

(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2009-539870

(P2009-539870A)

(43) 公表日 平成21年11月19日 (2009. 11. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-514512 (P2009-514512)
 (86) (22) 出願日 平成19年6月6日 (2007. 6. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年1月14日 (2009. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/070516
 (87) 国際公開番号 W02007/143689
 (87) 国際公開日 平成19年12月13日 (2007. 12. 13)
 (31) 優先権主張番号 60/811, 357
 (32) 優先日 平成18年6月6日 (2006. 6. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/866, 767
 (32) 優先日 平成18年11月21日 (2006. 11. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

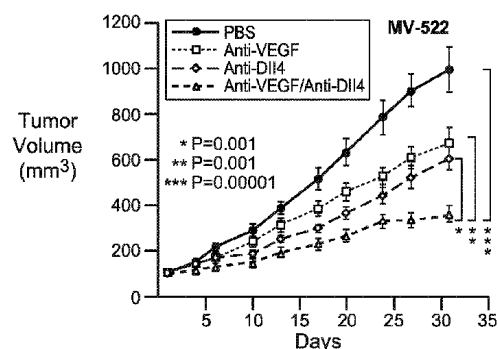
(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管発生を調節するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、血管発生を調節するために D L L 4 モジュレーターを使用する方法を提供する。更に、D L L 4 アンタゴニストのような D L L 4 モジュレーターを使用する治療法が提供される。本発明は、ノッチ受容体経路のデルタ様 4 (同じ意味で「D L L 4」と呼ばれる) 活性化を調節する薬剤による処理によって血管発生が阻害されるという発見に部分的に基づく。D L L 4 アンタゴニストによる処理は、腫瘍血管を含む血管において、内皮細胞 (E C) 増殖の増加、不適切な内皮細胞分化および不適切な動脈発生をもたらした。驚くべきことに、抗 D L L 4 抗体による処理はいくつかの異なる癌において腫瘍増殖の阻害をもたらした。したがって本発明は、血管形成に関与する過程の調節 (例えば、促進または阻害) のための、および血管形成に関連する病理学的症状を標的とする使用のための方法、組成物、キットおよび製品を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腫瘍、癌または細胞増殖障害を治療する方法であって、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含み、それによって該腫瘍、癌または細胞増殖障害が治療される、方法。

【請求項 2】

前記腫瘍、癌または細胞増殖障害が、結腸癌、肺癌、メラノーマまたはリンパ腫である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

血管形成に関連する病理学的状態を治療する方法であって、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含み、それによって血管形成に関連する病理学的状態が治療され、該 D L L 4 アンタゴニストが、内皮細胞増殖を刺激、内皮細胞分化を阻害、動脈発生を阻害、または血管灌流を阻害することができる、方法。

10

【請求項 4】

前記血管形成に関連する病理学的状態が、腫瘍、癌、および/または細胞増殖障害である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記血管形成に関連した病理学的状態が眼内血管新生疾患である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

そのような治療を必要とする被験体における内皮細胞増殖を刺激する方法であって、該被験体への有効量の D L L 4 アゴニストの投与を含み、それによって内皮細胞増殖が刺激される、方法。

20

【請求項 7】

そのような治療を必要とする被験体の内皮細胞分化を減少または阻害する方法であって、該被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含み、それによって内皮細胞増殖が阻害される、方法。

【請求項 8】

そのような治療を必要とする被験体の動脈発生を減少または阻害する方法であって、該被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含み、それによって動脈発生が阻害される、方法。

30

【請求項 9】

そのような治療を必要とする被験体の腫瘍の血管灌流を減少または阻害する方法であって、該被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含み、腫瘍の血流灌流が阻害される、方法。

【請求項 10】

前記被験体への有効量の抗血管形成剤の投与をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗血管形成剤が、前記 D L L 4 アンタゴニストの投与の前にまたは続いて投与される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記抗血管形成剤が前記 D L L 4 アンタゴニストと同時に投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗血管形成剤が血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) のアンタゴニストである、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 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 13 に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記抗 V E G F の抗体がベバシズマブである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

有効量の化学療法剤の投与をさらに含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

血管形成に関連する病理学的状態を有する被験体における抗血管形成剤の有効性を促進する方法であって、該抗血管形成剤との組合せで有効量の D L L 4 アンタゴニストを該被験体へ投与し、それによって該抗血管形成剤の阻害活性を促進することを含む、方法。

