抗腫瘍効果を与える使用範囲を決定した。

**【 0 7 4 5 】**

接合していない V E G F R 2 - ブロッキング , ヒト抗 V E G F 抗体の、抗血管新生治療における使用においては、臨床的治療のための投与量の策定における助けとするために、別の発行されたデータに目を向けることができる。例えば、本発明の効果は、本技術分野における抗体に比べて異なる利点を有するが、他の抗 V E G F 抗体での治療に関する文献の情報は、本出願におけるデータおよび教示内容と併せて使用され、治療プロトコールおよび投与量を設計および / または最適化することができる。

**【 0 7 4 6 】**

例えば、Borgstromら(1999)は、特に、参照により本明細書に援用され

10

20

30

40

50

るものであるが、M A b A 4 . 6 . 1 を用いて、乳癌のインビボでの血管新生における V E G F の重要性を説明している。A 4 . 6 . 1 抗体のヒト化の形態（アバスチン、ベバシズマブ）では、臨床的使用が提案されている（H u r w i t z ら、2 0 0 4）。本発明のヒト抗体は、A 4 . 6 . 1 / アバスチンでの比較研究において、同等か、あるいはより改善された抗腫瘍応答を示すことから、これらの抗体は、乳癌を含め、ヒトの癌治療において顕著な利用性を有するものであろう。本発明者らは、さらに、当業者ならば当然であるが、乳癌を有する患者は一般的には中年またはそれ以後の年齢群の女性であり、骨粗鬆症に関する懸念も明らかであることが理解される。つまり、本発明における V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、骨代謝に悪影響を惹起しないという追加的な利点があるので、骨粗鬆症を有するまたはそれが進行するリスクを有する乳癌の患者における使用は好ましいものである。

10

## 【 0 7 4 7 】

同様の種類の効用は、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の治療を、小児癌の治療のための好ましい薬剤とする。癌を持つ小児において、健康的かつ実質的な骨成長を維持するという必要性は明らかである。V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、骨の発達に重要な破骨細胞および軟骨吸収細胞の活性を実質的に悪化させるものではないので、これらの抗体は、アバスチンのような他の抗体に対して重要な利点を有するものであろう。

20

## 【 0 7 4 8 】

B o r g s t r o m ら（1 9 9 9）も、本明細書に参照として特に含まれるものであるが、ドキソルビシンとともに使用された場合、M A b A 4 . 6 . 1 は、有意な腫瘍の退行に至る旨の結果を示している。V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体と典型的な細胞毒性または化学治療の薬剤との複合的な使用を裏付けるもので、多様な癌の治療における有意な臨床的結果を達成している。接合していないドキソルビシンおよびドキソルビシンプロドラッグの組み合わせも考慮される。

20

## 【 0 7 4 9 】

Ferraraおよび同僚も、腫瘍を有するマウスにおける、マウス抗 V E G F モノクローナル抗体の有効性および濃度応答、ならびにヒトの治療への推測について報告している（Mordenti et al., 1999、参照により本明細書に援用される。）。この研究は、癌患者における上記抗体の組換えヒト化型の有効な血漿濃度を概算できるように、マウス抗 V E G F モノクローナル抗体の濃度応答的な関係を評価するために設定されたものである。

30

## 【 0 7 5 0 】

Mordenti et al., (1999)は、要求される有効な範囲でヒト用の治療抗体を維持するのに有効な臨床的な投与処方計画を規定するために、容易にヒトの系に適用することのできるマウス抗体の投与量を用いて、ヌードマウスにおける満足な腫瘍の抑制が達成されることを結論付けた。したがって、この人工的に管理されたマウスモデルからのデータは、Mordenti et al., (1999)にて報告された分析の種類、さらに、本明細書に記載された当業者に知られた技術を用いて、適切なヒトの投与量に変更することもできる。

30

## 【 0 7 5 1 】

サルにおける、G e n e n t e c h 社の抗 V E G F 抗体の組換えヒト化型の臨床前の安全性評価からの結果（Ryan et al., 1999、参照により本明細書に特に援用されるものである。）は、特定の候補となる治療の欠点を例示することになった。本抗体は、この動物において薬理学的活性を有するものの、本研究におけるサルは、肥大軟骨細胞、軟骨下骨板形成、成長板の血管侵入の阻害においての投与量相関的な増加を特徴とする骨端異形成を示した。このような欠点は、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の使用において全くないことが証明されており、そして V E G F R 1 に介在される軟骨吸収細胞および軟骨細胞のシグナル伝達を阻害しないものである。

40

## 【 0 7 5 2 】

ヒト化モノクローナル抗 V E G F 抗体の臨床前の薬物動態、種間スケーリングおよび組織分布についての更なる研究からのデータは、Lin et al., (1999、参照により本明細書

50

に特に援用される。)により報告されている。これらの研究は、マウス、ラット、サルおよびウサギにおいて実施され、後者では 125I 標識化抗体が使用されている。マウス、ラットおよびサルからの薬物動態のデータは、ヒトでの相対的スケーリングを用いてヒト化対応抗体の薬物動態を予想するために使用される。したがって、適切な投与量の情報は、リウマチ性関節炎、目における血管新生および癌のような、ヒトの病理的状態の治療へ展開される。

#### 【0753】

抗 VEGF 抗体 A4.6.1 (アバスチン、ベバシズマブ) のヒト化の形態は、現在、臨床的な使用検討がなされている (Hurwitz et al., 2004、参照により本明細書に援用される)。それゆえに、本発明の VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体の治療における投与量を設定する場合、このような臨床データは、参考材料として考慮され得る。本発明は、腫瘍担持マウスにおける研究においては、A4.6.1 / アバスチンと同じくらい有効な新規のヒト抗体を示すが、VEGF の、VEGFR2 介在の活性のみを阻害する特異性が利点である。治療に使用され得るヒト化抗 VEGF 抗体の投与量をさらに例示するために、WO98/45331 も参照により本明細書に特に援用される。

10

#### 【0754】

腫瘍治療における、接合した VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体の使用に関しては、腫瘍の血管系に対する幅広い治療を送達して有益な効果を達成する成功に関する科学技術文献および特許文献が参考されてもよい。例としては、米国特許第 5,855,866 号；第 5,877,289 号；第 5,965,132 号；第 6,051,230 号；第 6,004,555 号；第 5,776,427 号；第 6,004,554 号；第 6,036,955 号；および第 6,093,399 号のそれぞれは、そのような治療薬 - 指向性薬剤構造物の使用について更に説明するために、参考により本明細書に特に援用される。この場合においては、治療薬 - 指向性薬剤構造物は、抗血管新生効果を発揮する指向性薬剤部分を含み、それは付着した治療薬の抗腫瘍活性を拡大したり、あるいは向上させたりすることとなる。

20

#### 【0755】

本技術分野において知られているように、臨床的処置に進む前に、診療前試験に関連する基準として使用されてもよい現実的な目的がある。しかしながら、臨床における他の抗 VEGF 抗体の進展、本明細書で示されたような、許容されたモデルにおける実証済みの抗腫瘍効果、および本戦略における向上した安全性に照らし合わせてみると、本発明は、臨床的処置への急速な適用を伴う治療法を提供する。このように、臨床前試験を用いて、最も有利な抗体、投与量、または組み合わせを選択してもよい。

30

#### 【0756】

何れも一貫して検出可能な抗血管新生効果、転移阻害、腫瘍の血管系の破壊、腫瘍の血栓形成、壊死および / または一般的な抗腫瘍活性を結果として示す、いかなる VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体または免疫抱合体の投与量または複合薬剤も、有用な発明の輪郭を示す。本発明は、腫瘍の下流の血管に対して効果的である、すなわち、少なくとも、排出する血管の一部分を標的とする。特に腫瘍から放出されるサイトカインが、これらの血管に作用し、抗原プロフィールを変化させるためである。

40

#### 【0757】

VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗 VEGF 抗体または免疫抱合体の投与または複合治療の、抗血管新生および / または腫瘍効果が、意図された治療範囲の最低限に近い状況であったとしても、本治療は、特定の腫瘍対象または患者の内容においては、その他の公知の療法と同等か、さらにより効果的なものでありうることも理解されよう。不運なことに、臨床医には、ある腫瘍および症状は中長期の期間では効果的には治療できないが、本発明の治療の使用、特に少なくとも、その効果がその他一般的に提案されている戦略とほぼ同じくらいである場合の本発明の治療の使用を否定しないものであることは明らかである。

#### 【0758】

50

血管が形成された腫瘍を治療するために、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体構造物の適切な投与量、複合治療、設計する際に、本明細書に記載の動物研究および文献における知見から容易に推定して、臨床的投与のための適切な投与量に達することができよう。動物からヒトへの投与用へ変換を達成するには、実験動物の単位重量あたりの投与された薬剤の重量を測定し、好ましくは、実験動物とヒト患者との間の体表面積 ( $m^2$ ) の差異を計測する。このような計算は全て、当業者によく知られ、定型的なものである。

例えば、マウスの研究における問題のない投与量を例にとり、質量および表面積に基づいて基準計算を行うと、ヒト患者において使用するための有効な投与量は、約  $1\text{ mg} / m^2$  と約  $1000\text{ mg} / m^2$  の間、好ましくは約  $50\text{ mg} / m^2$  と  $500\text{ mg} / m^2$  の間、最も好ましくは約  $10\text{ mg} / m^2$  と  $100\text{ mg} / m^2$  の間であるだろう。これらの投与量は、裸のまたは接合していない抗体の抗血管新生剤としての使用について好ましいものであるが、裸のVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体及びVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF免疫抱合体にとって適切なものである。

#### 【0759】

したがって、この情報を用いて、本発明者は、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体の使用可能な低投与量は、約  $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45$  または約  $50\text{ mg} / m^2$  で、このような抗体または免疫抱合体のヒト投与のための使用可能な高投与量は、約  $600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 925, 950, 975$  または約  $1000\text{ mg} / m^2$  であること考慮した。つまり、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体のヒト投与のための中間投与量は、約  $55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550$  または約  $575\text{ mg} / m^2$  等のような低範囲と高範囲との間の投与量であることが考慮される。

#### 【0760】

前述した典型的な投与量の何れかの特定範囲または特定の範囲の間の値が考慮される。EGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF免疫抱合体は使用される場合、凝固性の免疫抱合体は毒性のある免疫抱合体よりも高い投与量で、一般的に使用できることが理解される。

#### 【0761】

概して、約  $10 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $10 \sim 90\text{ mg} / m^2$ 、約  $10 \sim 80\text{ mg} / m^2$ 、約  $20 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $20 \sim 90\text{ mg} / m^2$ 、約  $20 \sim 80\text{ mg} / m^2$ 、約  $30 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $30 \sim 90\text{ mg} / m^2$ 、約  $30 \sim 80\text{ mg} / m^2$ 、約  $15 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $25 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $35 \sim 100\text{ mg} / m^2$ 、約  $15 \sim 90\text{ mg} / m^2$ 、約  $25 \sim 90\text{ mg} / m^2$ 、約  $35 \sim 90\text{ mg} / m^2$  等の間の、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体または免疫抱合体の投与量範囲が好ましい。これら言及された範囲にもかかわらず、本明細書にて提示されたパラメーターおよび詳細な基準が与えられる場合、活性がある範囲または最適な範囲の更なる変更も本発明に包含されることが理解される。

#### 【0762】

したがって、より低い投与量は、その他の薬剤との組み合わせにおいては、より適切なものであり、高い投与量は、特に、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および免疫抱合体における向上された安全性がある場合、依然として許容できることが理解されよう。ヒト抗体（および、必要に応じてヒト凝固剤または抗血管新生タンパク質）の使用は、本発明が、臨床的に使用されるためにより安全なものとみなされ、健常な組織における有意な毒性または副作用の機会をさらに低減する。

#### 【0763】

本発明の治療の処方計画の意図するところは、一般的に、有意な抗腫瘍効果を発揮し、その上、投与量を、許容できない毒性を伴う基準以下にすることである。それ自体の投与

10

20

30

40

50

量の変更とともに、投与の処方計画も最適化された処置戦略が適用される。治療のプロトコールでは、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または免疫抱合体あるいはそのようなものを含む治療カクテルが、1週間当たり1～3回、好ましくは静脈内または筋肉内への投与、最も好ましくは静脈内への投与によって、約 $1\text{ mg/m}^2$ と約 $100\text{ mg/m}^2$ との間、好ましくは、約 $50\text{ mg/m}^2$ と約 $500\text{ mg/m}^2$ との間、最も好ましくは、約 $10\text{ mg/m}^2$ と約 $100\text{ mg/m}^2$ との間で投与される。

#### 【0764】

特定の投与量での投与を行うに当たり、提供する薬学的に許容し得る組成物（F D A の滅菌、発熱性、純度および一般的な安全性の基準に基づく）を患者に好ましくは全身的に提供されることが好ましい。静脈内注入が一般的に好ましい。約1時間または2時間程度の時間にわたっての持続注入も考慮される。

10

#### 【0765】

当然ながら、広範囲に使用するに先だって、臨床試験が実施される。臨床試験を実施する、患者処置およびモニタリングを含めた種々の要素が、本開示に照らし合わせて、当業者に知られている。なお、以下の情報は、このような試験を確立する際に使用されるための一般的基準を提示している。

#### 【0766】

最初のV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に選択された患者の処置研究は、少なくとも一連の典型的な治療に対しては反応を示さないであろうため、客観的に、理学的検査、検査室的技術、および／または放射線手技に決定されるような、測定可能な疾患を有する。いかなる化学治療も、本研究の開始の前に、少なくとも2週間は停止されるべきである。ここでは、マウスモノクローナル抗体または抗体部分が用いられ、上記患者はマウス免疫グロブリンに対するアレルギー履歴を有さないべきである。

20

#### 【0767】

特定の利点が、三重ルーメンポートを有する中心留置静脈カテーテルの使用にて見出される。V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は例え、 $0.22\text{ }\mu\text{フィルター}$ を用いた、ろ過処理がなされ、生理食塩水などで、最終体積 $100\text{ ml}$ に適切に希釈される。使用に先立って、試験試料も同様にしてろ過処理され、 $A_{280}$ 値を測定することで濾過前後のその濃度が評価される。予想される回収率は、87%～99%の範囲内にあるはずであり、タンパク質のロスのための調節も考慮されることができる。

30

#### 【0768】

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体または接合体は、2～7日のインターバルで2～4回の注入を受けた各患者には、およそ4～24時間の期間に亘って投与されてもよい。この投与、7日の期間に亘って一定速度にて実施され得る。どんな投与量の基準において与えられる注入も、観察される毒性による。それゆえに、もし、一度の注入後あるいは、一定速度の注入の特定の期間において、グレード2の毒性に達成した場合、毒性が改善されない限り、さらなる投与量は、控えるべきであり、または一定速度の注入を停止すべきである。約60%の患者が、あるカテゴリーにおいて、許容できないグレードI I I またはグレードI V を示すまでは、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体を患者群に投与すべきである。この値の2/3である投与量は、安全な投与量として定義される。

40

#### 【0769】

理学的検査、腫瘍測定および検査室的試験は、もちろん、処置前で、一ヶ月以後までのインターバルで実施される。検査室試験は、全血球計算、血清クレアチニン、クレアチニナーゼ、電解質、尿素、窒素、S G O T、ビリルビン、アルブミン、および全血清蛋白濃に関するものを含むべきである。処置後60日までに採取された血清試料は、ラジオイムノアッセイによって、投与された治療剤および該アッセイの抗体に一部に対する抗体の存在下において評価される。例えば、E L I S A またはR I A のような標準アッセイを用いての血清の免疫学的分析によって、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体の薬物動態およびクリアランスが評価可能である。

50

## 【0770】

抗腫瘍反応を評価するために、患者は48時間から1週間、および最後の注入後30日後にて再度検査される。触診可能な疾患が存在する場合、処置の間、治療完了後1週間以内および30日時点で全塊分の2つの垂直直径を測定する。触知不能な疾患を測定するために、48時間から1週間、および最後の注入後30日後、胸部、腹部および骨盤の1cm間隔で一連のCTスキャンを実施することができる。組織試料は、疾病部位からの生検もしくは、適切ならば血液または流動試料を用いて組織学的に、および/またはフローサイトメトリーによって評価される。

## 【0771】

また、臨床的反応は、許容可能な測定によって定義されてもよい。例えば、完全な臨床的反応は、処置後1月で、全ての計測可能な腫瘍の消失によって定義されたものでもよい。一方で、部分的な臨床的反応は、処置後1月で、腫瘍部位の拡大を伴わずに、評価可能な腫瘍の小塊全てにおける垂直直径の測定値の合計が50%以上低減することで、定義されたものでもよい。同様に、これらが併用された臨床的反応は、1以上の部位での進行を伴い、測定可能な損傷全ての垂直直径の測定値の50%以上の低減によって定義されるものでもよい。

10

## 【0772】

臨床試験の結果に照らし合わせると、上述したように、より正確な処置の処方計画が組み合わせられる。それでも、投与量の一部の変更は、処置される対象の状態に依存して、事後的に必要になろう。該投与を担当する内科医は、本開示に照らし合わせて、個々の対象に適切な投与量が決定されることができるよう。このような最適化および調整は、定型的に本技術分野において実施され、決して過度の実験に反映されるものではない。

20

## 【0773】

## G. 複合療法

関節炎、乾癬、アテローム性動脈硬化、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症、グレイヴィズ病、血管再狭窄、血管腫および血管新生性緑内症（または上述したその他の疾病）のような血管新生疾病または固形腫瘍を治療するのに使用するかどうかに関わらず、本発明は他の治療法と組み合わせることができる。

## 【0774】

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療法は、患者が呈する特定の腫瘍、疾病または障害の治療において一般的に使用するその他の方法と組み合わせることができる。特定の治療法が、患者の症状そのものに対して有害なものとして知られていない場合、およびVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体治療に対して有意に無効にしない場合に限り、本発明との組み合わせを考慮する。

30

## 【0775】

固形腫瘍の治療に関して、本発明は、外科的手術、放射線治療、化学治療などのような従来法と組み合わせて使用してもよい。従って、本発明は、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体構造物が、外科的手術または放射線照射とともに、その前またはその後に使用されるか、あるいは、典型的な化学治療、放射線治療もしくは血管新生阻害剤、標的となる抗毒素または凝固リガンドの治療とともに、その前に、またはその後に、患者に投与する複合療法を提供する。

40

## 【0776】

放射線治療、血管新生阻害剤、アボトーシス誘導剤および抗チューブリン剤とともに本発明の複合的な使用は、特に好ましい。このような薬剤の多くの例は、本発明の免疫抱合体に関連して上述されている。治療の接合体の一部分として使用すると最初に記載された薬剤も、別個に使用してもよいが、本発明とともに実施可能に組み合わせて使用してもよい。

## 【0777】

1つ以上の薬剤を、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療とともに組み合わせて使用した場合、各治療が別個に実施された際に観察される効果が追加される

50

べき組み合わされた結果が要求されない。少なくとも、追加効果は一般的に望ましいが、単一の治療の一つよりも向上した抗腫瘍効果は有益なものであろう。また、相乗効果を示す複合治療の要求は特にならないが、この複合治療は確かに可能性があり、かつ有利なものである。

#### 【0778】

例えば、目またはその他の血管新生性の疾病または障害に対するもののような、抗血管新生に対する複合治療を実施するために、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を、動物体内で、結果としてそのような複合治療または血管新生阻害活性が有効なように別の（第2の）血管新生阻害剤を含めた、その他の治療薬との組み合わせで、動物に単に投与される。

10

#### 【0779】

それゆえに、薬剤は、有効な量および結果として疾患部位内で混合して存在し、目のような疾病的環境におけるこれらの複合作用になる有効な投与量および回数の期間で提供される。

#### 【0780】

この目的を達成するに、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および他の治療または血管新生阻害剤は、動物に、単一の組成物にて、あるいは異なった投与経路を用いて、2つの別個の組成物で同時に投与されてもよい。代わりに、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療は、例えば、数分から週および月の範囲のインターバルで、他の治療または抗血管新生治療に先立つもの、あるいは後におこなうものであってもよい。このような治療は、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および他の治療または血管新生阻害剤が有利に複合治療の効果を発揮できるように、このような治療が実施される。

20

#### 【0781】

腫瘍治療においては、組み合わされた抗腫瘍治療を実施するために、同じように、動物体内で、結果として組み合わされた抗腫瘍作用が有効なようにVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を別の抗がん剤と組み合わせて、動物に投与される。この薬剤は、再度、結果として、腫瘍の血管系内で組み合わされて存在することと、腫瘍環境において組み合わされた作用になるように、効果的な量および回数の期間で投与される。

30

#### 【0782】

VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体および抗癌剤は、動物に、同時に、単一の組成物であるいは、異なる投与経路を用いて、2つの別個の組成物として投与されてもよい。代わりに、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、例えば数分から数週および数カ月離れて、抗がん剤の前、または後に与えられてもよい。抗癌剤およびVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、有利に組み合わされた効果を腫瘍に対して発揮する。多くの抗癌剤は、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の抗血管新生治療に先立って与えられる。しかしながら、多くの他の抗癌剤は、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体とともに、または、特にVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の後に使用された場合に、その後に、投与される。

40

#### 【0783】

癌治療における物質の組み合わせの一般的な使用は、よく知られている。例えば、米国特許番号5,710,134（参照により本明細書に特に援用される。）は、非毒性の物質すなわち「プロドラッグ」との組み合わせで腫瘍において壊死を誘導する構成物を開示している。壊死の過程で放出される酵素が、非毒性の「プロドラッグ」を開裂して毒性を有する「薬剤」を生成し、これが、腫瘍細胞の死に至らしめる。また、米国特許番号5,747,469（参照により本明細書に特に援用される。）は、p53をコードするウイルスベクターとDNA損傷薬剤とを組み合わせた使用が開示されている。このような類似した方法は本発明とともに使用され得る。

#### 【0784】

幾つかの状況においては、有意に治療の回数の期間を延長することが望しいことがある

50

。この場合、各投与間において数日（2、3、4、5、6または7）、数週（1、2、3、4、5、6、7または8）または数ヶ月（1、2、3、4、5、6、7または8）の期間である。このことは、ある治療が実質的に腫瘍を破壊することが実質的に意図され、外科的手術または化学治療および別の治療が、抗血管新生に基づいて治療のような、微小転移または腫瘍の再増殖を防止することが意図されている場合において有利である。抗血管新生は、手術後の注意を要する時期にて、投与され、効果的な創傷治癒に至らしめる。

#### 【0785】

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体か抗癌剤の何れかの、1以上の投与が利用されることも想定される。これらの薬剤は、交互に、別の日または週において投与されてもよいし、一連のV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体が、一連の抗癌剤治療の後に、投与されてもよい。何れにせよ、複合療法を用いて、腫瘍の退行を達成するためには、投与回数に関係なく、抗腫瘍効果を達成するのに有効な組み合わせられた量で療法の薬剤が送達されることである。

10

#### 【0786】

外科的手術に関して言えば、外科的介入は、本発明とともに組み合わされて実施することができる。放射線治療に関して、 $\gamma$ 線照射、X線照射、UV照射、マイクロ波照射さらには電子線放出等のように、DNA損傷を腫瘍細胞内で局所的に誘導するいきなる機構も考慮される。放射性同位体の腫瘍細胞への直接的な送達も考慮され、これは標的とする抗体または標的手段、好ましくはV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体に関して使用されてもよい。

20

#### 【0787】

サイトカイン治療も、複合治療の処方計画に有効なパートナーであることが証明されている。種々サイトカインがこのような複合法にて用いられる。サイトカインの例としては、IL-1、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TGF- $\beta$ 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ が挙げられる。サイトカインは、患者の症状およびサイトカインの相対的毒性のような臨床的適応に一致した、標準的な処方計画に準拠して投与される。ウテログロビンも転移を防止または阻害するために使用されてもよい（米国特許番号：5,696,092；参照により本明細書に特に援用される。）。

30

#### 【0788】

##### G 1 . 化学療法

特定の態様においては、本発明のV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体は、化学療法剤と組み合わされて使用されてもよい。多様な化学治療薬剤が、本明細書にて開示された複合治療法において使用されてもよい。化学治療薬剤は、典型的には、アドリアマイシン、ダクチノマイシン、マイトイマイシン、カルミノマイシン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、タモキシフェンタモキシフェン、タキソール、タキソテール、ピンクリスチン、ピンプラスチン、酒石酸ビノレルビン、エトポシド（VP-16）、5-フルオロウラシル（5FU）、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、チオテパ、メトレキセート、カンプトテシンアクチノマイシン-D、マイトイマイシンC、シスプラチニン（CDDP）、アミノブテリン、コンブレタスタチンおよびこれらの誘導体ならびにプロドラッグが挙げられることが考慮される。

40

#### 【0789】

当業者によって理解されるように、化学治療薬剤の適切な投与量は、一般的に臨床的治療において既に使用されるおよその量であって、化学療法は、単独で、その他の化学療法とともに、投与される。ほんの一例として、シスプラチニンのような薬剤およびその他のDNAアルキル化剤が使用されてもよい。シスプラチニンは、合計三回の間で、3週間につき5日間の20mg/m<sup>2</sup>の臨床的適用にて使用された効果的な投与量で、幅広く癌の治療に使用されている。シスプラチニンは、経口的には吸収されなく、そのため静脈内、皮下、

50

腫瘍内または腹腔内での注入を介して送達されなければならない。

【0790】

更なる有用な薬剤としては、DNA複製、有糸分裂および染色体分離を干渉する化合物が挙げられる。このような化学療法化合物としては、ドキソルビシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロキシン等として知られているアドリアマイシンが挙げられる。新生物の治療のための臨床の場において使用されているので、これらの化合物は、アドリアマイシンでは21日のインターバルの25～75mg/m<sup>2</sup>の投与量で静脈内に、エトポシドでは35～50mg/m<sup>2</sup>の投与量で静脈内に、または静脈内での投与量の倍量を経口的に、ボーラス注入を介して投与される。

