

(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2012-521218  
(P2012-521218A)

(43) 公表日 平成24年9月13日(2012.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B064
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 101	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-502160 (P2012-502160)  
 (86) (22) 出願日 平成22年3月23日 (2010. 3. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年11月21日 (2011. 11. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/028291  
 (87) 国際公開番号 W02010/111254  
 (87) 国際公開日 平成22年9月30日 (2010. 9. 30)  
 (31) 優先権主張番号 61/163, 241  
 (32) 優先日 平成21年3月25日 (2009. 3. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625  
 ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス  
 サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウェイ 1  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 リアン, ウェイ-チン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
 44, フォスター シティ, メンハー  
 デン コート 342

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗  $\alpha 5 \beta 1$  抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、新規な抗  $\alpha 5 \beta 1$  抗体と、該抗体を含んでなる組成物及びキットと、該抗体を作製し、使用方法を提供する。

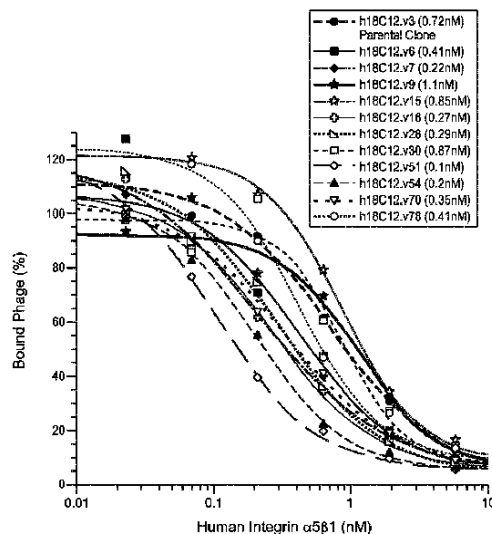


FIG. 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

T L - S / T - S / P / T - Q / N - H - F / S - T / I - Y - K / T - I - G / D / S (配列番号：15)を有するCDR - L 1；L / I - N / T - S - D / H / S - G / S - S / L / T - H / Y - N / K / Q / I - K / T - G / A - D / S / V (配列番号：16)を有するCDR - L 2；G / A - S / A / Y - S / Y - Y - S / A / Y - S / Y / T - G Y - V / I (配列番号：17)を有するCDR - L 3を含むV Lドメイン；及び

G F T F S - N / A - R W - I / V - Y (配列番号：18)を有するCDH - H 1；G I K T K P - N / A / T - I / R - Y A T - E / Q - Y A D S V K G (配列番号：19)を有するCDR - H 2；及びL / V - T G - M / K - R / K - Y F D Y (配列番号：20)を有するCDR - H 1を含むV Hドメイン

を含んでなる抗-<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体であって、

V Lドメインが、それぞれが図 3 に記載の配列を有するCDR - L 1、CDR - L 2、及びCDR - L 3を含み、

V Hドメインが、それぞれが図 3 に記載の配列を有するCDR - H 1、CDR - H 2、及びCDR - H 3を含む、抗体

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗-<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体であって、

V Lドメインが配列番号：3 - 8 の何れか一つを含み、

V Hドメインが配列番号：11 - 14 の何れか一つを含む、抗体。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体であって、

V Lドメインが配列番号：8 を含み、

V Hドメインが配列番号：14 のを含む、抗体。

## 【請求項 5】

ヒト、ヒト化、キメラ、二重特異性又は多重特異性抗体である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 6】

<sub>5</sub><sub>1</sub> に結合する抗体断片である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 7】

完全長 I g G 1 抗体である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 8】

抗体が N 2 9 7 A 置換を含む F c 部分を含む請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸を含んでなる宿主細胞。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の宿主細胞を、抗体が産生されるように培養することを含んでなる抗-<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体の製造方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体と細胞傷害剤を含んでなる免疫コンジュゲート。

## 【請求項 13】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体と薬学的に許容可能な担体を含有する薬学的組成物。

## 【請求項 14】

V E G F アンタゴニストを更に含有してなる請求項 13 に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

- 【請求項 15】  
VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である請求項14に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 16】  
抗VEGF抗体がペバシズマブである請求項15に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 17】  
検出可能な標識を更に含んでなる請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。
- 【請求項 18】  
放射性同位体、蛍光染料、及び酵素からなる群から選択されるメンバーである請求項17に記載の抗体。
- 【請求項 19】 10  
医薬として使用される請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。
- 【請求項 20】  
異常な血管新生及び/又は血管透過もしくは漏出に關与する疾患又は障害を治療する際に使用されるための請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。
- 【請求項 21】  
疾患が癌、眼疾患、自己免疫疾患からなる群から選択されるメンバーである請求項20に記載の抗体。
- 【請求項 22】  
血管新生の阻害に使用される請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。
- 【請求項 23】 20  
5 1タンパク質を含んでいることが疑われる試料中の 5 1タンパク質を検出する方法において、  
(a) 請求項17から18の何れか一項に記載の抗体を試料と接触させ；  
(b) 抗 5 1抗体と 5 1タンパク質との間の複合体の形成を検出することを含む方法。
- 【請求項 24】  
試料が、異常な血管新生、異常な血管透過性、及び/又は血管漏出に關与する疾患と診断された患者からのものである請求項23に記載の方法。
- 【請求項 25】 30  
異常な血管新生、異常な血管透過性、及び/又は血管漏出に關与する疾患又は障害を持つ個体を治療する方法において、請求項1から4の何れか一項に記載の抗体の有効量を個体に投与することを含む方法。
- 【請求項 26】  
疾患又は障害が、癌、眼疾患、自己免疫疾患からなる群から選択されるメンバーである請求項25に記載の方法。
- 【請求項 27】  
癌が、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、腎細胞癌、及び神経膠芽腫からなる群から選択される請求項26に記載の方法。
- 【請求項 28】 40  
疾患又は障害が、網膜症、加齢性黄斑変性症、角膜血管新生、角膜移植血管新生、網膜血管新生、及び血管新生緑内障からなる群から選択されるメンバーである請求項25に記載の方法。
- 【請求項 29】  
VEGFアンタゴニストの有効量を個体に投与することを更に含む請求項25に記載の方法。
- 【請求項 30】  
VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である請求項29に記載の方法。
- 【請求項 31】  
抗VEGF抗体がペバシズマブである請求項30に記載の方法。
- 【請求項 32】 50

V E G F アンタゴニストが抗 5 1 抗体の前に投与される請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

V E G F アンタゴニスト及び抗 5 1 抗体が同時に投与される請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

被験者を、被験者が V E G F アンタゴニスト治療に対して非応答性になるまで V E G F アンタゴニストで最初に治療し、ついで被験者を抗 5 1 抗体で治療する請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

抗血管新生剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害剤からなる群から選択される治療剤を投与することを更に含む請求項 2 9 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

V E G F アンタゴニストで治療された被験者における 5 1 を検出するためのキットにおいて、

( a ) 請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗 5 1 抗体と；

( b ) 使用のための指示書

を具備するキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

( 関連出願へのクロスリファレンス )

この出願は、その開示の全体が全ての目的に対して出典明示によりここに援用される 2 0 0 9 年 3 月 2 5 日出願の米国仮出願第 6 1 / 1 6 3 2 4 1 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

( 発明の分野 )

本発明は、新規な 5 1 抗体、該抗体を含んでなる組成物及びキット、及び該抗体を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

5 1 インテグリンは、その主要なリガンドであるフィブロネクチンを介して細胞 - E C M 相互作用を媒介する細胞膜糖タンパク質である。 5 1 インテグリンは細胞の遊走、分化及び生存においてある役割を担っている。 5 1 インテグリンのレベルは腫瘍血管内皮 (例えば、胃、結腸直腸、肝細胞、子宮頸部、及び乳癌) 及びその他の血管新生血管において上昇している。 5 1 インテグリンは、内皮細胞との壁細胞の結合及び血管新生中の内皮性細胞外マトリックスの構築を調節する。しかして、 5 1 インテグリンは、血管新生の阻害、及び V E G F アンタゴニストの影響への細胞の感作のための有用な標的である。

30

【0 0 0 4】

よって、当該分野では 5 1 インテグリンを標的とする組成物及び方法が必要とされている。

40

【発明の概要】

【0 0 0 5】

本発明は、モノクローナル抗体 1 8 C 1 2 から誘導される新規な抗 5 1 抗体、新規な抗 5 1 抗体を含んでなるキット及び組成物、及びそれらを作製し及び / 又は使用するを提供する。

本発明の一実施態様は、 T L - S / T - S / P / T - Q / N - H - F / S - T / I - Y - K / T - I - G / D / S (配列番号 : 1 5) を含む C D R - L 1 ; L / I - N / T - S - D / H / S - G / S - S / L / T - H / Y - N / K / Q / I - K / T - G / A - D / S / V (配列番号 : 1 6) を含む C D R - L 2 ; G / A - S / A / Y - S / Y - Y - S / A / Y - S / Y / T - G Y - V / I (配列番号 : 1 7) を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン ;

50

及び G F T F S - N / A - R W - I / V - Y (配列番号：18) を含む C D H - H 1 ; G I K T K P - N / A / T - I / R - Y A T - E / Q - Y A D S V K G (配列番号：19) を含む C D R - H 2 ; 及び L / V - T G - M / K - R / K - Y F D Y (配列番号：20) を含む C D R - H 1 を含む V H ドメインを含んでなる抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を提供する。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、それぞれ図3に記載される配列を有する C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む V L ドメイン、及びそれぞれ図3に記載される配列を有する C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む V H ドメイン、すなわち配列番号：21、22、23、又は24に記載される配列を有する C D R - L 1、配列番号：25、26、27、又は28に記載される配列を有する C D R - L 2、及び配列番号：29、30、31、又は32に記載される配列を有する C D R - L 3 を含む V L ドメイン；及び配列番号：34又は35に記載される配列を有する C D R - H 1、配列番号：36又は37に記載される配列を有する C D R - H 2、及び配列番号：38、39、又は40に記載される配列を有する C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：3-8の任意の一つを有する V L ドメイン、及び配列番号：11-14の任意の一つを有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：4を有する V L ドメイン、及び配列番号：11を有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：5を有する V L ドメイン、及び配列番号：12を有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：6を有する V L ドメイン、及び配列番号：13を有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：7を有する V L ドメイン、及び配列番号：13を有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：8を有する V L ドメイン、及び配列番号：14を有する V H ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、ヒト、ヒト化又はキメラである。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体はモノクローナル抗体である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、<sub>5</sub><sub>1</sub>インテグリンへの結合について18C12抗体と競合する。幾つかの実施態様では、モノクローナル抗体はキメラ抗体である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、<sub>5</sub><sub>1</sub>に結合する抗体断片である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、F a b、F a b'、F ( a b )' <sub>2</sub>、単鎖 F v ( s c F v )、F v 断片；ダイアボディ及び線形抗体から選択される。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、全長 I g G 1 又は全長 I g G 4 である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、二重特異性抗体又は多重特異性抗体である。幾つかの実施態様では、二重特異性抗体は、V E G F 及び <sub>5</sub><sub>1</sub> に結合し、V E G F アンタゴニストである。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は改変されたエフェクター機能を有する。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) 又は補体依存性細胞傷害 ( C D C ) 活性を低減し又は防止するように改変される (例えば、抗体の F c 部分をコードする核酸配列を変化させることによる)。幾つかの実施態様では、抗体の F c 部分は N 2 9 7 A 置換を含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、ヒトにおいてその半減期を増加させ又は低減させるように修飾されている (例えば、抗体の F c 部分をコードする核酸配列を改変させることによる)。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、他の実体 (例えば、治療剤又は検出可能な標識) にコンジュゲートした免疫コンジュゲートの一部である。幾つかの実施態様では、治療用実体は細胞傷害剤 (例えば、放射性同位元素、毒素、増殖阻害剤、又は化学療法剤) である。幾つかの実施態様では、検出可能な標識は蛍光染料、放射性同位元素、又は酵素である。

#### 【0006】

本発明の更なる実施態様は、ここに記載の抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体の何れかをコードする核酸分子、核酸を含む発現ベクター、及び核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明の更なる実施態様は、ここに記載の抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体の何れかを生産する方法を提供し、該方法は抗体が産生されるように宿主細胞を培養することを含む。幾つかの実施態様では、本方法は、宿主細胞から抗体を回収することを更に含む。

#### 【0007】

10

20

30

40

50

本発明の更なる実施態様は、この発明の<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体と薬学的に許容可能な担体を含有する薬学的組成物を提供する。幾つかの実施態様では、薬学的組成物は、例えばVEGFアンタゴニストを含む、少なくとも1、2、3、4、又はそれ以上の付加的な薬剤を更に含有する。幾つかの実施態様では、付加的な薬剤は、細胞傷害剤、化学療法剤、増殖阻害剤、又は抗血管新生剤から選択される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体である。幾つかの実施態様では、抗VEGF抗体はベバシズマブである。また本発明は（例えば、VEGFアンタゴニストで治療されている被験者において）<sub>5</sub><sub>1</sub>を検出するための使用説明書を含む製造品及びキットを提供する。

#### 【0008】

本発明の他の実施態様は、異常な血管新生、血管透過性、又は血管漏出に關与する疾患又は障害に罹患している被験者を治療する方法を提供する。本方法は、ここに記載の抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体の治療的有効量を被験者に投与し、それによって疾患又は障害を（例えば、異常な血管新生、血管透過性、又は血管漏出を部分的又は完全に阻害することにより）治療することを含む。また幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストが被験者に投与される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が同時に投与される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が逐次投与される。幾つかの実施態様では、疾患又は障害は、VEGFアンタゴニスト治療に対して応答性である。幾つかの実施態様では、疾患又は障害は、癌、免疫疾患、又は癌性疾患から選択される。一実施態様では、疾患又は障害は、固形腫瘍、転移性腫瘍、軟部組織腫瘍、眼の新生血管を有する疾患、異常な血管新生を有する炎症性疾患、被験者への移植後に生じた疾患、異常な血管結合組織の増殖を有する疾患から選択される。他の実施態様では、癌は、乳癌（転移性乳癌を含む）、子宮頸癌、結腸直腸癌（転移性結腸直腸癌を含む）、肺癌（非小細胞肺癌を含む）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、慢性リンパ性白血病、腎細胞癌、ホルモン不応性前立腺癌を含む前立腺癌、肝臓癌、頭部及び頸部の癌、メラノーマ、卵巣癌、中皮腫、軟部組織癌、消化管間葉性腫瘍、多形神経膠芽腫及び多発性骨髄腫から選択される。他の実施態様では、疾患は、網膜症、加齢黄斑変性（例えば、滲出型AMD）、糖尿病黄斑、浮腫、網膜静脈閉塞症（RVO）、及び乾性AMD/地図状萎縮（滲出型AMDの進行の予防）ルベオーシス；乾癬、炎症性腎疾患、溶血性尿毒症症候群、糖尿病性腎症（例えば、増殖糖尿病網膜症）、関節炎（例えば、乾癬性関節炎、骨関節炎、関節リウマチ）、炎症性腸疾患、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、角膜移植後拒絶反応、角膜血管新生、角膜移植血管新生、クローン病、近視、眼の新生血管病、パジェット病、類天疱瘡、多発動脈炎、ポストレザー放射状角膜切開、網膜血管新生、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎、移植片拒絶、肺炎症、ネフロゼ症候群、浮腫、悪性腫瘍を有する腹水、脳卒中、血管線維腫、及び血管新生緑内障から選択される。一実施態様では、本方法は、付加的な治療剤（例えば、抗悪性腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、又は細胞傷害剤）を被験者に投与することを更に含む。

#### 【0009】

本発明の更に他の実施態様は、被験者の癌を治療する方法を提供するものであり、該方法は、被験者に治療的有効量のVEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を投与することを含む。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が同時に投与される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が逐次投与される。幾つかの実施態様では、癌はVEGFアンタゴニスト治療に対して応答性である。

#### 【0010】

本発明の更なる実施態様は、加齢黄斑変性（AMD）（例えば、滲出型加齢黄斑変性を含む）を患っている被験者において、AMDを治療する方法を提供するものであり、該方法は、被験者に治療的有効量のVEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を投与することを含む。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が同時に投与される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が逐次投与される。更なる他の実施態様では、治療的有効量のVEGFアンタゴニストと<sub>5</sub><sub>1</sub>アンタゴニストを同時又は逐次投与する工程を含む、被験者における自己免疫疾患を治療する

10

20

30

40

50

方法が提供される。

【0011】

幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストは治療される被験者に最初に投与され、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体が被験者に続いて投与される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストと<sub>5</sub><sub>1</sub>アンタゴニストは、被験者に同時に投与される。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体 VEGFアンタゴニストは治療される被験者に最初に投与され、VEGFアンタゴニストが被験者に続いて投与される。幾つかの実施態様では、被験者はVEGFアンタゴニストに対して不反応性になるまでVEGFアンタゴニストを用いて治療され、ついで、被験者は抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を用いて治療される。特定の一実施態様では、被験者は、癌が非浸潤性又は初期段階である場合はVEGFアンタゴニストで治療され、癌が浸潤性である場合は抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を用いて治療される。他の実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を用いて治療された被験者では、疾患に罹患していない被験者からの組織又は疾患のない組織と比較して、疾患組織において<sub>5</sub><sub>1</sub>レベルが上昇している。この例において、本方法は、被験者、例えばVEGFアンタゴニストで治療された後の疾患組織において、<sub>5</sub><sub>1</sub>を検出する工程を更に含むことができる。一実施態様では、浸潤性癌は転移性癌である。他の実施態様では、初期段階の癌はアジュバント療法（例えば、化学治療又は外科的除去）により治療される癌である。

10

【0012】

この発明の一実施態様によれば、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体を用いて治療されるべき被験者は、VEGFアンタゴニスト用後に再発を被っているか、又はVEGFアンタゴニスト治療に対して抵抗性を有するようになっている。他の実施態様によれば、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体とVEGFアンタゴニストで治療される被験者は転移性癌に罹患しているか、又は以前にアジュバント療法で治療されている。一実施態様では、候補患者は再発性であり、化学療法剤、例えばイリノテカンに対して抵抗性又は耐性である。このような疾患の例には、限定されるものではないが、転移性結腸直腸癌、再発した転移性結腸直腸癌、転移性乳癌、再発した転移性乳癌、転移性HER2<sup>+</sup>乳癌、アジュバント乳癌、アジュバントHER2<sup>+</sup>乳癌、転移性膵臓癌、アジュバント結腸癌、アジュバント非小細胞肺癌、アジュバント直腸癌、アジュバント非小細胞肺、転移性小細胞肺癌、転移性卵巣癌、転移性腎細胞癌、及びアジュバント腎細胞癌が含まれる。

20

【0013】

一実施態様によれば、ここに記載の疾患に罹患している被験者は、VEGFアンタゴニストを用いた疾患の治療後に、維持療法がなされ、ここで維持療法は、単独であるか又はVEGFアンタゴニストと逐次又は同時の<sub>5</sub><sub>1</sub>アンタゴニストである。

30

【0014】

幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストは、抗体、イムノアドヘシン、ペプチボディ(peptibody)、小分子、ストリンジェントな条件下でVEGFをコードする核酸分子にハイブリダイズする核酸（例えば、リボザイム、siRNA、及びアプタマー）から選択される。幾つかの実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。一実施態様によれば、抗VEGF抗体は、アバスチン（登録商標）抗体によるヒトVEGFへの結合から競合的に阻害され得る。他の実施態様では、抗VEGF抗体は、ヒト、ヒト化又はキメラである。特定の一実施態様では、抗VEGF抗体はアバスチン（登録商標）抗体である。他の実施態様では、抗VEGF抗体は、Fab、Fab'、Fab'<sub>2</sub>、単鎖Fv(scFv)、Fv断片；ダイアボディ及び線形抗体からなる群から選択される。他の実施態様では、VEGFアンタゴニストは、VEGF及び<sub>5</sub><sub>1</sub>の双方に結合し、また<sub>5</sub><sub>1</sub>アンタゴニストでもある二重特異性抗体である。

40

【0015】

本発明の更なる実施態様は、<sub>5</sub><sub>1</sub>タンパク質を含んでいることが疑われる試料における<sub>5</sub><sub>1</sub>タンパク質を検出する方法を提供する。本方法は、(1)ここに記載の抗体を試料と接触させ；抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体と<sub>5</sub><sub>1</sub>タンパク質との間の複合体の形成を検出することを含む。幾つかの実施態様では、試料は、異常な血管新生、異常な血管透過性、及

50

び/又は血管漏出により特徴付けられる疾患に罹患していると診断された患者からのものである。

【0016】

本発明のこれらの及び他の実施態様は、次の詳細な説明に更に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】図1Aは、次のものについての軽鎖可変ドメインの配列のアラインメントを示す：ヒトラムダIII；ハムスター18C12；キメラ18C12.v.1.1；h18C12.v.3；h18C12.v.6；h18C12.v.6.1.Lam3；h18C12.v.6.2.Lam3；及びh18C12.v.6.1.5。

10

【図1B】図1Bは、次のものについての軽鎖可変ドメインの配列のアラインメントを示す：ヒトラムダIII；ハムスター18C12；キメラ18C12.v.1.1；h18C12.v.3；h18C12.v.6；h18C12.v.6.1.Lam3；h18C12.v.6.2.Lam3；及びh18C12.v.6.1.5。

【図2A】図2Aは、次のものについての重鎖可変ドメインの配列のアラインメントを示す：ハムスター18C12；h18C12.v.3；h18C12.v.6；h18C12.v.6.1.Lam3；h18C12.v.6.2.Lam3；及びh18C12.v.6.1.5。

【図2B】図2Bは、次のものについての重鎖可変ドメインの配列のアラインメントを示す：ハムスター18C12；h18C12.v.3；h18C12.v.6；h18C12.v.6.1.Lam3；h18C12.v.6.2.Lam3；及びh18C12.v.6.1.5。

20

【図3】図3は、h18C12.v.3及びh18C12.v.3親和成熟変異体h18C12.v.6；h18C12.v.7；h18C12.v.9；h18C12.v.15；h18C12.v.16；h18C12.v.28；h18C12.v.30；h18C12.v.51；h18C12.v.54；h18C12.v.70；及びh18C12.v.78のCDR配列を示す。

【図4】図4は、h18C12.v.3親クローン、及び18C12親和成熟変異体h18C12.v.6；h18C12.v.7；h18C12.v.9；h18C12.v.15；h18C12.v.16；h18C12.v.28；h18C12.v.30；h18C12.v.51；h18C12.v.54；h18C12.v.70；及びh18C12.v.78のヒト<sub>5</sub><sub>1</sub>インテグリンへの結合を証明するファージ競合ELISAの結果を示す。

30

【図5】図5は、h18C12.v.3親クローン、及びh18C12.v.3親和成熟変異体h18C12.v.6；h18C12.v.15；h18C12.v.54；及びh18C12.v.70の、ヒト<sub>5</sub><sub>1</sub>インテグリンへの結合を証明するBIACORE(登録商標)分析の結果を示す。

【図6】図6は、キメラ18C12及びh18C12.v.6.1.Lam3の、ヒト<sub>5</sub><sub>1</sub>インテグリンへの結合性のBIACORE(登録商標)分析の結果を示す。

【図7】図7は、h18C12.v.6.1クローンh18C12.v.6.1.1、h18C12.v.6.1.2、h18C12.v.6.1.3、h18C12.v.6.1.4、及びh18C12.v.6.1.5の結合性のBIACORE(登録商標)分析の結果を示し、h18C12.v.6.1クローンのそれぞれの位置50a、50b、50c、及び50dでのCDR-L2配列を示す。

40

【図8】図8は、フィブロネクチンへのU937細胞の結合を妨害するキメラ18C12及びh18C12.v.6.1の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。

【図9】図9は、フィブロネクチンへのU937細胞の結合を妨害するハムスター18C12及びh18C12.v.6.1.5の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。

【図10】図10は、フィブロネクチンへの<sub>5</sub><sub>1</sub>の結合を妨害するハムスター18C

50



12及びh18C12.v6.1.5の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。

【図11】図11は、フィブロネクチンへのHUVEC細胞の移動を妨害するキメラ18C12及びh18C12.v6.1の能力を比較するHUVEC遊走アッセイの結果を示す。