【請求項 1 8】

前記血管形成に関連する病理学的状態が、腫瘍、癌、および / または細胞増殖障害である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記血管形成に関連する病理学的状態が眼内血管新生疾患である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 D L L 4 アンタゴニストが抗 D L L 4 の抗体である、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 D L L 4 アンタゴニストが D L L 4 イムノアドヘジンである、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 D L L 4 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 D L L 4 抗体がヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 D L L 4 抗体が抗体フラグメントである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

抗体フラグメントが、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂ または s c F v である、請求項 2 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、一般に血管発生の調節のために有用な組成物および方法に関する。部分的に、本発明は、血管形成に関連した障害の診断および治療のためのデルタ様 4 (D L L 4) アンタゴニストの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

血管供給の発生は多くの生理学および病理学的過程のための基本的な必要条件である。胚および腫瘍のような活発に増殖する組織は適切な血液供給を必要とする。これらの組織は、血管形成と呼ばれる過程を介して新しい血管の形成を促進する血管形成支持因子の産生によって、この必要性を満たす。血管の管形成は、下記工程のすべてまたは多くを含む、複雑であるが秩序正しい生物学的事象である：a) 内皮細胞 (E C) は既存の E C から増殖するか、または前駆細胞から分化する；b) E C は索状組織様構造を形成するために移動および合体する；c) 次に、血管索状組織は、中心部内腔を備えた血管を形成するために管形成を行う；d) 既存の索状組織または血管は、二次血管を形成するために出芽する；e) 原始血管網はさらなる再構築および再形成を行う；および f) 内皮周囲の細胞は内皮の管を囲むために動員され、血管に維持および調節機能を提供し；そのような細胞

10

20

30

40

50

は、微小毛細血管については周皮細胞、より大きな血管については平滑筋細胞および心臓における心筋細胞を含む。Hanahan, D. Science 277: 48 - 50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. Nature Reviews Genetics 3: 513 - 23 (2002); Lubarisky, B. & Krasnow, M. A. Cell 112: 19 - 28 (2003)。

【0003】

血管形成が様々な障害の病因に関係することは、今や十分に確立されている。これらは、固形腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化、後水晶体線維形成症、血管腫、慢性炎症、増殖性網膜症（例えば糖尿病性網膜症）のような眼内血管新生疾患、加齢黄斑変性（AMD）、血管新生緑内障、移植された角膜組織および他の組織の免疫拒絶、関節リウマチならびに乾癬を含む。Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931 - 10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53: 217 - 239 (1991); and Garner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK 編、第2版（マルセル・デッカー（Marcel Dekker）、ニューヨーク、1994）、1625～1710ページ。

【0004】

腫瘍増殖の場合において、血管形成は、過形成から新生物形成への転換のために、および腫瘍の増殖および転移のための栄養の提供のために、重要であると思われる。Folkman et al., Nature 339: 58 (1989)。血管新生は、腫瘍細胞が、正常細胞に比べて、成長優位性および増殖自律性を獲得することを可能にする。腫瘍は、通常利用可能な毛細血管床からの距離のために、たった数立方ミリメートルのサイズに増殖できる一つの異常な細胞として始まり、それは、長期間の間さらに増殖および播種することなく「休止状態」でとどまる。次にいくつかの腫瘍細胞は、内皮細胞を活性化するために血管形成的な表現型に切り替わり、内皮細胞は増殖し新しい毛細血管へと成熟する。新しく形成された血管は、一次腫瘍の継続的な増殖だけでなく、転移性腫瘍細胞の播種および再コロニー形成もまた可能にする。したがって、腫瘍切片における微小血管の密度と、他のいくつかの腫瘍に加えて乳癌における患者の生存との間で、相関性が観察された。Weidner et al., N. Engl. J. Med 324: 1 - 6 (1991); Horak et al., Lancet 340: 1120 - 1124 (1992); Macchiarini et al., Lancet 340: 145 - 146 (1992)。血管形成スイッチを制御する正確なメカニズムは十分に理解されていないが、腫瘍塊の血管新生は多くの血管形成の促進因子および阻害因子のネットバランスに起因すると考えられている（Folkman, 1995, Nat Med 1(1): 27 - 31）。