【0791】

ポリヌクレオチド前駆体の合成および忠実性を崩壊する薬剤も、使用してもよい。広範な試験が実施され、容易に使用可能である薬剤が特に有用である。そのようなものとして、5-フルオロウラシル(5-FU)は、新生物組織に好ましく使用され、この薬剤を腫瘍細胞を標的とするのに特に役立つ。5-FUは、著しい毒性を有するものの、局所的投与を含めて、幅広い範囲の抗体において適用できるが、3～15mg/kg/日の範囲での投与量で静脈内投与が一般に使用される。

【0792】

複合治療のための、典型的な化学療法薬剤を、表Cに例示する。例示された各薬剤は、典型的なものであり、限定されない。当業者によれば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(15版、33章、特に624～652頁)が参考にされる。治療される症状に応じて、投与量における変更がなされ得る。内科医が施す治療は個々の対象に適切な投与量を決定することができよう。

【0793】

10

20

【表 C - 1】

TABLE C

## 腫瘍性疾病に有用な化学療法剤

部類	薬剤の種類	例	疾病
アルキル化剤	ナイトロジエンマスター	メクロレタミン(クロルメチン, ムスチン, ナイトロジエンマスター, HN <sub>2</sub> ) Mustargen®	ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫 10
		シクロホスファミド(サイトホスファン) Cytoxan®, Neosar®, Revimmune®	急性および慢性リンパ性白血病, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 多発性骨髄腫, 神経芽腫, 乳房, 子宮, 肺, ウイルムス腫瘍, 子宮頸部, 卵巣, 軟部肉腫
		イフオスファミド Mitoxana®, Ifex®	非ホジキンスリンパ腫, 軟部肉腫, 骨肉腫, 睾丸, 乳房, 肺, 子宮頸部, 卵巣, 骨
		メルファラン(L-サルコリシン) Alkeran®	多発性骨髄腫, 乳房, 卵巣, 骨髄腫 20
		チロラムブシル Leukeran®	慢性リンパ性白血病, 原発性マクログロブリン血症, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 卵巣
	エチレンイミン および メチルメラミン	ヘキサメチルメラミン (アルトレタミン, HMM) Hexalen®	卵巣 30
		チオ TEPA	膀胱, 乳房, 卵巣
	アルキルスルホン酸塩	ブスルファン Myleran®, Busulfex®	慢性顆粒球性白血病
	ニトロソ尿素	カルムスチン BiCNU®	ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 原発性脳腫瘍, 多発性骨髄腫, 悪性骨髄腫, 神経膠腫, 多形神経膠芽腫, 髓芽腫, 星状細胞腫
		ロムスチン(CCNU) CeeNU®	ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 原発性脳腫瘍, 小細胞肺 40

【0794】

【表 C - 2】

部類	薬剤の種類	例	疾病
代謝拮抗薬	トリアジン	セムスチン(メチル-CCNU)	原発性脳腫瘍, 胃, 結腸
		ストレプトゾシン(ストレプトゾトシン) Zanosar®	悪性膵臓インスリノーマ, 悪性カルチノイド
		ダカルバジン(ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド, イミダゾールカルボキサミド) DTIC®, DTIC-Dome®	悪性黒色腫, ホジキンス病, 軟部肉腫, 悪性膵臓インスリノーマ
	メチルヒドラジン誘導体	テモゾロミド Temodar®, Temodal®	星状細胞腫
		プロカルバジン(N-メチルヒドラジン, MIH) Matulane®, Natulan®, Indicarb®	ホジキンス病, 多形神経膠芽腫
	葉酸類似体	メトレキセート(アメトブテリン)	急性リンパ性白血病, 細毛癌, 菌状息肉腫, 乳房, 頭頸部, 肺, 骨肉腫, 神經膠芽腫
		アミノブテリン	白血病
		ペメトレキセド Alimta®	胸膜中皮腫, 非小細胞肺癌, 食道
		ラルチトレキセド Tomudex®	結腸直腸
	ピリミジン類似体	フルオロウラシル(5-フルオロウラシル, 5-FU, フルオロウラシル, フルオロデオキシリジン) Efudex®, Carac®, Fluoroplex®, フロクスウリジン(プロドラッグ) FUDR®	乳房, 結腸, 胃, 脳臓, 卵巣, 頭頸部, 泌尿器, 膀胱, 前癌性皮膚病変(局所)

10

20

30

【0795】

【表 C - 3】

部類	薬剤の種類	例	疾病
プリン類似体および関連阻害剤		シタラビン(シトシンアラビノシド, ara C) Cytosar-U®, Tarabine PFS®, Depocyt® カペシタビン(プロドラッグ) Xeloda®	急性顆粒球性および急性リンパ性白血病, 非ホジキンスリンパ腫
		ゲムシタビン Gemzar®	肺臓, 膀胱, 乳房, 食道および非小細胞肺癌, リンパ腫
		チオグアニン [thioguanine](チオグアニン[tioguanine], 6-チオグアニン[thioguanine]; TG)	急性顆粒球性, 急性リンパ性, 慢性顆粒球性および慢性骨髄性白血病
		ペントスタチン(2-デオキシコホルマイシン)	ヘアリーセル白血病, 菌状息肉腫, 慢性リンパ性白血病
		メルカプトプリン(6-メルカプトプリン, 6-MP) Purinethol®	急性リンパ性, 急性顆粒球性および慢性顆粒球性白血病, 非ホジキンスリンパ腫
		クラドリビン(2CDA) Leustatin®	ヘアリーセル白血病, B細胞白血病, リンパ腫
		クロファラビン Clolar®, Evoltra®	急性リンパ性白血病, 急性骨髓性白血病, 若年性骨髓単球性白血病
		フルダラビン(リン酸フルダラビン) Fludara®	血液系腫瘍
ビンカアルカロイド		ビンプラスチン(VLB)	ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 乳房, 精巣, 非小細胞肺癌
		ビンクリスチン Oncovin®	急性リンパ性白血病, 神経芽腫, ウイルムス腫瘍(腎芽腫), 横紋筋肉腫, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 小細胞肺
		ビンデシン Eldisine®	白血病, リンパ腫, 黒色腫, 乳房, 肺

10

20

30

【0796】

【表 C - 4】

部類	薬剤の種類	例	疾病
天然物	ポドフィロトキシン エピポドフィロトキシン	ビノレルビン Navelbine®	乳房, 非小細胞肺
		エトポシド(リン酸エトポシド) Eposin®, Etopophos®, Vepesid®, VP-16®	精巣, 小細胞肺および他の肺, 乳房, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 急性顆粒球性白血病, カポジ肉腫, 多形神経膠芽腫
		テニポシド Vumon®, VM-26®	急性リンパ性白血病
	アントラサイクリン系 抗生物質 (アントラサイクリン)	ダウノルビシン(ダウノマイシン, ルビドマイシン) Cerubidine®	急性顆粒球性および急性リンパ性白血病, 神経芽腫
		ドキソルビシン(ヒドロキシダウノルビシン, アドリアマイシン) Rubex®, Doxil®	軟部組織, 骨原性およびその他の肉腫, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 急性白血病; 乳房, 尿生殖器, 肺, 胃, 卵巣, 甲状腺, 膀胱, 神経芽腫, 多発性骨髄腫
		エピルビシン Ellence®, Pharmorubicin®, Ebewe®	乳房, 卵巣, 胃, 肺; リンパ腫
		イダルビシン(4-デメトキシダウノルビシン) Zavedos®, Idamycin®	急性骨髓性白血病
		バルルビシン(N-トリフルオローアセチル-アドリアマイシン-14-バレラート) Valstar®	膀胱
	アントラセンジョン	ミトキサントロン	急性顆粒球性白血病, 乳房, 非ホジキンスリンパ腫
		ピクサントロン	乳房, 非ホジキンスリンパ腫
	ポリペプチドおよび ペプチド抗生物質	ブレオマイシン Blenoxane®	精巣, 頭頸部, 皮膚, 食道, 肺および泌尿生殖器管, ホジキンス病, 非ホジキンスリンパ腫, 扁平上皮癌

10

20

30

40

【0797】

【表 C - 5】

部類	薬剤の種類	例	疾病
抗腫瘍薬	抗メチオニン合成酵素阻害剤	アクチノマイシン-D Dactinomycin®	絨毛癌, ウイルムス腫瘍, 横紋筋肉腫, 精巣, カポジ肉腫
		プリカマイシン(ミトラマイシン) Mithracin®	精巣, 悪性高カルシウム血症
		マイトマイシン(マイトマイシンC)	胃, 子宮頸部, 結腸, 乳房, 脾臓, 膀胱, 頭頸部, 食道
	酵素	L-アスパラギナーゼ Elspar®	急性リンパ性白血病, マスト細胞腫
細胞骨格破壊剤	生物応答修飾	インターフェロンアルファ(IFN α) ペグ化インターフェロン Multiferon®, Roferon®, Pegasys®, IntronA®, PegIntron®	ヘアリーセル白血病, カポジ肉腫, 黒色腫, カルチノイド, 腎細胞, 卵巣, 膀胱, 非ホジキンスリンパ腫, 菌状息肉腫, 多発性骨髄腫, 慢性顆粒球性白血病
		タキソール(パクリタキセル) Abraxane®	乳房, 卵巣, 肺, 頭頸部, カポジ肉腫
	タキサン	ドセタキセル Taxotere®	乳房, 卵巣, 肺, 結腸直腸, 卵巣, 胃, 脾臓, 前立腺, 肝臓, 頭頸部, 黒色腫
		コンプレタスタチン A-4 CA-4-P	甲状腺
抗がん薬	白金配位錯体	シスプラチン[cisplatin] (cis-DDP, シスプラチニン [cisplatin])	精巣, 卵巣, 膀胱, 頭頸部, 肺, 甲状腺, 子宮頸部, 子宮内膜, 神経芽腫, 骨肉腫, リンパ腫
		カルボプラチン Paraplatin®	卵巣, 肺, 頭頸部
		オキサリプラチン Eloxatin®, Oxaliplatin Medac®	結腸直腸
	カントンテシソ	トポテカン Hycamtin®	卵巣, 肺
		イリノテカン(CPT-11) カントナー	結腸

【表 C - 6】

部類	薬剤の種類	例	疾病	
他の薬剤	置換尿素	ヒドロキシウレア(ヒドロキシカルバミド)	慢性顆粒球性白血病, 真性多血症, 本態性血小板増加症, 悪性黒色腫	
	副腎皮質性	ミタン( <i>o,p'</i> -DDD) Lysodren®	副腎皮質	
	ステロイド抑制剤	アミノグルテチミド Cytadren®	乳房	
	チロシンキナーゼ阻害剤	アキシチニブ	乳房, 腎細胞癌, 脾臓	
		ダサチニブ (BMS-354825) Sprycel®	慢性骨髓性白血病, 急性リンパ性白血病, 転移性黒色腫	
		エルロチニブ (OSI-774) Tarccea®	非小細胞肺癌, 脾臓	
		ゲフィチニブ (ZD1839) Iressa®	非小細胞肺癌	
		イマチニブ (CGP57148B または STI-571) Gleevec®, Glivec®	慢性骨髓性白血病, 胃腸管	
		ラパチニブ (GW572016) Tykerb®, Tyverb®	乳房	
		ソラフェニブ Nexavar®	腎細胞癌, 肝細胞癌	
		スニチニブ(SU11248) Sutent®	腎細胞癌, 胃腸管, 非小細胞肺癌, 乳房	
受容体チロシンキナーゼ	セツキシマブ (抗 EGFR) Erbtitux®	結腸直腸, 頭頸部	10	
		パニツムマブ (抗 EGFR) Vectibix®	結腸直腸	20
			30	

【0799】

【表 C - 7】

部類	薬剤の種類	例	疾病
CD20		トラツズマブ (抗 HER2/neu, erbB2 受容体) Herceptin®	乳房, HER2/neu 癌
		リツキシマブ Rituxan®, MabThera®, Reditux®	非ホジキンスリンパ腫, B細胞白血病
		トシツモマブ (抗 CD20- <sup>131</sup> I) Bexxar®	濾胞性リンパ腫, 非ホジキンスリンパ腫
		アレムツズマブ (抗 CD52) Campath®	慢性リンパ性白血病(CLL), T細胞リンパ腫
		ペバシズマブ (抗 VEGF) Avastin®	結腸, 非小細胞肺癌, 乳房, 腎細胞癌, 多形神経膠芽腫, ホルモン難治性前立腺癌, 膀胱
アデノコルチコステロイド		ゲムツズマブ (抗 CD33 カリチアマイシン) Mylotarg®	急性骨髓性白血病
	アデノコルチコステロイド	プレドニゾン	急性および慢性リンパ性白血病, 非ホジキンスリンパ腫, ホジキンス病, 乳房, 多発性骨髄腫
	プロゲスチン	カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン 酢酸メドロキシプロゲステロン 酢酸メgestrol Megace®	子宮内膜, 乳房
	エストロゲン	ジエチルスチルベストロール エチニルエストラジオール Estramustine® (メクロレタミン誘導体)	乳房, 前立腺
	抗エストロゲン	タモキシフェン Nolvadex®, Istubal®, Valodex®	乳房

10

20

30

40

【0800】

【表 C - 8】

部類	薬剤の種類	例	疾病
	アンドロゲン	プロピオニ酸テストステロン フルオキシメステロン (ハロチスチン)	乳房
	抗アンドロゲン	フルタミド(フルタミン) Eulexin®	前立腺
	ゴナドトロピン放出ホルモン類似体	リューブロリド Lupron®, Lupron Depot®, Viadur®, Eligard®, Prostap®	前立腺、乳房

## G 2 . 抗血管新生

正常な生理状態の下では、ヒトまたは動物は、極めて特異的に制限された状況のみにおいて血管新生がなされる。例えば、血管新生は、創傷治癒、胎児や胚の発生、および黄体、子宮内膜および胎盤の形成において、正常に観察される。制御されていない（持続的および／または無秩序な）血管新生は、種々の疾患状態に関連し、腫瘍の転移の間ににおいて発生する。

## 【0801】

制御された血管新生も制御されていない血管新生も、何れも、同様に進行するものと考えられている。内皮細胞および周皮細胞は、基底膜に囲まれているものであり、毛細血管を形成するものである。血管新生は、内皮細胞および白血球によって放出される酵素により基底膜の浸食で始まる。内皮細胞は、血管の内腔に整列し、基底膜を介して突出している。血管新生の刺激物は、内皮細胞を誘導して、浸食された基底膜から遊走する。この遊走している細胞は、元の血管から「芽」を形成し、ここでは、内皮細胞は、有糸分裂および増殖を経る。内皮の芽は、互いに融合し、ループ状毛細血管を形成し、さらに、新規の血管を創出する。

## 【0802】

本願の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、1 以上の抗血管新生と組み合わせて使用されてもよい。その他の中和抗体 (Kim et al., 1992; Presta et al., 1997; Sioussat et al., 1993; Kondo et al., 1993; Asano et al., 1995; Hurwitz et al., 2004)、可溶型受容体構成物 (Kendall and Thomas, 1993; Aiello et al., 1995; Lin et al., 1998; Millauer et al., 1996)、チロシンキナーゼ阻害剤 (Siemeister et al., 1998)、V E G F または V E G F 受容体に対する、アンチセンス戦略、R N A アプタマーおよびリボザイム (Saleh et al., 1996; Cheng et al., 1996；何れも参照により本願明細書に援用される。) のような、V E G F を阻害する他の薬剤との組み合わせも含まれる。参照により本明細書に特に援用されるものであるが WO 98/16551 において記載されているように、アンタゴニスト特性を有する V E G F 変異体も使用されてもよい。

## 【0803】

抗血管新生治療は、血管新生阻害剤の提供またはアンタゴニスト剤の阻害に基づくものであってもよい。アンタゴニスト剤の阻害は、V E G F を阻害する 1 以上の方法によって達成されてもよく、中和抗体、可溶型受容体構造物、低分子阻害剤、アンチセンス、R N A アプタマーおよびリボザイムの全てが採用されてもよい。例えば、参照により本明細書に特に援用される、米国特許第 5,520,914 号において記載されているように、アンギオジェニンに対する抗体は用いられてもよい。F G F が血管形成に関連するという点では、F G F 阻害剤も使用されてもよい。一例としては、アルカラン硫酸のようなグルコサミノグリカンを含めた、主要な繰返し単位としての 2-O- 硫酸化ウロコン酸の配列を変

10

20

30

40

50

更したN-アセチルグルコサミンを有する化合物である。このような化合物は、参照により本明細書に特に援用される米国特許第6,028,061号に記載され、本発明にて組み合わされて使用されてもよい。

#### 【0804】

種々の疾患状態にて明らかにされているような血管新生の治療に有益な無数のチロシンキナーゼ阻害剤が現在知られている。これらの阻害剤としては、例えば、参照により本明細書に特に援用される米国特許第5,639,757号の4-アミノピロロ[2,3-d]ピリミジンが挙げられ、本発明と組み合わされて使用されてもよい。

#### 【0805】

VEGFR2受容体を介したチロシンキナーゼ情報伝達を調節することができる有機分子の更なる例としては、米国特許第5,792,771号のキナリゾン化合物およびその組成物が挙げられ、この特許文献は、特に、血管新生疾病の治療における本発明とともに使用するための更なる組み合わせを説明する目的で、参照により本明細書に援用される。

10

#### 【0806】

その他の化学品クラスの化合物も、血管新生を阻害することを示し、本発明と組み合わせて使用されてもよい。例えば、参照により本明細書に特に援用される米国特許第5,972,922号において記載されているような、血管新生抑制性の、4,9(11)-ステロイドおよびC21酸素化ステロイドのようなステロイド複合治療において使用される。米国特許第5,712,291号および第5,593,990号は、何れも参照により本明細書に特に援用される、サリドマイドおよび関連物質、前駆体、類似体、代謝物および加水分解物について記載されており、これらは、血管新生を阻害するために、本発明と組み合わされて使用されてもよい。米国特許第5,712,291号および第5,593,990号における化合物は、経口的に投与され得る。複合治療に関連して使用される、さらなる典型的な血管新生阻害剤は、表Dにて例示する。ここで例示された各薬剤は、典型的なものであって、決して限定されるものではない。

20

#### 【0807】

【表 D - 1】

TABLE D

血管新生の阻害剤および負の調節因子

物質	参考文献
可溶性 VEGFR1	Shibuya, 2006
可溶性 ニューロピリン-1 (NRP-1)	Gagnon <i>et al.</i> , 2000
アンジオスタチン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1994
エンドスタチン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1997
アンジオポエチン 2	Maisonpierre <i>et al.</i> , 1997
カルレチキュリン	Pike <i>et al.</i> , 1999
バソスタチン	Pike <i>et al.</i> , 1998
バスキュロスタチン	Kaur <i>et al.</i> , 2005
カンスタチン	Kamphaus <i>et al.</i> , 2000
マスピン	Zou <i>et al.</i> , 1994
16kDa プロラクチン 断片	Ferrara <i>et al.</i> , 1991; Clapp <i>et al.</i> , 1993; D'Angelo <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1998
ラミニン ペプチド	Kleinman <i>et al.</i> , 1993; Yamamura <i>et al.</i> , 1993; Iwamoto <i>et al.</i> , 1996; Tryggvason, 1993
フィブロネクチン ペプチド	Grant <i>et al.</i> , 1998; Sheu <i>et al.</i> , 1997
組織メタロプロテイナーゼ阻害剤 (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤 (PAI-1, -2)	Soff <i>et al.</i> , 1995
腫瘍壞死因子 $\alpha$ (高投与量, インビトロ)	Frater-Schroder <i>et al.</i> , 1987
TGF- $\beta$ 1	RayChadhury and D'Amore, 1991; Tada <i>et al.</i> , 1994
インターフェロン (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , $\gamma$ )	Moore <i>et al.</i> , 1998; Lingen <i>et al.</i> , 1998
ELR-CXC ケモカイン: IL-12; IL-4; IL-18; SDF-1; MIG; 血小板第4因子 (PF4); IP-10; CXCL10	Moore <i>et al.</i> , 1998; Hiscox and Jiang, 1997; Coughlin <i>et al.</i> , 1998; Tanaka <i>et al.</i> , 1997
トロンボスponジン (TSP), TSP-1 および TSP-2	Good <i>et al.</i> , 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma <i>et al.</i> , 1993; Sheibani and Frazier, 1995; Volpert <i>et al.</i> , 1998
SPARC	Hasselaar and Sage, 1992; Lane <i>et al.</i> , 1992; Jendraschak and Sage, 1996
2-メキシエストラジオール	Fotsis <i>et al.</i> , 1994

10

20

30

40

【 0 8 0 8 】

【表 D - 2】

物質	参考文献
プロリフェリン関連タンパク質	Jackson <i>et al.</i> , 1994
スラミン	Gagliardi <i>et al.</i> , 1992; Takano <i>et al.</i> , 1994; Waltenberger <i>et al.</i> , 1996; Gagliardi <i>et al.</i> , 1998; Manetti <i>et al.</i> , 1998
サリドマイド	D'Amato <i>et al.</i> , 1994; Kenyon <i>et al.</i> , 1997 Wells, 1998
カルボキシアミドトリアゾール (CAI)	Hussain <i>et al.</i> , 2003
コルチゾン	Thorpe <i>et al.</i> , 1993 Folkman <i>et al.</i> , 1983 Sakamoto <i>et al.</i> , 1986
リノマイド	Vukanovic <i>et al.</i> , 1993; Ziche <i>et al.</i> , 1998; Nagler <i>et al.</i> , 1998
フマギリン (AGM-1470; TNP-470)	Sipos <i>et al.</i> , 1994; Yoshida <i>et al.</i> , 1998
タモキシafen	Gagliardi and Collins, 1993; Lindner and Borden, 1997; Haran <i>et al.</i> , 1994
韓国のヤドリギの抽出物 ( <i>Viscum album coloratum</i> )	Yoon <i>et al.</i> , 1995
レチノイド	Oikawa <i>et al.</i> , 1989; Lingen <i>et al.</i> , 1996; Majewski <i>et al.</i> 1996
CM101	Hellerqvist <i>et al.</i> , 1993; Quinn <i>et al.</i> , 1995; Wamil <i>et al.</i> , 1997; DeVore <i>et al.</i> , 1997
デキサメタゾン	Hori <i>et al.</i> , 1996; Wolff <i>et al.</i> , 1997
白血病阻害因子 (LIF)	Pepper <i>et al.</i> , 1995

血管新生を阻害する際に使用するための特定の好ましい化合物は、アンジオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスプシンである。このような薬剤は、本発明の免疫抱合体に関して上述されたものであるが、非接合型の形態とともに組み合わされて使用されてもよい。

## 【0809】

バクテリアポリサッカリド CM101 および抗体 LM609 を含めた特定の抗血管新生治療では、腫瘍退行を引き起こすことが示されている。CM101 は、腫瘍における血管新生の炎症を誘導する能力において性状がよく調べられた、バクテリアのポリサッカリドである。CM101 は、補体系の活性化を刺激する、脱分化内皮にて発現した受容体に結合および架橋する。このことは、選択的に腫瘍に指向されたサイトカイン誘導性炎症反応を開始するものである。CM101 は、他に類を見ない、VEGF およびその受容体の発現を負の制御をする抗病理的血管新生薬剤である。CM101 は、現時点では抗癌剤としての臨床試験段階であり、本発明との組み合わせで使用され得る。

## 【0810】

トロンボスポンジン (TSP-I) および血小板第4因子 (PF4) も本発明と組み合わせて使用されてもよい。これらは、両方とも、ヘパリンと接合し、血小板顆粒にて見られる血管新生阻害剤である。TSP-I は、細胞外マトリックスの構成物である、大きな 450kDa のマルチドメインの糖蛋白質である。TSP-I は、HSPG、フィブロネクチン、ラミニンおよび異なる型のコラーゲンを含めた、細胞外マトリックスに見られる多くのプロテリオグリカン分子に結合する。TSP-I は、インビトロで内皮細胞の遊走および増殖を、インビトロで血管形成を阻害する。TSP-I は、形質転換した内皮細胞の悪性表現型および腫瘍形成を抑制する。癌抑制遺伝子 p53 は、p53 活性の欠損は、TSP-I 産生の劇的な減少および、血管新生が開示された腫瘍細胞において同時発生的な増加を引き起こすように、TSP-I を直接的に制御することが示されている。

10

20

30

40

50

## 【0811】

P F 4 は、70aaのタンパク質である。インビトロで内皮細胞増殖を、インビボで血管新生を充分に阻害する、ケモカインのCXC E L R - ファミリーのメンバーである。腫瘍内に投与された、またはアデノウイルスベクターにより送達された、P F 4 は、腫瘍増殖の阻害を引き起こすことができる。

## 【0812】

インターフェロンおよびメタロプロテイナーゼ阻害剤は、本発明と組み合わされ得る、天然の血管新生性阻害剤の2つのその他のクラスである。インターフェロンにおける抗内皮活性は、1980年代初頭から知られているが、阻害の機構は依然として明確でない。これらは、内皮細胞の遊走を阻害できること、および、おそらく腫瘍細胞による血管新生のプロモータの産生を阻害する能力で介在された、インビボで内皮細胞がある程度の抗血管新生活性を有することは知られている。血管腫瘍は特に、インターフェロンに対して感度があり、例えば、増殖する血管腫は有意に、IFN で上手く処置される。

10

## 【0813】

組織メタロプロテイナーゼ阻害剤 (T I M P) は、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) に対する天然の阻害剤のファミリーであって、血管新生も阻害でき、複合治療のプロトコールにおいて使用され得るものである。血管網の伸長またはリモデリングの際に、内皮細胞および纖維芽細胞が遊走するマトリックスを分解することから、MMPは、血管新生過程においてキーとなる役割を担い、実際、MMP-2のメンバーは、おそらくこの目的で、インテグリン  $\alpha$  3を介して活性化内皮に接合することが示されている。この相互作用は、MMP-2のフラグメントによって破壊されて、血管新生が負に制御されて、腫瘍における増殖が阻害される。