【図12】図12は、生存率を高めるh18C12.v6.1.5+/-抗VEGFの能力を測定する腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図13】図13は、腫瘍量を低減させるh18C12.v6.1.5+/-抗VEGFの能力を測定する腫瘍異種移植アッセイの結果を表す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

I.序

本発明は、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンに結合する新規な抗体の同定に基づく。 $\alpha_5\beta_1$ 抗体はモノクローナル抗体18C12から誘導され、様々な治療及び診断方法に使用することができる。例えば、 $\alpha_5\beta_1$ 抗体は、単独で、又は異常な血管新生、腫瘍、眼疾患及び自己免疫疾患を治療するための他の薬剤と組合せて使用することができる。抗体は、患者における $\alpha_5\beta_1$ タンパク質に対する抗体を投与し、患者からの試料中の $\alpha_5\beta_1$ タンパク質に結合した抗 $\alpha_5\beta_1$ 抗体を（例えば、インビボ又はエクスピボで）検出することにより、又は患者からの試料と抗体を接触させ、 $\alpha_5\beta_1$ タンパク質に結合する抗 $\alpha_5\beta_1$ 抗体を定性的又は定量的に検出することにより、患者又は患者試料中の $\alpha_5\beta_1$ タンパク質を検出するためにまた使用することができる。

【0019】

II.定義

「アルファ5ベータ1」又は「 $\alpha_5\beta_1$ 」又は「 $\alpha_5\beta_1$ 」又は「 $\alpha_5\beta_1$ 」は、二つの異なるタンパク質（すなわち、サブユニットアルファ5とベータ1）を有するインテグリンである。 $\alpha_5\beta_1$ は、フィブロネクチン、L1-CAM及びフィブリノーゲンに結合することが示されている。また、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは、最晩期活性化-5、VLA-5、アルファ5ベータ1、CD49e/CD29、フィブロネクチンレセプター、FNR、及びGPIC-IIIaとしても知られている。一実施態様によれば、 $\alpha_5\beta_1$ はヒト $\alpha_5\beta_1$ である。

【0020】

「アルファ5」は、ここでは、CD49e、 $\alpha_5$ 、インテグリンアルファ5サブユニット、VLA-5アルファサブユニットと交換可能に使用され、GPIC-IIIa及びFNRアルファ鎖のICサブユニットは、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの一つのサブユニットを意味する。アルファ5は、選択的スプライシングにより産生され、それらの細胞質ドメイン内で変化する4つのアイソフォーム（A-D）を有している。アルファ5のヒトアイソフォームのアミノ酸配列は、それぞれ例えばGenbank受託番号：X07979、U33879、U33882及びU33880で見出すことができる。

【0021】

また、「ベータ1」は、CD29、ベータ1、血小板GPIC-IIIa；VLA-ベータ鎖；ベータ-1インテグリン鎖、CD29；FNRB；MDF2；VLAB；GPIC-IIIa；MSK12及びVLA5Bとも呼ばれる。ヒトベータ1のアミノ酸配列は、例えばGenbank受託番号：X06256に見出すことができる。

【0022】

ここで使用される「VEGF」なる用語は、Leung等 Science, 246:1306 (1989)、及びHouck等 Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)により記載されているように、自然に生じたアレル及びそのプロセシング形態と共に、165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子、及び関連する121-、189-、及び206-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子を意味する。また、「VEGF」なる用語は、非ヒト種、例えばマウス、ラット又は霊長類からのVEGFもまた意味する。しばしば、特定の種からのVEGFは、例えばヒトVEGFに

10

20

30

40

50

対してhVEGF、又はマウスVEGFに対してmVEGF等の用語で示される。また、「VEGF」なる用語は、165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子のアミノ酸8~109又は1~109を含有するポリペプチドの切断型を意味するために使用される。任意のこのような形態のVEGFに対する引用は、本出願において、例えば「VEGF(8-109)」、「VEGF(1-109)」又は「VEGF<sub>165</sub>」と特定される。「切断型」天然VEGFについてのアミノ酸位置は、天然VEGF配列において示されたように番号付けされる。例えば、切断型天然VEGFにおけるアミノ酸位置17(メチオニン)は、天然VEGFにおいても17位(メチオニン)である。切断型天然VEGFは、天然VEGFに匹敵するKDR及びFlt-1レセプターに対する結合親和性を有する。一実施態様では、VEGFはヒトVEGFである。

10

#### 【0023】

「VEGFアンタゴニスト」は、VEGF、又は一又は複数のVEGFレセプター、又はそれらをコードする核酸へのその結合を含むVEGF活性を中和し、ブロックし、阻害し、抑制し、低減し、又は妨害することができる分子を意味する。好ましくは、VEGFアンタゴニストは、VEGF又はVEGFレセプターに結合する。VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体及びその抗原結合断片、VEGF及びVEGFレセプターに結合し、リガンド-レセプター相互作用をブロックするポリペプチド(例えば、イムノアドヘシン、ペプチボディ)、抗VEGFレセプター抗体及びVEGFレセプターアンタゴニスト、例えばVEGFRチロシンキナーゼの小分子インヒビター、VEGFに結合するアプタマー及びVEGF又はVEGFレセプターをコードする核酸配列にストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸(例えば、RNAi)を含む。一実施態様によれば、VEGFアンタゴニストはVEGFに結合し、インビトロでVEGF誘導性内皮細胞増殖を阻害する。一実施態様によれば、VEGFアンタゴニストは、非VEGF又は非VEGFレセプターよりも大きな親和性でVEGF又はVEGFレセプターに結合する。一実施態様によれば、VEGFアンタゴニストは、1µM~1pMのKdでVEGF又はVEGFレセプターに結合する。他の実施態様によれば、VEGFアンタゴニストは、500nM~1pMでVEGF又はVEGFレセプターに結合する。

20

#### 【0024】

一実施態様によれば、VEGFアンタゴニストは、ポリペプチド、例えば抗体、ペプチボディ、イムノアドヘシン、小分子又はアプタマーからなる群から選択される。一実施態様では、抗体は抗VEGF抗体、例えばアバスチン(登録商標)抗体又は抗VEGFレセプター抗体、例えば抗VEGFR2又は抗VEGFR3抗体である。VEGFアンタゴニストの他の例には、VEGF-Trap、ムカゲン、PTK787、SU11248、AG-013736、Bay439006(ソラフェニブ)、ZD-6474、CP632、CP-547632、AZD-2171、CDP-171、SU-14813、CHIR-258、AEE-788、SB786034、BAY579352、CDP-791、EG-3306、GW-786034、RWJ-417975/CT6758及びKRN-633が含まれる。

30

#### 【0025】

「抗VEGF抗体」は、十分な親和性と特異性でVEGFに結合する抗体である。好ましくは、本発明の抗VEGF抗体は、VEGF活性が関与する疾患又は病状を標的とし、また干渉する治療剤として使用することができる。抗VEGF抗体は、通常、他のVEGFホモログ、例えばVEGF-B又はVEGF-Cにも、又は他の増殖因子、例えばPLGF、PDGF又はbFGFにも結合しない。抗VEGF抗体は、ハイブリドーマATCC HB10709により産生されるモノクローナル抗VEGF抗体A4.6.1と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体である。より好ましくは、抗VEGF抗体は、Presta等(1997)Cancer Res. 57:4593-4599に従って産生される組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体であり、限定するものではないが、ベバシズマブ(BV;アバスチン(登録商標))として知られている抗体を含む。他の実施態様では、使用可能な抗VEGF抗体には、限定されるものではないが、国際公開第2005/012359号に開示の抗体

40

50

が含まれる。一実施態様によれば、抗VEGF抗体は、国際公開第2005/012359号の図24、25、26、27及び29に開示されている抗体の何れか一つの可変重領域及び可変軽領域を含む(例えば、G6、G6-23、G6-31、G6-23.1、G6-23.2、B20、B20-4及びB20.4.1)。他の実施態様では、ラニズマブとして知られている抗VEGF抗体は、糖尿病性網膜症及び滲出型AMD等の眼疾患に対して投与されるVEGFアンタゴニストである。

#### 【0026】

「rhUMA b VEGF」又は「アバスチン(登録商標)」としても知られている抗VEGF抗体「ベバシズマブ(BV)」は、Presta等(1997) Cancer Res. 57:4593-4599に従い産生された組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体である。それは、そのレセプターへのヒトVEGFの結合をブロックするマウス抗hVEGFモノクローナル抗体A.4.6.1からの、抗原-結合相補性-決定領域及び変異したヒトIgG1フレームワーク領域を含む。ほとんどのフレームワーク領域を含む、ベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ93%が、ヒトIgG1から誘導され、配列の約7%がマウス抗体A.4.6.1から誘導される。ベバシズマブは、約149000ダルトンの分子量を有し、グリコシル化されている。他の抗VEGF抗体は、米国特許第6884879号及び国際公開第2005/044853号に記載の抗体を含む。

10

#### 【0027】

抗VEGF抗体ラニズマブ又はLUCENTIS(登録商標)抗体又はrhUFabV2は、ヒト化された親和成熟抗ヒトVEGF Fab断片である。ラニズマブは、大腸菌発現ベクター及び細菌発酵における標準的な組換え技術法により生成される。ラニズマブはグリコシル化されておらず、~48000ダルトンの分子量を有する。国際公開第98/45331号及び米国特許出願公開第2003/0190317号を参照。

20

#### 【0028】

標的上で重複するか又は類似の領域に結合することにより特徴付けられる分子、例えば抗体は、競合阻害/結合アッセイにより同定することができる。

#### 【0029】

一実施態様では、HUVEC又は $5_1$ を発現する他の細胞が競合阻害アッセイに使用され、FACSが、互いに関連する二つの抗 $5_1$ 抗体の結合位置を評価するために使用される。例えば、HUVEC細胞はコニカルチューブで洗浄され、1000rpm5分でスピニングされる。ペレットは典型的には2回洗浄される。ついで、細胞は再懸濁され、計測され、使用するまで氷上で維持される。100 $\mu$ lの第一の抗 $5_1$ 抗体(例えば、1 $\mu$ g/ml濃度又は低濃度で出発)をウェルに添加することができる。次に、100 $\mu$ l(例えば $20 \times 10^5$ 細胞)の細胞がウェル当たり添加され、氷上で30分間インキュベートされる。ついで、100 $\mu$ lのビオチン化抗 $5_1$ 抗体(5 $\mu$ g/mlの原液)が各ウェルに添加され、氷上で30分間インキュベートされる。ついで、細胞が洗浄され、1000rpmで5分間ペレット化される。上清が吸引される。R-フィコエリトリンコンジュゲートストレプトアビジン(Jackson 016-110-084)がウェル(100 $\mu$ l@1:1000)に添加される。次に、プレートがホイルで包装され、氷上で30分間インキュベートされる。インキュベーション後、ペレットが洗浄され、1000rpmで5分間ペレット化される。ペレットは再懸濁され、FACS分析用のマイクロタイターチューブに移される。

30

40

#### 【0030】

「血管新生因子又は薬剤」は、血管の発生の刺激、例えば血管新生の促進、内皮細胞の増殖、血管の安定性、及び/又は脈管形成等に関与する増殖因子又はそのレセプターである。例えば血管新生因子には、限定されるものではないが、例えばVEGF及びVEGFファミリー及びそれらのレセプターのメンバー(VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2及びVEGFR3)、PLGF、PDGFファミリー、線維芽細胞増殖因子ファミリー(FGFs)、TIEリガンド(アンジオポエチン、ANGPT1、ANGPT2)、TIE1、TIE2、エフリン、Bv8、デルタ様リガンド4(D

50

L L 4)、D e l - 1、線維芽細胞増殖因子：酸性(a F G F)及び塩基性(b F G F)、F G F 4、F G F 9、B M P 9、B M P 1 0、フォリスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(G - C S F)、G M - C S F、肝細胞増殖因子(H G F) / 散乱因子(S F)、インターロイキン- 8 (I L - 8)、C X C L 1 2、レプチン、ミッドカイン、ニューロピリン、N R P 1、N R P 2、胎盤増殖因子、血小板由来内皮細胞増殖因子(P D - E C G F)、血小板由来増殖因子、特にP D G F - B B、P D G F R - アルファ、又はP D G F R - ベータ、プレイオトロフィン(P T N)、プログラニューリン、プロリフェリン(Proliferin)、トランスフォーミング増殖因子- アルファ(T G F - アルファ)、トランスフォーミング増殖因子- ベータ(T G F - ベータ)、腫瘍壊死因子- アルファ(T N F - アルファ)、A l k 1、C X C R 4、N o t c h 1、N o t c h 4、S e m a 3 A、S e m a 3 C、S e m a 3 F、R o b o 4等が含まれる。それは、血管新生を促進する因子、例えばE S M 1及びパルカンを更に含む。それは、創傷治癒を促進する因子、例えば成長ホルモン、インスリン様増殖因子- I (I G F - I)、V I G F、上皮細胞成長因子(E G F)、E G F様ドメイン、マルチプル7 (E G F L 7)、C T G F及びそのファミリーのメンバー、及びT G F - 及びT G F - をまた含む。例えば、Klagsbrun及びD' Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit及びDetmar (2003) Oncogene 22:3172-3179; Ferrara及びAlitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini等 (2003) Oncogene 22:6549-6556 (例えば既知の血管新生因子をリストに挙げる表1); 及びSato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206を参照のこと。

10

#### 【0031】

20

「抗血管新生剤」又は「血管新生インヒビター」は、小分子量物質、ポリヌクレオチド(例えば、抑制性R N A (R N A i 又はs i R N A)を含む)、ポリペプチド、単離されたタンパク質、組換えタンパク質、抗体、又はそのコンジュゲート又は融合タンパク質で、血管新生、脈管形成、又は所望しない血管透過性を、直接的に又は間接的に阻害するものを意味する。抗血管新生剤には、血管新生因子又はそのレセプターに結合しその血管新生活性を阻害する薬剤が含まれることが理解されなければならない。例えば、抗血管新生剤は、上述の血管新生剤に対する抗体又は他のアンタゴニスト、例えばV E G F - A 又はV E G F - A レセプター(例えば、K D R レセプター又はF l t - 1 レセプター)に対する抗体、抗P D G F R インヒビター、V E G F レセプターシグナル伝達をブロックする小分子(例えば、P T K 7 8 7 / Z K 2 2 8 4、S U 6 6 6 8、S U T E N T (登録商標) / S U 1 1 2 4 8 (リンゴ酸スニチニブ)、A M G 7 0 6、又は例えば国際特許出願国際公開第2004 / 113304号に記載されているものである。抗血管新生剤には、限定されるものではないが、次の薬剤：V E G F インヒビター、例えばV E G F 特異性アンタゴニスト、E G F インヒビター、E G F R インヒビター、アービタックス(登録商標)(セチキシマブ、mClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.)、ベクティビックス(登録商標)(パニツムマブ、Amgen, Thousand Oaks, CA)、T I E 2 インヒビター、I G F 1 R インヒビター、C O X - I I (シクロオキシゲナーゼI I)インヒビター、M M P - 2 (マトリックス-メタロプロテイナーゼ2)インヒビター、及びM M P - 9 (マトリックス-メタロプロテイナーゼ9)インヒビター、C P - 5 4 7, 6 3 2 (Pfizer Inc., NY, USA)、アキシチニブ(Pfizer Inc.; A G - 0 1 3 7 3 6)、Z D - 6 4 7 4 (AstraZeneca)、A E E 7 8 8 (Novartis)、A Z D - 2 1 7 1)、V E G F T r a p (Regeneron/Aventis)、パタラニブ(P T K - 7 8 7、Z K - 2 2 2 5 8 4としても知られている：Novartis & Schering AG)、マクジェン(ペガブタニブ八ナトリウム塩、N X - 1 8 3 8、E Y E - 0 0 1、Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、I M 8 6 2 (Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); 及びアンジオザイム(angiozyme)、及びRibozyme (Boulder, Colo.)及びChiron (Emeryville, Calif.)からの合成リボザイム、及びその組合せが含まれる。他の血管新生インヒビターには、トロンボスポンジン1、トロンボスポンジン2、コラーゲンI V 及びコラーゲンX V I I Iが含まれる。V E G F インヒビターは、その双方の全体が全ての目的に対して援用される米国特許第6534524号及び同第6235764号に開示されている。また抗血管新生剤には、天然の血管新生インヒビター、例えばアンジオスタチン、エンドスタチン等が含まれる。例えば、KI

30

40

50

agsbrun及びD'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39 ; Streit及びDetmar (2003) Oncogene 22:3172-3179(例えば、悪性メラノーマにおける抗血管新生治療剤を列挙する表3) ; Ferrara及びAlitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364 ; Tonini等 (2003) Oncogene 22:6549-6556(例えば、既知の抗血管新生因子を列挙する表2) ; 及びSato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206(例えば、臨床治験に使用される抗血管新生剤を列挙する表1)を参照。

【0032】

「抗血管新生治療」なる用語は、抗血管新生剤の投与を含む血管新生の阻害に有用な治療を意味する。

【0033】

この発明に係る抗体、抗VEGF抗体の「Kd」又は「Kd値」は、一実施態様では、VEGFに対するFabの溶液結合親和性を測定する次のアッセイによって、又は段階的な力価の非標識VEGFの存在下で、最小濃度の(<sup>125</sup>I)標識VEGF(109)でFabを平衡化し、ついで抗Fab抗体被覆プレートで結合VEGFを捕獲することによって(Chen等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、抗体のFab型とVEGF分子を用いて実施される放射標識VEGF結合評価(RIA)で測定される。アッセイの条件を樹立するために、マイクロタイタープレート(Dynex)を50mMの炭酸ナトリウム(pH9.6)中の5ug/mlの捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)で一晩被覆し、続いてPBS中の2%(w/v)ウシ血清アルブミンで室温(およそ23)で2から5時間ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)において、100pM又は26pMの[<sup>125</sup>I]VEGF(109)を段階希釈した興味あるFab(例えば、Fab-12(Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599))と混合する。ついで、興味あるFabを一晩インキュベートする；しかし、インキュベーションは平衡状態に達することを担保するために65時間継続してもよい。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で1時間インキュベートする。ついで、溶液を取り除き、プレートをPBS中0.1%のTween20で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150ul/ウェルの閃光物質(MicroScint-20;Packard)を加え、プレートをTopcount カウンター(Packard)で10分間計数する。最大結合の20%以下の濃度の各Fabを選択して競合結合アッセイに用いる。他の実施態様によれば、~10応答単位(RU)の固定した標的分子hVEGF(8-109)CM5チップを用いて25でBIAcore(商標)-2000又はBIAcore(商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを使用してKd又はKd値を測定する。簡潔には、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化させる。ヒトVEGFを注入前に10mMの酢酸ナトリウム(pH4.8)で5ug/ml(約0.2μM)に希釈し、結合したタンパク質の応答単位(RU)がおよそ10応答単位(RU)になるように5μl/分の流量で注入する。ヒトVEGFの注入後、未反応群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入する。動態測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78nMから500nM)を25、約25μl/分の流量で0.05%のTween20を含むPBS(PBST)に注入する。会合及び解離のセンサーグラムの同時フィッティングによる単純な一対一ラングミュア結合モデル(BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出する。平衡解離定数(Kd)を $k_{off}/k_{on}$ 比として算出した。Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照のこと。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、結合速度は、分光計、例えば、ストップフロー装備分光光度計(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度のヒトVEGF切断型(8-109)又はマウスVEGFの存在下で、PBS(pH7.2)中、25の、20nMの抗VEGF抗体(Fab型)の蛍光発光強度(励起=295nm;発光=3

10

20

30

40

50

40 nm、バンドパス = 16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて測定することができる。同様の結合アッセイは、抗 5 1 Fab 抗体又は 5 1 を標的として使用する抗体の K<sub>d</sub>を決定するために実施することができる。

#### 【0034】

ここで使用される場合、治療される被験者は哺乳動物(例えば、ヒト、非-ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ等)である。被験者は臨床患者、臨床治験ボランティア、実験動物等でありうる。被験者は、癌、免疫疾患、異常な血管新生を伴う任意の他の疾患への罹患が疑われているか、又は罹患する危険性のあるもの、癌、免疫疾患、異常な血管新生を伴う任意の他の疾患に罹患していると診断されているものでありうる。癌、免疫疾患、又は異常な血管新生を示す任意の他の疾患のための多くの診断方法、及びこれらの疾患の臨床描写は、当該分野で知られている。一実施態様によれば、この発明に従って治療される被験者はヒトである。

10

#### 【0035】

「異常な血管新生」は、疾患状態において又は疾患状態を引き起こすように、新規な血管が過剰に又は他に不適切に成長する場合に(例えば、医学的見地から望ましくない血管新生の位置、時間、度合い、又は発生)起きる。ある場合には、癌、特に血管新生化固形腫瘍及び転移性腫瘍(結腸癌、肺癌(特に小細胞肺癌)又は前立腺癌を含む)、眼性新血管形成による疾患、特に糖尿病性盲目、網膜症、一次性糖尿病性網膜症又は加齢黄斑変性、脈絡膜血管新生(CNV)、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォン・ヒッペル・リンドウ病、眼のヒストプラスマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜血管新生、及び網膜血管新生及びルベオシス;乾癬、関節炎、血管腫のような血管芽細胞腫;炎症性腎疾患、例えば糸球体腎炎、特に糸球体間質性増殖性の糸球体腎炎、溶血性尿毒症性症候群、糖尿病性ネフロパシ又は高血圧の腎硬化症;様々な炎症疾患、例えば、関節炎、特に関節リウマチ、炎症性腸疾患、乾癬、類肉腫症、移植後に生じる動脈の動脈硬化及び疾患、子宮内膜症又は慢性喘息、及び70以上の他の症状のような幾つの場合において、病状の悪化又は疾患を引き起こす新生血管成長がある時に過度の、制御されていない、又は他の不適切な血管新生が起きる。新生血管が疾患組織を育て、正常な組織を破壊し、癌の場合には、新生血管が腫瘍細胞を血流に逃れさせ、他の器官に留まらせる(腫瘍転移)。本発明は、上述の病気を発生させるリスクがある患者を治療することを考える。

20

#### 【0036】

「異常な血管透過性」は血管と血管外区画間の血流、分子(例えば、イオンと栄養)及び細胞(例えば、リンパ球)が過剰又は不適切な場合(例えば、医学的見地から望ましくない血管透過性の場所、時間、程度、又は発生)に起きる。異常な血管透過性は血管を介したイオン、水、栄養、又は細胞の過剰又は不適切な「漏れ」を起こし得る。幾つの場合において、過剰な、制御されない、又は不適切な血管透過又は血管漏出は、例えば、腫瘍を伴う、例えば、脳腫瘍;悪性腹水;メイグス症候群;肺炎;ネフロゼ症候群;心嚢貯留液;胸水;心筋梗塞および脳卒中などに続く状態のような心血管疾患と関連した透過性を含む浮腫を含む病状を悪化又は誘導する。本発明は、異常な血管透過及び漏出を伴う疾患又は障害を発生又は発生させるリスクがある患者を治療することを考慮する。

30

#### 【0037】

本発明の抗体又はポリペプチドを投与する候補となる他の患者は、血管結合組織組織の異常な増殖、赤瘡、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、ベーチェット病、血液由来の腫瘍、頸動脈閉塞性疾患、脈絡叢血管新生、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、コンタクトレンズ過剰装着、角膜移植片拒絶、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、クローン病、イールズ病、流行性角結膜炎、細菌性潰瘍、単純ヘルペス感染症、帯状疱疹、過粘稠度症候群、カボジ肉腫、白血病、脂質退化、ライム病、辺縁潰瘍性角膜炎、モーレン潰瘍、ハンセン病以外のマイコバクテリア感染症、近視、眼性新生血管疾患、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)、骨関節炎、パジェット病、毛様体扁平部炎、類天疱瘡、フリクテン症、多発動脈炎、レーザー治療後合併症、原生動物の感染症、弾性線維性偽性黄色腫、鱗角膜