【0005】

血管発生の過程は厳密に調節される。現在まで、かなりの数の分子（多くは、周囲の細胞により産生される分泌因子）は、ECの分化、増殖、移動および索状組織様構造への合体を調節することが示された。例えば、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は、血管形成刺激および血管透過性誘導に関与する鍵となる因子として同定された。Ferrara et al., Endocr. Rev. 18: 4 - 25 (1997)。単一のVEGF対立遺伝子の欠損でさえ胚致死性をもたらすという発見から、この因子が、血管系の発生および分化において欠くことのできない役割を果たすことが示される。更に、VEGFは、腫瘍および眼内障害に関連する血管新生の鍵となる仲介因子であることが示された。Ferrara et al., Endocr. Rev. 上記。VEGFのmRNAは、調べられた大多数のヒト腫瘍により過剰表現される。Berkman et al., J. Clin. Invest. 91: 153 - 159 (1993); Brown et al., Human Pathol. 26: 86 - 91 (1995)

); Brown et al, Cancer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et al, Brit. J. Cancer 73:931-934 (1996); Dvorak et al, Am. J. Pathol. 146:1029-1039 (1995)。

【0006】

さらに、眼球の液体中のVEGFの濃度レベルは、糖尿病性網膜症および他の虚血関連性網膜症に罹患する患者における血管の活発な増殖の存在に、高く関連している。Aiello et al, N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994)。更に、AMDに罹患した患者において脈絡膜新生血管膜中にVEGFが局在することが、研究から実証されている。Lopez et al, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996)。

10

【0007】

抗VEGFの中和抗体は、ヌードマウスにおける様々なヒト腫瘍細胞株の増殖を抑制し (Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgstrom et al, Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-924 (1996))、虚血性網膜障害のモデルにおける眼内血管形成もまた阻害する。Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)。したがって、抗VEGFモノクローナル抗体、またはVEGF作用の他の阻害剤は、腫瘍および様々な眼内血管新生障害の治療のための有望な候補である。そのような抗体は、例えば1998年1月14日に公表されたEP 817,648中に；および両方とも1998年10月15日に公表されたWO98/45331およびWO98/45332中に記載されている。抗VEGF抗体の1つであるベバシズマブは、転移性結腸直腸癌(CRC)を治療するために化学療法レジメンとの組合せにおける使用についてFDAによって承認された。さらにベバシズマブは、様々な癌徴候の治療のために多くの進行中の臨床試験において研究されている。

20

【0008】

多くの疾患および障害での血管形成の役割の概観において、これらの過程を引き起こす1つまたは複数の生物学的効果を調節する手段を有することは望ましい。治療剤としての開発のために最適な臨床的特質を有する薬剤に対する必要性が引き続き存在することは明らかである。本明細書において記載される本発明はこの必要性を満たし、他の利点を提供している。

30

【0009】

特許出願および公開を含む本明細書において引用された参照はすべて、それら全体を参照することによって組み入れられる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

発明の要旨

本発明は、ノッチ受容体経路のデルタ様4(同じ意味で「DLL4」と呼ばれる)活性化を調節する薬剤による処理によって血管発生が阻害されるという発見に部分的に基づく。DLL4アンタゴニストによる処理は、腫瘍血管を含む血管において、内皮細胞(EC)増殖の増加、不適切な内皮細胞分化および不適切な動脈発生をもたらした。驚くべきことに、抗DLL4抗体による処理はいくつかの異なる癌において腫瘍増殖の阻害をもたらした。したがって本発明は、血管形成に関与する過程の調節(例えば、促進または阻害)のための、および血管形成に関連する病理学的症状を標的とする使用のための方法、組成物、キットおよび製品を提供する。

50

【 0 0 1 1 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含む、腫瘍、癌および / または細胞増殖障害を治療する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

1つの態様において、本発明は、腫瘍または癌の増殖を低下、阻害、遮断または予防する方法であって、そのような治療を必要とする被験体への有効量の抗 D L L 4 アンタゴニストの投与を含む方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニスト (抗 D L L 4 抗体のような) の投与を含む、血管形成阻害のための方法を提供する。

10

【 0 0 1 4 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニスト (抗 D L L 4 抗体のような) の投与を含む、血管形成に関連する病理学的症状の治療のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、血管形成に関連した病理学的症状は、腫瘍、癌および / または細胞増殖障害である。いくつかの実施形態において、血管形成に関連した病理学的症状は、眼内血管新生疾患である。