20

## 【0814】

血管新生を阻害する多くの薬学的な薬剤があり、何れも、本発明と組み合わされて使用されてもよい。これらは、AGM-1470/TNP-470、サリドマイド、およびカルボキシアミドトリアゾール (CAI) が挙げられる。フマギリンは、1990年において血管新生の有力な阻害剤であることが知られ、フマギリンの合成類似体であるAGM-1470およびTNP-470も開発されている。これらの薬剤の両方とも、インビトロで内皮細胞の増殖を、インビボで血管新生を阻害する。TNP-470は、長期間投与が好適であることを示唆するデータを伴った、ヒトの臨床試験で充分に研究されている。

30

## 【0815】

サリドマイドは元々、鎮痛剤として使用されたが、強力な催奇形性剤であることが分かり、廃止されている。1994年では、サリドマイドは血管新生阻害剤であることが分かった。サリドマイドは、現在抗癌剤として、さらには血管性眼病の処置において、臨床試験段階である。

## 【0816】

CAIは、アクチン再構成、内皮細胞の遊走およびコラーゲンIVの展開を防止する、カルシウムチャネルの阻止剤として作用する、低分子の血管新生の合成阻害剤である。CAIは、生理学的に受け入れ可能な濃度において血管新生を阻害し、癌患者の経口的に許容される。CAIでの臨床試験は、治療前は進行性疾病を有していた癌患者の49%において、疾患の安定化を生じせしめた。

40

## 【0817】

ヘパリンまたはヘパリンフラグメントの存在下で、コルチゾンは、内皮細胞の増殖を阻止することで、マウスにおける腫瘍の増殖を阻害することが示された。ステロイドおよびヘパリンの相加的な阻害効果に関する機構は明確ではないが、ヘパリンは内皮細胞によるステロイドの吸収を向上させることが考えられる。この混合物は、新規に形成された毛細血管下の基底膜の溶解を向上させることを示しており、このことは、相加的な血管新生抑制性効果の可能性がある説明もある。ヘパリン-コルチゾール接合体も、インビボで、有力な血管新生抑制性効果および抗腫瘍効果活性を有する。

## 【0818】

50

更なる具体的な血管新生の阻害剤としては、これらに限定されないが、抗襲侵因子、レチノイン酸およびパクリタキセル（米国特許第5,716,981号；参照により本明細書に特に援用される。）；AGM-1470（Ingber et al., 1990；参照により本明細書に特に援用される。）；サメ軟骨抽出物（米国特許第5,618,925号；参照により本明細書に特に援用される。）；非イオン性ポリアミドまたはポリ尿素のオリゴマー（米国特許第5,593,664号；参照により本明細書に特に援用される。）；オキシンドール誘導体（米国特許第5,576,330号；参照により本明細書に特に援用される。）；エストラジオール誘導体（米国特許第5,504,074号；参照により本明細書に援用される。）；およびチアゾールピリミジン誘導体（米国特許第5,599,813号；参照により本明細書に援用される。）が挙げられ、本発明の組み合わされての使用のための抗血管新生性組成物としての使用が考慮される。

10

## 【0819】

$\text{v}_3$ インテグリンのアンタゴニストを含む組成物も、血管新生を阻害するために、本発明と組み合わされて使用されてもよい。米国特許第5,766,591号（参照により本明細書に援用されるものであるが、）に記載されているように、環状ポリペプチドを含む、RGD含有ポリペプチドおよびその塩は、 $\text{v}_3$ インテグリンアンタゴニストの好適例である。

## 【0820】

$\text{v}_3$ インテグリンに対するLM609抗体も、腫瘍の退行を誘導する。LM609のようなインテグリン $\text{v}_3$ アンタゴニストは、休眠している血管に影響を与えないでいる血管形成性の内皮細胞のアポトーシスも誘導する。LM609またはその他の $\text{v}_3$ アンタゴニストも、 $\text{v}_3$ の相互作用を阻害して作用し、内皮細胞および纖維芽細胞の遊走に重要な役割を担うと考えられる蛋白質分解酵素であるMMP-2との相互作用を阻害することで作用する。米国特許番号5,753,230は、血管形成阻害するために、本発明と組み合わされる、 $\text{v}_3$ （ビトロネクチン $\text{v}_3$ ）に対する抗体を説明するために、参照により本明細書に援用される。

20

## 【0821】

この場合における、血管形成性の内皮のアポトーシスは、血管網の残部において、カスケード効果を有するのかもしれない。腫瘍の血管網に、拡大するための腫瘍のシグナルに対して完全に応答しないよう阻害することは、実際、腫瘍細胞死および腫瘍容積の減少の結果となるような血管網の部分的または全体的な崩壊を開始する。エンドスタチンおよびアンジオテンシンは、同様に機能する可能性がある。LM609は、休眠している血管に作用しないが、腫瘍の退行を引き起こすことができるという事実は、腫瘍の全ての血管が、抗腫瘍効果を得るために、処置に指向される必要はないことを強く示唆している。

30

## 【0822】

Tie2受容体を介して情報伝達を変更することに基づいた、その他の治療的介入の方法も、例えば、Tie2活性化を阻止できる可溶型のTie2受容体を使用するような方法（Lin et al., 1998）も、本発明と組み合わされて使用され得る。組換えアデノウイルス遺伝子治療を用いた構造物の送達は、癌を治療し、転移を低減する点で有効であることが示されている（Lin et al., 1998）。

40

## G3. アポトーシス誘導剤

VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の治療剤も、アポトーシスを誘導する方法と有利に組み合わされてもよい。種々のアポトーシス誘導剤は本発明の免疫抱合体に関連して記載されている。このようなアポトーシス誘導剤は、本発明の抗体と結合していないで、本発明と組み合わせて使用されてもよい。

## 【0823】

免疫抱合体として上述されたアポトーシス誘導剤とは別に、アポトーシスすなわちプログラム細胞死を示す多くのがん遺伝子が同定されている。

## 【0824】

この分類における典型的な癌遺伝子は、これらに限定されないが、bcr-abl、b

50

c 1 - 2 ( b c 1 - 1、c y c 1 i n D 1 とは区別される。; G e n B a n k アクセッショ  
ン番号 M 1 4 7 4 5 , X 0 6 4 8 7 ; 米国特許第 5 , 6 5 0 , 4 9 1 号 ; および第 5  
, 5 3 9 , 0 9 4 号 ; 何れも参照により本願明細書に援用される。) および、B c 1 - x  
1 、M c M 、B a k 、A 1 、A 2 0 を含めたファミリーメンバーが挙げられる。b c 1 -  
2 の過剰発現は、初めに T 細胞リンパ腫において発見された。b c 1 - 2 は、癌遺伝子と  
しての B a x 、つまりアポトーシス経路におけるタンパク質に結合し、不活性化するこ  
とで機能する。b c 1 - 2 機能の阻害は、B a x 不活性化を防止して、アポトーシス経路の  
進行を可能にする。

## 【 0 8 2 5 】

癌遺伝子のこのクラスの阻害、例えば、アンチセンスヌクレオチド配列を使用した阻害  
は、本発明における使用を考慮され、アポトーシスを向上させるものである（米国特許第  
5 , 6 5 0 , 4 9 1 号；第 5 , 5 3 9 , 0 9 4 号；および第 5 , 5 8 3 , 0 3 4 号；何れ  
も参照により本願明細書に援用される。）。

10

## 【 0 8 2 6 】

G 4 . 抗毒素およびコアギュリガンド

本発明に係る治療方法は、例えば、抗体またはリガンドなどの標的部分が、腫瘍細胞、  
腫瘍の血管系または腫瘍間質の相対的に特異的なマーカーに向わされる抗毒素および / また  
は凝固リガンドと組み合わされて使用されてもよい。上記にて議論したように、化学療法  
および血管新生阻害剤と共に、標的化毒素または凝固剤との組み合わされた使用は  
、一般的に、相加的な（相加的效果以上に顕著に大きい）、または相乗的な、抗腫瘍効果  
を示す。

20

## 【 0 8 2 7 】

概して、これらの本発明の付加的な側面において使用される抗体またはリガンドは、好  
ましくは、優先的にまたは特異的に腫瘍部位にて発現された接近可能な腫瘍抗原を認識す  
る。抗体またはリガンドは、好ましくは、高い親和性の特性を示し、抗体、リガンドまたは  
その接合体は、インビボで、ヒトにおける、心臓、腎臓、脳、肝臓、骨髄、直腸、乳房  
、前立腺、甲状腺、胆嚢、肺、副腎、筋肉、神經線維、脾臓、皮膚、その他の生命を維持  
するための器官または組織から選択される 1 以上の組織のような、生命を維持するための  
正常組織に対して有意な副作用を発揮するものではない。ここで使用されるような、「有  
意な副作用」との用語は、抗体、リガンドまたは抗体接合体が、インビボで投与された場  
合、化学療法の間に普通に直面するような、無視できる副作用、あるいは臨床的に対処可  
能な副作用だけを生じることを指す。

30

## 【 0 8 2 8 】

本発明と組み合わされて使用される、これらの二次的な抗癌剤の少なくとも 1 つの結合  
領域は、腫瘍部位に毒素または凝固因子を送達すること、すなわち腫瘍部位内に局在化を  
可能にする構成である。このような指向性を有する薬剤は、腫瘍細胞、腫瘍の血管系または  
腫瘍間質の構成に向かうものである。この指向性を有する薬剤、一般的に腫瘍細胞、腫  
瘍血管系または腫瘍間質における、表面に発現した、表面に接近可能な、または表面に局  
在した構成に結合する。しかしながら、一旦、腫瘍血管系および腫瘍細胞の破壊が始まると、  
内部の構成が放出されて、実質的にどのような腫瘍の構成に対しての、標的化も許容  
してしまう。

40

## 【 0 8 2 9 】

多くの腫瘍細胞抗原は説明されているが、これらは、本発明の組み合わされた側面に関  
連して、標的として用いられ得る。追加される抗毒素および凝固リガンドが標的にするた  
めの、適切な腫瘍細胞抗原としては、B 3 (米国特許第 5 , 2 4 2 , 8 1 3 号；参照によ  
り本明細書に援用される；A T C C H B 1 0 5 7 3 ) ; K S I / 4 (米国特許第 4 ,  
9 7 5 , 3 6 9 号) 、参照により本明細書に援用される；N R R L B - 1 8 3 5 6 および  
/ または N R R L B - 1 8 3 5 7 のベクターを含む細胞から得られたもの；2 6 0 F 9 (A T C C  
H B 8 4 8 8 ) ; D 6 1 2 (米国特許第 5 , 1 8 3 , 7 5 6 号；参照により  
本明細書に援用される；A T C C H B 9 7 9 6 ) によって認識されるものが挙げられ

50

る。抗腫瘍細胞抗体を産生する適切な細胞株を認定するために、ATCCカタログを参考にしてもよい。

#### 【0830】

腫瘍血管系を標的とするためには、標的抗体またはリガンドは、しばしば、脈管が形成された腫瘍における、腫瘍内の血管に、発現している、吸着された、誘導されたあるいは局在化したマーカーに結合するものである。適切に発現した標的分子としては、例えば、エンドグリン、E-セレクチン、P-セレクチン、VCAM-I、ICAM-I、PSMA (Liu et al., 1997)、TIE、LAM-Iと反応するリガンド、VEGF/VPF受容体、FGF受容体、 $\alpha_3$ インテグリン、プライオトロピンおよびエンドシアリンが挙げられる。適当な吸着された標的としては、VEGF、FGF、TGF、HGF、PF4、PDGF、TIMP、TIEに結合するリガンドおよび腫瘍関連のフィブロネクチンアイソフォームが挙げられる。ELAM-I、VCAM-I、ICAM-I、LAM-Iに反応するリガンド、エンドグリンおよびMHCクラスII (例えばIL-I、TNF-、IFN-、IL-4および/またはTNF-などの、サイトカイン誘導性)；E-セレクチン、P-セレクチン、PDGFおよびICAM-I (トロンビン、第IX/Da因子、第X/Xa因子および/またはプラスミンなどの凝固剤誘導性)のような、天然におよび人工的にサイトカインおよび凝固剤によって誘導された抗原が標的化されてもよい。

10

#### 【0831】

以下の特許文献は、腫瘍血管系の、発現した、吸収された、誘導された、または局在化したマーカーに対して向かう抗毒素の調製物および使用に関する、本明細書の教示を更に補足する目的で、参照により本明細書に特に援用される。：米国特許第6,093,399号；第5,855,866号；第5,965,132号；第6,051,230号；第6,004,555号；第5,877,289号；第6,004,554号；第5,776,427号；第5,863,538号；第5,660,827号および第6,036,955号。

20

#### 【0832】

更なる腫瘍血管系を標的とする組成物および方法は、近年、腫瘍血管の、接近可能かつ特異的なマーカーであることが発見されたホスホファチジルセリンおよびホスホファチジルエタノールアミンのようなアミノリン脂質を標的とするものが挙げられる。抗アミノリン脂質抗体の単独投与は、血栓形成および腫瘍退行を誘導するのに充分である。本発明は、このように、非接合型の、抗ホスホファチジルセリン抗体および/または抗ホスホファチジルエタノールアミン抗体抗体、もしくはこのような抗体の免疫抱合体が使用され得る。

30

#### 【0833】

以下の特許文献は、抗アミノリン脂質抗体および抗毒素の調製物および使用に関する、本明細書の教示を更に補足する目的で、参照により本明細書に特に援用される；米国特許第6,406,693号；第6,312,694号；第6,783,760号；第6,818,213号；および第7,067,109号。また、米国特許第6,312,694号；第6,783,760号；第6,818,213等；および第067,109等は、毒素および凝固剤を腫瘍の血管に送達すること、および血栓形成や腫瘍退行を誘導することに使用されるための、アネキシン接合体のようなアミノリン脂質結合タンパク質接合体の使用に関する本明細書の教示を更に補足するために、さらに、参照により本明細書に援用されるものである。

40

#### 【0834】

好適な腫瘍間質の標的としては、腫瘍の細胞外マトリックスまたは間質の構造、もしくはこれらに結合している構造が挙げられ、例えば、基底膜マーカー、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテリオグリカン、フィブロネクチン、活性化血小板、LIBSおよびテナシンが挙げられる。このような使用に好適な標的はREBSである。

#### 【0835】

50

以下の特許文献は、腫瘍間質を標的とする薬剤の調製物および使用に関する本明細書の教示を更に補足するために、参照により本明細書に特に援用されるものである：米国特許第6,093,399号；第6,004,555号；第5,877,289号；および第6,036,955号。

#### 【0836】

第2の抗ガン治療は、VEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体または、抗毒素に基づいたVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体においての使用のために、細胞毒性剤あるいは、本明細書にて記載された抗細胞活性剤の何れかに動作可能に付着することができる。しかしながら、好適な抗細胞活性剤も放射性同位体を含む。リシンのA鎖および脱グリコシル化A鎖(dgA)のような毒性部位は、好ましいものである。

10

#### 【0837】

本発明との適切な使用のための使用第二の標的化薬剤は、凝集化を促進することができる標的化構成、すなわち凝固リガンドを含んでいてもよい。ここで、標的抗体またはリガンドは、直接的にまたは、例えば、別の抗体を介して間接的に、VEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体または凝固リガンドに基づくVEGFR2-ブロッキング、抗VEGF抗体において使用されるための、本明細書にて説明されたものを含む、直接的にまたは間接的に凝固を刺激する別の因子に結合されていてもよい。このような使用のための好適な凝固因子は、切り詰められたTF(tTF)，二量体型および多量体型のTFおよび、第VII因子を活性化する能力を欠陥した変異型TFのような、組織因子(TF)およびTF誘導体である。

20

#### 【0838】

癌の治療において組み合わされて使用されるための抗毒素および凝固リガンドの有効投与量は、週に約一回の頻度でIV経路を介して投与される場合、約0.1mg/kgと約2mg/kgとの間、好ましくは約0.8mg/kgと約1.2mg/kgとの間である。

#### 【0839】

投与量における一部の変更は、治療される対象の症状に応じて、必然的に起こり得る。投与を担当する内科医ならば、個々の対象に適切な投与量を決定できよう。

#### 【0840】

##### G5.TLRアゴニスト

30

To11様受容体(TLR)を介した情報伝達は、弱毒化された豚コレラ菌、BCGおよびタキソールを含めた公知の抗癌剤の効果に寄与し、それぞれTLR4を活性化することが、今や確立されている。実際、TLR4情報伝達は、化学療法および放射線治療における抗がん効果に寄与する(Apetoh et al., 2007)。特定の公知の抗癌剤の作用機構の更なる理解と同様に、TLR情報伝達の重要性の認識も、TLRを活性化することで機能する新規の癌治療を促進してきた。

#### 【0841】

従って、本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、癌治療において、TLRを介した情報伝達を促進する1以上の薬剤と、すなわち、1以上のTLRアゴニストと組み合わされて使用されてもよい。少なくとも第1のTLRアゴニストは、本発明のヒト抗体に動作可能に付着され、免疫抱合体の項において本明細書で記載されたような、治療接合体を形成するものであってもよい。以下のまたはその他のTLRアゴニストも本発明の複合的な癌治療において使用されてもよい。

40

#### 【0842】

適当なTLRアゴニストとしては、TLR1～TLR1の何れかのアゴニストが挙げられ、好ましくは、TLR1、TLR2、TLR4、TLR7、TLR8またはTLR9が挙げられ、最も好ましくは、TLR4、TLR7、TLR8またはTLR9が挙げられる。TLR1/TLR2アゴニストとしては、例えばOspAのリポタンパク質、およびトリアシル化リポペプチドが挙げられ、TLR2アゴニストとしては、バクテリアリポタンパク質、LAM、MALP-2、GPI、糖タンパク質およびポーリンが挙げられる。

50

## 【0843】

T L R 4 アゴニストの特定の例としては、5 D 2 4 . D 4 (Cohen et al., 2003) と称されるアゴニスト性の抗 T L R 4 抗体、L P S、リピッドA およびその誘導体が挙げられ、モノホスホリリピッドA (M P L) およびM P L類似体は、現時点では好適なものである。A G Pとして知られているM P L類似体は、本発明と組み合わされて、合成T L R 4 アゴニストとして使用されてもよい (Alderson et al., 2006)。T L R 4 およびC D 1 4 を介する情報伝達を促進するアゴニストとしては、タキソール、パクリタキセル、フルボリピンおよびG I P Lと同様に、リピッドA、M P L およびM P L類似体が挙げられる。T L R 4 アゴニストOK - 4 3 2 およびOK - P S Aは、子宮頸癌および非小細胞肺上皮性悪性腫瘍を処置するために使用されている。

10

## 【0844】

T L R 7 アゴニストは、イミキモド、レシキモドおよびイサトリビンが挙げられ (Finberg et al., 2005; Horsmans et al., 2005)、イミキモドは、基底細胞の上皮性悪性腫瘍を治療するための使用が認可されているものである。その他のT L R 7 アゴニストとしては、ガルジキモド、ロキソリビンおよびプロピリミンが挙げられる。レシキモドも、T L R 8 のアゴニストである。C p Gのような、T L R 9 アゴニストも非小細胞肺上皮性悪性腫瘍、非ホジキンスリンパ腫、腎細胞の上皮性悪性腫瘍および結腸直腸癌において使用される。

20

## 【0845】

## G 6 . A D E P T およびプロドラッグ治療

本発明のV E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体は、プロドラッグに関連して使用されてもよく、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗V E G F 抗体は、プロドラッグ活性化酵素のようなプロドラッグ活性化成分に動作可能に結合して、前記抗体との接触で、プロドラッグをより活性化した形態に転換する。この技術は一般的に、「A D E P T」と称されており、例えば、それぞれ参照により本明細書に特に援用されるWO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143および米国特許第4, 975, 278号および第5, 658, 568号において記載されている。

30

## 【0846】

本明細書で使用される「プロドラッグ」との用語は、プロドラッグが基づく親薬剤と比較して、腫瘍血管内皮細胞を含めた標的細胞における細胞毒性または抗細胞効果を低減させた生物学的または薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体を指す。好ましくは、プロドラッグ、すなわち前駆体は、「ネイティブ体」すなわち親の形態と比較して、有意に低減された、好ましくは無視できる程度の、細胞毒性または抗細胞効果を発揮する。「プロドラッグ」は活性化または変換して、該薬剤の親の形態よりも活性化されたものを生み出すことができる。

30

## 【0847】

プロドラッグを作製および使用の技術的な可能性は、当業者の範囲において存在するものである。Willman et al. (1988) や、Stella およびHimmelstein (1985) は、種々のプロドラッグの作製方法および使用する方法に関する記載および教示を更に補足する目的でそれぞれ参照により本明細書に特に援用される。本発明の内容において使用されてもよい典型的なプロドラッグ構造物としては、限定されないが、リン酸含有プロドラッグ (米国特許第4, 975, 278号)、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチドに基づくプロドラッグ (米国特許第5, 660, 829号; 第5, 587, 161号; 第5, 405, 990号; WO 97/07118)、D - アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシリ化プロドラッグ (米国特許第5, 561, 119号; 第5, 646, 298号; 第4, 904, 768号; 第5, 041, 424号)、- ラクタム含有プロドラッグで、必要に応じて置換されたフェノキシアセタアミドに置換された含有プロドラッグ (米国特許第4, 975, 278号)、必要に応じて置換されたフェニルアセタアミド含有プロドラッグ、5 - フルオロシトシン (米国特許第4, 975, 278号) および5 - フルオロウリジンプロドラッグが挙げられ、親薬剤のそれぞれは、参照により本明細書に特に援用

40

50

される。

【0848】

プロドラッグの形態において使用され得る治療薬剤または細胞毒性薬剤の種類は、実質的には限定されない。より高い細胞毒性の薬剤が、例えば、このような送達、例えば凝固剤の送達の形態に好ましく、プロドラッグとしての使用にはあまり好ましくはない。プロドラッグを形成する際に求められることは、プロドラッグが事実上不活性であり、「放出性された」薬剤すなわち活性化した薬剤は、実質的な活性、すなわち意図された目的のために少なくとも充分な活性を有するように設計される。

【0849】

WO 95/03830 ; EP 751,144 (アントラサイクリン) ; WO 97/07097 (シクロプロピルインドール) ; およびWO 96/20169にて開示されているように、原形のプロドラッグにおける種々の改善も知られており、本発明とともに使用されることが想定される。たとえば、低減された  $K_m$  値を有するプロドラッグは、米国特許第5,621,002号に記載されており、参照により本明細書に特に援用され、このプロドラッグは、本発明の内容において使用されてもよい。細胞内に実施されるプロドラッグ治療は、参照により本明細書に援用される、WO 96/03151にて例示されているように、知られているもので、本発明とともに実行され得る。

10

【0850】

A D E P T における使用のためには、プロドラッグをより活性な薬剤に活性化または変換する薬剤は、V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に動作可能に付着するものである。V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、血管新生部位好ましくは腫瘍血管系および腫瘍間質において、プロドラッグの変換能力を局在化し、活性化した薬剤が、このような領域においてだけ産生され、循環系または正常な組織においては、産生されないようにする。

20

【0851】

V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に付着してもよい、プロドラッグの活性化に機能する酵素としては、限定されないが、リン酸含有プロドラッグと組み合わされて使用するためのアルカリフォスファターゼ（米国特許第4,975,278号）；硫酸含有プロドラッグと組み合わされて使用するためのアリルサルファターゼ（米国特許第5,270,196号）；ペセラチラプロテアーゼ、サーモリシン、ズブチリシン、カルボキシペプチターゼ（米国特許第5,660,829号；第5,587,161号；第5,405,990号）やカテプシン（カテプシンBおよびLを含む）のような、ペプチドに基づくプロドラッグと組み合わされて使用するためのペプチターゼおよびプロテアーゼ；D - アミノ酸改変プロドラッグと組み合わされて使用するためのD - アラニルカルボキシペプチターゼ；-ガラクトシダーゼやニューアラミダーゼのような、グリコシリ化プロドラッグと組み合わされて使用するための炭水化物を開裂する酵素（米国特許第5,561,119号；第5,646,298号）；ラクトン含有プロドラッグと組み合わされて使用するためのラクタマーゼ；フェノシキアセタアミド基またはフェニルアセタアミド基でアミノ窒素で誘導体化された薬剤と組み合わされて使用するための、ペニシリンVアミダーゼのようなペニシリンアミダーゼ（米国特許第4,975,278号）またはペニシリンGアミダーゼ；および、5 - フルオロシトシンに基づくプロドラッグ（米国特許第4,975,278号）と組み合わされて使用するためのシトシンデアミナーゼ（米国特許第5,338,678号；第5,545,548号）が挙げられた、それぞれの特許文献は、参照により本明細書に特に援用される。

30

【0852】

酵素活性を有する抗体は、触媒酵素または「アブザイム」として知られており、プロドラッグを活性化した薬剤に変換するために使用され得る。V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体に基づいたアブザイムは、本発明のまた別の態様を形成するものである。アブザイムを作製する技術的な可能性は、当業者の範囲内において存在するもので、アブザイムに関する教示を補足する目的で、参照により本明細書に特に援用されるMassey

40

50

(1987)によって例示されている。ナイトロジエンマスターのアリルカルバメイトのようなカルバメイト位でプロドラッグの分解を触媒できる触媒抗体は、参照により本明細書に特に援用されるEP 745,673，在において記載されているようにさらに想定されるものである。