40

50

炎シッカ、放射状角膜切開、網膜血管新生、未熟児の網膜症、水晶体後繊維増殖、類肉腫、強膜炎、鎌状赤血球貧血、シェーグレン症候群、固形腫瘍、シュタルガルト病、ステイブンジョンソン疾患、上部の辺縁角膜炎、梅毒、全身狼瘡、テリアンの周縁退化、トキソプラズマ症、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、潰瘍性大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠乏およびウエゲナーサルコイドーシス、糖尿病と関連している望ましくない血管新生、寄生虫病、異常な創傷治癒、手術、損傷又は外傷後肥大、体毛成長の抑制、排卵および黄体形成の抑制、移植の阻害及び子宮の胚の発達の阻害を有しているか又は発症するリスクがある。

【0038】

抗血管新生治療は、移植片拒絶、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、心嚢貯留液、例として、心外膜炎及び胸水が関連するもの、望ましくない血管透過又は漏出によって特徴づけられる疾患及び疾患、例えば、脳腫瘍と関連している浮腫、悪性腫瘍と関連している腹水、メイグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心嚢浮腫、胸水、心血管疾患と関連している透過性、例えば心筋梗塞及び脳卒中などの後の症状の一般的な処置に有用である。

10

【0039】

本発明の他の血管新生依存性疾患には、血管線維腫(出血傾向がある異常な血管)、血管新生緑内障(目の血管成長)、動静脈奇形(動脈および静脈間の異常な連通)、結合しない骨折(治癒しない骨折)、アテローム動脈硬化性斑(動脈硬化)、化膿肉芽腫(血管から成る一般的な皮膚病変)、強皮症(結合織病の形)、血管腫(血管から成る腫瘍)、トラコーマ(発達途上国の盲目の主要な原因)、血友病関節、血管粘着力および肥大した瘢痕(異常な瘢痕形成)が含まれる。

20

【0040】

ここで使用される場合、「治療」(及びその文法的変形例、例えば「治療」又は「治療する」)は、予防的/治療的目的のために、化合物又は薬学的組成物を投与することを含む。「疾患を治療する」又は「治療的処置」への使用は、被験者の状態を改善するために、既に疾患に罹患している被験者に、処置を施すことを意味する。処置に所望される効果には、限定されるものではないが、疾患の再発予防、症状の軽減、任意の直接的又は間接的な疾患の病的結果の低減、転移予防、疾患の進行速度の低減、疾患状態の寛解又は軽減、及び予後の緩解又は改善が含まれる。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患発症の遅延化、又は疾患進行の遅延化に使用される。好ましくは、被験者は、以下に記載される特徴的症狀の何れかの特定又はここに記載された診断方法の使用に基づき、異常な血管新生を有する疾患に罹患していると診断されている。「疾患を予防する」とは、まだ病気に罹患していないが、特定の疾患に罹患しやすい、又は発症する危険性のある被験者を、予防的処置することを意味する。好ましくは、被験者は、ここに記載の診断方法を使用して、異常な血管新生を伴う疾患を発症する危険があることが判定される。

30

【0041】

「処置又は緩解」とは、発症前又は発症後の症状又は症状の徴候を緩解することを意味する。同等の未処置のコントロールと比較して、このような緩解又は治療度合いは、任意の標準的な技術で測定して、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%である。

40

【0042】

「再発(recurrence)」、「再発(relapse)」又は「再発した」なる用語は、疾患の消失の臨床的な評価後に、癌又は疾患が戻ることを意味する。遠隔転移又は局所再起の診断は再発と見なすことができる。

【0043】

「難治性」とは、治療に対する疾患又は病状の抵抗性又は非応答性を意味する(例えば、腫瘍性形質細胞の数が、たとえ治療が与えられても増加する)。ある実施態様では、「難治性」なる用語は、限定されるものではないが、VEGFアンタゴニスト、抗血管新生剤、及び化学療法処置を含む、任意の過去の処置に対して抵抗性又は非応答性があること

50

を意味する。ある実施態様では、「難治性」なる用語は、VEGFアンタゴニスト、抗血管新生剤及び/又は化学療法処置を含む任意の過去の処置に対する疾患又は病状の内因的な非応答性を意味する。ある実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体である。

【0044】

「再発」は、患者の病気が、その以前の疾患状態にまで戻る退行、特に回復したと思われるか又は部分的に回復した後に、症状が戻ってくることを意味する。ある実施態様では、再発状態とは、限定されるものではないが、VEGFアンタゴニスト、抗血管新生剤、及び化学療法的処置を含む先の治療の前の病気にまで戻る過程又は戻ることの意味する。ある実施態様では、再発状態は、VEGFアンタゴニスト、抗血管新生剤、及び/又は化学療法処置を含む癌治療に対して、最初の強い応答後に病気にまで戻る過程又は戻ることの意味する。ある実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体である。

10

【0045】

「アジュバント療法」なる用語は、主要な治療、通常は外科手術の後になされる治療である。癌又は疾患のアジュバント療法は、免疫療法、化学療法、放射線療法及びホルモン療法を含みうる。

【0046】

「維持療法」なる用語は、過去の治療の効果の維持を補助するためになされる計画された治療を意味する。維持療法はしばしば癌を寛解に維持するのを補助し、又は疾患の進行にかかわらず特定の治療に対する応答を延長するために与えられる。

20

【0047】

「浸潤性癌」なる用語は、正常な周辺組織に入り始めた組織の層を越えて広がった癌を意味する。浸潤性癌は転移性であってもなくてもよい。

【0048】

「非浸潤性癌」なる用語は、非常に早期の癌又は元の組織を越えて広がらなかった癌を意味する。

【0049】

腫瘍学における「無増悪生存期間」なる用語は、癌が増殖しない治療中及び治療後の期間の長さを意味する。無増悪生存期間は、患者が完全奏功又は部分奏功を経験した時間量、並びに患者が安定な疾患を経験した時間量を含む。

30

【0050】

腫瘍学における「進行性疾患」なる用語は、量の増加か腫瘍の拡がりの何れかによる、治療開始から20%より多い腫瘍の増殖を意味しうる。

【0051】

「疾患」は、抗体を用いて治療することによって利益を得る任意の症状である。例えば、異常な血管形成(過剰、不適切又は制御不能の血管形成)又は血管透過性又は漏出に罹患しているか、又はそれらに対して予防する必要がある哺乳動物。これには、哺乳動物の問題とする疾患の素因となる病的状態を含む慢性及び急性の疾患又は障害を包含する。ここで治療される疾患の非限定的な例には、悪性及び良性の腫瘍;非白血病及びリンパ系の悪性腫瘍;神経系、神経膠系、星状膠系、視床下部性及び他の腺性、マクロファージ系、上皮性、間質性、胞胚腔系の疾患;及び炎症性、血管原性及び免疫性の疾患が包含される。

40

【0052】

「癌」及び「癌性」なる用語は、典型的には制御されない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巢癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、腎癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝癌、頭頸部癌、直腸癌、結腸直腸癌、小細胞肺癌を含む肺がん、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、扁平細胞癌(例えば上皮の扁平細胞癌)、前立腺

50



ガン、腹膜ガン、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃または胃癌、膵癌、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、莢膜細胞腫、男化腫瘍、肝癌、非ホジキンリンパ腫を含む血液悪性腫瘍(NHL)、多発性骨髄腫及び急性の血液系悪性腫瘍、子宮内膜ないし子宮カルチノーマ、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛膜癌、唾液腺カルチノーマ、外陰部癌、甲状腺癌、食道カルチノーマ、肝癌、肛門部のカルチノーマ、陰茎カルチノーマ、上咽頭癌、喉頭のカルチノーマ、カポシ肉腫、メラノーマ、皮膚カルチノーマ、シュワン腫、乏突起細胞腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉種、平滑筋肉腫、尿路カルチノーマ、甲状腺カルチノーマ、ウィルムス腫瘍、並びにB細胞リンパ腫(低級/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)) ; 小リンパ球(SL)NHL ; 中級/濾胞性NHL ; 中級びまん性NHL ; 高級免疫芽細胞性NHL ; 高級リンパ芽球性NHL ; 高級小非分割細胞NHL ; バルキー疾患NHL ; 外套細胞リンパ腫 ; エイズ関連リンパ腫 ; 及びワルデンストロームのマクログロブリン病を含む) ; 慢性リンパ球性白血病(CLL) ; 急性リンパ芽球性白血病(ALL) ; ヘアリー細胞白血病 ; 慢性骨髄芽球性白血病 ; 及び移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)、並びに母斑症及びメイグス症候群と関係している異常な血管性増殖が含まれる。

10

#### 【0053】

ここで使用される「腫瘍」なる用語は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。

#### 【0054】

「抗腫瘍性組成物」又は「抗腫瘍薬」なる用語は、少なくとも一つの活性治療的作用剤、例えば「抗癌剤」を含む、癌を治療する際に有効な組成物を指す。治療的作用剤(抗癌剤)の例には、制限するものではないが、例えば、化学療法剤、増殖阻害性作用剤、細胞傷害性作用剤、放射線療法に用いられる作用剤、抗血管新生作用剤、アポトーシス作用剤、抗チューブリン作用剤および癌を治療する他の作用剤、例えば、抗HER-2抗体、抗CD20抗体、上皮増殖因子レセプター(EGFR)アンタゴニスト(例えばチロシンキナーゼインヒビター)、HER1/EGFRインヒビター(例えばエルロチニブ(Tarceva<sup>TM</sup>))、血小板由来増殖因子インヒビター(例えばGleevec<sup>TM</sup>(メシル酸イマチニブ))、COX-2インヒビター(例えばセレコキシブ)、インターフェロン、サイトカイン、以下の標的Erbb2、Erbb3、Erbb4、PDGFR、BAFF、BR3、APRIL、BCMA又はVEGFレセプターの一つ以上と結合するアンタゴニスト(例えば中和抗体)、TRAIL/Apo2および他の生理活性的で有機化学的作用剤などが含まれる。また、その組合せがこの発明において考えられる。

20

30

#### 【0055】

ここで使用される場合、「増殖阻害剤」は、細胞の成長又は増殖をインビトロ及び/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)ブロックする薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピнкаス(ピンクリスチン及びピンプラスチン)、タキソール(登録商標)、及びトポIIインヒビター、例えばドキシソルピシン、エビルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1を停止するこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

40

#### 【0056】

ここで使用される場合、「細胞傷害剤」なる用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し、及び/又は細胞破壊をもたらす物質を意味する。この用語は、放射性同位体(例えば、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、及び $Re^{186}$ )、増殖阻害剤、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素又はその断片などの毒素を含むことを意図する。

50

## 【 0 0 5 7 】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、癌の処置に有用な化学化合物が含まれる。化学療法剤の例には、チオテバ及びCYTOXAN(登録商標)シクロスホスファミドのようなアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロ-ロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)(特にプラタシン(bullatacin)及びプラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)(合成類似体、KW-2189及びCBI-TM1を含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、クロロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、及びラニムスチン；エネジイン(enediynes)抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンオメガI1、(例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照)；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン；クロドロネート(clodronate)などのビスホスホネート(bisphosphonates)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(aurhamycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラピシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルピシン(モルフォリノ-ドキシソルピシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エシルピシン、エソルピシン(esorubicin)、イダルピシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラピン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のよ

10

20

30

40

50

うな葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン(lonidainine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモール(mopidanmol)；ニトラエリン(nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ラソキサントロン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシン、ベラキュリンA(verracurin A)、ロリデンA(roridin A)及びアングエイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール(登録商標)バクリタキセル、(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANE™ クレモフォル(Cremophor)-フリー、アルブミン設計のナノ粒子形状のバクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びタキソテア(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；GEMZAR(登録商標)ゲンシタピン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトポシド(V P - 1 6 )；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；NAVELBINE(登録商標)ピノレルピン；ノバントロン(novantrone)；テニボシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；イリノテカン(Camptosar, CPT-11)(5-FUとロイコボリンを用いたイリノテカンの処置レジメを含む)；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸などのレチノイド類；カベシタピン(capecitabine)；コンプレタスタチン；ロイコボリン(L V)；オキサリプラチン処置レジメ(FOLFOX)を含むオキサリプラチン；例えばP K C -アルファ、R a f、H - R a s、E G F R(例えば、エルロチニブ(タルセバ<sup>T M</sup>))のインヒビターで、細胞増殖を低減するもの、上述したものの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体が含まれる。

【 0 0 5 8 】

また、化学療法剤には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(S E R M)など、例えばタモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びFARESTON トレミフェン；アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼインヒビターで、副腎でのエストロゲン産生を調節するもの、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタイン(formestanie)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ポロゾール、FEMARA(登録商標)レトロゾール、及びARIMIDEX(登録商標)アナストロゾール；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1, 3-ジオキサランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に不粘着性細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を抑制するも

の、例えばPKC-アルファ、Raf及びH-Ras；VEGF発現インヒビター(例えばANGIOZYME(登録商標)リボザイム)及びHER2発現インヒビターなどのリボザイム；遺伝子治療ワクチンなどのワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン及びVAXID(登録商標)ワクチン；PROLEUKIN(登録商標)rIL-2；LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX(登録商標)rmRH；ピノレルピン及びエスペラミシン(例えば、米国特許第4675187号を参照)、及び上記のものの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体が含まれる。

#### 【0059】

この出願で用いられる「プロドラッグ」なる用語は、親薬剤に比較して疾患細胞に対する細胞傷害性が低く、酵素的に活性化又はより活性化親形態に変換可能な薬学的活性物質の前駆体又は誘導体形態(例えば、小分子)を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting, Belfast (1986)、及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardt等(編), pp247-267, Humana Press (1985)を参照のこと。本発明のプロドラッグは、限定するものではないが、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 $\beta$ -ラクタム含有プロドラッグ、置換されていてもよいフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は置換されていてもよいフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグで、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能なものを含む。限定はしないが、この発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞傷害剤の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

#### 【0060】

「単離された」とは、ここで開示された様々なポリペプチドを記述するために使用する場合、それが発現する細胞又は細胞培養物から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、ポリペプチドの診断又は治療的な使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで十分なほど精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内のインサイツでのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一の精製工程により調製される。

#### 【0061】

「単離された」ポリペプチドコード核酸分子又は他のポリペプチドコード化核酸分子は、ポリペプチドコード化核酸の天然源に通常は伴う少なくとも一種の汚染核酸分子から同定され分離される核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、それが天然に見出される形態又は設定以外のものである。従って、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、それらが天然の細胞中に存在しているコード核酸分子から区別される。しかしながら、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞の位置とは異なる染色体位置にあるポリペプチドを通常は発現する細胞中に含まれるポリペプチドコード化核酸分子を含む。

#### 【0062】

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現させるために必要なDNA配列を意味する。原核生物に好適なコントロール配列は、例えばプロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

10

20

30

40

50

## 【0063】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に配されている場合「作用可能に結合している」。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているならば、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読み枠にあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、一般的な手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

10

## 【0064】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度にストリンジェントな条件」は、(1)例えば50の0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムと、洗浄に低イオン強度及び高温を用いる；(2)例えば42の50%(v/v)ホルムアミドに0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムと、ホルムアミド等の変性剤をハイブリダイゼーションに用いる；又は(3)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液を42で用い、0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)での42での洗浄と50%のホルムアミドでの55での洗浄に、55でのEDTAを含む0.1xSSCからなる高ストリンジェンシー洗浄が続くものによって同定されうる。

20

## 【0065】

ここに記載のアミノ酸配列は、特定しない限り、近接アミノ酸配列である。

## 【0066】

ここで使用される場合、「イムノアドヘシン」なる用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性を組合わせた抗体様分子を意味する。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位(抗原結合部位)以外の所望の結合特異性を備えた(つまり、「異種性」である)アドヘシンアミノ酸配列と免疫グロブリン定常ドメイン配列の融合体を含んでなる。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンド-例えばVEGFR又はフィブロネクチンリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えばIgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMから得ることができる。しばしば免疫グロブリンのFc部分に融合する標的に特異的に結合する配列のファージディスプレイ選択から誘導された配列を含むペプチボディがここでのイムノアドヘシンと考えることができる。

30

40

## 【0067】

「抗体」という用語は最も広義で使用され、例えば、単一のモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗体組成物、ポリクローナル抗体、単鎖抗体、及びこの発明の生物活性又は免疫学的活性を示す及び/又は天然ポリペプチドに特異的に結合する限り、抗体の断片(下記参照)を特にカバーしている。一実施態様によれば、抗体は標的タンパク質のオリゴマー形態、例えば三量体形態に結合する。他の実施態様によれば、抗体は、結合がこの発明のモノクローナル抗体により阻害可能なタンパク質(例えば、この発明の貯蔵(deposited)抗体)に特異的に結

50

合する。抗体の「機能的断片又はアナログ」なる表現は、言及される抗体に共通した定性的生物活性を有する化合物である。例えばこの発明の抗体の機能的断片又はアナログは、VEGF又は51に特異的に結合可能なものでありうる。一実施態様では、抗体は、細胞増殖を誘発するVEGFの能力を防止し又は実質的に低減させることができる。

#### 【0068】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され、分離され及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用に干渉する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質を含みうる。実施態様では、抗体は、(1)ローリー法で測定して抗体の95重量%を越え、最も好ましくは99重量%を越えるまで；(2)スピニングカップシークエネーターを使ったN末端又は内在するアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は(3)クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元状態の下でのSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。単離された抗体は、抗体の自然環境の少なくとも一成分が存在しないことから、組換え細胞にインサイツで抗体を含む。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程によって調製されるであろう。

10

#### 【0069】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、2-5の基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖を含む多価集合体を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は一つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、二つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに連結している。また各H及びL鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有している。各H鎖は、N末端に可変ドメイン( $V_H$ )と、これに続いて及び鎖それぞれに対しては3つの定常ドメイン( $C_H$ )、及び $\mu$ 及びアイソタイプに対しては4つの $C_H$ ドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン( $V_L$ )と、これに続いてその他端に定常ドメイン( $C_L$ )を有する。 $V_L$ は $V_H$ に整列されており、 $C_L$ は重鎖の第1定常ドメイン( $C_{H1}$ )に整列されている。特定のアミノ酸残基は軽鎖と重鎖の可変ドメインの界面を形成すると考えられている。 $V_H$ と $V_L$ は対になって、互いに単一の抗原結合部位を形成している。異なったクラスの抗体の構造及び特性については、例えば、BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁, 6章を参照のこと。

20

30

#### 【0070】

任意の脊椎動物種からのL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ及びラムダと称される、明確に区別される二つのタイプの一方を割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメイン( $C_H$ )のアミノ酸配列に基づき、免疫グロブリンは、異なったクラス又はアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには、それぞれ、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 及び $\alpha$ と命名される重鎖を有する、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つのクラスがある。 $\mu$ クラスは、更に $C_H$ 配列及び機能の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えばヒトでは、次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2と表される。

40

#### 【0071】

「可変」なる用語は、可変ドメインのあるセグメントが、抗体間で配列が広範囲に異なるという事実を意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンにわたって均一に分布しているのではない。代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分

50

離された15 - 30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きなβ-シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により連結された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、β-シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域と共に極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、様々なエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の寄与を示

【0072】

ここで使用される「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。高頻度可変領域は、一般に、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば、V<sub>L</sub>の概ね残基24 - 34(L1)、50 - 56(L2)及び89 - 97(L3)周辺と、V<sub>H</sub>の概ね31 - 35(H1)、50 - 65(H2)及び95 - 102(H3)(一実施態様では、H1は約31 - 35である);上掲のKabat等、及び/又は「高頻度可変ループ」由来のそれらの残基(例えば、V<sub>L</sub>の残基26 - 32(L1)、50 - 51(L2)及び91 - 96(L3)と、V<sub>H</sub>の26 - 32(H1)、53 - 55(H2)及び96 - 101(H3);Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))とを含む。

【0073】

本明細書及び特許請求の範囲において、カバット番号付けシステムは、可変ドメインの残基(ほぼ、軽鎖の残基1 - 107、及び重鎖の残基1 - 113)を指す場合に一般的に使用される(例えば、上掲のKabat等(1991))。「EU番号付けシステム」又は「EUインデックス」は、免疫グロブリン重鎖定常領域の残基を指す場合に一般的に使用される(例えば、出典明示によりここに援用される上掲のKabat等(1991)に報告されているEUインデックス)。ここで他の定義が記載されない限りは、抗体の可変ドメインにおける残基番号の言及は、カバット番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。ここで他の定義が記載されない限りは、抗体の定常ドメインにおける残基番号の言及は、EU番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。

【0074】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物に対して、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生産することを必要とすると解してはならない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, Nature 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4816567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, Nature 352:624-628 (1991)、及びMarks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから、又は以下の実施例に記載された方法を使用して、単離することもできる。

【0075】

ここでモノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りが他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれ

10

20

30

40

50

が所望の生物学的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号;及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

#### 【0076】

「親和性成熟」抗体は、改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改善を生じせしめるその一又は複数のCDRに一又は複数の改変を持つものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該分野で知られている手段により生産される。Marks等 Bio/Technology 10:779-783(1992)には、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和性成熟が記載されている。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然誘発は、Barbas等 PNAS USA 91:3809-3813(1994); Schier等 Gene 169:147-155(1995); Yelton等 J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jackson等 J. Immunol. 154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等 J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)に記載されている。

10

#### 【0077】

「阻止」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害し又は低減させるものである。例えば、阻止又はアンタゴニスト抗 5 1 抗体は、5 1 に結合することにより、血管新生を部分的に又は完全に阻害する。

#### 【0078】

「アゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を向上させ又は増加させるものである。例えば、アゴニスト抗体抗 5 1 抗体は、5 1 に結合することにより、血管新生を亢進する。

20

#### 【0079】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位並びにC<sub>L</sub>、及び少なくとも重鎖定常ドメイン、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、インタクトな抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

#### 【0080】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片; ダイアポディ; 線形抗体(米国特許第5641870号、実施例2; Zapata等 Protein Eng. 8(10): 1057-1062[1995]); 単鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

30

#### 【0081】

「線形抗体」なる表現は、一般的にZapata等 Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)に記載された抗体を意味する。簡潔に述べると、これらの抗体は、相補的軽鎖ポリペプチドと共に、一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデム型Fdセグメント(VH-C<sub>H</sub>1-VH-C<sub>H</sub>1)を含む。線形抗体は二重特異性又は単一特異性とすることができる。

#### 【0082】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる二つの同一の抗体結合断片、及び容易に結晶化する能力を反映する命名である残留「Fc」断片を生じる。Fab断片は、H鎖(V<sub>H</sub>)の可変領域ドメイン、及び一方の重鎖の第1定常ドメインと共に、全L鎖とからなる。各Fab断片は抗原結合に対して一価である、すなわち単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、抗原を架橋結合でき、二価の抗原結合活性を有するFab断片に連結した二つのジスルフィドにほぼ相当する単一の大きなF(ab')<sub>2</sub>断片が生じる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むC<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されていることによりFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有す

40

50



る F a b' 断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【 0 0 8 3 】

F c 断片は、ジスルフィドにより互いに保持された双方の H 鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は F c 領域における配列により決定され、該領域はまたあるタイプの細胞に見出される F c レセプター (F c R) により認識される部分である。

【 0 0 8 4 】

「変異体 F c 領域」は、ここで定義される少なくとも一の「アミノ酸修飾」により、天然配列 F c 領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体 F c 領域は、天然配列の F c 領域もしくは親ポリペプチドの F c 領域と比較して少なくとも一のアミノ酸置換、例えば、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域に約 1 から約 10 のアミノ酸置換、好ましくは約 1 から約 5 のアミノ酸置換を有する。一実施態様では、変異体 F c 領域は、天然配列の F c 領域と、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、又は少なくとも約 99% の同一性を有する。他の実施態様によれば、ここでの変異体 F c 領域は、親ポリペプチドの F c 領域と、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、又は少なくとも約 99% の同一性を有する。

10

【 0 0 8 5 】

「F c 領域含有ポリペプチド」なる用語は、ポリペプチド、例えば F c 領域を含む抗体又はイムノアドヘシン(以下の定義を参照)を意味する。F c 領域の C 末端リジン (E U 番号付けシステムによれば残基 447) は、例えばポリペプチドの精製中に、又は抗体をコードする核酸を組換え的に操作することによって、取り除くことができる。従って、この発明の F c 領域を有する抗体を含むポリペプチドを含む組成物は、全ての K 447 残基が除去された抗体、K 447 残基が除去されていないポリペプチド集団、又は K 447 残基を有する又は有さないポリペプチドの混合物を有するポリペプチド集団を含みうる。