【 0 0 1 5 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含む、内皮細胞増殖刺激のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、被験体は、血管形成に関連する病理学的症状 (腫瘍、癌および / または細胞増殖障害のような) を有している。

20

【 0 0 1 6 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含む、内皮細胞分化阻害のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、被験体は、血管形成に関連する病理学的症状 (腫瘍、癌および / または細胞増殖障害のような) を有する。

【 0 0 1 7 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含む、動脈発生阻害のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、被験体は、血管形成に関連する病理学的症状 (腫瘍、癌および / または細胞増殖障害のような) を有する。

30

【 0 0 1 8 】

1つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量の D L L 4 アンタゴニストの投与を含む、血管灌流の阻害のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、被験体は、血管形成に関連する病理学的症状 (腫瘍、癌および / または細胞増殖障害のような) を有する。

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本発明は、抗血管形成剤との組合せで有効量の D L L 4 アンタゴニストの被験体への投与を含む、血管新生に関連する病理学的症状を有する被験体において抗血管形成剤治療の有効性を促進する方法を提供する。そのような方法は、障害 (例えば癌、眼内血管新生疾患、特に抗血管新生剤単独による治療へ低反応である障害の疾患またはそのような段階) の治療において有用である。抗血管形成剤は、抗 V E G F 抗体のような V E G F アンタゴニストを含む、血管形成を低下または阻害する任意の薬剤でありえる。

40

【 0 0 2 0 】

1つの態様において、本発明は、有効量の D L L 4 アンタゴニスト (抗 D L L 4 抗体のような) の、他の治療剤 (抗血管形成剤のような) との有効量の組合せでの投与を含む方法を提供する。例えば、様々な新生物性症状または非新生物性症状を治療するために、D

50

ＬＬ４アンタゴニストは、抗癌剤または抗血管形成剤との組合せにおいて使用される。１つの実施形態において、新生物性症状または非新生物性症状は、血管形成に関連する病理学的症状である。いくつかの実施形態において、他の治療剤は、抗血管形成剤、抗新生物剤および／または化学療法剤である。

【００２１】

ＤＬＬ４アンタゴニストは、それらの目的のために有効な他の治療剤と共に、同一の組成物中または分離した組成物として、連続的にまたは組合せで投与することができる。ＤＬＬ４アンタゴニストおよび他の治療剤（例えば抗癌剤、抗血管形成剤）の投与は、同時に（例えば、単一組成物、または同一の投与経路もしくは異なる投与経路を使用する２つまたは複数の異なる組成物として）行うことができる。あるいはまたは加えて、投与は任意の順序で連続して行うことができる。あるいはまたは加えて、工程は、任意の順序で連続および同時の両方で、組合せとして行なうことができる。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔が、２つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。例えば、抗癌剤を最初に投与し、ＤＬＬ４アンタゴニストが後続してもよい。しかしながら、同時投与またはＤＬＬ４アンタゴニストの最初の投与もまた検討される。したがって１つの態様で、本発明は、抗血管形成剤（ベパシズマブのような抗ＶＥＧＦの抗体のような）の投与が後続する、ＤＬＬ４アンタゴニスト（抗ＤＬＬ４抗体のような）の投与を含む方法を提供する。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔が、２つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。

10

【００２２】

特定の態様において、本発明は、有効量のＤＬＬ４アンタゴニストおよび／または血管形成阻害剤および１つまたは複数の化学療法剤の投与によって障害（腫瘍、癌および／または細胞の増殖障害のような）を治療する方法を提供する。様々な化学療法剤は、本発明の組合わせ治療法において使用されてもよい。検討される化学療法剤の例示的および非限定的リストは、「定義」の下で本明細書において提供される。ＤＬＬ４アンタゴニストおよび化学療法剤の投与は、同時に（例えば、単一の組成物、または同一の投与経路もしくは異なる投与経路を使用する２つまたは複数の異なる組成物として）行うことができる。あるいはまたは加えて、投与は任意の順序で連続して行うことができる。あるいはまたは加えて、工程は任意の順序で連続および同時の両方で、組合せとして行なうことができる。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、２つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。例えば、化学療法剤を最初に投与し、ＤＬＬ４アンタゴニストが後続してもよい。しかしながら、同時投与またはＤＬＬ４アンタゴニストを最初に投与することもまた検討される。したがって１つの態様において、本発明は、化学療法剤の投与が後続する、ＤＬＬ４アンタゴニスト（抗ＤＬＬ４抗体のような）の投与を含む方法を提供する。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、２つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。