#### 【0853】

##### G7. 目における複合治療

本発明のVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、加齢性黄斑変性症、血管新生性緑内症および上述のその他の眼病を含めた、眼病および、血管新生性の眼病を治療するその他の治療と組み合わされて使用されてもよい。前記抗体は、外科的手術を含む、眼病の治療に使用されるその他の方法と組み合わされてもよい。

10

#### 【0854】

その他の治療薬剤との組み合わせに関しては、VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、その他の治療薬剤の前、後または実質的に同時に投与されてもよい。実質的な同時投与は単一の組成物から、または2つの別個の組成物から達成されてもよい。

#### 【0855】

脈絡膜血管新生に関しては、黄斑変性症、加齢性黄斑変性症(AMD)およびその他の目の徴候を伴うものであるが、本発明の特定の好適な組み合わせは、SPARC(酸性およびシスティンリッチの分泌型蛋白質[secreted protein, acidic and rich in cystein])(Nozaki et al., 2006; U.S. 2006/0135423)を、阻止、阻害、低減、下方制御、中和する第2の薬剤を使用するものである。

20

#### 【0856】

本発明の抗体は、VEGFR1活性化ではなく、VEGFR2活性化を阻止するように、SPARCを阻止する1以上の薬剤との組み合わせは、目におけるVEGF誘導性の血管新生を低減する特に効果的な方法を形成する。

#### 【0857】

SPARC阻害剤またはSPARCアンタゴニストとしては、例えば、VEGFそのものに対して改善されたような同様の分子種が挙げられる。典型的なSPARC阻害剤としては、阻害性の抗SPARC抗体およびその抗原結合断片(例えば、Sweetwyne et al., 2004); SPARC発現をサイレンシングまたは干渉するRNAアプタマーおよびRNA/DNAアプタマー、干渉RNA(siRNAまたはRNAi)のようなアンチセンス戦略; リボザイム; およびその他のタンパク質、ペプチドおよび低分子阻害剤が挙げられる。ポリクローナルやモノクローナル抗体およびsiRNAを含めた、SPARC阻害剤の多くは、例えば、Sigma/Aldrich(SantaCruz Biotechnology, R&D Systems)から市販されている。SPARC阻害剤は、DNA、RNAおよび/またはタンパク質レベルで、SPARCレベルまたは活性を、追加的に、阻止、阻害、低減、下方制御または中和するために、本発明に関連して使用されてもよい。

30

#### 【0858】

##### H. 診断および画像化

本発明は更に、インビトロおよびインビボでの診断方法およびイメージング方法を提供する。このような方法は、関節炎、乾癬、および固形腫瘍で例示されるが、本明細書に開示された全ての血管新生疾病を含む、任意の血管新生疾病的診断、予測またはイメージングの情報を創出するまでの使用のために適用することができる。腫瘍診断およびイメージングの分野以外では、本発明のこれらの側面は、好ましくは、検体が非侵襲的に得られ、ハイ・スループット・アッセイで試験される、および/または大まかな臨床診断および確認が望まれているインビトロでの診断試験での使用に最も好ましいものである。。

40

#### 【0859】

##### H1. 免疫検出方法およびキット

さらなる態様においては、本発明は、VEGFを結合、精製、除去、定量化、または一

50

一般的には検出する免疫検出方法および血管新生疾病を診断する免疫検出方法に関する。本発明の V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、単離された組織検体、生検または綿棒検体において、および / またはホモジナイズされた組織検体において、インビオでの V E G F を検出するのに使用してもよい（以下、参照）。このような免疫検出法は、確かな診断上の利用性があるが、抗原検体の力価測定などにおけるような、非臨床的な検体への適用もある。

#### 【 0 8 6 0 】

種々の有用な免疫検出法の段階は、例えば Nakamura et al. (1986, 参照により本明細書に援用される。) のような、科学技術文献において記載されている。概して、免疫結合法は、V E G F を含む疑いのある検体を得、阻止性のヒト抗 V E G F 抗体を、免疫複合体の形成を可能にする有効な条件下で接触させることを含む。このような方法においては、抗体は、カラムマトリックスのような形態におけるような固体支持体に結合されてもよく、免疫結合法は、V E G F を含む疑いのある検体は、固定化された抗体に供せることになる。

10

#### 【 0 8 6 1 】

より好ましくは、免疫結合法は、検体中の V E G F 量を検出、すなわち定量化する方法を含み、この方法は、結合過程において形成された免疫複合体の検出または定量化を要する。ここで、V E G F を含む疑いのある検体を得、本明細書に準拠して検体を抗体に接触させ、その後、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出すすなわち定量する。

20

#### 【 0 8 6 2 】

分析された生物学的検体は、V E G F を含む疑いのある検体であってもよく、一般的に、血管新生疾病を有する疑いのある動物または患者に由来するものである。この試料は、組織切片、標本、生検、スワブ試料、またはスメア試験の検体、ホモジナイズされた組織抽出物、または、そのような分離または生成された形態のものであってもよい。

30

#### 【 0 8 6 3 】

免疫複合体（初期の免疫複合体）の形成を可能にするのに効果的な条件下および充分な期間で、選択された生物学的検体を抗体に接触させることは、一般的に、抗体組成物を検体に単に加えること、抗体が存在する V E G F と免疫複合体を形成するのに、すなわち、V E G F に結合するのに、充分な時間で該混合物をインキュベートすることである。この時間の後には、組織片、E L I S A プレート、ドットプロットまたはウェスタンプロットのような、試料 - 抗体組成物は、一般的に洗浄されて、非特異的に結合された抗体種を除去して、抗体特異的に初期の免疫複合体に特異的に結合された抗体を検出するようにすることができる。

30

#### 【 0 8 6 4 】

免疫複合体の形成の検出は、当該技術分野においてはよく知られており、無数の方法の適用によって達成され得る。これらの方法は、一般的に、放射性、蛍光性、生物学的または酵素的なタグまたは、当該技術分野で公知の標識に基づくものである。このような標識の使用に関する米国特許文献としては、第 3,817,837 号；第 3,850,752 号；第 3,939,350 号；第 3,996,345 号；第 4,277,437 号；第 4,275,149 号および第 4,366,241 号が挙げられ、何れも参照により本願明細書に援用されるものである。発色基質との接触で着色された生成物を産生する酵素の使用は、一般的に好ましい。当該技術分野にて知られているように、二次抗体またはビオチン / アビジンリガンドのような二次結合リガンドも使用してもよい。

40

#### 【 0 8 6 5 】

上記検出に用いられる V E G F R 2 - ブロッキング、ヒト抗 V E G F 抗体は、それ自身が、検出可能な標識に結合してもよく、単にこの標識で検出し、これによって、組成物中における初期の免疫複合体の量を決定することができる。

#### 【 0 8 6 6 】

好ましくは、初期の免疫複合体は、本発明の抗体に対する結合親和性を有する第 2 の結合リガンドによって検出される。この場合、第 2 の結合リガンドは検出可能な標識に結合

50

されていてもよい。第2の結合リガンドは、それ自身はしばしば抗体であり、「二次」抗体と称される。初期の免疫複合体は、二次免疫複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下および充分な時間で標識化された二次結合リガンドまたは抗体に接触させられる。二次免疫複合体は、一般的に洗浄され、非特異的に結合された、標識化された二次抗体またはリガンドを除去して、二次免疫複合体における残存する標識が検出される。

#### 【0867】

更なる方法は、2段階の方法による初期免疫複合体の検出を含むものである。第1の抗体に対して結合親和性を有する、抗体のような第2の結合リガンド、上述のように二次免疫複合体を形成するのに使用される。洗浄後、再度、二次免疫複合体は、免疫複合体(第3の免疫複合体)ができるように効果的な条件下および充分な時間で、二次抗体に対する結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体に接触させられる。第3のリガンドまたは抗体は検出可能な標識に結合し、第3の免疫複合体の形成を確認できるようにさせる。この系は、所望ならばシグナル増幅のために提供されてもよい。

10

#### 【0868】

血管新生疾患有する患者の臨床的診断またはモニタリングにおいては、VEGFの検出、またはVEGFレベルの上昇は、正常な対象からの生物学的検体に相当するレベルと比較すると、血管新生疾患有する患者を示すものである。.

しかしながら、当業者に知られているように、このような臨床的診断は、この方法単独に基づいてなされる傾向は小さい。当業者は、陽性の検証を示すバイオマーカーの有意な発現と、バイオマーカーの低レベルまたはバックグラウンド発現との間で、識別することに極めて精通している。実際、バックグラウンド発現レベルは、「切り捨て部分」を形成するためにしばしば使用され、それ以上の上昇した染色は有意すなわち陽性として評価される。

20

#### 【0869】

##### H2. 画像化

本発明のこれらの側面では、腫瘍のイメージング法、腫瘍治療とイメージング法との組合せにおける使用が好ましい。1以上の検出可能な薬剤に結合されたVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、イメージングそのもの、治療に先立って信頼性が高い画像を作製するための前イメージングにおける使用が想定される。このような組成物および方法は、他の血管新生疾患有症状、特に非悪性腫瘍、アテローム性動脈硬化および内部画像が診断目的または予後目的もしくは治療の設計に望まれる症状におけるイメージングおよび診断に適用され得る。

30

#### 【0870】

VEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体のイメージング抗体は、一般的に、検出可能な標識に付着または接合されたVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体である。「検出可能な標識」は、特異的な機能特性または化学的特性のために検出され得る化合物または元素であり、この使用は、付着された成分を検出されること、所望ならば定量化されることを可能にする。インビボでの診断プロトコールまたは「イメージング法」に求められる抗体接合体は、非侵襲的な方法でを用いて検出され得る。

40

#### 【0871】

多数の、適切なイメージング剤は、抗体および結合リガンドへ付着させるための方法(例えば、米国特許第5,021,236号および第4,472,509号参照。両者はともに、参照により本明細書に援用される。)のように、当該技術分野において公知である。

#### 【0872】

特定の付着法は、例えば、抗体に付着される、DPTAのような有機金属キレート剤(米国特許第4,472,509号)を採用する金属キレート複合体が含まれる。モノクローナル抗体も、酵素の存在下において、グルタルアルデヒドまたは過ヨード酸塩のようなカップリング剤と反応する。フルオレセインマーカーを有する接合体は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソシアネートとの反応によって、調製される。

50

## 【0873】

検出可能な標識の例は、常磁性イオンであり、この場合、好適なイオンとしては、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテリウム(III)、ガドリウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジプロシウム(III)、ホルニウム(III)およびエルビウム(III)が挙げられ、ガドリウムが特に好ましいものである。

## 【0874】

X線イメージングのような他の内容において、使用可能なイオンとしては、限定されないが、ランタニウム(III)、金(III)、鉛(II)、特にビスマス(III)が挙げられる。蛍光標識としては、ローダミン、フルオレセイン、レノグラフィンが挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインは、イソチオシアネート中間体を介してしばしば結合されているものである。

10

## 【0875】

診断的利用のための放射性同位体の場合では、好適な例としては、炭素<sup>14</sup>、クロム<sup>51</sup>、塩素<sup>36</sup>、コバルト<sup>57</sup>、コバルト<sup>58</sup>、銅<sup>67</sup>、ユーロピウム<sup>152</sup>、ガリウム<sup>67</sup>、水素<sup>3</sup>、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、インジウム<sup>111</sup>、鉄<sup>59</sup>、リン<sup>32</sup>、リチウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、セレン<sup>75</sup>、硫黄<sup>35</sup>、テクネチウム<sup>99</sup>およびイットリウム<sup>90</sup>が挙げられる。<sup>125</sup>Iは、特定の態様における使用に好ましいものであり、低エネルギーおよび長期間に亘る検出のための適性のために、テクネチウム<sup>99m</sup>およびインジウム<sup>111</sup>も好ましい。

20

## 【0876】

本発明における使用のための、放射標識されたVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、当該技術分野における公知の方法に基づいて生成されてもよい。例えば、放射性同位体の金属イオンを抗体に結合させるために使用された中間の官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)基およびエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)基である。

## 【0877】

モノクローナル抗体も、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウムと、次亜塩素酸ナトリウムのような化学的な酸化剤またはラクトペルオキサターゼのような酵素の酸化剤との接触によってヨード化され得る。本発明による抗体は、例えば、スズ系溶液でペルテクネートを還元し、セファデックスカラム上で還元されたテクネチウムをキレート化して、このカラムに上記抗体を入れることによる工程、または、テクネチウム、SNC1<sub>2</sub>のような還元剤、フタル酸ナトリウム-フタル酸カリウム溶液のような緩衝溶液および前記抗体をインキュベートする工程による、リガンド交換工程によってテクネチウム<sup>99m</sup>で標識されてもよい。

30

## 【0878】

上述の種類の何れの検出可能なように標識化されたVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、本発明のイメージングまたは複合イメージングおよび治療の側面において使用されてもよい。これらは、同じようにインビトロでの診断における使用に好適である。インビオでのイメージングのための投与量は、一般的に治療のための投与量よりも少なくが、患者の年齢および体重も依存するものである。一回の投与量で充分なものであるべきである。

40

## 【0879】

インビオでの診断法またはイメージング法は、一般的に、非侵襲的方法で検出されるマーカーに接合されたVEGFR2-ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体の、診断上有効な量を患者に投与することを含む。抗体-マーカー接合体は、腫瘍内に局在化しVEGFに結合するのに充分な時間が与えられる。患者は、検出可能なマーカーを同定するために検出装置に露光された後、腫瘍の画像を形成する。

## 【0880】

H3. 診断キット

50

さらなる態様において、本発明は、免疫検出キットおよびイメージングキットの両方を含む、上述の免疫検出法およびイメージング法で使用するための診断キットを提供する。従って、VEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体は、キットにおいて提供され、一般的に、好適な容器に含まれている。

#### 【0881】

免疫検出のために、抗体は、マイクロタイタープレートのウェルのような固体支持体に結合されていてもよいが、再構成するには、抗体の溶液または粉体は好ましいものである。免疫検出キットは好ましくは、少なくとも第1の免疫検出試薬を含む。キットにおける免疫検出試薬は、様々な形態をとってもよく、例えば、該抗体に伴うまたは連結された検出可能な標識が挙げられる。二次結合リガンドを伴う、または付着された検出可能な標識も考慮される。典型的な二次リガンドは、第1の抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

#### 【0882】

本発明のキットにおける使用のための更に好適な免疫検出試薬としては、第1の抗体に対する結合親和性を有する二次抗体を含み、さらに二次抗体に対して結合親和性を有する三次抗体とともに、検出可能な標識に連結された三次抗体む二成分系剤が挙げられる。上述したように、当該技術分野において知られている多くの典型的な標識およびそのような全ての標識は、本発明に関連して使用されてもよい。これらのキットは、抗体 - 標識接合体を、完全に接合された形態で、中間体の形態で、またはキットの使用者によって接合される別個の部分として、抗体 - 標識接合体を含んでいてもよい。

#### 【0883】

イメージングキットは、好ましくは、インビボで検出可能な標識が既に付着されたVEGFR2 - ブロッキング、ヒト抗VEGF抗体を含む。しかしながら、標識手段および付着手段は、別個に供給することになるだろう。

#### 【0884】

検出アッセイのための検量線を作成するに使用されてもよいように、いずれのキットは、標識化されているか否かにかかわらず、好適にアリコートにされたVEGFの組成物のような、対照剤をさらに含んでいてもよい。キットの構成は、水媒体の形態または凍結乾燥された形態のいずれかで梱包されてもよい。

#### 【0885】

キットの容器手段は、一般的に、バイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたはその他の容器手段が挙げられ、これらの中に、抗体または抗原を入れてもよく、好ましくは、好適にアリコートにされていてもよい。第2のまたは第3の結合リガンドまたは追加成分が提供される場合、キットは、一般的に、リガンドまたは成分が中に入れられてもよい第2の容器、第3の容器、またはその他の追加容器を含む。本キットは、1以上の血管新生疾患において使用されるための、その他の診断試薬も含まれていてもよい。好ましくは、VEGF結合に基づかない第2の診断法が使用される。

#### 【0886】

本発明のキットは、通常、市販のための厳格な管理下において、抗体を収容するための手段および任意の他の試薬容器も含む。このような容器は、所望のバイアルが保持される射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器を含んでもよい。

#### 【0887】

10

20

30

40

【表1-1】

表1

配列番号	説明	配列
クローン EJ173-112-Cl1 (r84 scFv)		
1	VH ドメイン (nt)	CAGGTGCAGCTGGTCAATCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTAT GCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGATCCTG AAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATC TACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCAACAGGACGTTCTATGGITCGGGGAGTCAT TATACCTTTAACGGTATGGACGTCTGGGCC AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
2	VL ドメイン (nt)	GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAA AGTGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGGTCAGTGGCAGTGG TCTGGGACAGATTCACTCTCACCACAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCA ACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

10

20

30

【0888】

【表1 - 2】

表1		
配列番号	説明	配列
3	VH ドメイン (aa)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSSYAIR WVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT MTEDTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVR GVIIIPFNGMDVWGQGTTVTVSS  図1参照
4	VL ドメイン (aa)	DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSQGTDFLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGTKVEIK  図1参照
5	重 CDR1	SYAIS
6	重 CDR2	GFDPEDGETIYAQKFQG
7	重 CDR3	GRSMVRGVIIIPFNGMDV
8	軽 CDR1	RASQSISSYLN
9	軽 CDR2	AASSLQS
10	軽 CDR3	QQSYSTPLT
11	重 FR1	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFS
12	重 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
13	重 FR3	RVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
14	重 FR4	WGQGTTVTVSS
15	軽 FR1	DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITC
16	軽 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
17	軽 FR3	GVPSRFSGSQGTDFLTISSLQPEDFATYYC
18	軽 FR4	FGGGTKVEIK
19	リンカー	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
20	scFv クローン 全体 (nt)	図1参照
21	scFv クローン 全体 (aa)	図1参照
r84 完全長 IgG		
22	IgG 重鎖 (nt)	実施例6参照
23	IgG 軽鎖 (nt)	実施例6参照

10

20

30

40

【0889】

## 【表1 - 3】

表1		
配列番号	説明	配列
24	IgG 重鎖 (aa)	実施例6参照
25	IgG 軽鎖 (aa)	実施例6参照
26	IgG VH ドメイン (nt)	実施例6参照
27	IgG VL ドメイン (nt)	実施例6参照

10

20

30

40

50

## 【0890】

\* \* \*

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を明示するために包含されるものである。本実施例で開示された技術は、本発明者によって発見された本発明の実施の際によく機能する代表的な技術を示すことが当業者に理解され、実施のための好適な態様を構成することも理解される。しかしながら、当業者は、本明細書での開示に照らし合わせて、開示されている具体的な実施態様において、本発明の精神および範囲から逸脱せずに、多くの変更がなされ得ること、それにもかかわらず同様の結果または類似の結果を得られることを理解するべきである。

## 【0891】

実施例実施例1：抗体選択

VEGFは、胚形成、骨格成長、および生殖機能の間の生理的血管新生においてキーとなる調節因子である。チロシンキナーゼ受容体であるVEGFR2との相互作用によるVEGFシグナル伝達は、腫瘍成長に関連する血管新生を含む、病理学的血管新生においても重要である。血管新生を阻止する特異的なヒト抗体が治療に必要であることを鑑みて、VEGFとVEGFR2 (KDR/Flik-1)との相互作用を特異的かつ実質的に阻止するが、VEGFとVEGFR1 (Flt-1)との相互作用を実質的に阻止しない、VEGFのエピトープに対して反応性を有するヒト抗体を同定した。

## 【0892】

c-mycおよび6×Hisタグのエピトープを含む、pHOG21プラスミド (Kipriyanov et al., 1996; 1997) (図9Aおよび図9B) に、(NcoIおよびNotI制限部位で) 単鎖形態の抗体をクローニングした。E.coli細胞であるXL-1blueを形質転換し、アンピシリン平板培地上で選択し、そしてIPTGで誘導してscFvを発現させた。精製したscFvについて、VEGFに対する選択的な生物学的活性を有するかをELISAで試験した。VEGFとVEGFR1との相互作用ではなく、VEGFとVEGFR2との相互作用を特異的に阻止するマウス抗体2C3 (Brekken et al., 1998; 2000) を用いて、競合ELISAアッセイにより、選択的な生物学的活性をさらに確認した。また、Biacoreにより、固定化VEGF-Aに対してscFv抗体が結合することを示した。ヒトVEGFと同様にマウスVEGFに対して結合することも評価した。

## 【0893】

## A. シークエンシング

重鎖および軽鎖の好ましい抗体産生クローンの1つのヌクレオチド配列を示す。この抗

体を、E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)と称し、s c F v型（実施例1および図1）ならびに完全長IgG型（実施例6）の両方を作製した。単鎖型のE J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)の軽鎖および重鎖のスクレオチド配列ならびにアミノ酸配列を図1および表1に示す。完全長IgG型のr 8 4 / P G N 3 1 1の軽鎖および重鎖のスクレオチド配列ならびにアミノ酸配列を実施例6に示す。E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)の軽鎖および重鎖のC D Rならびにフレームワーク領域を表1に示す。

#### 【0894】

実施例2：E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)は高い親和性でV E G Fと結合する

10

抗体の特異性を確認するために、塗布したヒトV E G F - A (Dr. Rolf A. Brekken, U T Southwestern Medical Center, ダラス, テキサスから入手)に対してs c F v型のE J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)が結合するかE L I S Aで試験した。簡単に説明すると、2 μ g / m lのV E G F - Aをポリスチレンプレートに塗布した。次に、2 0 μ g / m lの精製したE J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)s c F vを、1番目のウェルに加え、3倍に希釈して滴定した。マウス抗c - m y cタグモノクローナル抗体（インビトロジエン）およびH R P接合二次ウサギ抗マウス抗体を用いて、結合したs c F vを検出した。

#### 【0895】

E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)s c F v（図2）がV E G Fに結合したこと、重要なことに、その母クローニと比較して結合シグナルが増加したこと、それ故に、親和性が増加したことが、E L I S Aの結果からわかった。陽性対照としてマウスB9抗体を用いる。該抗体はヒトV E G F - Aに対するマウスs c F v抗体（Dr. Philip E. Thorpe, UT Southwestern Medical Center, ダラス, テキサスから入手）である。

20

#### 【0896】

E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)は、母クローニと比較してさらに有益な特徴を示した。E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)は、母クローニと比較して、血清中の安定性がより高いこと、およびs c F v型で凝集する傾向が低いことを示した（データは示さず）。

30

#### 【0897】

E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)の重鎖可変領域と、他の抗V E G F抗体の7つの異なる重鎖とのシャフリング

V E G Fに対する結合特性を維持する点において、r 8 4 / P G N 3 1 1の軽鎖可変領域の重要性を確認するために、E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)の軽鎖可変領域を、r 8 4 / P G N 3 1 1とは異なる他の抗V E G F抗体クローニに由来する7つの異なる重鎖可変領域と組み合わせた。得られたクローニを発現させ、N i N T AカラムでH i sタグを介して精製した。精製後、濃度を測定し、塗布したヒトV E G F - Aに対してE L I S Aを実施した。2 0 μ g / m lの精製したs c F vを加え、結合したs c F vを、マウス抗c - m y cタグモノクローナル抗体（インビトロジエン）およびH R P接合二次ウサギ抗マウス抗体を用いて検出した。

40

#### 【0898】

他の抗V E G F抗体クローニに由来する重鎖可変領域と、E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)の軽鎖可変領域とを組み合わせた7つのうち3つが、このE L I S AでV E G Fに有意に結合することを示した。これは、極めて妥当な割合であって、r 8 4 / P G N 3 1 1の軽鎖可変領域がV E G Fに対する結合の維持に重要なこと、そしてV E G Fに結合する抗体を生じさせるためにこの軽鎖可変領域と組み合わせができる他の重鎖可変領域を容易に同定することができるることも示すものである。

#### 【0899】

実施例3：E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 (r 8 4 / P G N 3 1 1)はマウス2 C 3と競

50

## 合する

抗体の特異性をさらに示すために、2C3が2通りの濃度で存在する場合の、EJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvの結合を、塗布したVEGF-Aに対するELISAで試験した。簡単に説明すると、2μg/mlのVEGF-Aをポリスチレンプレートに塗布した。次に、1μg/mlの精製したEJ173/112-C11(r84/PGN311)scFv、母クローニまたはマウスB9のscFv(図3)を、6つの平行したウェルに加えた。そのうち2つは0.1μgのマウス2C3のIgGを含み、他の2つは1μgのマウス2C3IgGを含み、2C3のIgGの最終濃度がそれぞれ1および10μg/mlとなるようにした。結合して残存するscFvを、HRP接合マウス抗c-mycタグモノクローナル抗体(インビトロジエン)を用いて検出した。

10

### 【0900】

2C3 IgGの濃度を増大させて競合させることによって、VEGFに対するEJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvの結合が減少した。従って、これらの結果から、EJ173/112-C11(r84/PGN311)は、VEGFへの結合をめぐって、2C3抗体と競合することがわかり、EJ173/112-C11(r84/PGN311)が2C3と実質的に同じエピトープに結合することを示している。

### 【0901】

実施例4：EJ173/112-C11(r84/PGN311)はヒトおよびマウスVEGFに結合する

ヒトおよびマウスVEGFに対するEJ173/112-C11(r84/PGN311)scFvの結合を測定した。1μg/mlのマウスVEGF(R&D System s, 493-MV-005/CF, 無担体マウスVEGF164)およびヒトVEGFを、ポリスチレン免疫プレートに塗布した。10μg/mlの精製したscFvを加え、マウス抗c-mycタグモノクローナル抗体(インビトロジエン)およびHRP接合二次ウサギ抗マウス抗体を用いて検出した。