20

【 0 0 8 6 】

「F v」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この断片は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これら二つのドメインの折り畳みから、抗原結合に対するアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する 6 つの高頻度可変ループ (H 及び L 鎖からそれぞれ 3 つのループ) が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン (又は抗原に対して特異的な 3 つの CDR のみを含む F v の半分) でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

30

【 0 0 8 7 】

「s F v」又は「s c F v」と省略される「単鎖 F v」は、単一のポリペプチド鎖に連結する V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F v ポリペプチドは、s F v が抗原結合に対する所望の構造を形成するようにするポリペプチドリンカーを V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> ドメインの間に更に含む。s F v の概説については、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); 以下の Borrebaeck 1995 を参照のこと。

40

【 0 0 8 8 】

「ダイアボディ」なる用語は、V ドメインの鎖内ではなく鎖間ペアリングが達成され、よって二価断片、すなわち二つの抗原-結合部位を有する断片を生じるように、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン間に、短いリンカー (約 5 - 10 残基) を有する s F v 断片 (先の段落を参照) を構築することにより調製される小さい抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは、二つの「クロスオーバー」s F v 断片のヘテロ二量体であり、二つの抗体の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインは異なるポリペプチド鎖上に存在している。ダイアボディは、例えば欧州特許出願公開第 404097 号; 国際公開第 93/11161 号; 及び Hollinger 等, *PNA S USA 90: 6444-6448* (1993) に更に十分に記載されている。

【 0 0 8 9 】

50

「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である非ヒト(例えば齧歯類)抗体の形態である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものをまた含む。更なる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329(1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)を参照のこと。

10

20

30

40

50

#### 【0090】

「種依存性抗体」は、第2の哺乳動物種からの抗原のホモログに対してよりも、第1の哺乳動物種からの抗原に対して、より強い結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体はヒト抗原に「特異的に結合する」(すなわち、約 $1 \times 10^{-7}$  M以下、約 $1 \times 10^{-8}$  M以下、又は約 $1 \times 10^{-9}$  M以下の結合親和性(Kd)値を有する)が、第2の非ヒト哺乳動物種からの抗原のホモログに対しては、ヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い結合親和性を有する。種依存性抗体は、上述した種々の種類の抗体の何れであってもよいが、ヒト化又はヒト抗体であることが好ましい。

#### 【0091】

そのような実施態様では、「非標的」タンパク質に対するポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器(FACS)分析又は放射免疫沈降(RIA)によって定量して、その特定の標的タンパク質へのポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の結合の約10%よりも低い。標的分子へのポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の結合に関して、特定のポリペプチド、又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子との競合によって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 $10^{-4}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-5}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-6}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-7}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-8}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-9}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-10}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-11}$  M、あるいは少なくとも約 $10^{-12}$  M、あるいはそれ以上のKdを持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的結合」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへも実質的に結合することなく、分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

#### 【0092】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異Fc領域)に起因するそれらの生物活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変化する

る。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC);Fcレセプター結合;抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC);ファゴサイトーシス;細胞表面レセプターのダウンレギュレーション;及びB細胞活性化等が含まれる。「天然配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。Fc配列の例は、例えば限定されるものではないが、上掲のKabat等(1991)に記載されている。

#### 【0093】

ここで同定されるポリペプチド及び抗体配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」又は「相同性」は、任意の保存的置換を配列同一性の一部として考慮して配列を整理させた後、比較されるポリペプチドにおけるアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁(Washington D.C., 20559)に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社(South San Francisco, California)を通して公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

#### 【0094】

「Fcレセプター」又は「FcR」なる用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。一実施態様では、この発明のFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を有する(M. Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)参照)。本用語は、アロタイプ、例えばFcRIIIIAアロタイプ:FcRIIIIA-Phe158、FcRIIIIA-Val158、FcRIIIA-R131及び/又はFcRIIIA-H131を含む。FcRは、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991);Capel等, Immunomethods 4:25-34(1994);及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここでの用語「FcR」によって包含される。またこの用語は胎児への母性IgGの移動の原因である新生児レセプターFcRnもまた含む(Guyer等, J. Immunol. 117:587(1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249(1994))。

#### 【0095】

「FcRn」なる用語は、新生児レセプター(FcRn)を意味する。FcRnは主要組織適合複合体(MHC)と構造的に類似しており、2-マイクログロブリンに非共有的に結合した鎖からなる。新生児FcレセプターFcRnの複数の機能は、Ghetie及びWard(2000)Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766に概説されている。FcRnは、母から若者への免疫グロブリンIgGの受動的送達及び血清IgGレベルの調節における役割を担っ

10

20

30

40

50

ている。FcRnはサルベージレセプターとして作用可能であり、細胞内及び細胞を渡って、インタクトな形態で飲作用IgGに結合し、移送し、デフォルト分解経路からそれらを救う。

【0096】

国際公開第00/42072号 (Presta)、及びShields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)には、FcRsへの結合性が改善され又は低減された抗体変異体が記載されている。これらの文献の内容は出典明示により特にここに援用される。

【0097】

ヒトIgGFc領域の「CH1ドメイン」(「H1」ドメインの「C1」とも称される)は、通常、約アミノ酸118から約アミノ酸215まで(EU番号付けシステム)伸長する。

10

【0098】

「ヒンジ領域」は、一般的に、ヒトIgG1のGlu216からPro230までの伸長として定義される(Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985))。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、最初と最後のシステイン残基を置き換え、同じ位置に重鎖内S-S結合を形成させることにより、IgG1配列と整列させることができる。

【0099】

Fc領域の「下方ヒンジ領域」は、C末端の直ぐからヒンジ領域までの残基の伸長、すなわちFc領域の残基233から239として通常は定義される。過去の報告では、FcR結合は、IgGFc領域の下方ヒンジ領域中のアミノ酸残基に一般に起因する。

20

【0100】

ヒトIgGFc領域の「CH2ドメイン」(「H2」ドメインの「C2」とも称される)は、通常約アミノ酸231から約アミノ酸340まで伸長する。CH2ドメインは、他のドメインと密には対をなしていない点で独特である。むしろ、二つのN結合した分枝状炭水化物鎖は、インタクトな天然IgG分子の二つのCH2ドメイン間に割り込んでいる。炭水化物はドメイン-ドメインペアリングの代替を提供し、CH2ドメインの安定化に役立つ。Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)。

【0101】

「CH3ドメイン」(「C2」又は「H3」ドメインとも称される)は、Fc領域において、C末端からCH2ドメインまでの残基(すなわち、約アミノ酸残基341から抗体配列のC末端、典型的にはIgGのアミノ酸残基446又は447)の伸長を含む。

30

【0102】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」は、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)；ファゴサイトーシス；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター；BCR)のダウンレギュレーション等を含む。このようなエフェクター機能は、一般的に、Fc領域を結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、例えばここで開示されているような様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0103】

「C1q」は、免疫グロブリンのFc領域に対する結合部位を含むポリペプチドである。C1qは、二つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sと共に、複合体C1、つまり補体依存性細胞傷害(CDC)経路の第一成分を形成する。ヒトC1qは、例えばQuidel, San Diego, CAから商業的に購入可能である。

40

【0104】

「結合ドメイン」なる用語は、他の分子に結合するポリペプチドの領域を意味する。FcRの場合、結合ドメインは、Fc領域に結合する原因であるそのポリペプチド鎖の一部(例えば、その鎖)を含みうる。有用な一つの結合ドメインは、FcRアルファ鎖の細胞外ドメインである。

【0105】

50

「変化した」FcR結合親和性又はADCC活性を有する変異体IgG Fcの抗体又はペプチドは、親ポリペプチド又は天然配列Fc領域を有するポリペプチドと比較して、高められた又は低減したFcR結合活性(例えば、FcR又はFcRn)及び/又はADCC活性を有するものである。FcRに対する「増加した結合性を示す」変異体Fcは、親ポリペプチド又は天然配列IgG Fcよりも高い親和性(例えば、より低い見かけKd又はIC50値)を有する少なくとも一のFcRに結合する。幾つかの実施態様では、親ポリペプチドと比較した結合性の改善度合いは、約3倍、好ましくは約5、10、25、50、60、100、150、200、250、300、350、400、450、又は500倍であり、又は約25%~1000%の改善度合いである。FcRに対して「低減した結合性」を示すポリペプチド変異体は、親ポリペプチドよりも低い親和性(例えば、より高い見かけKd又はIC50値)を有する少なくとも一のFcRに結合する。親ポリペプチドと比較した結合性の低減度合いは、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、又はそれ以上であってよい。

10

20

30

40

50

#### 【0106】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又は「ADCC」は、所定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcR)に結合した分泌型Igがこれらの細胞傷害性エフェクター細胞を抗原保持標的細胞に特異的に結合させ、続いて標的細胞を細胞毒によって死滅させる細胞傷害性の形態を指す。抗体は細胞傷害性細胞「を装備し」、そのような死滅に必ず必要である。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcRIのみを発現する一方、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血性細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet, *Annu.Rev.Immunol.*, 9:457-92(1991)の464頁の表3に要約されている。対象分子のADCC活性を評価するためには、米国特許第5500362号又は第5821337号、又は以下の実施例に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子のADCC活性は、例えばClynes等, *PNAS(USA)*, 95:652-656(1998)に開示されたもののような動物モデルにおいて、インビボで評価されうる。

#### 【0107】

野生型IgG Fcを有するポリペプチド又は親ポリペプチドより効果的に、ヒトエフェクター細胞の存在下で、「亢進したADCCを示す」か又は抗体依存性細胞媒介傷害性(ADCC)を媒介する変異Fc領域を含むポリペプチドは、アッセイにおける変異型Fc領域を含むポリペプチド及び野生型Fc領域を含むポリペプチド(又は親ポリペプチド)の量が本質的に同じ場合に、インビトロ又はインビボで、ADCCの媒介について実質的により効果的であるものである。一般的に、このような変異体は、ここに開示されたインビトロADCCアッセイを用いて同定されるが、例えば、動物モデルにおける、他のアッセイ又はADCC活性を決定するための方法が考えられる。一実施態様では、好ましい変異体は、ADCCの媒介で、野生型のFc(又は親ポリペプチド)より約5倍から約100倍、例えば約25倍から約50倍、より効果的である。

#### 【0108】

「補体依存性細胞傷害」もしくは「CDC」は、補体の存在下での標的の溶解を意味する。古典的な補体経路の活性化は、補体系(C1q)の第一成分が、その同族抗原に結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)に記載されているような、CDCアッセイを実施することができる。

#### 【0109】

Fc領域アミノ酸配列が改変され、C1q結合能力が増大又は減少させられたポリペプチド変異体は、米特許第6194551号及び国際公開第99/51642号に記載されている。その特許文献の内容は、出典明示によって特にここに援用される。またIdusogie等, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

## 【0110】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又はそれ以上のFcRsを発現し、エフェクターとしての機能を発揮する白血球のことである。一実施態様では、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を発揮する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCsとNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、その天然源、例えばここに記載される血液やPBMCから単離されうる。

## 【0111】

FcRnへの結合を測定する方法は知られている(例えばGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はFc変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。一実施態様では、変異IgGFcを有する本発明の抗51抗体は、野生型IgGFcを有するポリペプチドよりも、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも100倍、少なくとも125倍、少なくとも150倍、亢進したヒトFcRnへの結合親和性を示す。特定の実施態様では、ヒトFcRnに対する結合親和性は、約170倍亢進する。

10

## 【0112】

FcRnへの結合親和性について、一実施態様では、ポリペプチドのEC50又は見かけのKd(pH6.0での)は1μM未満、より好ましくは100nM以下、更に好ましくは10nM以下である。FcRIII(F158;すなわち低親和性アイソタイプ)への増加した結合親和性について、一実施態様では、EC50又は見かけのKdは10nM以下であり、FcRIII(V158;高親和性アイソタイプ)について、EC50又は見かけのKdは3nM以下である。他の実施態様では、試験抗体とコントロール抗体の結合曲線の間点における吸光度の値の比(例えば $A_{450nm}(\text{抗体}) / A_{450nm}(\text{コントロールAb})$ )が40%以下である場合に、コントロール抗体(例えばハーセプチン(登録商標)抗体)との相対的なFcレセプターに対する抗体結合の減少は、コントロール抗体と有意に相関しているとみなしうる。他の実施態様によれば、試験抗体とコントロール抗体の結合曲線の間点における吸光度の値の比(例えば $A_{450nm}(\text{抗体}) / A_{450nm}(\text{コントロールAb})$ )が125%以上である場合に、コントロール抗体(例えばハーセプチン(登録商標)抗体)との相対的なFcレセプターに対する抗体結合の増加は、コントロール抗体と有意に相関しているとみなしうる。

20

30

## 【0113】

「親ポリペプチド」又は「親抗体」は、変異体ポリペプチド又は抗体が生じるアミノ酸配列及び変異体ポリペプチドないし抗体が比較されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドないし抗体である。典型的には、親ポリペプチドないし親抗体は、ここに開示した一又は複数のFc領域修飾を欠き、ここに開示したポリペプチド変異体と比較してエフェクター機能が異なる。親ポリペプチドは天然配列のFc領域又は(例えば付加、欠失及び/又は置換のような)本来存在するアミノ酸配列の修飾を有するFc領域を含みうる。

40

## 【0114】

この発明の抗体はファージディスプレイから得られる。ここで使用される場合、「ライブラリー」は複数の抗体又は抗体断片配列、又はこれらの配列をコードする核酸を意味し、該配列は本発明の方法によってこれらの配列中に導入される変異アミノ酸の組合せにおいて異なっている。

## 【0115】

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドを、ファージ、例えば糸状ファージ粒子の表面上のコートタンパク質の少なくとも一部への融合タンパク質としてディスプレイする。ファージディスプレイの有用性は、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリーを、高親和性で標的分子に結合する配列について迅速にかつ効率的に選別できると

50

いう点にある。ファージ上へのペプチド及びタンパク質ライブラリーのディスプレイは、特異的結合特性を持つものについて何百万ものポリペプチドをスクリーニングするために使用されている。多価ファージディスプレイ法は、糸状ファージの遺伝子 I I I 又は遺伝子 V I I I への融合体を通してランダム小ペプチド及び小タンパク質をディスプレイするために使用されている。Wells 及び Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992) と、そこで引用されている文献。一価ファージディスプレイでは、タンパク質又はペプチドライブラリーは遺伝子 I I I 又はその一部に融合させられ、ファージ粒子が融合タンパク質の 1 コピーをディスプレイするか何もディスプレイしないように野生型遺伝子 I I I タンパク質の存在下で低レベルで発現される。選別が内因的なりガンド親和性に基づくように結合活性効果が多価ファージに対して低減され、ファージミドベクターが使用され、これが DNA 操作を単純にする。Lowman 及び Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991)。

10

## 【0116】

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えば C o 1 E 1、及びバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、糸状バクテリオファージ及びラムドイドバクテリオファージを含む任意の既知のバクテリオファージで使用されうる。プラスミドはまた一般には抗生物質耐性の選択可能マーカースも含む。これらのベクターにクロニングされる DNA のセグメントはプラスミドとして増殖することができる。これらのベクターを内部に持つ細胞がファージ粒子の生産に必要な全ての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミド DNA の一つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファージミドは感染性または非感染性ファージ粒子を形成しうる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子表面に提示されるように遺伝子融合体としてこの異種ポリペプチドの遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子又はその断片を含むファージミドを含む。

20

## 【0117】

「ファージベクター」なる用語は、異種遺伝子を含んでいて複製ができるバクテリオファージの二本鎖複製型を意味する。ファージベクターは、ファージ複製及びファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有している。ファージは糸状バクテリオファージ、例えば M 1 3、f 1、f d、P f 3 ファージもしくはその誘導体、又はラムドイドファージ、例えばラムダ、2 1、phi 8 0、phi 8 1、8 2、4 2 4、4 3 4 等、もしくはその誘導体でありうる。

30

## 【0118】

ペプチボディ、イムノアドヘシン、抗体及び短いペプチドのようなポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾のタイプには、ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ポリペプチドの選択された側鎖又は N 又は C 末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることが含まれる。二官能性試薬による誘導体化は、例えばポリペプチドを、抗体の精製方法で用いる水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために有用であり、その逆も同じである。通常用いられる架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば 4-アジドサリチル酸を有するエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬が含まれる。

40

## 【0119】

他の修飾には、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N 末端アミンのアセチル化

50

、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0120】

他の修飾はメイタンシン及びメイタンシノイド、カリケアマイシン及び他の細胞傷害剤のようなアンタゴニストへの毒素のコンジュゲーションを含む。

【0121】

ポリペプチドの共有結合的修飾の他のタイプは、ポリペプチドを、種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。

10

【0122】

本発明のポリペプチドは、別の非相同のポリペプチド又はアミノ酸配列(例えば、イムノアドヘシン又はペプチボディ)に融合させたポリペプチドを含むキメラ分子を形成するのに有利な場合、修飾することもできる。

【0123】

一実施態様では、そのようなキメラ分子はポリペプチドと、例えば、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質のタンパク質伝達ドメイン(Schwarze等, 1999, Science 285: 1569-72)を使用して、種々の組織へ及び特に血液脳関門を越えて運搬するためにポリペプチドを標的とするタンパク質伝達ドメインとの融合を含むものである。

【0124】

他の実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって、ポリペプチドを容易に精製できるようにする。様々なタグポリペプチド及びそれら各々の抗体が当該分野で知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-His)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(ポリ-His-Gly)タグ；fluHAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, PNAS USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

20

30

【0125】

別の実施態様では、キメラ分子はポリペプチドの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含みうる。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域でありうる。この発明のIg融合体は、Ig分子中の少なくとも一の変換領域に、概ね又は唯、ヒトの残基94-243、残基33-53又は残基33-52を含むポリペプチドを含む。特定の実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ヒンジ、CH2及びCH3、又はIgG1分子のヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、米国特許第5428130号を参照のこと。

40

【0126】

本発明は腫瘍増殖の再発又は癌細胞増殖の再発を抑制又は阻害するための方法及び組成物を提供する。様々な実施態様では、癌は、癌細胞の数が有意には減少しないか、もしくは

50



は増加しているか、又は腫瘍サイズが有意には減少していないか、もしくは増加しており、又は癌細胞のサイズ又は数の更なる減少に失敗した、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞の増殖である。癌細胞の治療効果をアッセイするための当該分野で知られている任意の方法で、インビトロ又はインビボにおいて、癌細胞が再発性腫瘍増殖か又は再発性癌細胞の増殖かどうかの決定がなされうる。抗VEGF治療に対して耐性の腫瘍は再発性腫瘍増殖の一例である。

【0127】

ここに開示されるポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「有効量」とは特に述べられた目的を実施するのに十分な量である。「有効量」は経験的にかつ述べられた目的に関連して既知の方法を用いて決定されうる。

10

【0128】

「治療的有效量」という用語は、哺乳動物の疾病や疾患（患者としても知られている）の「治療」のために有効な本発明の抗体、ポリペプチド、又はアンタゴニストの量を称する。癌の場合は、治療的有效量の医薬により、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさ又は重さを小さくし；癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害（すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める）し；腫瘍の転移を阻害（すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める）し；腫瘍の成長をある程度阻害し；及び/又は癌に関連する一又は複数の症状をある程度和らげることが可能である。ある程度、医薬は、成長を妨げ及び/又は既存の癌細胞を殺すことが可能で、細胞分裂停止性及び/又は細胞傷害性である。一実施態様では、治療的有效量は成長阻害量である。別の実施態様では、治療的有效量は、患者の生存期間を延長する

20

【0129】

創傷治癒の場合、「有効量」又は「治療的有效量」なる用語は患者の創傷治癒を加速し又は改善するために有効な医薬の量を意味する。治療的投与量とは患者に治療効果を示す用量であり、治療的投与量未満とは治療される患者に治療効果を示さない投与量を意味する。

【0130】

「慢性創傷」は、治癒しない創傷を意味する。例えば、Lazarus等、Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)を参照。慢性創傷には、例えば、動脈の潰瘍、糖尿病性潰瘍、褥瘡、静脈潰瘍などが含まれるが、これに限定されるものではない。急性創傷は慢性創傷に発達しうる。急性創傷には、例えば、熱傷害、外傷、手術、広範囲な皮膚癌の切除、深在性真菌及び細菌の感染、血管炎、強皮症、天疱瘡、中毒性表皮壊死症などによって生じる創傷が含まれるが、これに限定されるものではない。例えば、Buford, Wound Healing and Pressure Sores, Healing Well.com, published on: October 24, 2001を参照。「通常の創傷」は、通常の創傷治癒修復を経る創傷を意味する。

30

【0131】

この発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「増殖阻害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害できる量である。腫瘍性細胞増殖の阻害の目的のためのこの発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「増殖阻害量」は、経験的にかつ知られている方法によって又はここに提供される実施例により決定することができる。

40

【0132】

この発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「細胞傷害量」は、細胞、特に腫瘍、例えば癌細胞の破壊を、インビトロ又はインビボで生じせしめることができる量である。腫瘍性細胞増殖の阻害の目的のためのこの発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「細胞傷害量」は、経験的にかつ当該分野で知られている方法で決定することができる。

【0133】

50

ここでの「自己免疫疾患」は、個体自身の組織から生じたそれに対して向けられた疾患又は障害、あるいはその同時分離又は徴候又はそれから生じる症状である。自己免疫疾患又は障害の例には、限定されないが、関節炎（関節リウマチ、例えば急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、感染性関節炎、ライム病関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、脊椎関節炎、及び若年発症関節リウマチ、骨関節炎、関節炎慢性化、関節炎変形、関節炎慢性原発、反応性関節炎、及び強直性脊椎炎）、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えばプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬、皮膚炎、例えば接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状皮膚炎、及びアトピー性皮膚炎、x連鎖性高IgM症候群、蕁麻疹、例えば慢性特発性蕁麻疹、例えば慢性自己免疫蕁麻疹、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症(MS)、例えば脊椎眼(spino-optical)MS)、原発性進行性MS、及び再発性寛解MS、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、硬化症汎発、及び失調性硬化症、炎症性腸疾患(IBD)(例えばクローン病、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸性潰瘍、微細な大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープ、壊死性全腸炎及び貫壁性大腸炎、及び自己免疫炎症性腸疾患)、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎)、呼吸窮迫症候群、例えば成人性又は急性の呼吸窮迫症候群(ARDS)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液疾患、リウマチ様脊椎炎、突発性聴力障害、IGE媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び/又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(GN)、例えば慢性又は急性の糸球体腎炎、例えば原発性GN、免疫性GN、膜性GN(膜性ネフロパシー)、特発性膜性GN、膜性増殖性GN(MPGN)(タイプI及びタイプIIを含む)、及び急速進行性GN、アレルギー性症状、アレルギー性反応、アレルギー性又はアトピー性湿疹を含む湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息、及び自己免疫喘息、T細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球接着不全症、全身性エリテマトーデス(SLE)又は全身性エリテマトーデス、例えば皮膚SLE、亜急性皮膚エリテマトーデス、新生児期ループス症候群(NLE)、紅斑性狼瘡汎発、(腎炎、脳炎、小児、非腎性、円板状、脱毛症を含む)ループス、若年発症(I型)真正糖尿病、例えば小児インシュリン依存性真正糖尿病(IDDM)、成人発症型真正糖尿病(II型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、ヴェゲナーの肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、(大脈管脈管炎(リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞(高安)動脈炎を含む)血管炎を含む、中脈管脈管炎(川崎病及び結節性多発動脈炎を含む)、微小多発動脈炎、CNS脈管炎、壊死性血管炎、皮膚性血管炎又は過敏性血管炎、全身性壊死性血管炎、及びANCA関連の脈管炎、例としてチャージ-ストラウス脈管炎又は症候群(CSS))、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイヤモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全(PRCA)、第V因子欠損症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、CNS炎症性疾患、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット(Bechet)又はベーチェット(Behcet)病、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば類水疱性天疱瘡及び類天疱瘡皮膚、天疱瘡(尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、ペンフィグス粘液膜類天疱瘡及び天疱瘡エリテマトーデスを含む)、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、