20

### 【0902】

この結果から、EJ173/112-C11(r84/PGN311)scFv(図4)がマウスVEGFおよびヒトVEGFの両方に結合することがわかった。

30

### 【0903】

加えて、マウスVEGFに対する、scFv型のr84とその母クローニとの結合親和性を評価するために、Biacore T100を用いた。このため、1000RUの組換え型マウスVEGF<sub>164</sub>(493-MV/CF, R&D Systems)をCM5チップ(Biacore)に固定化し、単量体scFvの希釈系列(100nMおよび2倍希釈)を50μl/分の流速でフローさせた。Biacore T100装置に付属のソフトウェアを用いて、1:1のフィッティングモデルにより、K<sub>D</sub>として表される結合親和性を算出した。K<sub>D</sub>値は、EJ173/112-C11(r84/PGN311)で1.0×10<sup>-8</sup>Mおよび母クローニで4.0×10<sup>-8</sup>Mとして算出された。このように、r84/PGN311は、マウスVEGFに対して、母クローニより高い結合親和性を示す。

40

### 【0904】

これらの結果から、ヒトおよびマウス両方の前臨床試験に、この選択した抗体(r84/PGN311)を用いるのが好適であることがわかる。

50

### 【0905】

実施例6で詳述するように、r84抗体の完全にヒトおよびマウスのキメラIgG型を作製した。これらIgG型r84抗体もそれぞれ、マウスVEGFおよびヒトVEGFの両方に結合することが、ELISAによる結合の研究によって確認された(図19)。2C3抗体がマウスVEGFに対して有意な結合を示さないことから、2C3抗体より、選択した完全にヒトr84抗体の方が、他の利点を有することがこれらの結果に示されてい

る。

【0906】

マウスVEGFに対して2C3が意味を持って結合しないことは、間接的なELISAアッセイで示されている。このアッセイにおいて、VEGFファミリーの他のメンバーと同様に、ヒトおよびマウスVEGFと2C3との相互作用を評価した。

【0907】

間接的なELISAアッセイは、基本的にはBrekken et al., Cancer Research 1998および2000に記載されているように実施した。簡単に説明すると、様々な成長因子、すなわち、ヒトVEGF-A(VEGF), マウスVEGF, PIGF, VEGF-B, VEGF-CおよびVEGF-DをR&D Systemsから購入し、ELISAプレートのウェル表面を被覆した(増感緩衝液中0.5g/mlで50μl/ウェル, 4で終夜)。37で1時間5%CAH(カゼイン酸加水分解物(Sigma), PBSで作製)でウェルをプロッキングし、そして2C3抗VEGF抗体を1.0μg/mlで3重に、室温で2時間インキュベートした。ペルオキシダーゼ接合二次抗体(抗ヒトまたは抗マウスIgGのいずれか、1:5000で希釈)を用いて、結合を検出した。TMB(HRPの発色基質)でウェルを発現させ、吸光度を450nmで読み取った。平均した吸光度の値は以下の通りである:ヒトVEGF-A(3.07), マウスVEGF(0.09)(これはバックグラウンドシグナルと同じであった), PI GF(0.1), VEGF-B(0.09), VEGF-C(0.09)およびVEGF-D(0.12)。

【0908】

この結果から、2C3はヒトVEGF-Aと結合するが、マウスVEGF-A, PI GF, VEGF-B, VEGF-CまたはVEGF-Dとは反応しないことがわかった。このアッセイは数回反復し、同様の結果が得られている。

【0909】

2C3およびアバスチンがマウスVEGFに結合しない一方で、IgG型のr84/PGN311抗体がマウスVEGFに結合するという、さらなる証拠が、r84, 2C3およびアバスチンを用いて処理した動物において、血清中のマウスVEGFレベルを評価する実験から得られた。

【0910】

対照IgG(シナジス), アバスチン, 2C3またはr84で処理した担癌動物の血清を回収し、R&D Systemsのキットを用いて、マウスVEGFのレベルをELISAでアッセイした。加えて、r84で処理したマウス血清の検体のいくつかをプロテインGビーズとともにインキュベーションして、すべての抗体を免疫除去した。

【0911】

この結果を図24に示す。マウスVEGFの血清レベルは、対照, アバスチンおよび2C3で処理した動物間で極めて類似している。しかしながら、マウスVEGFの血清レベルは、r84で処理した動物で劇的に高い。対照, アバスチンおよび2C3で処理した動物に見られるマウスVEGFのレベルと、r84で処理した動物に見られるマウスVEGFのレベルとの違いは、r84抗体IgGがマウスVEGFに結合する一方で、対照, アバスチンおよび2C3抗体がマウスVEGFに結合しないという証拠である。

【0912】

図24中の「r84」の列は、血清中の総VEGF量を示す(すなわち、遊離の(生物学的に活性な)VEGFおよびr84と複合体化したVEGF)。遊離の(生物学的に活性な)VEGF量は、抗VEGF抗体を治療に用いる場合に(特に、VEGFに結合するまでの抗体の効果を評価するために)測定されるべき重要なパラメータであると考えられる(Loupakis et al., 2007)。「r84 super」の列は、r84免疫グロブリンおよびマウスVEGFに結合したr84をプロテインGとともにインキュベーションして取り除いた後の、血清中の遊離VEGF量を示す。このように、図24は、r84処理動物の血清中の遊離マウスVEGFレベルがベースライン・レベルであることを示す。こうして、図24の結果は、r84がマウスVEGFに良好に結合することを示すのみならず、

10

20

30

40

50

r 8 4 が血清中の遊離の（生物学的に活性な）V E G F のレベルを枯渇させる上でも極めて有効であることも示しており、これは治療に用いるのに重要な特性である。

#### 【 0 9 1 3 】

同系マウス乳房腫瘍モデルを用いて、マウスキメラ r 8 4 が腫瘍担持マウスの生存を有意に改善したことを示す、下記実施例 1 1 E で検討するこのような結果は、インビボで r 8 4 がマウス V E G F に結合し、マウス V E G F 活性を阻止するという、さらなる確証となる。

#### 【 0 9 1 4 】

上記結果は、2 C 3 およびアバスチン抗体がマウス V E G F に結合しない一方で、完全にヒト r 8 4 / P G N 3 1 1 抗体がマウスおよびヒト V E G F の両方に結合することを示す。例えば、マウス同系モデル（すなわち、マウス腫瘍細胞がマウスに投与される場合）および異種移植モデル（すなわち、ヒト腫瘍細胞がマウスに投与される場合）の両方における抗腫瘍活性を評価するために、r 8 4 を用いることができるという観点から、これは重要な利点である。

10

#### 【 0 9 1 5 】

加えて、2 C 3 やアバスチンなどの抗体ではなく、r 8 4 / P G N 3 1 1 で示されるような、マウスおよびヒト V E G F の両方に結合できることは、異種移植マウスモデルで r 8 4 により示された結果の方がヒト対象における r 8 4 の活性をより代表しそうである（すなわち、前臨床マウスモデルでの r 8 4 の結果は、該抗体を患者に入れた際に見られる現象に対する良好なモデルとなりそうである）ことを意味する。この理由は、ヒト V E G F のみに結合できる抗体（例えば、アバスチンや 2 C 3 など）が、ヒト腫瘍細胞で産生される V E G F には結合するが、内因性のマウス V E G F には結合できないことによる。これは、腫瘍で産生される V E G F と内因性の V E G F が存在するであろうヒト患者の状況とはもちろん異なる。

20

#### 【 0 9 1 6 】

このような状況における潜在的に不利な点は、マウス V E G F ではなくヒト V E G F に結合する抗体が、マウス異種移植モデルにおいては良好に機能するかもしれないが、多くの V E G F が存在するヒトの体においても同様に機能することを示すことにはならないだろうという点である。換言すれば、ヒト V E G F にのみ結合できる抗体を用いたマウス異種移植システムで見られた抗腫瘍効果は、実際の臨床治療より良好に見えるかもしれない。対照的に、あなたがヒトおよびマウス V E G F の両方に結合できる抗体を取り扱っているならば、これは、マウスモデル系に存在する V E G F のすべての型に結合し、該抗体がヒトに入れられた際の状況をより代表しそうである。これは、重要な利点であり、本発明の抗体により示されるものである。

30

#### 【 0 9 1 7 】

##### 実施例 5 : E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 ( r 8 4 / P G N 3 1 1 ) の結合親和性

様々な抗体の結合親和性を評価するために、B i a c o r e を用いた。種々の s c F v 抗体を 1 μ M (マイクロモラー) の濃度で、固定化 V E G F (アミンカップリング) を有する CM 5 チップ表面にフローさせた。結合曲線を図 5 に示す。これにより、r 8 4 / P G N 3 1 1 の s c F v 型が母クローンの単鎖型 (m) より、顕著に高い結合親和性を有することがわかる。

40

#### 【 0 9 1 8 】

加えて、最初の研究として、r 8 4 の I g G を様々な濃度で固定化 V E G F - A の表面をフローさせることによって、V E G F に対する r 8 4 の I g G の結合親和性を算出した。この点に関して、K<sub>d</sub> として表される結合親和性を、B i a c o r e 3 0 0 0 E v a l u a t i o n ソフトウェアの 1 : 1 結合モデルを用いて算出した。この最初の研究において、r 8 4 の I g G について得られた K<sub>d</sub> 値は、6 . 7 × 1 0<sup>-9</sup> M として算出された。

#### 【 0 9 1 9 】

続いて、B i a C o r e を用いた親和性の研究から、表 2 に示される親和性のデータが

50

得られた。これらの実験において、E J 1 7 3 / 1 1 2 - C l 1 ( r 8 4 / P G N 3 1 1 ) および 2 C 3 の I g G 型の親和性を、C M 5 チップ ( Bi a c o r e ) 上に 1 0 0 R U のヒト V E G F - A を固定化して測定した。各 I g G を希釈系列 ( 1 0 0 n M および 2 倍希釈 ) で、V E G F で被覆したフローセルの表面を 5 0  $\mu$  l / 分の流速でフローさせた。B S A で被覆したフローセルから得られたバックグラウンドシグナルを、結合曲線から減算した。K<sub>D</sub> で表される結合親和性を、Bi a c o r e T 1 0 0 装置に付属のソフトウェアを用いて 1 : 1 のフィッティングモデルにより算出した。

## 【 0 9 2 0 】

【 表 2 】

10

KD (M)	被覆 VEGF (100 RU), 25 °C	被覆 VEGF (100 RU), 37 °C
2C3	$1.24 \times 10^{-8}$	$3.13 \times 10^{-7}$
r84	$3.21 \times 10^{-9}$	$5.22 \times 10^{-9}$

## 【 0 9 2 1 】

このデータから、r 8 4 が、2 5 と 3 7 との両方で 2 C 3 より優れた親和性により V E G F に結合することがわかる。この違いが、癌を含む血管新生疾病の治療に関連した多くの臨床状況において、2 C 3 と比較したときの r 8 4 の優れた特徴に繋がると予想することは合理的である。3 7 での結果が特に興味深いのは、これはインビボで使用する場合に抗体が受ける温度だからである。この実験で、2 5 および 3 7 での結合と比較した場合の親和性でアバスチンが約 1 0 倍の損失を示し、一方 r 8 4 は温度に対する感受性がより少ない ( K D の減少が 2 倍もない ) ことも注目すべきである。

20

## 【 0 9 2 2 】

実施例 6 : r 8 4 / P G N 3 1 1 の s c F v 型から I g G 型への転換

以下のようにして、r 8 4 の完全にヒト I g G 型を最初に構築した。図 1 に示す r 8 4 / P G N 3 1 1 抗体配列の s c F v 型の V H 鎖および V L 鎖を選択し、L o n z a p C o n I g G 1 a およびカッパ発現ベクターに挿入した後、すべての r 8 4 抗体遺伝子を含む 1 つのベクターを作製するために組み合わせた。それから、完全長 I g G 抗体を作製するため、このベクターを C H O K 1 S V 細胞にトランスフェクションした。

30

## 【 0 9 2 3 】

いったん増殖条件が最適化されると、株化細胞による抗体の生産速度は、細胞培養 1 リットル当たり約 5 ミリグラムであった。この発現法は効果的ではあるが、精製された抗体のすべてが安定であるというわけではなかった。緩衝液を最適化した後は抗体の凝集が減少し、8 9 . 5 % のモノマーおよび 1 0 . 5 % の凝集体が得られた。

## 【 0 9 2 4 】

使用した最適化された増殖条件は、インビトロジェンの C D - C H O , 4 0  $\mu$  M の M S X , pH 6 . 8 ~ 7 . 0 , 5 % C O<sub>2</sub> , 3 7 であった。使用した最適化された緩衝液は、p H 5 . 5 で 1 0 m M のリン酸ナトリウム , 2 5 m M の酢酸ナトリウム , 5 0 m M のグリシンである。

40

## 【 0 9 2 5 】

r 8 4 / P G N 3 1 1 の安定性をさらに上昇させるために、アミノ酸配列を分析した。r 8 4 配列を典型的なヒト抗体配列と比較すると、r 8 4 の V L 鎖の最後のアミノ酸が、用いた構造物から失われていた ( すなわち、最後のリジン残基 ( K ) が失われていた ) ことがわかった。この残基を再導入した。C H O 細胞とより「適合性を有する」ために、D N A 配列も変えた ( 翻訳されるアミノ酸配列を変えずに )。この結果が新規 D N A 配列であり、V L 鎖がリジンで終わるアミノ酸配列であった。I g G 抗体の新規で完全な重鎖お

50

より軽鎖のヌクレオチド配列ならびにアミノ酸配列を以下に示す：

r 8 4 / P G N 3 1 1 の IgG の重鎖（核酸配列）

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCTGCAAGGCATCTGGTGG  
 GACATTTCTCCTATGCCATCTCCTGGGTCGGCAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGGGGGGTCATCCCG  
 AAGACGGAGAGACCATTACGCACAGAAGTTCAAGGTGCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGC  
 CGGGTAATCATCCCTTCAACGGGATGGATGTATGGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCACATCGG  
 TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTAAGGACTACTTCCC  
 GAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGCCTACAGTCCTCAGG  
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTAGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAAGCCAGGCT  
 CAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCTGCCTTCACCC  
 GGAGGCCTCTGCCGCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGCTTCTGGCTTTCCCCAGGCTCTGGCAGGCACAGGCTA  
 GGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGCAGGTGCTGGCTCAGACCTGCCAGAGCCATATCCGGAGGACCC  
 TGCCCCCTGACCTAACGCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTCTCCTCCAGATTCCAG  
 TAACCTCCAACTTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCC  
 CAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCAGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCAGCCGGTGCTG  
 ACACGTCCACCTCCATCTTCCCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAACCCAAG  
 GACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGT  
 CAACGGTACGGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGGAGCAGTACAACACGACAGTACCGTG  
 TGGTCAGCGTCTCACCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC  
 CCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCAAAGCCAAGGTGGACCCGTGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGC  
 TCGGCCACCCCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACCAGGTGTAC  
 ACCCTGCCCTCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGA  
 CATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCGACGGT  
 CCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGCAGGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAG

（配列番号 2 2）

r 8 4 / P G N 3 1 1 の IgG の重鎖（アミノ酸配列）

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGGTFSSYI SWVRQAPQGLEWMGGFDPEDGETI YAQKFQGRVTMTEDTSTDAY  
 MELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIPFNMDVWQGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTWSNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCCPA  
 PELLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHPDEPEVKFNWYVDGVEHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHMHEALHNHTQKSLSLSPGK

（配列番号 2 4）

r 8 4 / P G N 3 1 1 の IgG の軽鎖（核酸配列）

GACATTCGGATGACTCAGTCCTCCCTCTTGTAGCGCTCTGTGGGCGATAGGGTTACTATCACTTGTGAGCCTCTCA  
 ATCCATCAGCTCCTACTTGAACCTGGTACCGAGCAGAAACCCGGAAAGCACCCAGCTGCTTATTTACGCCCTCCTCCC  
 TGCAATCCGGAGTGCCTCCGGTTAGCGGCTCCGGCTCTGGAACAGACTTACCCCTGACCATTCTTGCAGCCT  
 GAGGATTTGCTACTTACTCTGTACAGCAGAGTTACTCCACCCCTTGACATTGGTGGAAACGAAAGTAGAAATTAA  
 GCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTGTTGT  
 GCCTGCTGAATAACTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATGGTAACCTCCAG  
 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA  
 GAAACACAAAGTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGT  
 GTTAG

（配列番号 2 3）

r 8 4 / P G N 3 1 1 の IgG の軽鎖（アミノ酸配列）

DIRMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTSSLQPE  
 EDFATYYCQQSYSTPLTFGGTKVEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ

10

20

30

40

50

ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号 25)

上記の新規 r 84 / PGN311 の DNA 配列を、Lonza pCon IgG1a およびカッパ発現ベクターに挿入した後、全 r 84 / PGN311 抗体配列を含む 1 つのベクターを作製するために組み合わせた。それから、このベクターを CHO K1S V 細胞にトランスフェクションした。細胞培養の最適化をほとんどせずに 1 リットル当たり 350 ミリグラムを超えるまで抗体産生を増加させた。さらに重要なことに、抗体ははるかにより安定であり、モノマーは 99 % を超えていた。

【0926】

r 84 / PGN311 の IgG 型の可変重鎖および可変軽鎖の核酸配列も以下に示す：

r 84 / PGN311 の IgG の VH 鎖（核酸配列）

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTTAGCTGCAAGGCATCTGGTGG  
GACATTTCCCTCATGCCATCTCCTGGGTCGGCAGGCTCCCGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGGGGTTCGATCCCG  
AAGACGGAGAGACCATTACGCACAGAAGTTCAAGGTCGCGTACCGATGACCGAGGATACTTCTACCGACACAGCATAT  
ATGGAGCTCAGTAGCTTGCCTCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGCGCGGGTAAT  
CATCCCTTCAACGGGATGGATGTATGGGCCAAGGGACCACCGTGACAGTCAGCTCT

(配列番号 26)

r 84 / PGN311 の IgG の VL 鎖（核酸配列）

GACATTGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTGAGCGCTTCTGTGGCGATAGGGTTACTATCACTTGTGAGGCCTCTCA  
ATCCATCAGCTCCTACTTGAACCTGGTACCAAGCAGAAACCCGGAAAGCACCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCCTCCTCC  
TGCAATCCGGAGTGCCCTCCGGTTAGCGGCTCCGGCTGGAACAGACTTACCCGTACCACTTCTTGCAGCCT  
GAGGATTTGCTACTTACTACTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTGACATTGGTGGTGGAACGAAAGTAGAAATTAA  
G

(配列番号 27)

マウス r 84 抗体のキメラバージョンも構築した。これは、完全にヒト可変領域をマウス定常領域に付着させて実施し、マウスにおける特定の前臨床研究に用いるマウス抗体が得られた。マウス定常領域をコードする核酸配列に、完全にヒト可変領域をコードする核酸配列を付着させたこと以外は、完全にヒト IgG について上記したようにして、マウスキメラ抗体を作製した。

【0927】

マウス抗体キメラ IgG における新規で完全な重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列ならびにアミノ酸配列を以下に示す：

R 84 / PGN311 のキメラ重鎖（核酸配列）

caggtgcagctggtaatctgggctgaggtaagaaggcctggggccctcagtgaaggcttcctgcaaggcttctggagg  
cacccctcagcagctatgcatacgctgggtgcgcacaggcccggacaaggcttgatggatggaggtttgtatccct  
aagatggtaaaacaaatctaagcacagaagtccaggcagagtaccatgaccgaggacacatctacagacacagccctac  
atggagctgagcagccctgagatctgaggacacggccgttattactgttgcacaggacgttctatggttcggggagtc  
tatacccttaacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctccctcagcgcgcgtgtgcaccgact  
tctatccactggccctgtgtggagataacaactggctccctggactcttaggatgcctggtaagggttattccct  
gagccagtgaccctgacactctggatccctgtccactgggtgtgcacaccctcccaagctgtccctgcagtc  
ctacaccctcagcagctcagtgactgtacccctcgagcacctggcccaaggccatccatcacctgcaatgtggcc  
caaggcagccaccaagggtggacaagaaagagccagaggcccacaatcaagccctgtccctcatgcaaatgccc  
aacctcttgggtggaccatccgtcttcatctccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccat  
cacatgtgtgggtggatgtgagcagggatgaccagatgtccagatcagctggttgtgaacaacgtgaaagtacaca  
cagctcagacacaaaacccatagagaggattacaacagttactctccgggtggactgtccctcccatcc  
tggatgagttggcaaggagtcaaatgcaaggtaacaacaacaaagacctccagcgcgcctatcgagagaaccat  
caaagggtcagtaagagctccacaggtatgttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggt  
aacactgaaccagtccctggactctgtatgttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaact  
aagaaatagctactcctgttcatgtggccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcc  
50

gtaaatga

(配列番号 3 1 )

R 8 4 / P G N 3 1 1 のキメラ重鎖（アミノ酸配列）

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDAY  
MELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIPFNGMDVWVGQGTTVTVSSRADAAPTVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP  
EPVTLWNSSGSLSSGVHTFPALQSDLYTLSSTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAP  
NLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHGD  
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNKGTELNYK  
NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSFRTPGK

(配列番号 3 2 )

10

R 8 4 / P G N 3 1 1 のキメラ軽鎖（核酸配列）

GATATCAGGATGACGCAGAGTCCAAGCTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGGGACAGGGTGACTATTACTTGTCCGGCATCACA  
GAGTATCTCCAGCTACCTTAATTGGTACCAGCAAAAGCCCCGCAAAGCCCCAAATTGCTGATTTACGCCAGCCAGCTCCC  
TTCAGTCTGGCGTCCCTAGCCGTTCTCCGGGAGCGGATCAGGCACAGACTTACGTTGACAATCAGTTCTGCAGCCG  
GAGGATTTGCCACTTACTACTGTCAACAGAGCTACAGTACGCCCTCACGTTGGCGGTGGACAAAGGTGGAAATCAA  
ACGGGCTGATGCTGCACCGACTGTGCCATCTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTG  
GCTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTG  
AACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGA  
ACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGT  
GT

20

(配列番号 3 3 )

R 8 4 / P G N 3 1 1 のキメラ軽鎖（アミノ酸配列）

DIRMTQSPSSLASVGDRVTICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTISSLQP  
EDFATYYCQQSYSTPLTFGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVL  
NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(配列番号 3 4 )

30

実施例 7 : E J 1 7 3 / 1 1 2 - C 1 1 ( r 8 4 / P G N 3 1 1 ) は V E G F R 2 に媒介される事象を阻害する

A . r 8 4 / P G N 3 1 1 は V E G F R 2 経由の細胞シグナル伝達を阻害する

選択した抗体に対する細胞の性能を確認するために、細胞アッセイを用いた。 V E G F は、 M A P K キナーゼ経路を介して細胞内シグナル伝達を刺激し、それはまた、それぞれ 4 4 キロダルトンおよび 4 2 キロのダルトンの、 M A P K 1 および M A P K 2 と呼ばれている 2 つのタンパク質の活性化（リン酸化による）を含む。これらのタンパク質の別名は、 E r k 1 および E r k 2 である。 V E G F の V E G F R 2 との相互作用を阻害する抗体は、同様に、 E r k 1 / 2 の活性化を阻害することができる。

【 0 9 2 8 】

40

b E n d . 3 または P A E / K D R 株化細胞（それぞれ、 U T - Southwestern Medical Center, ダラス, テキサスの Dr. Philip Thorpe および U l m University Medical Center, ウルム, ドイツの Dr. Johannes Waltenberger から入手）はそれら表面に V E G F R 2 を発現し、それらを V E G F で刺激することができる。株化細胞を、血清および増殖因子を 4 8 時間欠乏させて、次に、 I g G 型の候補（ 4  $\mu$  g / m l ）の存在下または非存在下で、 V E G F 1 6 5 を 1 0 n g / m l ( V 1 0 ) および 5 0 n g / m l ( V 5 0 ) 添加することで刺激した。刺激しなかった細胞を陰性対照 ( N S ) とした。この刺激の後、細胞を溶解する前に、異なるホスファターゼ阻害剤を含む氷冷した P B S で洗浄した。遠心分離した細胞抽出物をポリアクリルアミドゲルで泳動させた後、分離したタンパク質をニトロセルロース膜にプロットした。 E r k 1 / 2 リン酸化の阻害を観測するために、そのプロットに対して抗ホスホ E r k 1 / 2 抗体をプローブとして用いた（図 6 ）。総 E r k 1 / 2 量も細胞レベルの内部標準として検出した。 r 8 4 / P G N 3 1 1 の I g G クローンは E r k 1 / 2 のリン酸化を阻害した。

【 0 9 2 9 】

50

VEGFはまた、155キロダルトンのタンパク質の活性化（リン酸化による）を含むホスホリパーゼC（PLC-）経路を介する細胞内シグナル伝達も刺激する。VEGFのVEGFR2との相互作用を阻害する抗体は、同様に、PLC-の活性化を阻害することができる。

#### 【0930】

ヒト真皮微小血管内皮株化細胞（HDMEC, Lonza, カタログ#CC2810）はそれらの表面にVEGFR2を発現し、VEGFで刺激することができる。6ウェルプレートを用いて、1ウェル当たり250,000細胞でHDMECを塗布した。5%のFBS ECM（血管内皮細胞培地）中で細胞を終夜接着させた。細胞を、24時間血清を欠乏させた後、アバスチン（ペバシズマブ, Presta et al., 1997），r84/PGN311，2C3（すべてIgG型）または対照のIgG抗体（ヒト抗RSVであるシナジス（パリビズマブ），MedImmune）の抗体存在下、VEGFI65(+VEGF)を50ng/ml添加することで刺激した。IgGは90μg/mlで用いた。刺激しなかった細胞を陰性対照（NT）とした。アバスチンおよびr84/PGN311を、VEGF非存在下の細胞にも加えた。

10

#### 【0931】

この刺激の後、細胞を溶解する前に、異なるホスファターゼ阻害剤を含む氷冷したPBSで洗浄した。遠心分離した細胞抽出物をポリアクリルアミドゲルで泳動させた後、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。リン酸化の阻害を観測するために、このプロットに対して抗ホスホErk1/2抗体（図16A, pERK1/2）および抗ホスホPLC-抗体（図16A, pPLC-）をプローブとして用いた。総Erk1/2量（図16A, ERK1/2）および総PLC-量（図16A, PLC-）も細胞レベルの内部標準として検出した。HDMEC上のVEGFR2の発現をVEGFR2に対する抗体を用いて検出した（図16A）。図16Aは、r84/PGN311のIgG抗体がErk1/2およびPLC-の両方に対するリン酸化を阻害したことを示す。

20

#### 【0932】

上記と同じ方法を用いて、アバスチンもしくはr84/PGN311（IgG型）の抗体の存在下または非存在下で50ng/mlのVEGFI65の添加により刺激するか、あるいは無処理のままにする前に、VEGFR1を発現しているPAE\_F1t1細胞を、同様の方法で処理または欠乏させた。プロットを調製し、抗ホスホVEGFR1抗体をプローブとして用いた（図16B, ホスホVEGFR1）。総VEGFR1量（図16B, 総VEGFR1量）も細胞レベルの内部標準として検出した。図16Bのデータは、陽性対照のアバスチンがVEGFR1のリン酸化を阻害したのに対し、r84/PGN311はVEGFR1のリン酸化を阻害しなかったことを示す。図16Aおよび図16Bはともに、r84/PGN311がVEGFR2経路を選択的に阻止することを確認するものである。

30

#### 【0933】

B. r84/PGN311はVEGFR2を発現している細胞のVEGFに誘導される遊走を阻止する

予想される通り、VEGFR2発現している内皮細胞のVEGFに誘導される遊走を、r84/PGN311が強力に阻害できることも確認した。この活性の例を、HDMECについては図20Aに、PAE\_KDRを発現している細胞については図20Bに示す。これらのアッセイのそれぞれで、r84は、VEGFR2を発現している細胞のVEGFに誘導される遊走を有意に阻害しており、少なくともアバスチンと同様にして機能する点に注意する。

40

#### 【0934】

VEGFR1を発現しているPAE\_F1t1細胞を用いた比較研究によって、r84がVEGFR1を発現している細胞のVEGFに誘導される遊走を阻害しないことがわかった（図21）。対照的に、アバスチンは、VEGFR1を発現している細胞のVEGFに誘導される遊走を有意に阻害する（図21）。

50

## 【0935】

実施例8：E J 173 / 112 - C 11 (r 84 / PGN311) は VEGF121 に結合する

VEGF-Aの生物学的に活性を有するアイソフォームであるVEGF121に対するE J 173 / 112 - C 11 (r 84 / PGN311) s c F v の結合を測定した (R & D Systems, HuVEGF121 298 - VS - 005 / CF)。2 μg / m l の無担体 VEGF121 をポリスチレン免疫プレートに塗布した。10 μg / m l の精製した s c F v を加え、マウス抗c-my c タグモノクローナル抗体 (インビトロジエン) および HRP 接合二次ウサギ抗マウス抗体を用いて検出した。

## 【0936】

この結果から、E J 173 / 112 - C 11 (r 84 / PGN311) (図7) が VEGF121 に対して陽性であることがわかった。B9マウス s c F v である対照も VEGF121 を認識したが、ヒト異型より低いレベルであった。

## 【0937】

実施例9：E J 173 / 112 - C I 1 (r 84 / PGN311) は VEGFR1 ではなく VEGFR2 に対する VEGF の結合を阻止する

1ウェル当り 50 μl の増感緩衝液中、可溶性の HuVEGFR1 / Fc (R & D Systems, カタログ # 321 - FL - 050, CF) または HuVEGFR2 (R & D Systems, 357 - KD - 050 / CF) を 1.0 μg / m l の濃度で、96ウェル E L I S A プレート (BD ファルコン、カタログ # 353279) を終夜 4 で被覆した。洗浄緩衝液 (WB) (TBS-T (トリス緩衝生理食塩水、0.1%の Tween 20)) でウェルを洗浄し、20% Aquablock (East Coast Biologics社) を含む WB で、37 で 1 時間プロッキングした。適切な濃度の IgG または WB を 50 μl ウェルに添加し、その直後に最終濃度で 100 ng / m l の VEGF - ビオチンを添加した。このプレートを RT で 2 時間インキュベートし、3回洗浄し、WB で 1 : 7500 に希釈したペルオキシダーゼ接合アビシン (Jackson Immuno Research) 1ウェル当り 100 μl とともに RT で 1 時間インキュベートした。4回プレートを洗浄後、TMB でシグナルを発現し、酸で止め、450 nm で読み取った。

## 【0938】

これらのアッセイの結果を図8A および図8B に示す。VEGF 単独のシグナル (VEGF) または示された抗体存在下の VEGF のシグナルを VEGF 単独 (100%) で標準化した。平均 + / - SEM を示す。N = 12 (各処理それぞれ 3 反復実施した 4 枚の同一のプレート)。50%未満のシグナルは、結合の有意な阻害と考えられる。

## 【0939】

図8A および図8B に示すように、この対照研究の結果から、r 84 / PGN311 は VEGF の VEGFR2 との相互作用を実質的に阻止するが、VEGF の VEGFR1 との相互作用を実質的に阻止しないことがわかる。r 84 / PGN311 およびアバスチン (ペバシズマブ) (Presta et al., 1997) を用いた並行研究から、VEGFR2 および VEGFR1 の両方と VEGF との相互作用を実質的に阻止するとして知られているアバスチンの特性を確認した。加えて、VEGFR1 に対する VEGF 結合の実質的な阻止ではなく、VEGFR2 に対する VEGF 結合の実質的な阻止における差異が 2C3 の場合より r 84 の場合の方がさらに大きいことが、r 84 / PGN311 および元のマウス 2C3 抗体を用いた並行研究からわかった。これは、2C3 抗体に対する r 84 の他の驚くべき利点を示すものである。

## 【0940】

実施例10：腫瘍関連マクロファージは VEGFR2 を発現する

A. モデル

1 × 10<sup>6</sup> 個の M i a P a C a - 2 細胞を 腋臓の尾部に注射することによって、無胸腺ヌードマウス (7 ~ 9 週) に同所性腫瘍を定着させた。治療を始める前に 1 週間腫瘍を成

10

20

30

40

50

長させた。

【0941】

B. 処理

週2回で3週間、対照抗体(C44)またはマウス2C3抗体をi.p.注射することで動物を処理した。屠殺し腫瘍を切除して、残存する脾臓とともに重さを量り、急冷するか、または組織化学的および免疫組織化学的分析用にメチルカルノアで固定化した。

【0942】

C. IHC

マクロファージマーカーとして用いる抗体として、CD86, CD14およびF4/80が挙げられる。VEGFR2抗体としてT014およびRAFL-2を用いた。

10

【0943】

D. 腹腔マクロファージの単離

腫瘍担持(TB)または非腫瘍担持(NTB)動物のマクロファージを、無菌の腹腔洗浄法により単離した。

【0944】

E. 結果

驚くべきことに、腫瘍関連マクロファージ(TAM)がVEGFR2を発現していたことが判明した。これにより、インビボで2C3がVEGFR2陽性TAMの浸潤を減少させたという観察結果が説明される。この結果を図10A, BおよびCに示す。

20

【0945】

この点に関して、対照で処理または2C3で処理した動物からの腫瘍切片における染色からT014(VEGFR2抗体)およびF4/80(マクロファージマーカー)が共局在化していることを図10Aは示している。2C3は、マクロファージ浸潤を減少させる。しかしながら、両方の群とも、VEGFR2およびマクロファージマーカーの共局在化を示している。3つの異なるマクロファージマーカーのうちの1つおよびVEGFR2が二重陽性である細胞数を、図10Bに示す。図10Cにおいて、腫瘍担持動物の腹腔マクロファージが、2つの異なる抗体を用いたVEGFR2を示す。

【0946】

実施例11：r84/PGN311は動物の腫瘍容積を減少させる

r84/PGN311抗体を投与することで腫瘍容積が有意に減少することを示すために動物モデルを用いた。

30

【0947】

A. MDA-MB-231乳癌細胞腫瘍モデル

500万個のMDA-MB-231細胞を、SCIDマウスの乳房脂肪体に注射した。治療開始の前に26日間腫瘍を成長させた。この時、動物を無作為に治療群に割り当てた。100μlの生理食塩水(対照, n=5)、または100μlの緩衝液中250μgのアバスチンIgG(n=8)もしくはr84/PGN311 IgG(n=9)を週2回皮下注射により投与した。この結果を、平均腫瘍容積+/-SEMを表す図11に示す。アバスチンおよびr84を処理したマウスは、対照を処理した動物より有意に小さい腫瘍容積を有する。図12は、各群の個々の動物の腫瘍重量/体重を示す。アバスチンおよびr84で処理したマウスは、対照で処理した動物より有意に小さい腫瘍/体の比率を有する。図11および図12の結果から、r84がアバスチンと基本的に同程度効果的に機能することがわかる。

40

【0948】

B. A673横紋筋肉腫瘍モデル

1.0×10<sup>6</sup>個のA-673細胞(ヒト横紋筋肉腫株化細胞-ATCC CRL-1598)を、22nu/nu(NCI)マウスに皮下注射した。このマウスを3つの群に分け(2C3およびr84/PGN311の場合n=8/群, n=6/対照群)、腫瘍細胞注射(TCI)後5日目に治療を開始した。治療は、50μgの示されたIgGを週2回i.p.注射することとなる。動物の重量および腫瘍容積を観測した。対照抗体をシナジ

50

ス(ヒト抗RSV)とした。

【0949】

TCI後5日目～29日目の間に、治療としてマウスに8回注射した。図13は、TCI後30日目の各群の腫瘍容積を示す。一元配置分散分析によって、群が統計学的に差があるものであること；さらに、「ダネットの多重比較試験」( $p < 0.05$ )により、2C3およびr84/PGN311が対照と差があることが示された。週2回の $50\mu\text{g}$ という適度な用量での注射で2C3およびr84が腫瘍成長を減少させたことは、これらの結果から明らかである。r84は、2C3と基本的に同様の活性を示した。この動物研究からの全体的な結論は、2C3およびr84がA673腫瘍の成長を抑制する点で効果的であるということである。

10

【0950】

C. ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)モデル

r84/PGN311抗体を投与することによって、腫瘍成長を有意に減少させることを示すために、さらにインビボの動物モデルを用いた。

【0951】

r84/PGN311がインビボで腫瘍成長を阻害することができるか、H1299(ATCC CRL-5803), H460(ATCC HTB-177), H358(ATCC CRL-5807)およびA549(ATCC CCL-185)の4つの異なるヒト非小細胞肺癌(NSCLC)で試験した。SCIDマウス(株化細胞当たり $n = 25$ )に $2.5 \times 10^6$ 個の細胞を皮下注射し、TCI後1日目から治療を開始した。治療は、 $250\mu\text{g}$ のシナジスまたはXTL(陰性対照)、アバスチンIgG(陽性対照)または $500\mu\text{g}$ のr84/PGN311のIgGを各週2回腹膜内(i.p.)に送達することからなる。治療はマウスを屠殺するまで実施した。H460マウスは40日後に屠殺、H1299マウスは48日後に屠殺、A549マウスは55日後に屠殺、そしてH358マウスは83日後に屠殺した。腫瘍重量を計量し、その結果を平均腫瘍重量+/-SEMとして、図17A(H460の場合)、図17B(H1299の場合)、図17C(H358の場合)および図17D(A549の場合)に示す。対照の腫瘍重量に対する治療した腫瘍重量の比率も図17A、図17B、図17Cおよび図17D('T/C')に示す。

20

【0952】

図17A、図17B、図17Cおよび図17Dから、アバスチンおよびr84/PGN311で処理した動物が対照で処理した動物より有意に小さい腫瘍重量を有することがわかる。H460(図17A)、H1299(図17B)およびA549(図17D)モデルにおいて、r84/PGN311はアバスチンより良好に機能する。H358アッセイ(図17C)においては、r84/PGN311は、アバスチンと少なくとも同程度効果的に機能する。

30

【0953】

D. Panc1膵臓癌細胞腫瘍モデル

膵臓腺癌細胞であるPanc1担持マウスに、r84/PGN311のIgGまたは陰性対照としてシナジスのいずれかを投与した。治療はマウスを屠殺するまで実施した。腫瘍容積を計量し、この結果を図22に示す。r84/PGN311が対照と比較して顕著にPanc1腫瘍成長を減少させることがわかる(図22)。

40

【0954】

E. 4T1乳房腫瘍モデル

マウスr84/PGN311のキメラバージョンを用いた対照研究から、r84抗体が、同系4T1乳房腫瘍担持マウスの生存を延長できることがわかった。図23に示すように、マウスキメラr84/PGN311を用いた治療によって、対照で処理した群の動物より長く生存するマウスになるという結果となった。

【0955】

実施例12：r84/PGN311は微小血管密度および腫瘍関連マクロファージの浸

50

### 潤を減少させる

実施例 1 1 に記載した M D A - M B - 2 3 1 動物モデル研究で用いたマウスから腫瘍を採取し、緩衝液 1 0 0  $\mu$  l 中 2 C 3 の I g G を 2 5 0  $\mu$  g 用いる同じ投薬計画に従って並行して治療したマウスからも腫瘍を採取した。これらの腫瘍を切片化し、マウス内皮細胞 (M E C A - 3 2 ) およびマクロファージマーカー (M a c - 3 ) に対する抗体で染色した。対照動物からの 3 つの腫瘍および r 8 4 / P G N 3 1 1 および 2 C 3 で処理した動物それぞれからの 3 つの腫瘍を分析し、各腫瘍からの 5 つの画像を研究した。この結果を図 1 4 および図 1 5 に示す。この結果から、r 8 4 および 2 C 3 で処理した動物からの腫瘍が、血管数 / 高倍率視野 (M E C A - 3 2 , p < 0 . 0 0 0 1 , 図 1 5 ) を有意に減少させ、マクロファージマーカー (M a c - 3 , r 8 4 の場合 p < 0 . 0 1 , 図 1 4 ) の発現を有意に減少させたことがわかった。これは、r 8 4 が微小血管密度および腫瘍関連マクロファージの浸潤を減少させること、ならびに r 8 4 の、腫瘍関連マクロファージの浸潤を減少させる効果が 2 C 3 より顕著であるとの証拠となる (図 1 4)。

10

### 【 0 9 5 6 】

#### 実施例 1 3 : 腫瘍に浸潤する細胞に対する r 8 4 / P G N 3 1 1 の効果

##### A . 多形核白血球

実施例 1 1 に記載した M D A - M B - 2 3 1 動物モデル研究で用いたマウスから腫瘍を採取し、緩衝液 1 0 0  $\mu$  l 中 2 C 3 の I g G を 2 5 0  $\mu$  g 有する同じ投薬計画に従って並行して治療したマウスからも腫瘍を採取した。

20

### 【 0 9 5 7 】

この研究から、r 8 4 および 2 C 3 で処理した動物の腫瘍が、対照と比較して多形核白血球 (P M N ) 浸潤を有意に増加させることがわかる。この効果は、r 8 4 および 2 C 3 抗体の場合、統計的に有意であった。アバスチン (ベバシズマブ) も対照と比較して M D A - M B - 2 3 1 腫瘍への P M N の浸潤を増加させたが、r 8 4 および 2 C 3 とは対照的に、この増加はアバスチンの場合、統計的に有意ではなかった。

20

### 【 0 9 5 8 】

##### B . C D 1 1 b + / G r 1 + 細胞

M D A - M B - 2 3 1 腫瘍担持マウスのさらなる研究から、対照とは対照的に、r 8 4 で処理した動物の腫瘍に浸潤する C D 1 1 b / G r 1 二重陽性細胞は、有意に少ないことがわかる。比較研究において、アバスチンで処理した動物において若干の減少が測定できたが、2 C 3 抗体もアバスチンも、C D 1 1 b + / G r 1 + 浸潤において統計的に有意な減少を示さなかった。

30

### 【 0 9 5 9 】

実施例 1 1 に記載した M D A - M B - 2 3 1 動物モデル研究で用いたマウスから腫瘍を採取し、緩衝液 1 0 0  $\mu$  l 中 2 C 3 の I g G を 2 5 0  $\mu$  g 有する同じ投薬計画に従って並行して治療したマウスからも腫瘍を採取した。

30

### 【 0 9 6 0 】

この研究から、対照とは対照的に、r 8 4 で処理した動物の腫瘍に浸潤する C D 1 1 b + / G r 1 + 二重陽性細胞は、有意に少ないことがわかる (分散分析による評価, p < 0 . 0 1 , 図 2 5 中 \*\* で示す)。二重陽性細胞数の減少は 3 9 % であった。比較研究において、C D 1 1 b + / G r 1 + 浸潤において、2 C 3 は統計的に有意な減少を示さなかつた (図 2 5)。

40

### 【 0 9 6 1 】

近年、両マーカーを発現している細胞が、抗 V E G F 療法に対する腫瘍の治療抵抗性の媒介に関連することが判明している (Shojaei et al., 2007) ことから、骨髄に派生するサプレッサー細胞 C D 1 1 b + / G r 1 + の浸潤が減少したことが特に興味深い。骨髄由来のサプレッサー細胞 (C D 1 1 b + G r 1 +) も、腫瘍進行の重要な一因である。腫瘍微細環境において、これらの細胞は、免疫抑制性の伝達物質を分泌し、T リンパ球機能不全を誘発する (Gabrilovich et al., 2001; Serafini et al., 2004)。

50

### 【 0 9 6 2 】

r 8 4 を処理した動物において、CD11b<sup>+</sup> / Gr1<sup>+</sup>細胞の腫瘍浸潤が、最も顕著でない／有意に低いことから、r 8 4 を用いた治療は、VEGFを標的とする他の薬物を用いた治療より、抗VEGF療法に対する薬物耐性または治療抵抗性を生じにくい。

#### 【0963】

このように、CD11b<sup>+</sup> / Gr1<sup>+</sup>細胞の腫瘍への浸潤を減らさせることは、r 8 4 / PGN311抗体により示されるさらに有利な特性であり、r 8 4 / PGN311の治療への適用にとって潜在的な重要性を有する特性である。さらにまた、この特性は、2C3抗体によっては示されず、アバスチンでもより低下したレベルでしか示されない。

#### 【0964】

##### 実施例14：r 8 4 / P G N 3 1 1 が腫瘍のリンパ管密度を減少させる

10

MDA-MB-231腫瘍を有するマウスを、r 8 4 / PGN311または対照抗体で処理し、腫瘍内のリンパ管を示すために腫瘍切片を分析した。この結果を図18A、図18Bおよび図18Cに示す。図から、r 8 4 を処理された腫瘍のリンパ管密度が対照腫瘍より有意に小さいことがわかる。

#### 【0965】

特に、リンパマーカー、ポロプラニンおよびProx1によりリンパ管を同定するため、凍結したMDA-MB-231腫瘍切片の免疫蛍光染色を最初に実施した。これらの結果を図18Aに記載する。これらは、ポドプラニン（緑）、Prox1（赤）およびこれらの合成の画像を示し、対照（上のパネル）およびr 8 4 （下のパネル）で処理した腫瘍におけるリンパ管が同定されている。LYVE-1染色も、MDA-MB-231腫瘍切片で順次実施した。図18Bに示すように、これらの結果は、LYVE-1で染色したMDA-MB-231腫瘍切片におけるリンパ管のパターンが、ポドプラニンおよびProx1で観察されたパターン（図18A）と類似していることを示す。

20

#### 【0966】

対照およびr 8 4 で処理した腫瘍におけるリンパ管密度に差があるか決定するために、LYVE-1で染色した各腫瘍切片の全域を低倍率で検査し、NIS-Elementsイメージング・ソフトウェアを用いて、LYVE-1陽性領域のパーセントを視野ごとに決定した。最もパーセントが高いLYVE-1陽性領域での10個の視野を合わせて平均化し、腫瘍ごとの最終スコアを得て、対応のないスクレーベントt検定により群の平均の有意差を試験した。図18Cに示すように、対照腫瘍のLYVE-1陽性領域のパーセント（7.03 ± 1.013；n = 6）は、r 8 4 で処理した腫瘍（2.23 ± 0.986；n = 5）より、P = 0.0042で有意に大きかった。r 8 4 / PGN311による処理で、腫瘍リンパ管密度が有意に小さくなることが示されるように、これらの結果は、リンパ管形成を阻害するための本発明のヒト抗体の使用を支持している。

30

#### 【0967】

##### 実施例15：r 8 4 / P G N 3 1 1 の長期投与はマウスに毒性を誘導しない

30

非腫瘍担持マウスおよび腫瘍担持マウスをこれらの研究に用いた。

#### 【0968】

5 × 10<sup>6</sup>個の Panc-1細胞（ヒト膵臓癌株化細胞、ATCC CRL-1469）を、10匹のSCIDマウスに注射した。TCI後1日目に、5匹の腫瘍担持マウスおよび5匹の非腫瘍担持マウスに、500 μgのシナジスまたはr 8 4 / PGN311のIgGをi.p.注射した。治療として、週に2回の注射を12週間継続し、その後マウスを屠殺した。屠殺時に血液を採取し、標準的な血液化学で分析した。肝臓、腎臓、および甲状腺も、組織学的に評価するために回収した。

40

#### 【0969】

これらの分析から、H & E染色により検査した（この検査は、マウス組織の組織学を専門とする病理学者が盲検法でこの検査を実施した）任意の組織に係る組織学において、明らかな変化はないことがわかった。さらにまた、22の異なる検体について血液化学により分析し、対照のマウス、実験に使わなかったナイーブマウス、またはr 8 4 で処理したマウスの間で有意な変化は見られなかった。

50

\* \* \*

本発明の組成物および方法が、好ましい態様に関して記載されているとはいえ、本発明の概念、精神および範囲を逸脱せずに、本明細書に記載の組成物、方法および方法における段階または方法における一連の段階に変動を適用することはできるることは当業者に明らかである。より詳細には、同一のまたは類似の結果が達成される限り、化学的および生理学的の両方に関連する特定の薬剤は、本明細書に記載の薬剤と置換することができる事が明らかである。当業者に明らかである同様な置換および変更は全て、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の精神、範囲および概念に含まれるとみなされる。

【 0 9 7 0 】

参考文献

10

本明細書に明記したものに補足する手順の例や他の詳細を提供する限りにおいて、以下の参考文献は参照により本明細書に特に援用される。

【 0 9 7 1 】

Abrams and Oldham, "In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer", Foo n and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 103-120, 1985.

Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle, Ferrara, King, Smith, "Suppr ession of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endotheli al growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins," Proc. Na tl. Acad. Sci., USA, 92:10457-10461, 1995.

20

Alderson, McGowan, Baldridge, Probst, "TLR4 Agonists as Immunomodulatory Agents", J. Endoxin Res., 12(5):313-319, 2006.

Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, Vascular endothelial growth facto r acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implication s for retinopathy of prematurity," Nature Med., 1:1024-1028, 1995.

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST a nd PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997.

30

Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in h uman placenta and cultured placental fibroblasts", Placenta, 15:557-61, 1994.

Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, Ortiz, Criollo, Mignot, Maiuri, Ulrich, Saulnier, Yang, Amigorena, Ryffel, Barrat, Saftig, Levi, Lidereau, Nogues , Mira, Chompret, Joulin, Clavel-Chapelon, Bourhis, Andre, Delaloge, Tursz, Kroemer, Zitvogel, "Toll-Like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy", Nat. Med., 13:1050-1059, 2007.

40

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muylderma ns, "Selection and ide ntification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodie s", FEBS Lett., 414:521-526, 1997.

Asahara, Murohara, Sullivan, Silver, van der Zee, Li, Witzenbichler, Scha tteman, Isner, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogene sis," Science, 275(5302):964-967, 1997.

50

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.

Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity in vivo," *Hybridoma*, 17:185-90, 1998.

10

Baca, Presta, O' Connor, Wells, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in *Saccharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 6:229-234, 1987.

Barbas, Kang, Lerner and Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(18):7978-7982, 1991.

20

Baxter and Jain, "Transport of fluid and macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991.

Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer*, 109(2):170-179, 2006.

Benjamin, Golijanin, Itin, Pode and Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Clin. Invest.*, 103(2):159-165, 1999.

30

Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, et al., "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.

Borgstrom, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.

40

Borgstrom Bourdon, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.

Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anti cancer Research*, 19(5B):4203-11, 1999.

Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," FAS

50

EB J, 6(14):3290-3299, 1992.

Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," Cancer Res., 58(9):1952-1959, 1998.

Brekken, Overholser, Stasny, Waltenberger, Minna, Thorpe, "Selective inhibition of VEGFR2 activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", Cancer Res., 60:5117-24, 2000.

Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," Angiogenesis, 10 2: 9-20, 1998.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(13):4438-4442, 1985.

Burke, Carle, Olson, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", Science, 236, 806-812, 1987.

Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," Biochem. Biophys. Res. Comm., 207:348-354, 1995. 20

Burrows and Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," Pharmacol. Ther., 64:155-174, 1994.

Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:896-9000, 1993.

30

Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," Cancer Res., 52:5954-5962, 1992.

Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Van den Hoeck, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," Nature, 380(6573):435-439, 1996.

40

Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", SIAM J. Applied Math., 48:1073, 1988.

Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8502-8507, 1996.

Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," Cancer R 50

es., 56:172-181, 1996.

Clapp, Martial, Guzman, Fentier-Delure, Weiner, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," Endocrinology, 133(3):1292-1299, 1993.

Clauss, Weich, Breier, Knies, Rockl, Waltenberger, Risau, "The vascular endothelial cell growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities," J. Biol. Chem., 271(30):17629-17634, 1996.