10

20

30

40

50

慢性神経障害、例えばIgM多発性神経炎又はIgM媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、例えば慢性及び急性のITPを含む特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、原発性甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブ病、多腺性症候群、例として自己免疫多腺性症候群(又は多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランパート-イトン筋無力症候群又はイトン ランパート症候群、スティッフマン(stiff-man)又はスティッフパーソン(stiff-person)症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)、重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(OMS)及び感覚系神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ系間隙間質性肺炎、閉塞性細気管支炎(非移植)対NSIP、ギラン バレー症候群、ベルガー病(IgAネフロパシー)、特発性IgAネフロパシ、線状IgA皮膚病、原発性胆管萎縮症、肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアック病、コエリアック病、セリアックスブルー(グルテン腸疾患)、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(ALS;筋萎縮性側索硬化症(ルー・ゲーリック病))、冠状動脈疾患、自己免疫内耳疾患(AIED)、又は自己免疫聴力障害、眼球クローヌス筋硬直徴候(OMS)、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、アミロイドーシス、強膜炎、非癌性リンパ球増多症、モノクローナルB細胞リンパ球増多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び意義未確定のモノクローナル免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance)MGUS)を含む原発性リンパ球増多症、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びCNSのチャンネル病、自閉症、炎症性ミオパシー、局所性分節性系球体硬化症(FSGS)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄疾患、例として、自己免疫脱髄性病、糖尿病性腎症、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症、及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎及び繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic fasciitis)、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎、又はフックス毛様体炎、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァン症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞蹈病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、アスペルミオジェネーシス(aspermiogenesis)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、癩性結節性紅斑、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハン

マンリッチ病、感音性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感神経(symphatica)眼炎、精巣炎肉芽腫症、膵炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、Quervain甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、抗精子抗体による不妊性、非悪性胸腺腫、白斑、SCID及びエプスタインバーウイルス関連疾患、後天性免疫不全症候群(エイズ)、寄生虫病、例えばリーシュマニア属、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球接着不全症、サイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膵島炎、多内分泌性不全、末梢性神経障害、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症(AOIH)、完全脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症(EBA)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム、又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清陰性脊椎関節炎疹、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、プラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウイスコットアルドリッチ症候群、毛細血管拡張性失調症候群、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、神経病学的疾患、リンパ節炎、虚血性再灌流障害、血圧応答の減退、血管機能不全、脈管拡張(angiectasis)、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、心筋又は他の組織の再灌流損傷、急性炎症性成分を有する皮膚病、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈疾患、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0134】

「検出する」なる用語は、物質の存在又は不存在を決定すること又は物質の量を定量することを含むことを意図する。従って、該用語は、定量的及び定性的な決定のための本発明の物質、組成物、及び方法の使用を意味する。一般的に、検出に使用される特定の技術は、本発明の実施に重要ではない。

#### 【0135】

例えば、本発明に係る「検出する」は、5遺伝子産物、1遺伝子産物(例えば、mRNA分子)、又は5もしくは5-1ポリペプチドの存在又は非存在；5もしくは5-1ポリペプチドのレベル又は標的に結合した量の変化；5もしくは5-1ポリペプチドの生物学的機能/活性の変化を観察することを含み得る。幾つかの実施態様では、「検出する」は野生型5又は5-1のレベル(例えば、mRNAもしくはポリペプチドのレベル)を検知することを含みうる。検出することは、コントロールと比較した際に、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、又はそれ以上の任意の値の変化(例えば、増加又は減少)を定量することを含みうる。検出することは、少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、又はそれ以上、例えば20倍、30倍、4-倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍又はそれ以上の任意の値の変化を定量することを含みうる。

#### 【0136】

ここで使用される場合、「標識」は抗体に直接的に又は間接的にコンジュゲートされる検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自体が検出可能である(例えば、放

放射性同位体又は蛍光標識)か、又は酵素標識の場合では、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒しうる。

【0137】

III. 抗 5 1 抗体

ヒト 5 1 に結合し、抗 5 1 18C12 抗体のヒト 5 1 への結合を競合的に阻害しうる抗体がここで提供される。従って、本発明の一実施態様は、配列番号：2、3、4、5、6、7又は8の何れか一に記載の可変軽鎖(VL)配列、及び配列番号：9、10、11、12、13、又は14の何れか一に記載の可変重鎖(VH)ドメインを含む抗体を提供する。ここに記載の抗 5 1 抗体のヒト又はキメラ(例えばヒト化を含む)形態の抗体もまた考慮される。

10

【0138】

一実施態様によれば、抗体は、500 nMから1 pMの間のKdでヒト 5 1 に結合する。ある実施態様では、ここで提供される抗体は、解離定数(Kd) 1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、又は0.001 nM(例えば、10<sup>-8</sup> M未満、例えば10<sup>-8</sup> M~10<sup>-13</sup> M、例えば10<sup>-9</sup> M~10<sup>-13</sup> M)を有する。他の実施態様によれば、抗体は V 3 又は V 5 又は V 1 に結合しない。別の実施態様によれば、抗体は例えばヒトIgG1又はヒトIgG4のようなヒトIgGのFc配列を含む。別の実施態様では、Fc配列は、それらのFcレセプター(FcR)への結合にしばしば関連する抗体依存性細胞傷害(ADCC)エフェクター機能を欠くように改変又は変化等される。エフェクター機能を変えることが可能なFc配列の変化又は変異の例は多い。例えば、国際公開第00/42072号及びShields等J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)は、FcRへの結合が改善又は減少した抗体変異体を記載している。その刊行物の内容はここで出典明示により特に援用される。抗体はFab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、単鎖Fv(scFv)、Fv断片;ダイアボディ及び線形抗体の形態でありうる。また、抗体は 5 1 に結合し、5 1 アンタゴニストであるが、また一又は複数の他の標的に結合しその機能(例えばVEGF)を阻害する多重特異性抗体、又は 5 1 上の2又はそれ以上の異なる部位に結合する多重特異性抗体でありうる。抗体は治療剤(例えば、細胞傷害剤、放射性同位体及び化学療法剤)又は患者の試料中又はイメージングを用いたインビボにおいて 5 1 を検知するための標識(例えば、放射性同位体、蛍光色素及び酵素)とコンジュゲートされうる。

20

30

【0139】

抗 5 1 抗体をコードする核酸分子、一方又は双方の可変ドメインをコードする核酸分子を含む発現ベクター、及び核酸分子を含む細胞も意図される。これらの抗体はここで記載される治療法において、また患者の試料(例えば、FACS、免疫組織化学(IHC)、ELISAアッセイ)又は患者中の 5 1 タンパク質を検出するために使用されうる。

【0140】

A. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、例えば、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法を使用して調製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができ、又はここで以下の実施例に記載された方法で作製することができる。ハイブリドーマ法では、ハムスター、マウス又はその他の適当な宿主動物を、典型的には免疫化剤を(例えば、5、1、又は5 1 ポリペプチドを単独で、又は適切な担体と組み合わせて)用いて免疫し、免疫化剤と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。

40

【0141】

免疫化剤は典型的にはポリペプチド又は関心あるタンパク質の融合タンパク質又は該タンパク質を含有する組成物を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細

50

胞又はリンパ節細胞が使用される。ついで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成せしめる。GODING, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York: Academic Press, 1986) pp. 59-103。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来のミエローマ細胞である。通常、ラット又はマウスのミエローマ細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は増殖を阻害する一又は複数の物質を含む適切な培地で培養されうる。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT又はHPRRT) を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプチリン及びチミジンを含み (「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

10

## 【0142】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウスミエローマ株であり、これは、例えば、カリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体産生ためにヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株も記載されている。Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur等, MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS (Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63。

20

## 【0143】

ついで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって又はラジオイムノアッセイ (RIA) や酵素結合免疫測定法 (ELISA) 等のインビトロ結合アッセイによって測定されうる。このような技術及びアッセイは、当該分野において知られている。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson及びPollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980) によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

## 【0144】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限定希釈手順によってサブクロニングし、標準的方法で増殖させる。上掲のGoding。この目的のために適切な培養培地は、例えば、ダルベッコの改良イーグル培地及びRPMI-1640培地を含む。別法では、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物中に腹水としてインビボで増殖させることができる。

30

## 【0145】

サブクロンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の一般的な免疫グロブリン精製法によって培養培地又は腹水液から単離され又は精製されうる。

## 【0146】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4816567号に記載された方法により産生せしめることができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる。これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成しないミエローマ細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより (

40

50

上掲の米国特許第4816567号；Morrison等）、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二重特異性抗体を生成する。

【0147】

抗体は一価抗体でありうる。一価抗体の調製方法は当該分野において知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

10

【0148】

一価抗体の調製にはまたインビトロ法が適している。その断片、特にFab断片を生産するための抗体の消化は、限定されるものではないが、当該分野において知られている技術を使用して達成することができる。

【0149】

B. ヒト抗体

ある実施態様では、ここで提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当該分野で知られている様々な技術を使用して産生せしめることができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk及びvan de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。

20

【0150】

ヒト抗体は、抗原投与に反応してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫源を投与することによって調製することができる。このような動物は、ヒト免疫グロブリン座位の全て又は一部を典型的には含み、内在性免疫グロブリン座位を置き換えるか、又は染色体外、又は動物の染色体内にランダムに組み込まれて存在する。このようなトランスジェニックマウスにおいて、内在性免疫グロブリン座位は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の概説は、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照のこと。また、XENOMOUSE<sup>TM</sup>技術を記載する米国特許第6075181号及び同6150584号；HUMAB（登録商標）技術を記載した米国特許第5770429号；K-MOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許第7041870号；VELOCIMOUSE（登録商標）を記載した米国特許出願公開第2007/0061900号を参照。このような動物により産生されるインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば異なるヒト定常領域と組合せることにより、更に修飾することができる。

30

【0151】

また、ヒト抗体は、ハイブリドーマベースの方法により作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエロマ及びマウス-ヒトヘテロミエロマ細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及びBoerner等, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)を参照）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して産生されるヒト抗体は、Li等, *PNAS. USA*, 103:3557-3562 (2006)にまた記載されている。付加的な方法には、例えば米国特許第7189826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の生産を記載）、及びNi, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載）に記載されている。また、ヒトハイブリドーマ技術（トリオマ技術）は、Vollmers及びBrandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)及びVollmers及びBrandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)にも記載されている。

40

【0152】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン

50

可変ドメイン配列を単離することにより産生せしめることもできる。ついで、このような可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組合せられうる。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を以下に記載する。

【0153】

C. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し、所望の結合特性を有する抗体について、このようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が当該分野で知られている。このような方法は、例えばHoogenboom等 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)において概説され、更に、例えばMcCafferty等, *Nature* 348:552-554 ; Clackson等, *Nature* 352: 624-628 (1991) ; Marks等, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) ; Marks及びBradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175(Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003) ; Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及びLee等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

10

【0154】

ある種のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により別々にクローニングされ、ファージライブラリーにおいてランダムに組換えられ、これがついで、Winter等, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されているように、抗原-結合クローンについてスクリーニングされうる。ファージは、典型的には、単鎖Fv(scFv)断片又はFab断片として、抗体断片をディスプレイする。免疫化されたソースからのライブラリーにより、ハイブリドーマを構築する必要なく、免疫原に対して高親和性の抗体が提供される。あるいは、天然レパートリーを、Griffiths等, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)に記載されているように、免疫化をすることなく、広範囲の非自己、更には自己抗原に対するヒト抗体の単一供給源を提供するために(例えばヒトから)クローニングすることができる。最後に、天然ライブラリーは、幹細胞から再配置されていないV-遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することで合成的に作製することができ、高頻度可変CDR3領域をコードし、Hoogenboom 及び Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)により記載されているような、再配置をインビトロで達成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許文献には、例えば米国特許第5750373号、及び米国特許出願第2005/0079574号、同2005/0119455号、同2005/0266000号、同2007/0117126号、同2007/0160598号、同2007/0237764号、同2007/0292936号、及び同2009/0002360号が含まれる。

20

30

【0155】

ヒト抗体ライブラリーから単離される抗体又は抗体断片は、ここでのヒト抗体又はヒト抗体断片と考えられる。

【0156】

D. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様では、ここで提供される抗体はキメラ抗体である。あるキメラ抗体は、例えば米国特許第4816567号；及びMorrison等, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例では、キメラ抗体は非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサル由来の可変領域)とヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体はクラス及びサブクラスが親抗体のものとは変化せられた「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体はその抗原結合断片を含む。

40

【0157】

ある種の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるた

50



めにヒト化される。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（又はその一部）が非ヒト抗体由来であり、FR（又はその一部）がヒト抗体配列由来である—又は複数の可変ドメインを含む。場合によっては、ヒト化抗体は、ヒト定常領域の少なくとも一部を含むであろう。幾つかの実施態様では、ヒト化抗体における幾つかのFR残基は、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が誘導される抗体）からの対応する残基で置換され、例えば抗体特異性又は親和性が回復又は改善される。

#### 【0158】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えばAlmagro 及び Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)に概説されており、更に例えば、Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988) ; Queen等, *PNAS USA* 86:10029-10033 (1989) ; 米国特許第 5 8 2 1 3 3 7 号、同 7 5 2 7 7 9 1 号、同 6 9 8 2 3 2 1 号、及び同 7 0 8 7 4 0 9 号 ; Kashmiri等, *Methods* 36:25-34 (2005) ( SDR ( a-CDR ) グラフトを記載 ) ; Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ( 「リサーフェシング(resurfacing)」を記載 ) ; Dall'Acqua等, *Methods* 36:43-60 (2005) ( 「FRシャッフリング」を記載 ) ; 及びOsbourn等, *Methods* 36:61-68 (2005) 及び Klimka等, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) ( FRシャッフリングに対する「案内選別(guided selection)」アプローチ法を記載 ) に記載されている。

10

#### 【0159】

ヒト化に使用されうるヒトフレームワーク領域には、限定されるものではないが、「ベストフィット法」を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims等 *J. Immunol.* 151:2296 (1993)を参照）；軽鎖又は重鎖可変ドメインの特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導されるフレームワーク領域（例えば、Carter等 *PNAS USA*, 89:4285 (1992)；及び Presta等 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)）；ヒト成熟（体細胞的に変異された）フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域（例えば、Almagro及びFransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照）；及びFRライブラリーのスクリーニング由来のフレームワーク領域（例えば、Baca等, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 及び Rosok等, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)を参照）が含まれる。

20

#### 【0160】

##### F. 多重特異性抗体

ある種の実施態様では、ここで提供される抗体は多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある種の実施態様では、結合特異性の一つは 5 1 に対してであり、他方は任意の他の抗原(例えば、VEGF)に対してである。ある種の実施態様では、二重特異性抗体は、5 1 の二つの異なるエピトープに結合しうる。また二重特異性抗体は 5 1 を発現する細胞に細胞傷害剤を局在化させるために使用することができる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片から調製することができる。

30

#### 【0161】

多重特異性抗体を作製するための技術には、限定されるものではないが、異なる特異性を有する二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え同時発現 (Milstein及びCuellar, *Nature* 305: 537 (1983)を参照)、国際公開第 9 3 / 0 8 8 2 9 号、及びTraunecker等, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)、及び「ノブ-イン-ホール」技術（例えば、米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号を参照）が含まれる。また、多重特異性抗体は、抗体ヘテロ二量体分子を作製するための静電気操縦効果の設計（国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 A 1 号）；2又はそれ以上の抗体又は断片の架橋（例えば、米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号、及びBrennan等, *Science*, 229: 81 (1985)を参照）；二重特性抗体の産生のためのロイシンジッパーの使用（例えば、Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)）；二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用（例えば、Hollinger等, *PNAS USA*, 90:6444-6448 (1993)を参照）；及び単鎖 Fv (s Fv) ダイマーの使用（例えば、Gruber等, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)を参照）；及びTutt等 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)に記載されているような三重特異性抗体の調製により、作製することができる。

40

50

## 【 0 1 6 2 】

「オクトパス抗体」を含む3又はそれ以上の機能的抗原結合部位を有する操作抗体もここに含まれる（例えば、米国特許第2006/0025576A1号を参照）。また、ここでの抗体又は断片は、5 1並びに他の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用Fab」又は「DAF」も含む（例えば、米国特許第2008/0069820号を参照）。

## 【 0 1 6 3 】

## F. 抗体変異体

ある実施態様では、ここに提供される抗体のアミノ酸配列変異体が考えられる。例えば、抗体の結合親和性及び/又は生物学的性質を改善させることが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入して、又はペプチド合成により調製されうる。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば抗原結合性を有している限り、欠失、挿入又は置換をどのように組合せて、最終コンストラクトに到達してもよい。

10

## 【 0 1 6 4 】

## 1. 置換、挿入、及び欠失変異体

ある実施態様では、一又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換的突然変異誘発に対して興味のある部位は、HVRs及びFRsを含む。保存的置換は、「保存的置換」の見出しで表1に示される。より実質的な置換は「例示的置換」の見出しで表1に提供され、更にアミノ酸側鎖クラスと関連して以下に更に記載する。アミノ酸置換を興味ある抗体中に導入し、所望の活性、例えば保持された/改善された抗原結合性、減少した免疫原性、又は改善されたADCC又はCDCについて生成物をスクリーニングすることができる。

20

表 1

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

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 5 】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

- ( 1 ) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- ( 2 ) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- ( 3 ) 酸性：Asp、Glu；
- ( 4 ) 塩基性：His、Lys、Arg；
- ( 5 ) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- ( 6 ) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

## 【 0 1 6 6 】

一タイプの置換変異体は、親抗体（例えばヒト化又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度

可変領域残基を置換することを含む。一般的に、更なる開発のために選択される、得られた変異体は、親抗体と比較して所定の生物学的性質（例えば増加した親和性、減少した免疫原性）における修飾（例えば改善）を有するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、これは、ここに記載されたもののようなファージディスプレイベースの親和性成熟技術を使用して簡便に産生せしめることができる。簡潔に言えば、一又は複数のHVR残基を突然変異させ、変異体抗体をファージにディスプレイさせ、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングする。

#### 【0167】

改変（例えば置換）は、例えば抗体親和性を改善するために、HVRsにおいてなされる。このような改変はHVR「ホットスポット」、つまり体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えばChowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照）、及び/又はSDRs（a-CDRs）においてなされる場合があり、得られる変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築しそれから再選択することによる親和性成熟は、例えばHoogenboom等 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等編, Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様では、様々な方法（例えばエラープライムPCR、鎖シャフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発）の何れかによって成熟のために選択された可変遺伝子中に多様性が導入される。ついで、二次抗体が作製される。ついで、ライブラリーがスクリーニングされ、所望の親和性を有する任意の抗体変異体が同定される。多様性を導入する他の方法は、幾つかのHVR残基（例えば一度に4-6残基）が無作為化されるHVR指向性アプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基が、例えばアラニンスキャン突然変異誘発又はモデリングを使用して、特に同定されうる。特にCDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的とされる。

#### 【0168】

ある実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、一又は複数のHVRs内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に減少させない保存的改変（例えばここで提供される保存的置換）をHVRsにおいてなすことができる。そのような改変はHVR「ホットスポット」又はSDRsの外側でありうる。上に提供された変異VH及びVL配列の所定の実施態様では、何れかの各HVRが改変されず、又は一、二又は三のアミノ酸置換を含む。

#### 【0169】

突然変異誘発に対して標的とされうる抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) *Science*, 244:1081-1085に記載されたような「アラニンスキャン突然変異誘発法」と呼ばれる。この方法では、残基又は標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、及びgluのような荷電残基）が同定され、中性の又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置換され、抗原との抗体の相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に、更なる置換が導入されうる。あるいは、又は加えて、抗体及び抗原間の接触点を同定するための抗原抗体複合体の結晶構造である。そのような接触残基及び隣接する残基を置換のための候補として標的化し又は削除することができる。変異体は、それらが所望の性質を含むかどうかを決定するためにスクリーニングしうる。

#### 【0170】

アミノ酸配列挿入は、長さが1残基から百以上の残基を含むポリペプチドまで及び、アミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合、並びに単一の又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させる酵素（例えばADEPT）又はポリペプチドへの抗体のN又はC末端の融合を含む。

#### 【0171】

### 2. グリコシル化変異体

ある実施態様では、ここで提供される抗体は、抗体がグリコシル化される度合いを増大

10

20

30

40

50

又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を、一又は複数のグリコシル化部位が作られ又は除去されるように改変させることによって、簡便に達成されうる。

【0172】

抗体がFc領域を含む場合、そこに結合される炭水化物が改変されうる。哺乳動物細胞により産生される天然抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297に対してN結合により一般的に結合する分枝状、二分岐のオリゴ糖を含む。例えば、Wright等 TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は様々な炭水化物、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸を含み得、並びにフコースが二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合される。幾つかの実施態様では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾が、ある種の改善された特性を有する抗体変異体を生じせしめるために、なされうる。

10

【0173】

一実施態様では、Fc領域に(直接又は間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、又は20%から40%でありうる。フコースの量は、例えば国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定して、Asn297(例えば複合のハイブリッド及び高マンノース構造)に結合した全ての糖構造の合計に対してAsn297の糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297はFc領域内の約297位(Fc領域のE番号付け)に位置したアスパラギン残基を意味する；しかしながら、Asn297は、抗体中のマイナーな配列変異のために、297位から約±3アミノ酸上流又は下流に、つまり294位と300位の間に位置している場合がありうる。そのようなフコシル化変異体は改善されたADCC機能を有しうる。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.)；米国特許出願公開第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照。「脱フコシル化された」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連した刊行物の例には、米国特許出願公開第2003/0157108号；国際公開第2000/61739号；国際公開第2001/29246号；米国特許出願公開第2003/0115614号；米国特許出願公開第2002/0164328号；米国特許出願公開第2004/0093621号；米国特許出願公開第2004/0132140号；米国特許出願公開第2004/0110704号；米国特許出願公開第2004/0110282号；米国特許出願公開第2004/0109865号；国際公開第2003/085119号；国際公開第2003/084570号；国際公開第2005/035586号；国際公開第2005/035778号；国際公開第2005/053742号；国際公開第2002/031140号；Okazaki等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004)；Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。脱フコシル化抗体を生産可能な細胞株の例には、タンパク質フコシル化に欠けているLec13CHO細胞(Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許出願公開第2003/0157108A1号, Presta, L；及び国際公開第2004/056312A1号, Adams等, 特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y等, Biotechnol. Bioeng. , 94(4):680-688 (2006)；及び国際公開第2003/085107号を参照)が含まれる。

20

30

40

【0174】

例えば抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcにより二分される二分岐オリゴ糖を有する抗体変異体が更に提供される。そのような抗体変異体は、フコシル化が低減され、及び/又はADCC機能が改善されている場合がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairet等)；米国特許第6602684号(Umana等)；及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umana等)

50

に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖に少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。このような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有している場合がある。このような抗体変異体は、例えば国際公開第1997/30087号(Patel等)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

#### 【0175】

### 3. Fc領域変異体

ある実施態様では、一又は複数のアミノ酸修飾が、例えば異常な血管新生及び/又は異常な血管透過性又は漏出に關与する疾患又は障害の治療における抗体の効能を、亢進するように、ここに提供される抗体のFc領域に導入し、それによりFc領域変異体を産生せしめてもよい。Fc領域変異体は、一又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含んでなるヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4Fc領域)を含みうる。

10

#### 【0176】

ある実施態様では、本発明は、幾つかであるが全てではないエフェクター機能を持つ抗体変異体を考察し、これは、抗体を、インビボでの抗体の半減期は重要であるが、あるエフェクター機能(例えば、補体及びADCC)は不要か又は有害である用途のために望ましい候補とする。CDC及び/又はADCC活性の減少/喪失を確認するために、インビトロ及び/又はインビボ細胞傷害性アッセイが実施されうる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠く(よってADCC活性を欠くと思われる)が、FcRn結合能力を保持していることを確かめるために実施されうる。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcI、FcII及びFcIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-492(1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するための非限定的なインビトロアッセイが米国特許第5500362号(例えばHellstrom, I.等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I.等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)；5,821,337 (Bruggemann, M.等, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照)に記載されている。別法では、非放射性アッセイ法が用いられ得る(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA；及びCytotox96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照)。このようなアッセイのために有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に記載されているような動物モデルにおいてインビボで評価されうる。C1q結合アッセイが、抗体がC1qに結合できず、よってCDC活性を欠くことを確認するためにまた実施されうる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施することができる(Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)；Cragg, M.S.等, Blood 101:1045-1052 (2003)；及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照)。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期定量も当該分野で知られている方法を使用して実施することがまたできる(例えば、Petkova, S.B.等, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照)。

20

30

40

#### 【0177】

減少したエフェクター機能を有する抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327及び329の一又は複数の置換を有するものを含む(米国特許第737056号)。このようなFc変異体は、二又はそれ以上のアミノ酸位265、269、270、297及び327に置換を有するFc変異体を含み、アラニンへの残基265及び297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7332581号)。

50

## 【0178】

FcRへの改良又は減少された結合を有するある種の抗体変異体が記載されている（例えば米国特許第6737056号；国際公開第2004/056312号、及びShields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照）。

## 【0179】

ある実施態様では、抗体変異体は、ADCCを改善する一又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334での置換(残基のEU番号付け)を有するFc領域を含む。

## 【0180】

幾つかの実施態様では、例えば米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に記載されているように、  
10 改変された(つまり、改善され又は減少した)Clq結合及び/又は補体依存性細胞傷害性(CDC)を生じる改変がFc領域に改変がなされる。

## 【0181】

Fc領域配列における変異又は改変を、FcR結合を改善するためになすことができる(例えばFcR, FcRn)。一実施態様によれば、本発明の抗体は、天然のIgG又は親抗体と比較して、ADCC、CDC及び改善したFcRn結合からなる群から選択される少なくとも一のエフェクター機能を変更している。幾つかの有用な特定の変異の例は、  
20 例えばShields, RL等 (2001) JBC 276(6)6591-6604; Presta, L.G., (2002) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490; 及び国際公開第00/42072号に記載されている。増加した半減期及び胎児への母性IgGsの移動に関する新生児Fcレセプター(FcRn)(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))への改善された結合性を有する抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934A1 (Hinton等)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する一又は複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の一又は複数での置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものを含む(米国特許第7371826号)。

## 【0182】

Fc領域変異体の他の例に関しては、Duncan及びWinter, Nature 322:738-40 (1988);  
30 米国特許第5648260号; 米国特許第5624821号; 及び国際公開第94/29351号も参照のこと。

## 【0183】

## 4. システイン操作抗体変異体

ある実施態様では、システイン操作抗体、例えば抗体の一又は複数の残基がシステイン残基で置換される「thioMAbs」を作ることが望ましいことがある。特定の実施態様では、置換される残基が抗体の接近可能な部位で生じる。これらの残基をシステインと置換することによって、反応性チオール基が抗体の接近可能な部位に位置させられ、抗体を他の部分、例えば薬剤部分又はリンカー薬剤部分に結合させ、ここで更に記載されるよう  
40 免疫コンジュゲートを作るために使用されうる。ある実施態様では、以下の残基の任意の一又は複数がシステインと置換されうる: 軽鎖のV205(カバット番号付け); 重鎖のA118(EU番号付け); 及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン操作抗体は、例えば米国特許第7521541号に記載されるようにして、産生されうる。

## 【0184】

ある実施態様では、Fc領域にシステイン残基を導入することができ、それによってこの領域での鎖間ジスルフィド結合形成が起こりうる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は改善された内部移行能及び/又は増強された補体媒介性細胞死滅化及び抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)及びS  
50

hopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照。抗腫瘍活性が亢進されたホモ二量体抗体もまたWolff等 Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製されうる。あるいは、抗体を二重のFc領域を持つように操作することができ、それによって亢進された補体溶解及びADCC能を有しうる。Stevenso n等 Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照のこと。

#### 【0185】

##### 5. 抗体誘導体

ある実施態様では、ここに提供される抗体は、当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、限定しないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利でありうる。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか等を含む、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

10

20

#### 【0186】

他の実施態様では、放射線への暴露によって選択的に加熱されうる非タンパク質様部分及び抗体のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質様部分はカーボンナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))。放射線は任意の波長のものであってよく、限定されるものではないが、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質様部分に近位の細胞が死滅させられる温度まで非タンパク質様部分を加熱する波長が含まれる。

30

#### 【0187】

##### 免疫コンジュゲート

本発明は、また、例えば化学療法剤又は薬物、増殖阻害剤、毒素(例えばタンパク質毒素、酵素的に活性な細菌、真菌、植物、又は動物由来の毒素、又はその断片)、又は放射性同位体のような一又は複数の細胞傷害性薬剤とここでコンジュゲートされた抗体を含む免疫コンジュゲートを提供する。

#### 【0188】

一実施態様では、免疫コンジュゲートは、限定しないが、メイタンシノイド(米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許第0425235B1号を参照)；アウリスタチン、例えばモノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5635483号及び同第5780588号及び同第7498298号を参照)；ドラスタチン；カリケアマイシン又はその誘導体(米国特許第5712374号、同第5714586号、同第5739116号、同第5767285号、同第5770701号、同第5770710号、同第5773001号、及び同第5877296号；Hinman等, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)；及びLode等, Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)を参照)；アントラサイクリン、例えばダウノマイシン又はドキソルピシン(Kratz等, Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey等, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov等, Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；N

40

50



agy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik等, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King等, J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); 及び米国特許第6630579号を参照); メトトレキセート; ビンデシン; タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル; トリコテシン及びCC1065を含む一又は複数の薬物に抗体がコンジュゲートされる抗体薬剤コンジュゲート(ADC)である。

#### 【0189】

他の実施態様では、免疫コンジュゲートは、限定しないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンチンタンパク質、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サバオナリア(*Sapaonaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテシンを含む酵素的に活性な毒素及びその断片にコンジュゲートされたここに記載の抗体を含む。

#### 【0190】

他の実施態様では、免疫コンジュゲートは放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートされたここに記載の抗体を含む。様々な放射性同位元素が放射性コンジュゲートの生産に利用できる。例には $A t^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 及びLuの放射性同位元素が含まれる。放射性コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば $tc99m$ 又は $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)画像法(磁気共鳴画像法、mriとしても知られている)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含みうる。

抗体と細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするための例示的キレート剤である。国際公開第94/11026号を参照のこと。リンカーは細胞中の細胞傷害剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」でありうる。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用されうる(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

#### 【0191】

ここでの免疫コンジュゲート又はADCsは、限定されないが、(例えば米国イリノイ州ロックフォードのPierce Biotechnology社より)市販されているBMPs、EMCS、GMBs、HBVs、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBs、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、

10

20

30

40

50

及びSVSB（スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート）を含む架橋試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に考慮する。

【0192】

H. 免疫リポソーム

ここに開示される抗体は免疫リポソームとして製剤化することもできる。抗体を含むリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したりポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

【0193】

特に有用なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、抗悪性腫瘍剤、増殖阻害剤、又は化学療法剤(ドキシソルビジンなど)がリポソーム内にまた包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照のこと。

【0194】

IV. 抗 5 1抗体を使用する治療方法

ここで提供される抗 5 1抗体の何れも治療方法において使用することができる。ここに記載された製剤又は治療方法の何れかにおいて抗 5 1抗体の代わりに又はそれに加えて本発明の免疫コンジュゲートが使用されることが理解される。

【0195】

一態様では、医薬として使用される抗 5 1抗体が提供される。更なる態様では、例えば、癌、眼疾患、及び免疫疾患(例えば、自己免疫疾患)を含む異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を含む疾患及び障害の治療に使用される抗 5 1抗体が提供される。ある実施態様では、治療方法に使用される抗 5 1抗体が提供される。ある実施態様では、本発明は、有効量の抗 5 1抗体を個体に投与することを含む、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を含む疾患又は障害を有する個体を治療する方法に使用される抗 5 1抗体を提供する。そのような一実施態様では、該方法は、例えばここに記載の抗血管新生剤、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、又は化学治療薬を含む少なくとも一、二、三、四、又はそれ以上の更なる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様では、本発明は、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を阻害するために使用される抗 5 1抗体を提供する。ある実施態様では、本発明は、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を阻害するために有効量の抗 5 1抗体を個体に投与することを含む、個体における異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を阻害する方法に使用するための抗 5 1抗体を提供する。上記実施態様の何れかに係る「個体」とは好ましくはヒトである。

【0196】

更なる態様では、本発明は、医薬の製造又は調製における抗 5 1抗体の使用を提供する。一実施態様では、医薬は、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出に關与する疾患又は障害の治療のためのものである。更なる実施態様では、医薬は、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出に關与する疾患又は障害を有する個体に有効量の医薬を投与することを含む異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出に關与する疾患又は障害を治療する方法に使用するためのものである。そのような一実施態様では、方法は、例えばここに記載の抗血管新生剤、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、又は化学治療薬を含む少なくとも一、二、三、四、又はそれ以上の更なる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様では、医薬は、異常血管新生及び/又は血管透過又は血管漏出を阻害するためのものである。更なる実施態様では、医薬は、異常血管新生及び/又は血管透過

10

20

30

40

50

又は血管漏出を阻害するために有効量の医薬を個体に投与することを含む、個体における異常血管新生及び／又は血管透過又は血管漏出を阻害する方法に使用するのためのものである。上記実施態様の何れかに係る「個体」とはヒトでありうる。

【0197】

更なる態様では、本発明は、異常血管新生及び／又は血管透過又は血管漏出に關与する疾患又は障害を治療する方法を提供する。一実施態様では、該方法は、異常血管新生及び／又は血管透過又は血管漏出に關与するような疾患又は障害を有する個体に有効量の抗 5 1 抗体を投与することを含む。そのような一実施態様では、該方法は、以下に記載のような、有効量の少なくとも一の更なる治療剤を個体に投与することを更に含む。上記実施態様に係る「個体」とはヒトでありうる。

10

【0198】

更なる態様では、本発明は、個体における異常血管新生及び／又は血管透過又は血管漏出を阻害する方法を提供する。一実施態様では、該方法は、異常血管新生及び／又は血管透過又は血管漏出を阻害するための有効量の抗 5 1 抗体を個体に投与することを含む。一実施態様では、「個体」はヒトである。

【0199】

更なる態様では、本発明は、例えば上記の治療方法の何れかに使用するための、ここで提供される抗 5 1 抗体の何れかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様では、薬学的製剤は、ここに提供される抗 5 1 抗体の何れかと薬学的に許容可能な担体含有する。他の実施態様では、薬学的製剤はここに提供される抗 5 1 抗体の何れかと例えばここに記載されるもののような少なくとも一の更なる治療剤含有する。

20

【0200】

ここに記載される併用療法は、併用投与（二、三、四又はそれ以上の治療剤が同じ又は別の製剤に含められる）及び別個の投与を包含し、後者では、本発明の抗体の投与が更なる治療剤及び／又はアジュバントの投与の前に、その投与と同時に、及び／又はその投与の後に生じうる。本発明の抗体はまた放射線療法と組み合わせて使用することができる。

【0201】

ある実施態様では、更なる治療剤は V E G F アンタゴニスト（例えば抗 V E G F 抗体、例えばペバシズマブ）である。幾つかの実施態様では、抗 5 1 抗体は V E G F アンタゴニストと組み合わせて投与される。抗 5 1 抗体及び更なる薬剤（例えば、V E G F アンタゴニスト）は同時に又は連続的に投与されうる。別法では、被験者は V E G F アンタゴニストを投与され、ついで 5 1 アンタゴニストを投与され得、例えば、被験者が V E G F アンタゴニスト治療に应答しなくなるまで V E G F アンタゴニストで処置し、ついで被験者を 5 1 アンタゴニストで処置する。一実施態様によれば、癌が非浸潤性の場合、被験者は V E G F アンタゴニストで治療され、ついで癌が浸潤性の場合、5 1 アンタゴニストで治療される。非疾患患者又はコントロールと比較して、自然に 5 1 レベルが上昇し、又は V E G F アンタゴニスト治療に应答するある患者は、特にこの併用療法に应答性でありうる。治療剤（例えば、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害剤）を更に含む組み合わせが考えられる。例えば、化学治療（例えば、イリノテカン）及び 5 1 アンタゴニストで治療されることになるか、又は化学治療及び 5 1 アンタゴニストで治療されている患者は V E G F アンタゴニスト治療の恩恵を受けうる。別法では、化学治療及び V E G F アンタゴニストで治療されている患者は 5 1 アンタゴニスト治療の恩恵を受けうる。一実施態様では、抗 V E G F 抗体はペバシズマブである。別の実施態様では、抗 5 1 抗体はここに記載される抗 5 1 抗体である。

30

40

【0202】

本発明の抗体（及び任意の更なる治療剤）は、非経口、腹腔内、及び鼻腔内、及び局所治療が望まれるならば、病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与されうる。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投薬は、任意の適切な経路、例えば投与が短期か慢性であるかどうかにより部分的に依存して、静脈内又は皮下注

50

射のような注射によるものとできる。限定しないが、単一又は様々な時点にわたる複数回の投与、ポラス投与、及びパルス注入を含む様々な投薬スケジュールがここで考えられる。

#### 【0203】

本発明の抗体は、良好な医療実務に一致した形で製剤化され、用量決定され、投与される。この文脈で考慮される因子は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤のデリバリー部位、投与の方法、投与のスケジュールリング、及び医師に知られている他の因子を含む。抗体は、必要ではないが、場合によっては、問題の疾患を予防し又は治療するために現在使用されている一又は複数の薬剤と共に製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは一般にここに記載のものと同じ投薬量及び投与経路で、あるいはここに記載された投薬量の約1から99%で、あるいは経験的/臨床的に適切であると判定される任意の投薬量及び任意の経路で、使用される。

10

#### 【0204】

疾患の予防又は治療に対して、本発明の抗体の適切な投薬量（単独で又は一又は複数の他の更なる治療剤と組み合わせて使用される場合）は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重篤度及び経過、抗体が予防目的か又は治療目的で投与されるかどうか、過去の治療法、患者の臨床履歴及び抗体に対する応答、及び主治医の裁量に依存する。抗体は一度に又は一連の治療にわたって患者に適切に投与される。疾患のタイプ及び重篤度に応じて、約1 µg / kg から15 mg / kg（例えば、0.1 mg / kg - 10 mg / kg）の抗体が、例えば一又は複数の別個の投与であれ、又は連続的注入によるものであれ、患者への投与に対する最初の候補投薬量でありうる。典型的な毎日の一投薬量は、上述の因子に依存して、約1 µg / kg から100 mg / kg 又はそれ以上の範囲であるかも知れない。数日又はそれ以上にわたる繰り返し投与の場合、症状に応じて、治療は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで一般に維持されるであろう。抗体の例示的な一投薬量は、約0.05 mg / kg から約10 mg / kg の範囲でありうる。よって、約0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg 又は10 mg / kg（又はその任意の組合せ）の一又は複数の用量が患者に投与されうる。そのような用量は、間欠的に、例えば毎週又は3週毎に（例えば患者が約2から約20、又は例えば約6の用量の抗体を受けるとして）投与されうる。ある実施態様では、最初の高い負荷用量と続く一又は複数の低用量を投与することができる。初期の高負荷用量と、続く一又は複数の低用量を投与することができる。しかしながら、他の投薬計画も有用な場合がある。この治療法の進行は一般的な技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

20

30

#### 【0205】

治療される適応症及び当該分野の医師が熟知している投薬に関連した因子に依存して、本発明の抗体は、毒性と副作用を最小にししながら、その適応症の治療に効果的な投与量で投与される。

#### 【0206】

癌治療は、例えば、限定されるものではないが、腫瘍の縮退、癌の重量又は大きさの縮退、無増悪期間、生存期間、無増悪生存期間、奏功率、奏功期間、生活の質、タンパク質発現及び/又は活性で評価されうる。ここに記載の抗血管新生剤は腫瘍血管を標的とし、必ずしも腫瘍細胞自体を標的としていないため、それらは独特のクラスの抗癌剤であり、従って、薬剤に対する臨床的応答の独特の尺度及び定義を必要としうる。例えば、2次元解析において50%より大きい腫瘍の縮退は、応答を断定するための標準的なカットオフである。しかしながら、本発明の5-αアンタゴニスト及びVEGFアンタゴニストは、原発腫瘍が縮退せずに、転移の拡がりを阻害せしめうるか、又は単に腫瘍抑制効果を発揮しうる。従って、例えば、血管新生の血漿又は尿マーカーの測定及び放射線イメージングの応答の測定を含む、治療の効果を決定するアプローチ法が採用されうる。

40

#### 【0207】

50

加齢黄斑変性 (AMD) の治療評価は、限定されるものではないが、更なる視力の喪失の速度低下又は更なる視力の抑制を含む。AMD の治療では、インビボの効能は、例えば、以下の一又は複数により測定され得る：所望の時間での、ベースラインから最高矯正視力 (BCVA) までの平均変化の評価、ベースラインと比較して、所望の時間で 15 文字より少ない視力の喪失する患者の割合を評価し、ベースラインと比較して、所望の時間で 15 文字以上の視力を獲得する患者の割合を評価し、所望の時間で、スネレン等価視力が 20 / 2000 又はより低い患者の割合を評価し、NEI 視力機能アンケートを評価し、所望の時点における CNV の大きさ及び CNV の漏出量を、蛍光眼底観察法で評価する等。

【0208】

V. 薬学的製剤

抗 5 1 抗体は、投与に適切になるように、適切な担体又は賦形剤を用いて製剤化されうる。抗体の適切な製剤は、所望の純度を持つ抗体を、任意成分の薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences 16 版, Osol, A. 編 (1980))、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態に調製される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる投薬量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料 (例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾール)；低分子量 (約 10 残基未満) のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA 等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び / 又は TWEEN (商標)、PLURONICS (商標) 又はポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤を含む。典型的な抗体製剤は、出典明示によりここに援用される国際公開第 98 / 56418 号に記載される。ここでの例示的な薬学的に許容可能な担体は、間質内薬剤分散剤、例えば可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (SHASEGP)、例えばヒト可溶性 PH-20 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば rHuPH20 (HYLENEX (登録商標), Baxter International, Inc.) を更に含む。rHuPH20 を含むある種の例示的 SHASEGPs 及び使用方法は米国特許出願公開第 2005 / 0260186 号及び第 2006 / 0104968 号に記載されている。一態様では、SHASEGP は、コンドロイチナーゼのような一又は複数の更なるグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。皮下投与に適合化された凍結乾燥製剤は国際公報 97 / 04801 に記載されている。そのような凍結乾燥製剤は適当な希釈剤で高いタンパク質濃度に再構成され得、再構成された製剤はここで治療される哺乳動物に皮下的に投与されうる。

【0209】

また、ここでの製剤は治療を治療される特定の適応症に必要な一を越える活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものを含みうる。例えば、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、及び / 又は化学療法剤を更に提供することが望ましい場合がある。このような分子は意図された目的のために有効な量で組合わせて適切に存在する。このような他剤の有効量は製剤中に存在する抗体量、疾患又は障害又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは一般に同じ投薬量及びここに記載された投与経路又はこれまで用いられている用量のおよそ 1 から 99 % 量で用いられる。

【0210】

活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロ

10

20

30

40

50

カプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタアシレート）マイクロカプセルに封入されうる。このような技術は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編 (1980)に開示されている。

【0211】

徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の好適な例は、アンタゴニストを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフィア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。

10

【0212】

リポフェクション又はリポソームを使用して、細胞中に本発明のポリペプチド及び抗体、又は組成物を送達することができる。抗体断片が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは化学的に合成し、及び/又は組換えDNA技術により生産することができる。Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893 (1993)を参照のこと。

20

【0213】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、上掲のRemington's PHARMACEUTICAL SCIENCESに開示されている。

30

【0214】

徐放性調製物を調製することもできる。徐放性調製物の好適な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフィア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に亘って放出することができるが、ある種のヒ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身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の使用、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

40

【0215】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは滅菌フィルター膜を

50

通して濾過することによって直ぐに達成される。

【0216】

VI. 抗 5 1 抗体を使用する診断及びイメージングの方法

5 1 ポリペプチドに特異的に結合する

標識された抗 5 1 抗体、及びその誘導体及びアナログは、5 1 の発現、異常な発現及び/又は活性に関する疾患及び/又は疾病を診断又はモニターするために使用することができる。例えば、本発明の抗 5 1 抗体は、インサイト、インピボ、エクスピボ、及びインピトロ診断アッセイ又はイメージングアッセイに使用することができる。

【0217】

5 1 ポリペプチドの発現を検出する方法は、(a) 本発明の一又は複数の抗体を用いて、個体の細胞(例えば、組織)又は体液中におけるポリペプチドの発現をアッセイし、(b) 標準の遺伝子発現レベルと遺伝子発現のレベルを比較することを含み、これによって標準の発現レベルと比較してアッセイした遺伝子の発現が増加しているか減少しているかが異常な発現を示している。

10

【0218】

本発明の更なる実施態様は動物中(例えば、ヒトのような哺乳動物)における 5 1 の発現又は異常な発現に関連する疾患又は障害を診断する方法を含む。該方法は、哺乳動物中の 5 1 分子の検出を含む。一実施態様では、VEGFアンタゴニストを投与後、診断は、(a) 標識した抗 5 1 抗体の哺乳動物への有効量の投与(b) 5 1 分子が発現される被検体内の部位に標識した 5 1 抗体が優先的に濃縮するように(また、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルにまで除去されるように)、投与後一定期間をおくこと;(c) バックグラウンドレベルを測定すること;及び(d) 被検体内の標識した分子を検出することを含み、バックグラウンドレベル以上に標識した分子が検出されれば、該被検体が 5 1 の発現ないし異常発現に関する特定の疾患ないし疾病を有することが示される。バックグラウンドレベルは、様々な方法、例えば特定のシステムについて既に測定された標準値と検出された標識分子との量を比較することによって決定することができる。

20

【0219】

本発明の 5 1 抗体を、当業者に知られている古典的な免疫組織学的方法を用いて生体試料中のタンパク質のレベルをアッセイするために用いることができる(例えば、Jalkanen, 等, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, 等, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)を参照)。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体ベースの方法には、イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫測定法(ELISA)及び放射性免疫測定法(RIA)が含まれる。好適な抗体アッセイ標識は当該分野で知られており、酵素標識、例えばグルコースオキシダーゼ;放射性同位体、例えばヨウ素( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、炭素( $^{14}\text{C}$ )、イオウ( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム( $^3\text{H}$ )、インジウム( $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、及びテクネチウム( $^{99\text{Tc}}$ 、 $^{99\text{mTc}}$ )、タリウム( $^{201}\text{Tl}$ )、ガリウム( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ ;ルミノール;及び蛍光標識、例えばフルオレセイン、ローダミン及びピオチンが含まれる。

30

40

【0220】

当該分野で知られている技術は、本発明の標識された抗体に適用することができる。このような技術には、限定するものではないが、二官能性コンジュゲート剤の使用が含まれる(例えば、米国特許第5756065号;同第5714631号;同第5696239号;同第5652361号;同第5505931号;同第5489425号;同第5435990号;同第5428139号;同第5342604号;同第5274119号;同第4994560号;及び同第5808003号を参照)。

50

## 【0221】

特定の一実施態様では、5 1 ポリペプチド発現又は過剰発現は、VEGF アンタゴニスト治療薬を投与後に細胞の表面上に存在する 5 1 のレベルを評価することにより診断又は予後アッセイにおいて決定される（例えば、抗 5 1 抗体を使用する免疫組織アッセイを介して）。あるいは又は加えて、例えば、5 1 をコードした核酸又はその相補鎖に対応する核酸ベースのプロブを使用した蛍光インサイツハイブリダイゼーション法；（FISH；1998年10月公開の国際公開第98/45479号を参照）、サザンブロット法、ノーザンブロット法、又は実時間定量PCR（RT-PCR）等のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術により、細胞内の 5 1 ポリペプチドコード化核酸又は mRNA のレベルを測定することができる。また、例えば抗体ベースのアッセイ（例えば、1990年6月12日発行の米国特許第4933294号、1991年4月18日公開の国際公開第91/05264号、1995年3月28日発行の米国特許5401638号、及びSias等、J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)を参照）を使用して、血清等の生物学的流体中に流れる抗原を測定することにより、5 1 の過剰発現を研究することができる。上記アッセイ以外にも、当業者であれば様々なインビボ及びエクスピボアッセイが利用できる。例えば、哺乳動物の体内の細胞を、放射性同位元素等の検出可能なラベルで場合によっては標識される抗体に曝すことができ、例えば外側から放射能をスキャンしたり、又は事前に抗体に曝された哺乳動物から採取した試料（例えば、生検又は他の生物学的試料）を分析することで、抗体の結合を評価することができる。