10

Cohen, Gaskins, Nasoff, "Generation of a Monoclonal Antibody Agonist to Toll-Like Receptor 4", Hybridoma, 24(1):27-35, 2005.

Condeelis and Pollard, "Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis", Cell, 124:263-266, 2006.

Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," J. Clin. Invest., 84:1470-1478, 1989.

20

Coughlin, Salhany, Wysocka, Aruga, Kurzawa, Chang, Hunter, Fox, Trinchieri, Lee, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," J. Clin. Invest., 101(6):1441-1452, 1998.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in Aspergillus Nidulans", Biotechnology, 5:369, 1987.

D'Amato, Loughnan, Flynn, Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(9):4082-4085, 1994.

30

D'Angelo, Struman, Martial, Weiner, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(14):6374-6378, 1995.

Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:7-12, 1996. Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," Annu. Rev. Biochem. 59:439-473, 1990.

40

Davies and Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", Biotechnology (NY), 13:475-479, 1995.

Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", Curr. Top. Microbiol. Immunol., 237:173-85, 1999.

Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its r

50

ceptors in psoriasis," *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.

Devereux, Haeberli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.

DeVore, Hellerqvist, Wakefield, Wamil, Thurman, Minton, Sundell, Yan, Carter, Wang, York, Zhang, Johnson, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.

deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Ferrara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science*, 255(5047): 989-991, 1992. 10

Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3:77-85, 1991 a.

Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel, Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*, 174:1275-1 20 278, 1991b.

Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.

Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.

Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991. 30

Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature*, 380(6573):439-442, 1996.

Fidler and Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell*, 79(2):185-188, 1994.

Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.*, 4 Suppl 1:S58-66, 1998. 40

Finberg, Knipe, Kurt-Jones, "Herpes Simplex Virus and Toll-Like Receptors", *Viral Immunol.*, 18(3):457-465, 2005.

Folkman and Shing, "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934, 1992.

Folkman, Langer, Linhardt, Haudenschild, Taylor, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983. 50

Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature*, 376:66-70, 1995.

Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cell. Biol.*, 16:4604-4613, 1996.

Fotsis, Zhang, Pepper, Adlercreutz, Montesano, Nawroth, Schweigerer, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994. 10

Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *J. Biol. Chem.*, 270:12607-12613, 1995.

Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992. 20

Frater-Schroder, Risau, Hallmann, Gautschi, Bohlen, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.

Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.

Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4): 212-22, 1996. 30

Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, 166, 5398-406.

Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.

Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993. 40

Gagliardi, Kassack, Kreimeyer, Muller, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.

Gagnon, Bielenberg, Gechtman, Miao, Takashima, Soker, Klagsbrun, "Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(6):2573-2578, 2000. 50

Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," *J. Biol. Chem.*, 272:23659-23667, 1997.

Gerber, Vu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation"; *Nature Medicine*, 5(6):623-8, 1999.

Giovarelli, Cappello, Forni, Salcedo, Moore, LeFleur, Nardelli, Di Carlo, Lollini, Ruben, Ullrich, Garotta, Musiam, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", *J. Immunol.*, 164, 3200-3206, 2000  
10

Glennie, McBride, Worth, Stevenson, "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.

Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.  
20

Good, Polverini, Rastinejad, Beau, Lemons, Frazier, Bouck, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.

Goswami, Sahai, Wyckoff, Cammer, Cox, Pizley, Stanley, Segall and Condeelis, "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop", *Cancer Res.*, 65(12):5278-5283, 2005.  
30

Grant, Caballero, Bush, Spoerri, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.

Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. Biol. Chem.*, 270:6729-6733, 1995.  
40

Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993.

Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.

Hanahan and Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996.  
50

Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis", Scandinavian J. Rheumatol., 27(5):377-80, 1998.

Haran, Maretzke, Goldberg, Horowitz, Degani, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," Cancer Res., 54(21):5511-5514, 1994.

Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," J. Cell Biochem., 49(3):272-283, 1992. 10

Harlow and Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 978-087969314-5 :1-726, 1988.

Hellerqvist, Thurman, Page, Wang, Russell, Montgomery, Sundell, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," J. Cancer Res. Clin. Oncol., 120(1-2):63-70, 1993. 20

Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, 1992.

Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929, 1978.

Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(16):9349-9354, 1998.

Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," In Vivo, 11(2):125-132, 1997. 30

Holash, Maisonpierre, Compton, Boland, Alexander, Zagzag, Yancopoulos, Wigand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", Science, 284:1994-1998, 1999.

Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136, 2005.

Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", Trends in Biochemical Sciences, 20:478-480, 1995. 40

Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", J. Mol. Biol., 233:123-38, 1993

Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", Nucleic AcidRes., 26:316-9, 1998.

Hood and Granger, "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth 50

factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(36):23504-23508, 1998.

Hood, Meininger, Ziche, Granger, "VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. Physiol.*, 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.

Hori, Hu, Yasui, Smither, Gresham, Fan, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.

10

Horsmans, Berg, Desager, Mueller, Schott, Fletcher, Steffy, Bauman, Kerr, Averett, "Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection," *Hepatology*, 42(3):724-31, 2005.

Houben-weyl, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, Vol. 15 I and II, Thieme, Stuttgart, 1987.

Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Mol. Endocrinol.*, 5(12):1806-1814, 1991.

20

Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.

Hurwitz, Fehrenbacher, Novotny, Cartwright, Hainsworth, Heim, Berlin, Baron, Griffing, Holmgren, Ferrara, Fyfe, Rogers, Ross, Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer", *N. Engl. J. Med.*, 350:2335-2342, 2004.

30

Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic and Lerner, "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.

Hussain, Kotz, Minasian, Premkumar, Sarosy, Reed, Zhai, Steinberg, Raggio, Oliver, Figg, Kohn, "Phase II Trial of Carboxyamidotriazole in Patients With Relapsed Epithelial Ovarian Cancer", *J. Clin. Oncol.*, 21(23):4356-4363, 2003.

Ingber, Fujita, Kishimoto, Sudo, Kanamaru, Brem, Folkman, "Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.

40

Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation*, 98(20):2108-16, 1998.

Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated

50

d with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.

Iwamoto, Nomizu, Yamada, Ito, Tanaka, Sugioka, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.

Jackson, Volpert, Bouck, Linzer, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190): 1581-1584, 1994.

10

Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996

Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.

Kamphaus, Colorado, Panka, Hopfer, Ramchandran, Torre, Maeshima, Mier, Sukhatme, and Kalluri, "Canstatin, a Novel Matrix-derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth", *J. Biol. Chem.*, 275(2):1209-1215, 2000.

20

Kang, Barbas, Janda, Benkovic and Lerner, "Linkage of Recognition and Replication Functions by Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.

Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic MRNAs and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6:187-195, 1987.

30

Kaur, Brat, Devi and Van Meir, "Vasculostatin, a proteolytic fragment of Brain Angiogenesis Inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor", *Oncogene*, 24:3632-3642, 2005.

Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science*, 246:1309-1312, 1989.

Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.

40

Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997.

Kerbela, Viloria-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med.*, 4(5):286-295, 1998.

50

Keyt, Nguyen, Berleau, Duarte, Park, Chen, Ferrara, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," J. Biol. Chem., 271(10):5638-46, 1996.

Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," Growth Factors, 7:53-64, 1992.

Kim, Li, Winer, Armanini, Gillett, Phillips, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo," Nature, 362:841-844, 1993. 10

Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", FEBS Lett., 443(3):35 3-6, 1999.

Kipriyanov, Kupriyanova, Little, Moldenhauer, "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry", J. Immunol. Meth., 196:51-62, 1996. 20

Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures", J. Immunol. Meth., 200:69-77, 1997.

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", Nucleic Acids Research, 34(19):e132, 2006.

Kleinman, Weeks, Schnaper, Kibbey, Yamamura, Grant, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," Vitam. Horm., 47:161-186, 1993. 30

Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," Biochem.Biophys. Res. Commun, 194(3):1234-1241, 1993.

Korpelainen and Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," Curr. Opin. Cell Biol., 10(2):159-164, 1998.

Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," Cancer Res., 57:3852-3859, 1997. 40

Kroll and Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells", J. Biol. Chem., 272:32521-7, 1997.

Kroll and Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)," Biochem. Biophys. Res. Commun., 252( 50

3):743-746, 1998.

Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF<sub>α</sub>): a Putative -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature -Factor", Cell, 30:933-943, 1982.

Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.

Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," J. Biol. Chem., 267(23):16736-16745, 1992. 10

Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", Protein Engineering, Design & Selection, 17(4):357-366, 2004.

Lee, Clapp, Martial, Weiner, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," Endocrinology, 139(9):3696-3703, 1998. 20

Lewis and Pollard, "Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments", Cancer Res., 66(2):605-612, 2006.

Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," Cell Growth Differ., 9:49-58, 1998.

Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95(15):8829-34, 1998. 30

Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi, "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", J. Pharmacol. Exp. Therap., 288(1):371-8, 1999.

Lin, Nguyen, Russell and Pollard, "Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy", J. Exp. Med., 193(6):727-739, 2001. 40

Lin, Li, Gnatovskiy, Deng, Zhu, Grzesik, Qian, Xue and Pollard, "Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer", Cancer Res., 66(23):11238-11246, 2006.

Lindner and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," Int. J. Cancer, 71(3):456-461, 1997.

Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergisti 50

stically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.

Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996.

Lin-ke, Hong-Qu, Nagy, Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. J. Cancer*, 32A(14):2467-2473, 1996.

10

Loupakis, Falcone, Masi, Fioravanti, Kerbel, Del Tacca, Bocci "Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Immunodepleted plasma of Cancer Patients As a Possible Pharmacodynamic Marker for Bevacizumab Activity," *J. Clin. Onc*, 1816-1818, 2007.

Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.

20

Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.

Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.

Majewski, Skopinska, Marczak, Szmurlo, Bollag, Jablonska "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.

30

Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.*, 112:1476-1482, 1994.

Maisonpierre, Suri, Jones, Bartunkova, Wiegand, Radziejewski, Compton, Mc Clain, Aldrich, Papadopoulos, Daly, Davis, Sato, Yancopoulos, "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science*, 277(5322):55-60, 1997.

40

Manetti, Cappello, Botta, Corelli, Mongelli, Biasoli, Borgia, Ciomei, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.

Massey, "Catalytic Antibodies Catching On", *Nature*, 328:457-458, 1987.

Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypo

50

xia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," *Cancer Res.*, 56:3436-3440, 1996.

McNamara, Harmey, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published erratum appears in *Br J Surg.*, Oct;85(10):1449, 1998," *Br. J. Surg.*, 85(8):1044-1055. 1998.

Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.

10

Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.

Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.

Mills, Brooker and Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.

20

Moore, Arenberg, Addison, Keane, Streiter, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.

Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans", *Toxicologic Pathology*, 27(1):14-21, 1999.

Morrison, Wims, Kobrin and Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.

30

Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:7192-7197, 1997.

Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.

40

Mustonen and Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," *J. Cell Biol.*, 129:895-898, 1995.

Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", CABIOS, 4:11-17, 1988.

Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", *Clin. Exp. Immunol.*, 116(2):360-5, 1999.

50

Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis in vivo by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.

Nakamura Voller and Bidwell, "Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems", In: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: *Immunochemistry*, D.M. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986, Chapter 27.

Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.*, 7: 248-254, 1995.

Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J.*, 13(1):9-22, 1999.

Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13: 1882-1891, 2004.

Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama, "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", *J. Exp. Med.*, 190(2):293-8, 1999.

Nozaki, Sakurai, Raisler, Baffi, Witta, Ogura, Brekken, Sage, Ambati, Ambati, "Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A", *J. Clin. Invest.*, 116(2):422-9, 2006.

Oikawa, Hirotani, Nakamura, Shudo, Hiragun, Iwaguchi, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.

Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 175:68-76, 1991.

O'Reilly, Holmgren, Shing, Chen, Rosenthal, Moses, Lane, Cao, Sage, Folkman "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.

O'Reilly, Boehm, Shing, Fukai, Vasios, Lane, Flynn, Birkhead, Olsen, Folkman "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.

Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.

Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.

Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.

Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.

Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.

Pepper, Ferrara, Orci, Montesano, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro," *J. Cell Sci.*, 108(1):73-83, 1995. 10

Petersen, Wang, Yalcin-Chin, Li, Peyton, Minna, Harran, Wang, "Autocrine TNF Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis", *Cancer Cell*, 12(5):445-456, 2007.

Petrova, Nykanen, Norrmen, Ivanov, Andersson, Haglund, Puolakkainen, Weme, von Melchner, Gradwohl, Vanharanta, Aaltonen, Saharinen, Gentile, Clarke, Taitale, Oliver, Alitalo, "Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype", *Cancer Cell*, 13(5):407-19, 2008. 20

Pike, Yao, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and Tosato, "Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth", *J. Exp. Med.*, 188(12):2349-2356, 1998.

Pike, Yao, Setsuda, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Atreya, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and Tosato, "Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth", *Blood*, 94(7):2461-2468, 1999. 30

Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer*, 59:520-529, 1994.

Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiter, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," In: *Growth Factors in Tumor Angiogenesis*, Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 57-70, 1995.

Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997. 40

Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007

Quinn, Thurman, Sundell, Zhang, Hellerqvist, "CM101, a polysaccharide anti-tumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res.* 50

Clin. Oncol., 121(4):253-256, 1995.

Raychaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," J. Cell Biochem., 47(3):224-229, 1991.

Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", Critical Reviews in Oncology Hematology, 40:25-35, 2001.

Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", Nature Biotechnology, 14:1239-1245, 1996. 10

Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", Science, 245:175-177, 1989.

Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", Toxicologic Pathology, 27(1):78-86, 1999.

20

Sakamoto, Tanaka, Togho, Ogawa, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," Canc. J., 1:55-58, 1986

Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," Cancer Res., 56:393-401, 1996.

Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ColdSpring HarborPress, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

30

Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," Cell Res., 8(3):171-177, 1998.

Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", Gene, 54:113-123, 1987.

Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", Nature, 329:840, 1987.

40

Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," Science, 219:983-985, 1983.

Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines," Cancer Res., 46:5629-5632, 1986.

Senger, Connolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH2-termin

50

al amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 50:1774-1778, 1990.

Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Galina, G., Zanovello, P. & Bronte, V. (2004). "Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells", *Cancer Immunol Immunother*, 53, 64-72.

Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature*, 376:62-66, 1995. 10

Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.

Sheu, Yen, Kan, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997. 20

Shibuya, "Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis", *Angiogenesis*, 9(4):225-30, 2007.

Shojaei, Wu, Malik, Zhong, Baldwin, Schanz, Fuh, Gerber, Ferrara, "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloid cells", *Nature Biotechnology*, 25:911-920, 2007.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, et al., "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989. 30

Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.

Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Bio sci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993. 40

Sipos, Tamargo, Weingart, Brem, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.

Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Ce 50

"Its Infected With Baculovirus Expression Vector", Mol. Cell Biol., 3:2156-2165, 1983.

Soff, Sanderowitz, Gately, Verrusio, Weiss, Brem, Kwaan, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," J. Clin. Invest., 96(6):2593-2600, 1995.

Soker, Takashima, Miao, Neufeld, Klagsbrun., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor," Cell, 92(6):735-745, 1998. 10

Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults," Mol. Cell, 2(5):549-558, 1998.

Stella and Himmelstein, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Sweetwyne <http://www.jhc.org/cgi/content/full/52/6/723> - FN2FN2, Brekken <http://www.jhc.org/cgi/content/full/52/6/723> - FN3FN3, Workman, Bradshaw, Carbon , Siadak, Murri and Sage, "Functional Analysis of the Matricellular Protein SPARC with Novel Monoclonal Antibodies", J. Histochem. Cytochem., 52(6):723-733, 2004. 20

Tada, Fukunaga, Wakabayashi, Masumi, Sato, Izumi, Kohno, Kuwano, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," Biochim. Biophys. Acta, 1201(2):135-142, 1994. 30

Takano, Gately, Neville, Herblin, Gross, Engelhard, Perricone, Eidsvoog, Brem, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," Cancer Res., 54(10):2654-2660, 1994.

Tanaka, Manome, Wen, Kufe, Fine, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," Nat. Med., 3(4):437-442, 1997. 40

Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor," Biochem. Biophys. Res. Comm., 187:1579-1586, 1992.

Terman, Khandke, Dougher-Vermazen, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor," Growth Factors, 11(3):187-195, 1994.

Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. Biol. Chem.*, 271:603-606, 1996.

Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.

Thorpe, Derbyshire, Andrade, Press, Knowles, King, Watson, Yang, Rao-Bette, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.

Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954, 1991.

Tolsma, Volpert, Good, Frazier, Polverini, Bouck, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.

van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001.

van dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren and Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.

Varfolomeev, Blankenship, Wayson, Fedorova, Kayagaki, Garg, Zobel, Dynek, Elliott, Wallweber, Flygare, Fairbrother, Deshayes, Dixit, Vucic, "IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B Activation, and TNF -Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):669-681, 2007.

Vince, Wong, Khan, Feltham, Chau, Ahmed, Benetatos, Chunduru, Condon, McKinnlay, Brink, Leverkus, Tergaonkar, Schneider, Callus, Koentgen, Vaux, Silke, "IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF -Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):682-693, 2007.

Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.

10

20

30

40

50

Vukanovic, Passaniti, Hirata, Traystman, Hartley-Asp, Isaacs, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.

Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.

Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signaling transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994. 10

Waltenberger, Mayr, Pentz, Hombach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation*, 94:1647-1654, 1996.

Waltenberger, Mayr, Frank, Hombach, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its angiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996. 20

Wamill, Thurman, Sundell, DeVore, Wakefield, Johnson, Wang, Hellerqvist, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.

Ward, Gussow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia Coli", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.

Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998. 30

Whitehurst, Flister, Bagaitkar, Volk, Bivens, Pickett, Castro-Rivera, Brekken, Gerard, Ran, "Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model", *Int. J. Cancer*, 121(10):2181-91, 2007.

Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997. 40

Willman et al., "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.

Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.

Wolff, Guerin, Laterra, Bressler, Indurti, Brem, Goldstein, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.

Wyckoff, Wang, Lin, Wang, Pixley, Stanley, Graf, Pollard, Segall and Cond 50

eelis, "A Paracrine Loop Between Tumor Cells and Macrophages is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors", *Cancer Res.*, 64:7022-7029, 2004.

Xie, Chen, Fu, Harter, Young, Sunkara, Novak, Villanueva-Siles, Ratech, "Podoplanin (d2-40): a new immunohistochemical marker for reactive follicular dendritic cells and follicular dendritic cell sarcomas", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 1(3):276-84, 2008.

Yoon, Yoo, Choi, Do, Kang, Lee, Azuma, Kim, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non- haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett.*, 97(1):83-91, 1995. 10

Yoshida, Kaneko, Tsukamoto, Han, Ichinose, Kimura, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.

Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995. 20

Yamamura, Kibbey, Jun, Kleinman, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.

Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," *Exp. Nephrol.*, 6(6):480-487, 1998.

Zambryski, Herrera-Estreilla, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984. 30

Zapata, Ridgway, Mordini, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')<sub>2</sub> Fragments For Efficient Production in Escherichia Coli and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656): 371-373, 2004.

Ziche, Donnini, Morbidelli, Parenti, Gasparini, Ledda, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998. 40

Zou, Anisowicz, Hendrix, Thor, Neveu, Sheng, Rafidi, Seftor, Sager, "Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells", *Science*, 28:263(5146):526-9, 1994.

【図1】

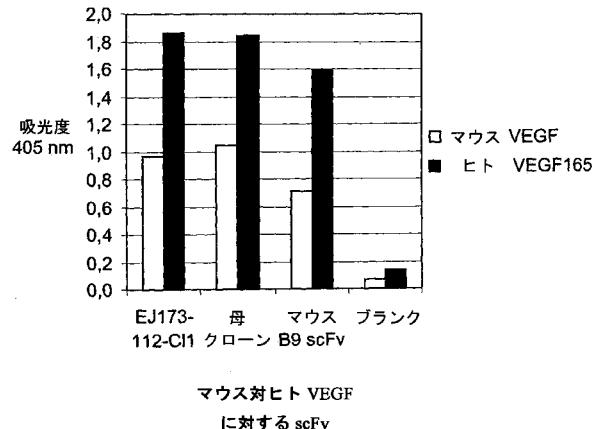
## 塩基配列

CCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG  
 NcoI |-----VH開始(配列番号20開始)  
 CCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG  
 CTGGGTGGACAGGCCCTTGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGATCCTGAA  
 GATGGTGAACAAATCTACGCACAGAACAGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACA  
 CATCTACAGACACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGT  
 GTATTACTGTGCAACAGGACGGTCTATGGTPCGGGGAGTCATTACCTTTAACGGT  
 ATGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCTCAAAGCTTTCAAGGAGT  
 VH終了-----|---HindIII---リンカー開始  
 CATCCGCCAAAATTTGAAGAAGGTGAATTTCAAGAACGACACGGTAGACATCCGGAT  
 リンカー終了-----MluI-----VL開始  
 GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCACTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACITGC  
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATGGTATCAGCAGAACCCAGGGAAAG  
 CCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCACTCAGTTGCAAAGTGGGCCCCATCAAGGTT  
 CAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA  
 GATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCGCTCACTTCGGCGAG  
 GGACCAAGGTGGAGATCAAAGCGCCCGC (配列番号30)  
 (配列番号20終了) VL終了-----|---NotI

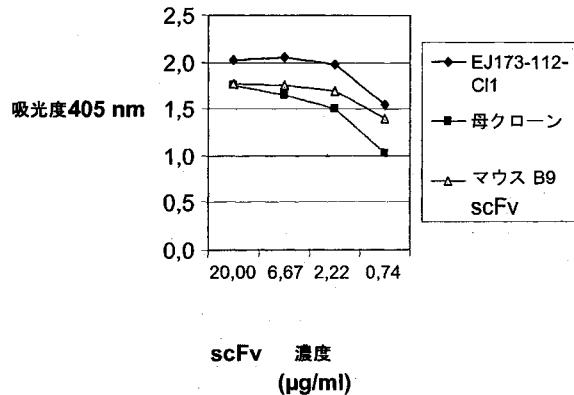
## アミノ酸配列

QVQLVSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGFDPEGET  
 |-----VH開始(配列番号21開始)  
 IYAQKFQGRVTMTEDTSTDATYMEMLSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVVIIPFNGMDVW  
 GQGTTTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIRMTQSPSSLASAVGDRTITCRASQ  
 VH終了-----|---リンカー-----リンカー-----|---VL開始  
 SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQSYSTPLTFGGTKVEIK  
 (配列番号21終了) VL終了-----|