10

20

## 【0222】

## V I I . 製造品及びキット

本発明の別の実施態様では、癌治療（例えば、腫瘍）、眼疾患（例えば、滲出性AMD）又は自己免疫疾患及び関連の症状の治療に有用な物質を含む製造品である。該製造品は、容器及び容器の上に又は容器に付属してラベル又はパッケージ挿入物を含みうる。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ等が含まれる。容器はガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成されうる。一般的に、容器は該症状の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有しうる（例えば、容器は、静脈注射用溶液のバッグ又は皮下注射針で穿孔可能なストッパを有するバイアルでありうる）。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明のVEGF アンタゴニスト又は 5 1 アンタゴニスト又はアゴニスト又は 5 1 アゴニストである。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が対象の特定の症状を治療するために使用されること示す。ラベル又はパッケージ挿入物は、抗体組成物を患者に投与するための指示書を更に含む。ここに記載される併用療法を含む製造品及びキットもまた考えられる。

30

## 【0223】

パッケージ挿入物は、治療用製品の商業パッケージに慣例的に含まれる指示書を意味し、そのような治療用製品の使用に関する適応症、用法、用量、投与方法、禁忌、及び/又は警告を含む。

## 【0224】

加えて、製造品は薬学的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びはデキストロス溶液を含む第二の容器を更に含みうる。それは更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む商業的及び使用者の視点から望ましいその他の材料を含みうる。

40

## 【0225】

例えば、場合によっては製造品と組み合わせることにより、患者中の 5 1 及び/又はVEGFの単離又は検知のような、様々な目的のために有用なキットがまた提供される。5 1 の単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）と連結させた抗 5 1 抗体を含みうる。5 1 及び/又はVEGFを、例えば、ELISA又はウェスタンブロットで、インビトロで定量又は検知するための抗体を含むキットが提供されうる。製造品と同様に、キットは容器と容器の上に又は付随してラベル又はパッケージ挿入物を含む。例えば、容器は少なくとも一の本発明の抗 5 1 抗体を含む

50



組成物を収容する。例えば、希釈剤及びバッファー、コントロール抗体を含む更なる容器が含まれうる。ラベル又はパッケージ挿入物は組成物の処方並びにインビトロ又は診断用途を意図した使用法を提供しうる。

#### 【0226】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC受託番号により次の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、VAである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下のテキストに記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いている：上掲のSambrook等；Ausubel等，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989)；Innis等，PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990)；Harlow等，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988)；Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (IRL Press: Oxford, 1984)；Freshney, ANIMAL CELL CULTURE, 1987；Coligan等，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1991。

10

#### 【実施例】

#### 【0227】

次の実施例は請求項記載の発明を例証するものであって、限定するものではない。当業者であれば、本質的に同じ結果を生じせしめるために変更又は修正することができる様々な非臨床パラメータが直ぐに分かるであろう。

20

#### 【0228】

##### 実施例1：材料と方法

##### A．バイアコア分析：

ここに記載した抗体の結合動態及び親和性を決定するために、BIAcore™-3000機器を用いた表面プラスモン共鳴(SRP)測定を使用した。抗体を、およそ150RU(応答単位)を達成するために異なったフローセル上に前もって固定化したウサギ抗ヒトFcCM5バイオセンサーチップによって最初に捕捉した。動態測定のために、2倍段階希釈したヒトインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ (300nMから1.2nM)を、25、30 $\mu$ l/分の流量でPBTバッファー(0.05%Tween20を含むPBS)に注入した。単純な一対一ラングミュア結合モデル(BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出した。平衡解離定数( $K_D$ )を $k_{off}/k_{on}$ 比として算出した。

30

#### 【0229】

##### B．U937細胞でのフィブロネクチン結合アッセイ

PBS(pH7.4)に希釈した100 $\mu$ lの10 $\mu$ g/mlのフィブロネクチン(R&D Systems)を、96ウェルプレート(Nucn MaxiSorp)のウェルに添加し、2-8で一晚インキュベートした。プレートを200 $\mu$ LのPBS(pH7.4)で3回洗浄した。200 $\mu$ LのPBS(pH7.4)/1%BSAを全てのウェルに添加し、プレートを穏やかに攪拌しながら室温で少なくとも60分インキュベートした。プレートを200 $\mu$ LのPBS pH7.4で3回洗浄した。

40

#### 【0230】

50 $\mu$ lの希釈した抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体を各ウェルに加え(10 $\mu$ g/mlの段階希釈1:3を10回)、直ぐ後に50 $\mu$ lのU937細胞(ATCC, Cat#CRL-1593.2)を、アッセイ培地(RPMI1640(Media Prep A0806), 5mg/mlBSA, 1mML-グルタミン, 1mMMgCl<sub>2</sub>)中 $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で加えた。

#### 【0231】

プレートを37で30分インキュベートし、未結合細胞を破棄し、プレートを150 $\mu$ Lのアッセイ培地で2回洗浄した。100 $\mu$ Lのアッセイ培地と100 $\mu$ LのCell-TiterGlow(Promegaカタログ#G7573)を各ウェルに加えた。プ

50

レート室温で10 - 15分インキュベートし、カバーした。発光をVICTOR<sup>2</sup>V (Perkin-Elmer)プレートリーダーで検出し、非線形最小自乗フィッティング法を使用して、アッセイで使用した抗体に対して発光単位を解析してIC<sub>50</sub>値を得た。

#### 【0232】

##### C. 5-1でのフィブロネクチン結合アッセイ

PBSに希釈した25 µlの1 µg/mlのフィブロネクチン(R&D Systems)を384ウェルプレート(Nucn MaxiSorp)のウェルに添加し、2 - 8 で一晩インキュベートした。プレートを80 µLのPBTバッファーで3回洗浄した。50 µLのPBS / 1%BSAを全てのウェルに添加し、プレートを穏やかに攪拌しながら室温で少なくとも60分インキュベートし、ついで80 µLのPBTバッファーで3回洗浄した。

10

#### 【0233】

抗5-1抗体(30 µg/mL)を1:3で11回、段階希釈した。50 µLの段階希釈した抗5-1抗体を0.65 mLのマイクロチューブに加え、穏やかに攪拌しながら室温で60分、ELISAバッファー(150 mMのNaCl, 10 mMのトリス, pH 7.5, 5 mg/mLのBSA, 1 mMのMnCl<sub>2</sub>)中50 µLの200 ng/mLの5-1(R&D Systems)と共にプレミックス(1:1)した。25 µLのプレミックスした5-1及び抗5-1抗体を、フィブロネクチン被覆ウェルに加え、プレートを穏やかに攪拌しながら室温で60分インキュベートした。プレートをPBTバッファーで6回洗浄し、ELISAバッファー中100 ng/mLの抗1-ビオチンを各ウェルに加え、プレートを穏やかに攪拌しながら室温で60分インキュベートした。プレートを80 µLのPBTバッファーで6回洗浄し、25 µLのストレプトアビジン-HRP(ELISAバッファー中1:50000, GE Healthcare)を各ウェルに加え、プレートを穏やかに攪拌しながら室温で60分インキュベートした。プレートを80 µLのPBTバッファーで6回洗浄し、25 µLのTMB基質(Kirkgaard and Perry Laboratories)を各ウェルに加え、プレートを室温で約6分インキュベートし、反応を、25 µLの1 Mのリン酸で停止させた。吸光度を450 nmで読み取り、IC<sub>50</sub>値を、上のセクションBに記載したようにして分析した。

20

#### 【0234】

##### D. HUVEC遊走アッセイ

HUVEC細胞を標準培地中で80%の培養密度になるまで増殖させた。該細胞をトリプシン処理し、計数し、0.1%のBSAを含むEBM-2培地に5 × 10<sup>5</sup>細胞/mLの濃度で再懸濁させた。アッセイでは、BD Falcon HTSマルチウェルシステム24ウェル(BD参照番号: 351185, 孔径8 µm)中にウェル当たり100 µLの細胞(5 × 10<sup>4</sup>細胞/ウェル)を播種した。該HTSプレートに一晩かけてフィブロネクチン(1 - 2 µg/mL)を予め被覆した。プレートをPBSで洗浄し、500 µL(0.1%BSAを含むEBM)溶液を底部チャンバーに加えた。各試料に対して、3 - 6ウェルを使用した。遊走刺激物(例えばVEGF)はネガティブコントロールのウェルには加えなかった。

30

#### 【0235】

アッセイを開始するために、100 µLの細胞(5 × 10<sup>4</sup>細胞/ウェル)を上部チャンバーに加えた。下部チャンバーは500 µLの培地(0.1%BSAを含むEBM)を含んでいた。抗インテグリン5-1抗体及びアイソタイプコントロールを、0 µg/mL、1 µg/mL又は5 µg/mLの最終濃度で細胞を含む上部チャンバーに一般に加え、15分インキュベートした後、遊走刺激物(VEGF)を下部チャンバーに加えた。

40

#### 【0236】

刺激物を下部チャンバー(10 ng/mL VEGF-A)に加え、プレートを4 - 6時間又は一晩インキュベートした。細胞を、スポンジスワブを使用して上部チャンバーから掻き取り、PBSを添加した後、上部チャンバーから細胞を再び掻き取った。培地を下部チャンバーから排出させ、細胞を、500 µLの100%メタノールを用いて5分間固定

50

させた。

【0237】

ついで、細胞を、500 $\mu$ lのSYTOX（登録商標）Green核酸染色（PBS中1：5000又は1：10000希釈）（Molecular Probes S7020）を用いて少なくとも10分（暗所にて）染色した。ついで、顕微鏡を使用して各ウェルの個々の写真を撮った。写真はAxioVision ACプログラム及び5 $\times$ 対物を使用して撮った。

【0238】

Image Jを使用して結果を分析した（最小5ピクセル、二値5）。ウェル当たりの細胞数を記録しマイクロソフトのエクセルを使用して解析した。

10

【0239】

実施例2：抗 5 1抗体の産生

抗 5 1抗体を、組換えヒト 5 1細胞外ドメインポリペプチドを用いてハムスターを免疫することによって産生した。図1及び2に記載されたVH及びVL配列を含むハムスターモノクローナル抗体18C12を選択した。

【0240】

キメラハムスター18C12の二つの型 h18C12.v1.1及びh18C12.v2.1を、ハムスター18C12からの軽鎖をCDR-H3接触領域においてのみ異なる二つのコンセンサスVL<sub>kappa</sub>1/VH<sub>I I I</sub>フレームワーク：h18C12.v1.1及びh18C12.v2.1中にクローニングすることによって産生せしめた。すなわち、h18C12.v1.1のCDR-H3接触領域は次の残基：C<sup>92</sup>A<sup>93</sup>R<sup>94</sup>を含み、h18C12.v2.1のCDR-H3接触領域は次の残基：cC<sup>92</sup>T<sup>93</sup>S<sup>94</sup>を含む。h18C12.v1.1及びh18C12.v2.1双方がFabフォーマットのファージに成功裏にディスプレイされ、結合をファージ競合ELISAによって観察した。結合における有意差はh18C12.v1.1とh18C12.v2.1の間では観察されなかった。h18C12.v1.1を更なるヒト化のために選択した。ヒト化18C12.v3は、軽鎖中の次の残基：Y36、A43、及びY49を除いて、h18C12.v1.1の軽鎖フレームワークの殆どをヒトコンセンサスIVフレームワークと交換することによって産生させた。また、ヒトVH<sub>I I I</sub>フレームワーク中の次の残基：G49及びD73を保持した。

20

30

【0241】

h18C12.v3を親和性成熟させ、次のクローンを産生せしめた：h18C12.v6；h18C12.v7；h18C12.v9；h18C12.v15；h18C12.v16；h18C12.v28；h18C12.v30；h18C12.v51；h18C12.v54；h18C12.v70；h18C12.v78。各クローンCDR配列は図3に記載する。h18C12.v6クローンのCDR配列を次のように修飾した：CDR-L2：D50cS及びD56S；CDR-H1：N31A；及びCDR-H2：N53A。修飾されたCDR配列をついで修飾されたヒトIII/VHIIIフレームワーク中に挿入し、h18C12.v6.1Lam3（h18C12.v6.1）及びh18C12.v6.2Lam3（h18C12.v6.2）を産生せしめた。h18C12.v6.1に対する修飾されたヒトIIIフレームワークは次の修飾を含んでいた：L46Y；V47L；I48M；N69A；A71R；及びG77N。h18C12.v6.2に対する修飾されたヒトIIIフレームワークは次の修飾を含んでいた：N69A；A71R；及びG77N。修飾されたVHIIIフレームワークは次の修飾を含んでいた：S49G及びN73D。

40

【0242】

クローンh18C12.v6.1を更に修飾してCDR-L2中のアスパラギン（N）を除去した（N<sup>50a</sup>S<sup>50b</sup>S<sup>50c</sup>G<sup>50d</sup>）。次のクローンを産生せしめた：h18C12.v6.1.1；h18C12.v6.1.2；h18C12.v6.1.3；h18C12.v6.1.4；及びh18C12.v6.1.5。各h18C12.v6

50

． 1 クローンの 50 a、50 b、50 c、及び 50 d 位の CDR - L2 配列を図 7 に記載する。

#### 【0243】

##### 実施例 3：ファージ競合 ELISA

MAXISORPT<sup>TM</sup> マイクロタイタープレートに一晩かけて PBS 中 5 µg/ml の組換えヒトインテグリン 5<sub>1</sub> (R&D) を被覆し、ついで室温で 1 時間、PBST バッファー (PBS 中 0.5% BSA 及び 0.05% Tween 20) でブロックした。培養上清からのファージを、組織培養マイクロタイタープレート中において 1 時間、PBST バッファー中の段階希釈したヒトインテグリン 5<sub>1</sub> と共にインキュベートし、その後、80 µl の混合物を 15 分間、標的被覆ウェルに移し、未結合ファージを捕捉した。プレートを PBST バッファー (PBS 中 0.05% Tween 20) で洗浄し、HRP コンジュゲート抗 - M13 (Amersham Pharmacia Biotech) を 40 分かけて (PBST バッファー中 1:5000 で) 加えた。プレートを PBST バッファーで洗浄し、テトラメチルベンジジン基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を加えることによって反応させた。450 nm での吸光度を溶液中の標的濃度の関数としてプロットし、ファージ IC<sub>50</sub> を決定した。これを、ファージの表面にディスプレイされた Fab クローンに対する親和性推定値として使用した。図 4 は、親和性成熟 18C12 変異体 h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; 及び h18C12.v78 のヒト 5<sub>1</sub> インテグリンに対する結合性を証明するファージ競合アッセイからの結果を示している。

10

20

#### 【0244】

##### 実施例 4：バイアコアによる抗体親和性の定量

キメラ 18C12、h18C12.v6.1、h18C12.v6.1.1、h18C12.v6.1.2、h18C12.v6.1.3、h18C12.v6.1.4、h18C12.v6.1.5 IgGs の結合動態及び親和性を決定するために、実施例 1 に記載したように、BIAcore<sup>TM</sup> - 3000 機器を用いた表面プラスモン共鳴 (SRP) 測定を使用した。

30

#### 【0245】

図 5 は、ヒト 5<sub>1</sub> インテグリンに対する親和性成熟 18C12 変異体の結合の BIAcore 分析の結果を示す。図 6 は、ヒト 5<sub>1</sub> インテグリンに対する図 1 に記載されたハムスター VL 及び VH 配列を含むキメラ 18C12 (図 1 に記載された配列と IgG1 の Fc 部分を含む 18C12) 及び h18C12.v6.1 の結合の BIAcore 分析の結果を示す。該データは、ヒト 5<sub>1</sub> インテグリンに対するハムスター 18C12 の結合親和性よりもおよそ 2 倍高いヒト 5<sub>1</sub> インテグリンに対する結合親和性を有していることを証明している。図 7 は各 h18C12.v6.1 クローンに対する BIAcore 分析の結果を示す。

40

#### 【0246】

##### 実施例 5：18C12 抗体はフィブロネクチンへの結合を阻害する

フィブロネクチンへの結合に対するキメラ 18C12 及び h18C12.v6.1 又は h18C12.v6.1.5 IgGs の効果を比較するために、実施例 1 に記載されたフィブロネクチン結合アッセイを使用した。

#### 【0247】

図 8 は、フィブロネクチンに対する U937 細胞の結合を妨害するキメラ 18C12 及び h18C12.v6.1 の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。図 9 は、フィブロネクチンに対する U937 細胞の結合を妨害するハムスター 18C12 及び h18C12.v6.1.5 の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。図 10 は、フィブロネクチンに対する組換え 5<sub>1</sub> 細胞外ドメインの結合を

50

妨害するハムスター 18C12 及び h18C12.v6.1.5 の能力を比較するフィブロネクチン結合アッセイの結果を示す。データは、ハムスター 18C12、キメラ 18C12、h18C12.v6.1、及び h18C12.v6.1.5 がフィブロネクチンに対する U937 細胞又は組換え 5 1 細胞外ドメインの結合を阻害することを証明している。

【0248】

実施例 6：18C12 抗体は HUVEC 遊走を阻害する

HUVEC 細胞の遊走に対するキメラ 18C12 及び h18C12.v6.1 IgGs の効果を比較するために、上の実施例 1 に記載された HUVEC 遊走アッセイを使用した。

【0249】

図 11 は、フィブロネクチンに対する HUVEC 細胞の遊走を妨害するキメラ 18C12 及び h18C12.v6.1 の能力を比較する HUVEC 遊走アッセイの結果を示す。データは、キメラ 18C12 及び h18C12.v6.1 がフィブロネクチンに対する HUVEC 細胞の遊走を阻害することを証明している。

【0250】

実施例 7：胚発生アッセイ

キメラ 5 1 インテグリン (ヒト 5 及びマウス 1) を発現する 5 トランスジェニックマウスを胚発生アッセイにおいて使用して、ここに記載の 18C12 抗体の効能を証明した。ヒト 5 を発現しマウス 5 を発現しない雄のトランスジェニックマウスを、ヒト 5 を発現せずマウス 5 に対してヘテロ接合性の雌のマウスに交配した。妊娠したマウスに、性交後 9.5 日に開始して 2x/週で 10mg/kg の抗 5 1 抗体 (h18C12.v6.1.5) 又はネガティブコントロール抗体を腹腔内注射した。性交後 14.5 日目に、胚を集め、遺伝子型を同定し、胚脈管構造評価した。結果を以下の表にまとめる。

処置	インテグリン $\alpha 5$ 発現	血管発生
h18C12.v6.1.5	ヒト $\alpha 5$ のみ	出血、発達阻止、 広範な全身性浮腫
h18C12.v6.1.5	マウス $\alpha 5$ のみ	正常
ネガティブコントロール抗体	ヒト $\alpha 5$ のみ	正常
ネガティブコントロール抗体	マウス $\alpha 5$ のみ	正常

これらの結果は、h18C12.v6.1.5 が血管発生中にインビボで 5 1 インテグリン機能を破壊することを証明している。

【0251】

実施例 8：腫瘍同種移植アッセイ

C57/B16 同種移植腫瘍モデルを、ここに記載の 18C12 抗体の効力を証明するために研究で使用する。C57/B16 腫瘍細胞をマウス ノックアウト：：ヒト 5 トランスジェニックマウス中に移植し、マウスを抗 5 1 抗体で処理する。

【0252】

樹立された腫瘍を有するマウスを 4 群に無作為化し、全ての群が類似の腫瘍体積を有しているようにする。投薬レジメンは次の通りである：

- (1) ネガティブコントロール抗体 (13.5 mg/kg, 2x/週)
- (2) 抗 VEGF 抗体 (3.5 mg/kg, 2x/週 + ネガティブコントロール抗体 (10 mg/kg, 2x/週))
- (3) ネガティブコントロール抗体 (3.5 mg/kg, 2x/週) + 抗 5 1 抗体 (18C12) (10 mg/kg, 2x/週)

(4) 抗VEGF抗体(3.5 mg/kg, 2x/週) + 抗51抗体(18C12)(10 mg/kg, 2x/週)

【0253】

腫瘍の長さ $w$ と幅 $l$ をノギスを使用して週二回測定し、腫瘍体積を式：腫瘍体積( $\text{mm}^3$ ) =  $(w^2 \times l) / 2$  (ここで $w$  = 幅 $\text{mm}$ 及び $l$  = 長さ $\text{mm}$ )を使用して計算する。腫瘍体積は腫瘍増殖速度を反映させるために時間に対してプロットする。

【0254】

実施例9：腫瘍異種移植アッセイ

ここに記載された18C12抗体の効力を証明するための研究において腫瘍異種移植アッセイを使用した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有するヒトU87グリオーナ細胞をヌードマウスの脳内に移植し、マウスを抗51抗体で処理する。

10

【0255】

樹立された腫瘍を有するマウスをバイオルミネセンスイメージングを使用して画像化し、3群に無作為化し、全ての群が類似の出発腫瘍量を有しているようにする。投薬レジメンは次の通りである：

(1) ネガティブコントロール抗体(ブタクサ)(5 mg/kg, 2x/週) + 抗gD(10 mg/kg, 2x/週)

(2) 抗VEGF抗体(B20-4.1)(5 mg/kg, 2x/週) + ネガティブコントロール抗体抗gD(10 mg/kg, 2x/週)

(3) 抗VEGF抗体(B20-4.1)(5 mg/kg, 2x/週) + 抗51抗体(h18C12.v6.1.5)(10 mg/kg, 2x/週)

20

【0256】

腫瘍細胞の外科的移植後にこれらのマウスノ生存を毎日モニターした。抗VEGF抗体と組み合わせた抗51抗体h18C12.v6.1.5での治療は抗VEGF単独に対してマウスの生存率を向上させた。結果を図12に示す。腫瘍量はまたバイオルミネセンスイメージングを使用して移植後の1、3、4、及び5週目にも測定した。抗VEGFと組み合わせて抗51抗体h18C12.v6.1.5で治療したマウスは抗VEGF単独で治療したマウスに対して減少した腫瘍量を有していた。結果を図13に示す。

【0257】

ここで引用される(例えば特許、公開特許出願、及びGenbank受託番号を含む)全ての刊行物を、あたかも各文献が出典明示により特にかつ個々に援用されているかの如く、あらゆる目的に対してその全体を出典明示によりここに援用する。

30



【 図 3 】

FIG. 3

クローン	CDR-L1				CDR-L2				CDR-L3																				
	24	25	26	27	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41													
h18C12.v3	F	L	S	Q	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	G	Y	V	29	
h18C12.v6	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	A	A	V	Y	V	30
h18C12.v7	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	Y	S	Y	V	31
h18C12.v9	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	Y	S	Y	V	32
h18C12.v15	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	S	Y	V	29
h18C12.v16	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	S	Y	V	29
h18C12.v28	T	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	S	Y	V	33
h18C12.v30	F	L	T	Q	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	S	Y	V	29	
h18C12.v51	F	L	T	Q	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	25	G	S	S	Y	V	29	
h18C12.v54	F	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	26	G	S	S	Y	V	29
h18C12.v70	F	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	27	G	S	S	Y	V	29
h18C12.v78	F	L	S	S	O	H	S	T	F	I	G	E	L	N	S	D	G	S	H	K	G	D	26	G	S	S	Y	V	29

クローン	CDR-H1				CDR-H2				CDR-H3																					
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65														
h18C12.v3	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v6	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	X	Y	F	D	Y	39
h18C12.v7	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v9	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v15	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v16	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v28	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v30	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v51	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	37	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v54	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v70	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	
h18C12.v78	G	P	T	F	S	R	R	I	Y	A	T	E	F	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	Y	F	D	Y	38	