【図4】

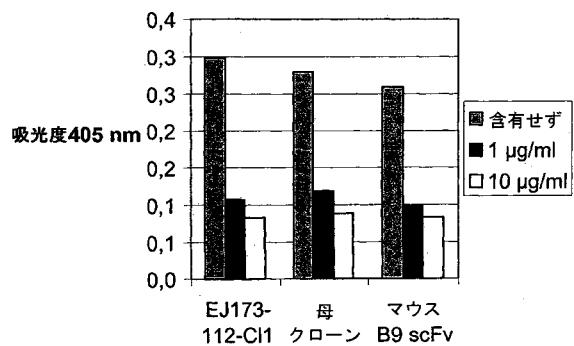


【図2】

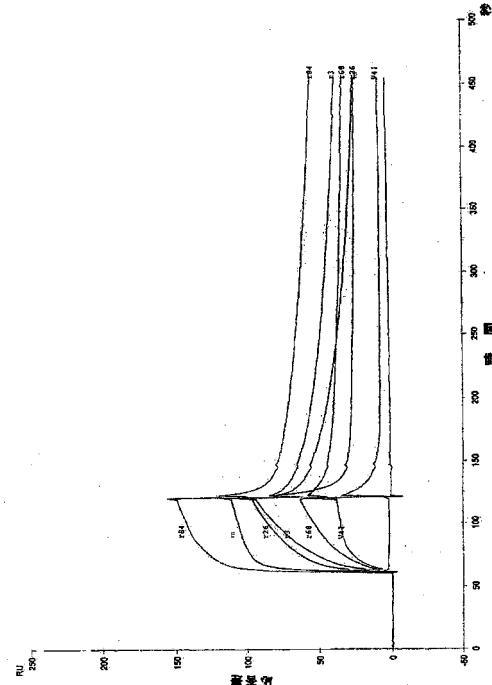


【図3】

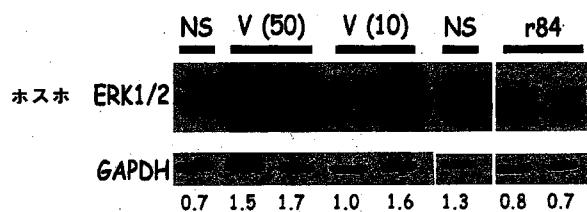
## 2C3 競合アッセイ



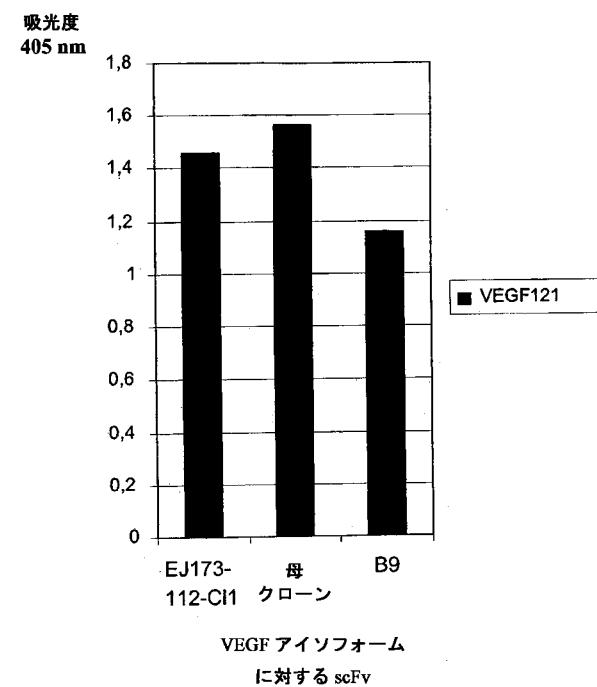
【図5】



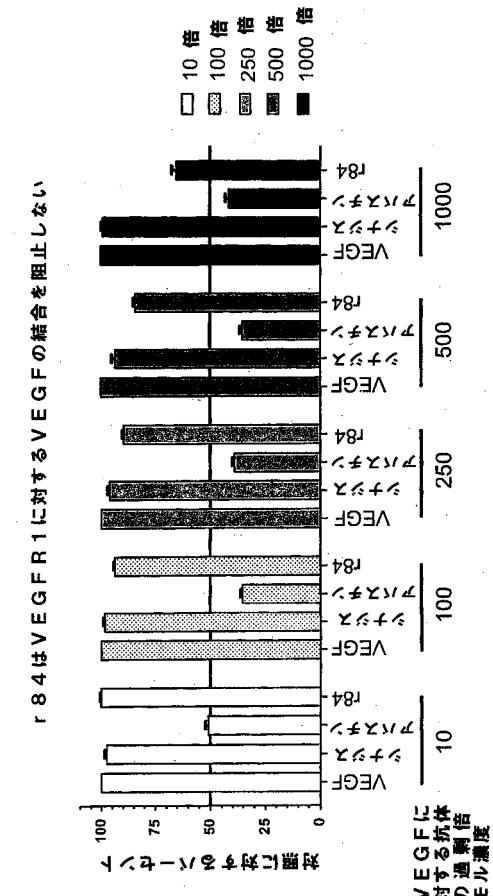
【図6】



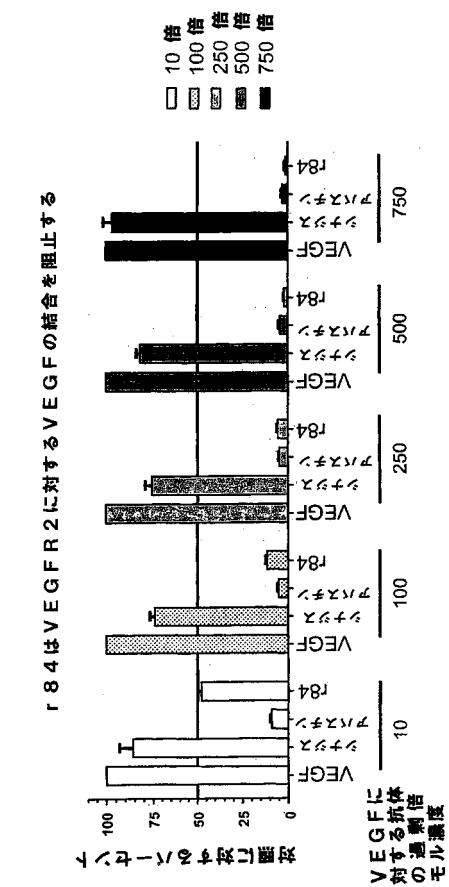
【図7】



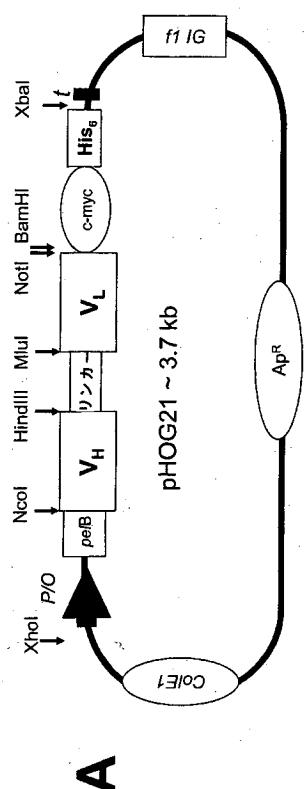
【図8 A】



【図8 B】



【図9】

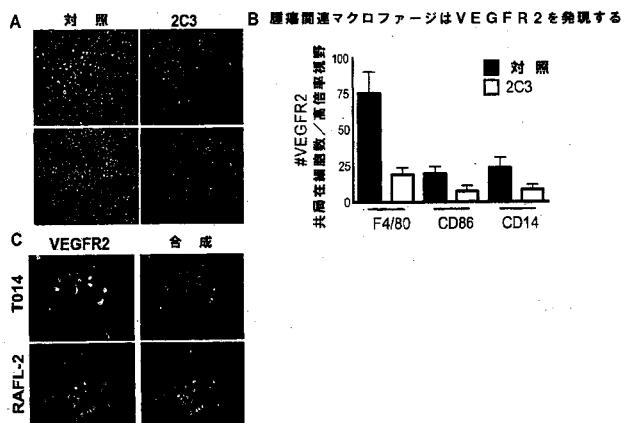


A

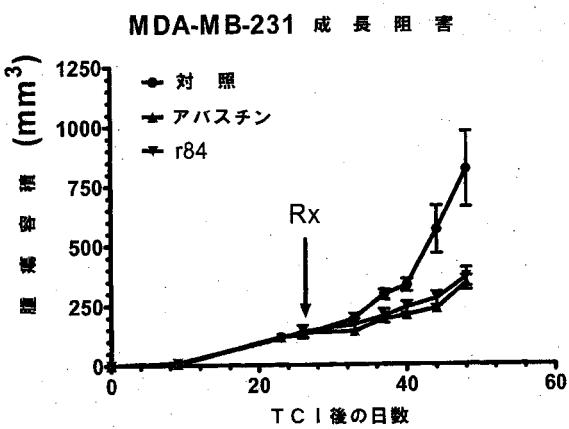
2

【図10】

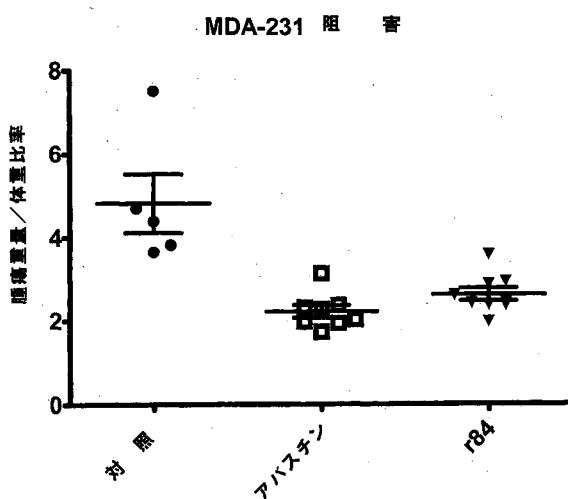
マクロファージはVEGFRを発現する



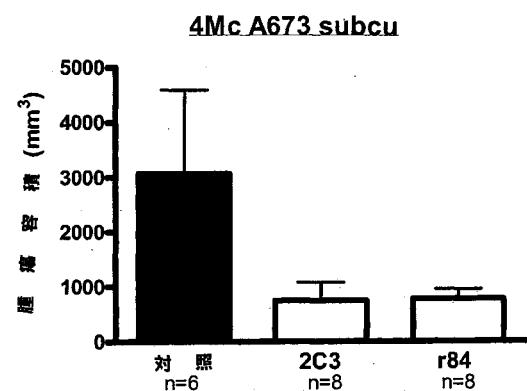
【 111 】



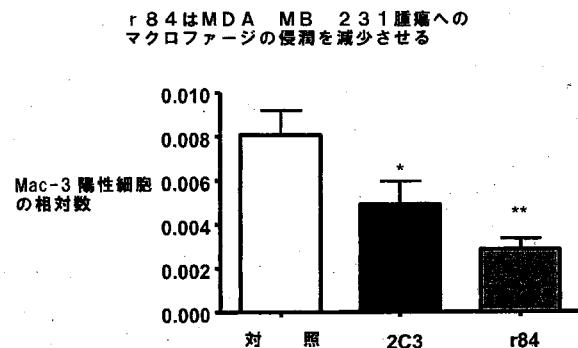
〔 図 1 2 〕



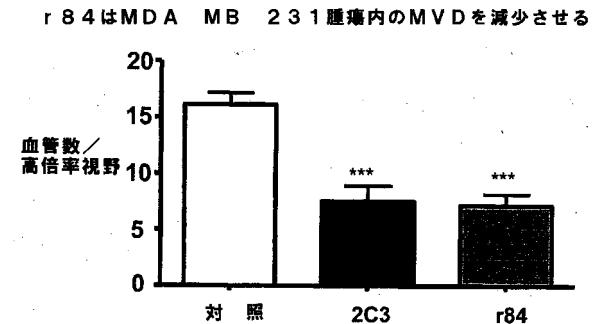
【図13】



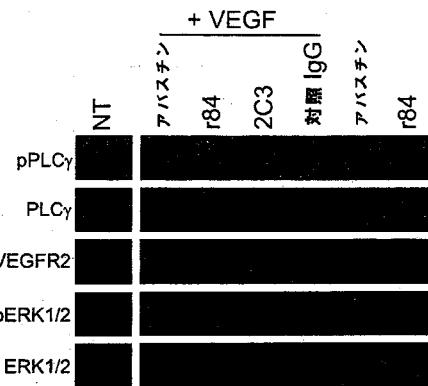
【図14】



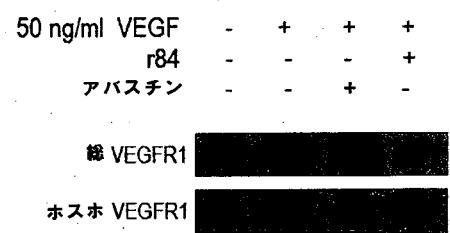
【図15】



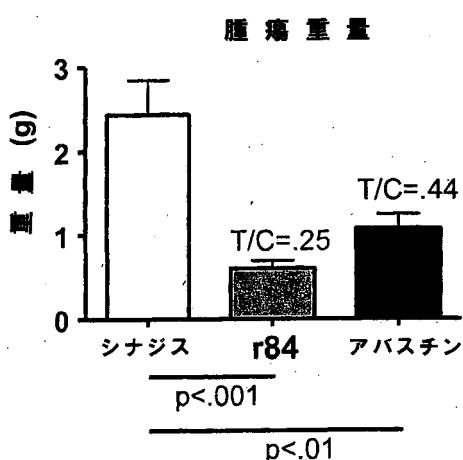
【図16A】



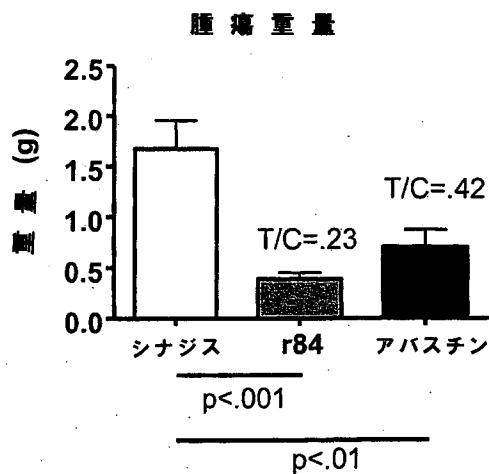
【図16B】



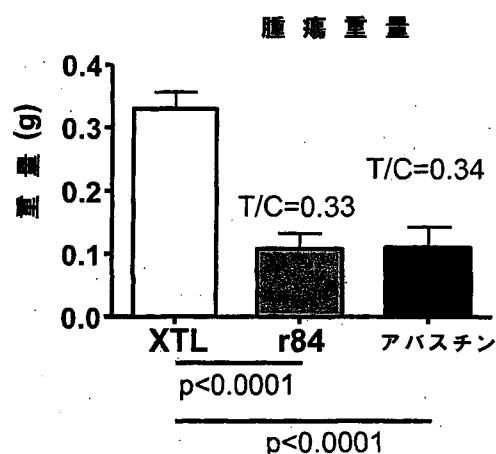
【図17B】



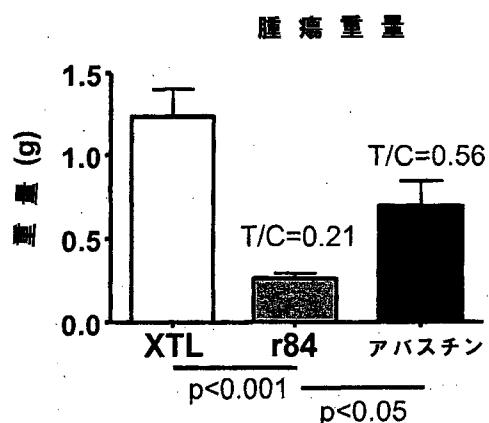
【図17A】



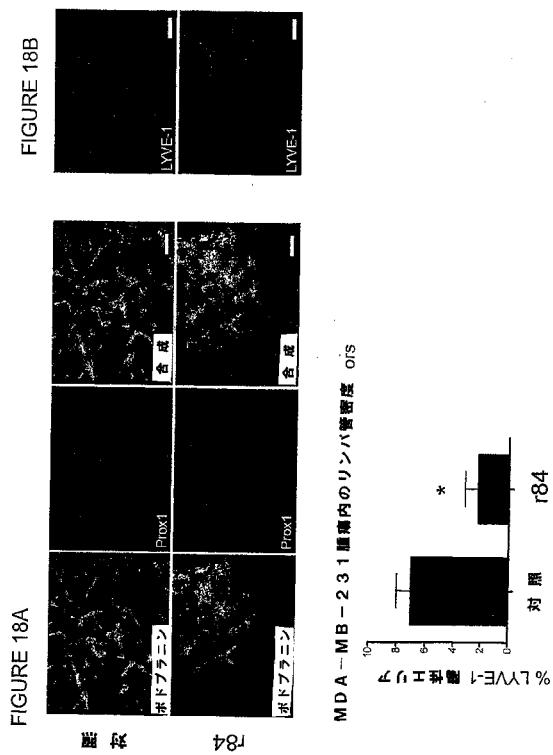
【 図 1 7 C 】



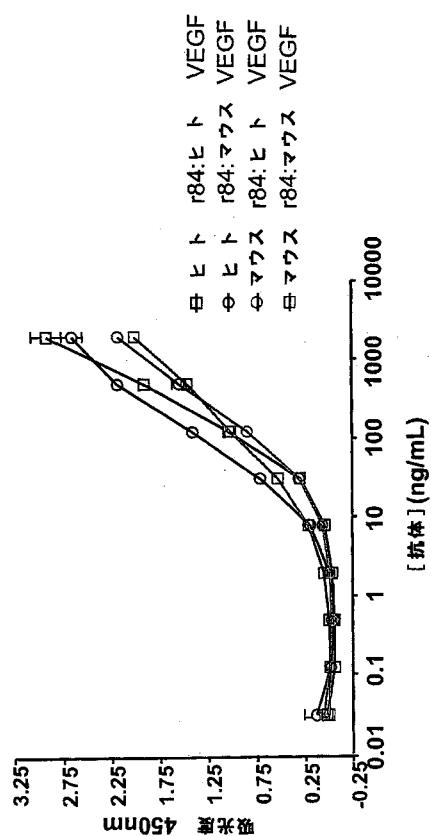
【図17D】



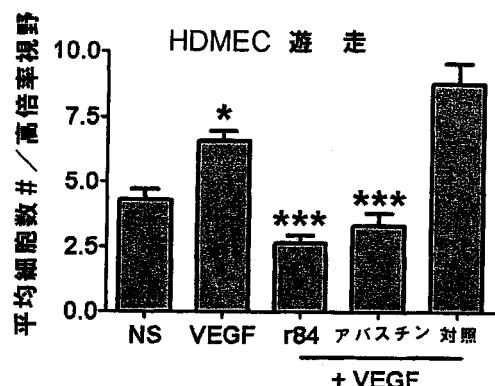
【 図 1 8 】



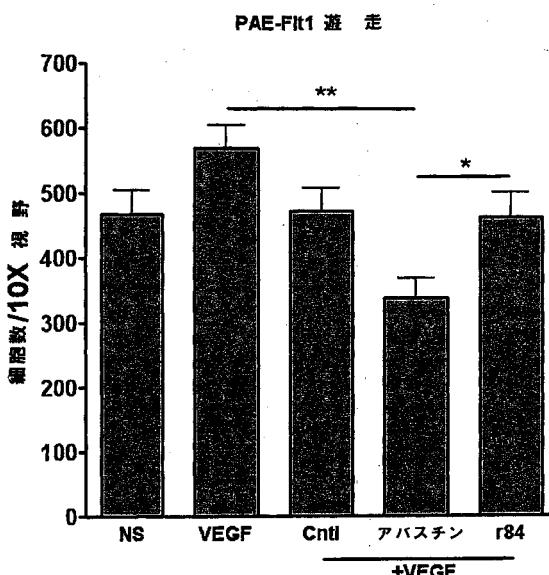
【 図 1 9 】



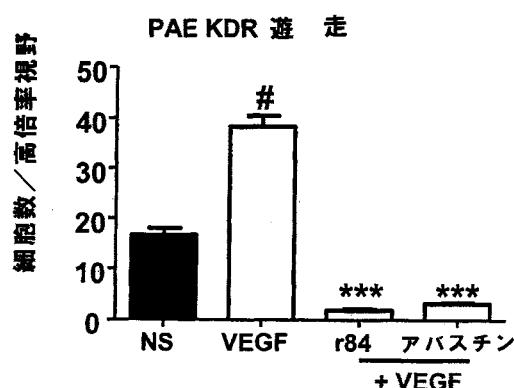
【図 20 A】



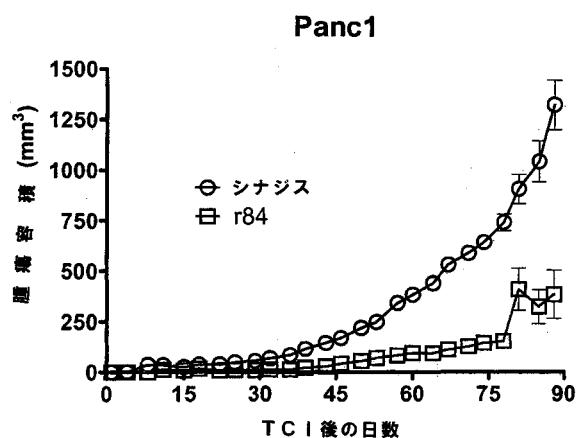
【図 21】



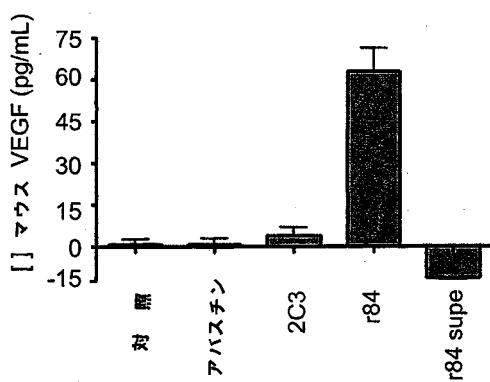
【図 20 B】



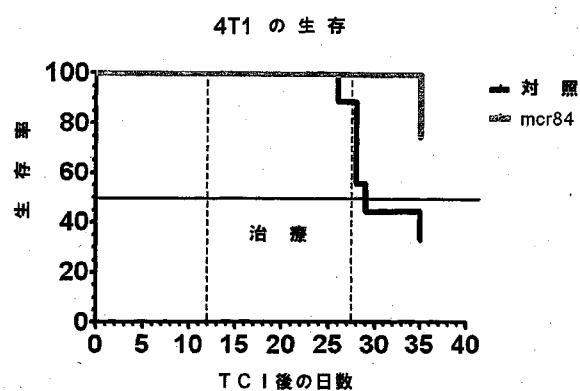
【図 22】



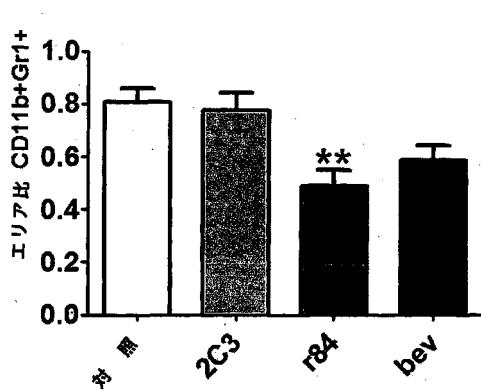
【図 24】



【図 23】



【図 25】



【配列表】

2011502503000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2008/003745

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/395 A61P35/00 C07K16/22		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 524 583 B1 (THORPE PHILIP E [US] ET AL) 25 February 2003 (2003-02-25) column 132 - column 152 -----	1-60
X	US 2006/280747 A1 (FUH GERMAINE [US] ET AL) 14 December 2006 (2006-12-14) paragraph [0424] paragraphs [0284] - [0294], [0387], [0424], [0444] - [0449] - paragraph [0294] table 1 figures 2,3,7,8,30 -----	1-60
X	WO 03/102157 A (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE G [US]; SIDHU SACHDEV S [US]) 11 December 2003 (2003-12-11) page 117, lines 1-22 figures 29-33 -----	1-60
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 March 2009	30/03/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5010 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Cilensek, Zoran	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/GB2008/003745

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LIANG W-C ET AL: "Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF"  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 281, no. 2, 13 January 2006 (2006-01-13), pages 951-961, XP002481172  ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2005-11-07]  page 960, left-hand column  table 1  figures 3-5</p> <p>-----</p>	1-60
A	<p>KLOHS W D ET AL: "ANTIANGIOGENIC AGENTS"  CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 10, no. 6, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 544-549, XP001206158  ISSN: 0958-1669  page 544, right-hand column, paragraph 3</p> <p>-----</p>	1-60
A	<p>FUH GERMAINE ET AL: "Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fab's and comparison with the AVASTIN (TM) Fab"  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 281, no. 10, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 6625-6631, XP002472297  ISSN: 0021-9258  page 6630, right-hand column, paragraph 2  - page 6631, paragraph 3</p> <p>-----</p>	1-60

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2008/003745

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 6524583	B1	25-02-2003	CN US	101073668 A 2003175276 A1		21-11-2007 18-09-2003
US 2006280747	A1	14-12-2006	US	2007020267 A1 2007141065 A1		25-01-2007 21-06-2007
WO 03102157	A	11-12-2003	AU CA EP JP	2003239966 A1 2488441 A1 1513879 A2 2005535301 T		19-12-2003 11-12-2003 16-03-2005 24-11-2005

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
G 0 1 N 33/563 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/563	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
	G 0 1 N 33/573	Z

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

(72)発明者 カヴリー , アニータ

ノルウェー オスロ エヌ - 0 2 8 7 , ストロムスボルグヴェイエン 3 9 エイチ

(72)発明者 シュルネッガー , カイル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 9 2 , ミッションヴィエホ , ペラレス 2 7 9 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 GA11

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4C085 AA13 AA14 CC22 CC23

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	抗VEGF抗体的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011502503A</a>	公开(公告)日	2011-01-27
申请号	JP2010532654	申请日	2008-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	百富勤制药公司 AFFITECH		
申请(专利权)人(译)	百富勤制药公司 阿菲技术研究Eiesu		
[标]发明人	カヅリーアニータ シュルネッガーカイル		
发明人	カヅリー, アニータ シュルネッガー, カイル		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P27/06 A61P17/06 C07K16/28 C12P21/08 G01N33/563 G01N33/531 G01N33/573		
CPC分类号	A61K39/395 A61K39/39533 A61K39/3955 A61K45/06 A61K47/6845 A61K2039/505 C07K16/005 C07K16/22 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 A61P7/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P9/10 A61P27/06 A61P17/06 C07K16/28 C12P21/08 G01N33/563 G01N33/531.A G01N33/573.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	60/987015 2007-11-09 US 61/106047 2008-10-16 US 61/108023 2008-10-24 US		
其他公开文献	<a href="#">JP5809415B2</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

公开了特异性抑制VEGF仅与两种主要VEGF受体中的一种 ( VEGFR2 ) 结合的人抗体。该抗体有效地抑制血管生成并诱导肿瘤消退，并且由于其特异性而具有改善的安全性。因此，本发明提供了用于治疗癌症和其他血管生成疾病的新的基于人抗体的组合物，方法和组合方案。还提供了使用新的VEGF特异性人抗体的有利的免疫缀合物组合物和方法。

特表2011-5025A

(P2011-502503

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.2)

(51) Int.Cl.	F I	テマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	<b>C 12 N 15/00</b>	Z NAA
<b>A 61 K 39/395</b> (2006.01)	<b>A 61 K 39/395</b>	D 4 B 0 6 4
<b>A 61 P 35/00</b> (2006.01)	<b>A 61 P 39/395</b>	N 4 C 0 8 5
<b>A 61 P 9/00</b> (2006.01)	<b>A 61 P 35/00</b>	H 0 4 0 5
<b>A 61 P 27/02</b> (2006.01)	<b>A 61 P 9/00</b>	
		審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 205 頁) 最終頁に統
(21) 出願番号	特願2010-532654 (P2010-532654)	(71) 出願人 506048038
(86) (22) 出願日	平成20年11月7日 (2008.11.7)	ペレグリン フーマーシュティカルズ,
(85) 領文提出日	平成22年7月12日 (2010.7.12)	インコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2008/0093745	アメリカ合衆国 9 2 7 8 0 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02009/060198	ニア州 タスチナ スイート 1 0 0, フ
(87) 国際公開日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	ランクリン アベニュー 1 4 2 7 2
(31) 優先権主張番号	60/987,015	(71) 出願人 509268749
(32) 優先日	平成19年11月9日 (2007.11.9)	アフィテック リサーチ エイエス
(33) 優先権主張国	米国(US)	ノルウェー, エヌ-0 3 4 9 オスロ,
(31) 優先権主張番号	61/106,047	ガウスタダリーン 2 1, オスロ!
(32) 優先日	平成20年10月16日 (2008.10.16)	サーチ パーク
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S S I N P A T
(31) 優先権主張番号	61/108,023	
(32) 優先日	平成20年10月24日 (2008.10.24)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に統く