【 図 5 】

抗 $\alpha 5\beta 1$	ヒト インテグリン $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v3	0.71 ± 0.08	8.07 ± 0.37	11.5 ± 1.1
h18C12.v6	1.74 ± 0.51	7.50 ± 1.64	4.8 ± 2.1
h18C12.v15	2.23 ± 0.09	15.2 ± 0.5	6.9 ± 0.3
h18C12.v54	0.63 ± 0.11	7.34 ± 0.32	11.9 ± 2.4
h18C12.v70	0.66 ± 0.19	12.8 ± 0.8	20.3 ± 3.8

FIG. 5

【 図 6 】

抗体	ヒト インテグリン $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v6.1.Lam3	0.97 ± 0.03	3.86 ± 0.24	4.00 ± 0.32
キメラ 18C12	1.2 ± 0.1	9.22 ± 0.19	7.68 ± 0.53

FIG. 6

【 図 7 】

抗 $\alpha 5\beta 1$ h18C12.v6.1 変異体	CDR-L2				ヒト インテグリン $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	50a	50b	50c	50d	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v6.1.1	S	S	S	G	1.2	32	26.7
h18C12.v6.1.2	N	S	D	G	0.48	6.43	13.5
h18C12.v6.1.3	N	S	A	G	1.1	40	36.4
h18C12.v6.1.4	N	S	D	A	0.46	14.4	31.6
h18C12.v6.1.5	N	S	D	S	0.43	6.59	15.5

FIG. 7

【 図 4 】

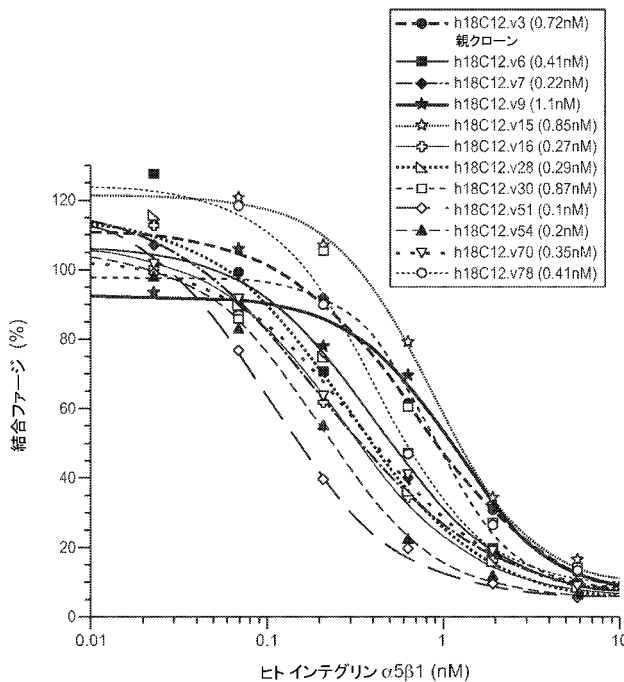


FIG. 4

【 図 8 】

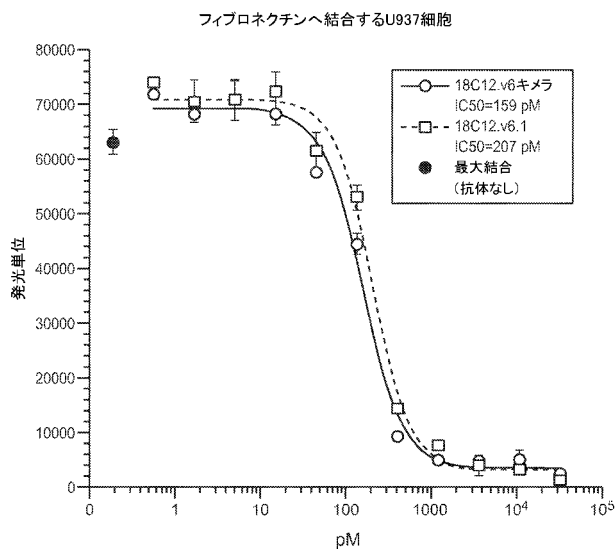


FIG. 8



【 図 9 】

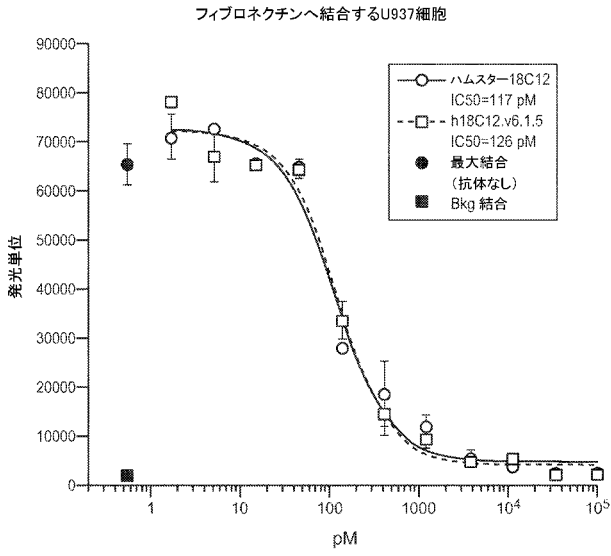


FIG. 9

【 図 10 】

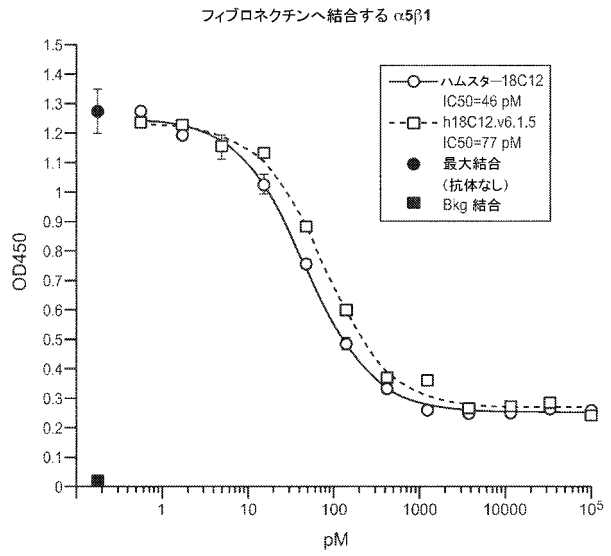


FIG. 10

【 図 11 】

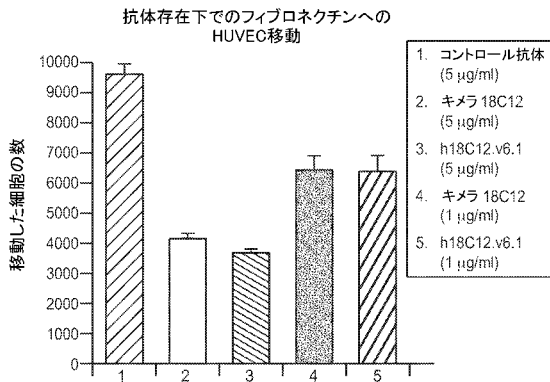


FIG. 11

【 図 12 】

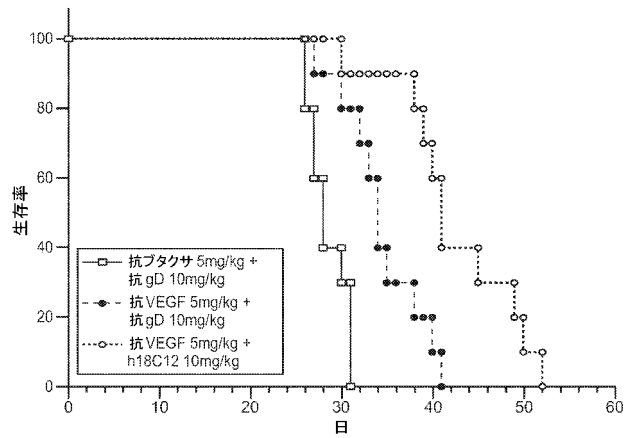


FIG. 12

【 図 1 3 】

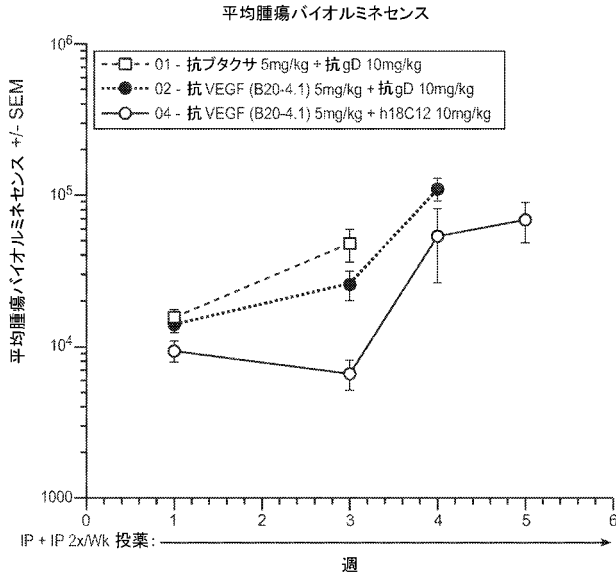


FIG. 13

## 【 配列表 】

2012521218000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成24年2月29日 (2012.2.29)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 0 5

【 補正方法 】 変更

## 【 補正の内容 】

## 【 0 0 0 5 】

本発明は、モノクローナル抗体 1 8 C 1 2 から誘導される新規な抗 <sub>5</sub> <sub>1</sub> 抗体、新規な抗 <sub>5</sub> <sub>1</sub> 抗体を含んでなるキット及び組成物、及びそれらを作製し及び / 又は使用するを提供する。

本発明の一実施態様は、T L - S / T - S / P / T - Q / N - H - F / S - T / I - Y - K / T - I - G / D / S (配列番号 : 1 5) を含む C D R - L 1 ; L / I - N / T - S - D / H / S - G / S - S / L / T - H / Y - N / K / Q / I - K / T - G / A - D / S / V (配列番号 : 1 6) を含む C D R - L 2 ; G / A - S / A / Y - S / Y - Y - S / A / Y - S / Y / T - G Y - V / I (配列番号 : 1 7) を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン ; 及び G F T F S - N / A - R W - I / V - Y (配列番号 : 1 8) を含む C D R - H 1 ; G I K T K P - N / A / T - I / R - Y A T - E / Q - Y A D S V K G (配列番号 : 1 9) を含む C D R - H 2 ; 及び L / V - T G - M / K - R / K - Y F D Y (配列番号 : 2 0) を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含んでなる抗 <sub>5</sub> <sub>1</sub> 抗体を提供する。幾つかの実施態様では、抗 <sub>5</sub> <sub>1</sub> 抗体は、それぞれ図 3 に記載される配列を有する C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む V L ドメイン、及びそれぞれ図 3 に記載される配列を有する C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む V H ドメイン、すなわち

配列番号：21、22、23、又は24に記載される配列を有するCDR-L1、配列番号：25、26、27、又は28に記載される配列を有するCDR-L2、及び配列番号：29、30、31、又は32に記載される配列を有するCDR-L3を含むVLドメイン；及び配列番号：34又は35に記載される配列を有するCDR-H1、配列番号：36又は37に記載される配列を有するCDR-H2、及び配列番号：38、39、又は40に記載される配列を有するCDR-H3を含むVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：3-8の任意の一つを有するVLドメイン、及び配列番号：11-14の任意の一つを有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：4を有するVLドメイン、及び配列番号：11を有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：5を有するVLドメイン、及び配列番号：12を有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：6を有するVLドメイン、及び配列番号：13を有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：7を有するVLドメイン、及び配列番号：13を有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、配列番号：8を有するVLドメイン、及び配列番号：14を有するVHドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、ヒト、ヒト化又はキメラである。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体はモノクローナル抗体である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、<sub>5</sub><sub>1</sub>インテグリンへの結合について18C12抗体と競合する。幾つかの実施態様では、モノクローナル抗体はキメラ抗体である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、<sub>5</sub><sub>1</sub>に結合する抗体断片である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、単鎖Fv(scFv)、Fv断片；ダイアボディ及び線形抗体から選択される。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、全長IgG1又は全長IgG4である。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、二重特異性抗体又は多重特異性抗体である。幾つかの実施態様では、二重特異性抗体は、VEGF及び<sub>5</sub><sub>1</sub>に結合し、VEGFアンタゴニストである。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は改変されたエフェクター機能を有する。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を低減し又は防止するように改変される(例えば、抗体のFc部分をコードする核酸配列を変化させることによる)。幾つかの実施態様では、抗体のFc部分はN297A置換を含む。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、ヒトにおいてその半減期を増加させ又は低減させるように修飾されている(例えば、抗体のFc部分をコードする核酸配列を改変させることによる)。幾つかの実施態様では、抗<sub>5</sub><sub>1</sub>抗体は、他の実体(例えば、治療剤又は検出可能な標識)にコンジュゲートした免疫コンジュゲートの一部である。幾つかの実施態様では、治療用実体は細胞傷害剤(例えば、放射性同位元素、毒素、増殖阻害剤、又は化学療法剤)である。幾つかの実施態様では、検出可能な標識は蛍光染料、放射性同位元素、又は酵素である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S(配列番号：15)を有するCDR-L1；L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V(配列番号：16)を有するCDR-L2；G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I(配列番号：17)を有するCDR-L3を含むVLドメイン；及び  
GFTFS-N/A-RW-I/V-Y(配列番号：18)を有するCDR-H1；GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVK(配列番号：19)を有

する C D R - H 2 ; 及び L / V - T G - M / K - R / K - Y F D Y (配列番号 : 2 0 ) を有する C D R - H 3 を含む V H ドメインを含んでなる抗 5 1 抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体であって、

V L ドメインが、それぞれが図 3 に記載の配列を有する C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含み、

V H ドメインが、それぞれが図 3 に記載の配列を有する C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む、抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗 5 1 抗体であって、

V L ドメインが配列番号 : 3 - 8 の何れか一つを含み、

V H ドメインが配列番号 : 1 1 - 1 4 の何れか一つを含む、抗体。

【請求項 4】

T L S S Q H S T Y T I G (配列番号 : 2 1) を有する C D R - L 1 ; L N S D S S H N K G S (配列番号 : 8 の残基 5 0 - 6 0) を有する C D R - L 2 ; A A Y Y A Y G Y V (配列番号 : 3 0) を有する C D R - L 3 を含む V L ドメイン ; 及び

G F T F S A R W I Y (配列番号 : 1 4 の残基 2 6 - 3 5) を有する C D R - H 1 ; G I K T K P A I Y A T E Y A D S V K G (配列番号 : 1 4 の残基 5 0 - 6 8) を有する C D R - H 2 ; 及び L T G M K Y F D Y (配列番号 : 1 4 の残基 1 0 1 - 1 0 9) を有する C D R - H 3 を含む V H ドメイン

を含んでなる抗 5 1 抗体。

【請求項 5】

ヒト、ヒト化、キメラ、二重特異性又は多重特異性抗体である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

5 1 に結合する抗体断片である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

完全長 I g G 1 抗体である請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

抗体が N 2 9 7 A 置換を含む F c 部分を含む請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 1 0】

請求項 9 に記載の核酸を含んでなる宿主細胞。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の宿主細胞を、抗体が産生されるように培養することを含んでなる抗 5 1 抗体の製造方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体と細胞傷害剤を含んでなる免疫コンジュゲート。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体と薬学的に許容可能な担体を含有する薬学的組成物。

【請求項 1 4】

V E G F アンタゴニストを更に含有してなる請求項 1 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 5】

V E G F アンタゴニストが抗 V E G F 抗体である請求項 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】

抗 V E G F 抗体がベパシズマブである請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 17】

検出可能な標識を更に含んでなる請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 18】

放射性同位体、蛍光染料、及び酵素からなる群から選択されるメンバーである請求項 17 に記載の抗体。

## 【請求項 19】

医薬として使用される請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 20】

異常な血管新生及び/又は血管透過もしくは漏出に関与する疾患又は障害を治療する際に使用されるための請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 21】

疾患が癌、眼疾患、自己免疫疾患からなる群から選択されるメンバーである請求項 20 に記載の抗体。

## 【請求項 22】

血管新生の阻害に使用される請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体。

## 【請求項 23】

5 1 タンパク質を含んでいることが疑われる試料中の 5 1 タンパク質を検出する方法において、

(a) 請求項 17 から 18 の何れか一項に記載の抗体を試料と接触させ;

(b) 抗 5 1 抗体と 5 1 タンパク質との間の複合体の形成を検出することを含む方法。

## 【請求項 24】

試料が、異常な血管新生、異常な血管透過性、及び/又は血管漏出に関与する疾患と診断された患者からのものである請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

異常な血管新生及び/又は血管透過性もしくは血管漏出に関与する疾患又は障害を持つ個体を治療するための医薬において、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体を含有してなる医薬。

## 【請求項 26】

疾患又は障害が、癌、眼疾患、自己免疫疾患からなる群から選択されるメンバーである請求項 25 に記載の医薬。

## 【請求項 27】

癌が、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、腎細胞癌、及び神経膠芽腫からなる群から選択される請求項 26 に記載の医薬。

## 【請求項 28】

疾患又は障害が、網膜症、加齢性黄斑変性症、角膜血管新生、角膜移植血管新生、網膜血管新生、及び血管新生緑内障からなる群から選択されるメンバーである請求項 20 に記載の抗体又は請求項 25 に記載の医薬。

## 【請求項 29】

VEGF アンタゴニストの有効量が個体に投与される請求項 20 に記載の抗体又は請求項 25 に記載の医薬。

## 【請求項 30】

VEGF アンタゴニストが抗 VEGF 抗体である請求項 29 に記載の医薬。

## 【請求項 31】

抗 VEGF 抗体がベバシズマブである請求項 30 に記載の医薬。

## 【請求項 32】

VEGF アンタゴニストが抗 5 1 抗体の前に投与される請求項 29 に記載の医薬。

## 【請求項 33】

VEGF アンタゴニスト及び抗 5 1 抗体が同時に投与される請求項 29 に記載の医薬。

## 【請求項 3 4】

被験者は、被験者が V E G F アンタゴニスト治療に対して非応答性になるまで V E G F アンタゴニストで最初に治療され、ついで被験者は抗 5 1 抗体で治療される請求項 2 9 に記載の抗体又は医薬。

## 【請求項 3 5】

上記抗体が、抗血管新生剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害剤からなる群から選択される治療剤と共に投与される請求項 2 9 に記載の抗体又は医薬。

## 【請求項 3 6】

V E G F アンタゴニストで治療された被験者における 5 1 を検出するためのキットにおいて、

( a ) 請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗 5 1 抗体と；

( b ) 使用のための指示書

を具備するキット。

## 【請求項 3 7】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の抗体を含有する血管新生を阻害するための医薬。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2010/028291

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	C07K16/28	C12N15/13 A61K39/395 A61P35/00
ADD.		
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)		
C07K C12N A61K A61P		
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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, 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.
Y	WO 2008/060645 A2 (GENENTECH INC [US]; CHUNTHARAPAI ANAN [US]; PLOWMAN GREG [US]; TESSIER) 22 May 2008 (2008-05-22) the whole document	1-36
Y	WO 2004/056308 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; POWERS DAVID) 8 July 2004 (2004-07-08) the whole document	1-36
Y	WO 2005/092073 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; BHASKAR VINAY) 6 October 2005 (2005-10-06) the whole document	1-36
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 June 2010		17/06/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Ferreira, Roger

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/US2010/028291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/134876 A2 (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; MORPHOSYS AG [DE]; MENRAD ANDREAS [GB];) 29 November 2007 (2007-11-29) the whole document	1-36
Y	WO 2004/089988 A2 (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; JOHNSON DALE E [US]; JEFFRY URSULA [US]) 21 October 2004 (2004-10-21) the whole document	1-36
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB LNKD-DOI:10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-36
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL LNKD-DOI:10.1016/S1380-2933(96)00045-0, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	1-36
A	MOULD A P ET AL: "Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD-DOI:10.1074/JBC.272.28.17283, vol. 272, no. 28, 11 July 1997 (1997-07-11), pages 17283-17292, XP002485038 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-36

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/028291
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURROWS L ET AL: "Fine mapping of inhibitory anti-alpha5 monoclonal antibody epitopes that differentially affect integrin-ligand binding" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1042/0264-6021:3440527, vol. 344, no. Pt 2, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 527-533, XP002485037 ISSN: 0264-6021 the whole document	1-36
A	ORECCHIA ANGELA ET AL: "Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha5beta1 integrin" JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1242/JCS.00673, vol. 116, no. 17, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 3479-3489, XP002468572 ISSN: 0021-9533 the whole document	1-36
A	RAMAKRISHNAN V ET AL: "Preclinical evaluation of an anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent" JOURNAL OF EXPERIMENTAL THERAPEUTICS AND ONCOLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 5, no. 4, 4 May 2006 (2006-05-04), pages 273-286, XP008081487 ISSN: 1359-4117 the whole document	1-36
A	ECONOMOPOULOU MATINA ET AL: "Inhibition of pathologic retinal neovascularization by alpha-defensins" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US LNKD- DOI:10.1182/BLOOD-2005-03-0889, vol. 106, no. 12, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 3831-3838, XP002495156 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-36
Y,P	WO 2009/042746 A1 (GENENTECH INC [US]; LIANG WEI-CHING [US]; PLOWMAN GREGORY D [US]; WU Y) 2 April 2009 (2009-04-02) the whole document	1-36
	----- -/-- -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2010/028291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	WO 2009/100110 A1 (MEDAREX INC [US]; PFIZER [US]; BENDER STEVEN LEE [US]; CASPERSON GERAL) 13 August 2009 (2009-08-13) the whole document	1-36

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2010/028291

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/028291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 2008060645	A2	22-05-2008	AR 060040 A1 21-05-2008			
			AU 2007319757 A1 22-05-2008			
			CA 2646611 A1 22-05-2008			
			EC SP088835 A 27-11-2008			
			EP 1989231 A2 12-11-2008			
			JP 2009536921 T 22-10-2009			
			KR 20080113246 A 29-12-2008			
			US 2009220504 A1 03-09-2009			
WO 2004056308	A2	08-07-2004	AU 2003298783 A1 14-07-2004			
			BR 0316670 A 11-10-2005			
			CA 2507099 A1 08-07-2004			
			CN 1753911 A 29-03-2006			
			EP 1575516 A2 21-09-2005			
			JP 2006516098 T 22-06-2006			
			KR 20050089151 A 07-09-2005			
			MX PA05005558 A 26-07-2005			
			NZ 540562 A 30-04-2008			
			RU 2346701 C2 20-02-2009			
			ZA 200505114 A 28-03-2007			
			WO 2005092073	A2	06-10-2005	AU 2005226736 A1 06-10-2005
BR PI0509177 A 18-09-2007						
CA 2560508 A1 06-10-2005						
EP 1755659 A2 28-02-2007						
JP 2007530584 T 01-11-2007						
KR 20070009637 A 18-01-2007						
WO 2007134876	A2	29-11-2007	AR 061107 A1 06-08-2008			
			AU 2007253586 A1 29-11-2007			
			CA 2652886 A1 29-11-2007			
			CN 101495515 A 29-07-2009			
			DO P20070101 A 30-12-2007			
			EA 200802348 A1 28-08-2009			
			EC SP088909 A 30-12-2008			
			EP 2032605 A2 11-03-2009			
			JP 2009537158 T 29-10-2009			
			KR 20090027218 A 16-03-2009			
			US 2009081207 A1 26-03-2009			
			UY 30362 A1 02-01-2008			
			WO 2004089988	A2	21-10-2004	CA 2520121 A1 21-10-2004
						EP 1625165 A2 15-02-2006
JP 2007524605 T 30-08-2007						
WO 2009042746	A1	02-04-2009	AR 066170 A1 29-07-2009			
WO 2009042746	A1		AU 2008304452 A1 02-04-2009			
			PE 10292009 A1 19-08-2009			
			US 2009098112 A1 16-04-2009			
WO 2009100110	A1	13-08-2009	NONE			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ブラウマン, グレゴリー, ディー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, チェスナット ストリート  
1 3 8 6

(72) 発明者 ウー, ヤン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, ブライス ストリート  
1 1 6 0

(72) 発明者 イェ, ウェイラン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, バーケンティン ストリート  
1 1 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 DA20 EA04 GA11 HA01  
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA44  
4C085 AA14 AA16 AA21 BB11 CC02 CC03 CC23 CC32 DD63 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA23 EA28 FA74