20

30

【００２３】

１つの態様において、本発明は、血管形成に関連した病理学的症状のような障害の療法的治療および／または予防的治療のための薬剤の調製におけるＤＬＬ４アンタゴニストの使用を提供する。いくつかの実施形態において、障害は、腫瘍、癌、および／または細胞増殖障害である。

40

【００２４】

１つの態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量のＤＬＬ４アゴニストの投与を含む、障害の治療のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、障害は、ＤＬＬ４－ノッチ受容体経路の発現および／または活性に関連している（ＤＬＬ４－ノッチ受容体経路の活性増加のような）。いくつかの実施形態において、障害は、血管形成、血管新生および／または肥大が所望される障害（例えば、血管外傷である、創傷、裂傷、切開、熱傷、潰瘍（例えば糖尿病性潰瘍、圧迫潰瘍、血友病潰瘍、静脈瘤性潰瘍）、組織増殖、体重増加、末梢動脈障害、分娩誘導、毛髪増殖、水疱性表皮剥離症、網膜萎縮、骨折、骨脊椎固定術、半月板破裂など）である。いくつかの実施形態に

50

において、障害は血管形成の障害が所望される障害である。いくつかの実施形態において、D L L 4 アゴニストは D B Z である。

【 0 0 2 5 】

D L L 4 のアンタゴニストおよびアゴニストは当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書において記述および例示される。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、D L L 4 に結合し、D L L 4 に関連する効果の1つまたは複数の態様を中和、遮断、障害、停止、低下または妨害する分子である。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、ノッチ受容体（ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3および/またはノッチ4のような）に結合し、D L L 4 に関連する効果の1つまたは複数の態様を中和、遮断、障害、停止、低下または妨害する分子である。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、内皮細胞増殖の促進、内皮細胞分化の障害、動脈発生の障害および/または血管灌流の低下を可能にする。当技術分野において確立しているように、内皮細胞増殖、内皮細胞分化、動脈発生および血管機能（血管灌流のような）は、任意の様々な分析（それらのいくつかは本明細書において記述および例示される）を使用して、評価することができ、様々な定量値に換算して表現することができる。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストの、内皮細胞増殖促進、内皮細胞分化障害、動脈発生障害および/または血管機能低下（血管灌流低下のような）の能力は、D L L 4 アンタゴニストによる治療の非存在下における内皮細胞増殖、内皮細胞分化、動脈発生および/または血管機能（血管灌流のような）のレベルと比較して評価される。いくつかの実施形態において、内皮細胞増殖促進、内皮細胞分化障害、動脈発生障害および/または血管機能低下（血管灌流低下のような）の能力は、インビトロの分析（本明細書において記載される H U V E C 分析のような）において決定される。いくつかの実施形態において、内皮細胞増殖促進、内皮細胞分化障害、動脈発生障害および/または血管機能低下（血管灌流低下のような）の能力は、インビボの分析（本明細書において記載されるマウス網膜発生分析のような）において決定される。

10

20

【 0 0 2 6 】

D L L 4 アンタゴニストは抗 D L L 4 抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、抗 D L L 4 抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗体は抗体フラグメントである。いくつかの実施形態において、抗体は F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂ または s c F v である。いくつかの実施形態において、抗体は、表 1 中に示される重鎖および軽鎖可変領域を含む。

30

【 0 0 2 7 】

【表 1 - 1】

表1

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYYI
SPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFD
YWGQGTLLVT (配列番号 1)

40

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFTGQGTKVEIKR
(配列番号 2)

1 つの実施形態において、抗体は、キメラ抗体、例えば異種の非ヒト配列、ヒト配列ま

50

たはヒト化配列に移植された非ヒトドナーからの抗原結合配列を含む抗体である（例えばフレームワークおよび／または定常ドメイン配列）。１つの実施形態において、非ヒトドナーはマウスである。１つの実施形態において、例えば抗原結合配列は、変異誘発（例えばファージディスプレイスクリーニングなど）により得られた合成物である。１つの実施形態において、本発明のキメラ抗体にはマウスV領域およびヒトC領域を有する。１つの実施形態において、マウス軽鎖V領域はヒト 軽鎖へ融合される。１つの実施形態において、マウス重鎖V領域はヒトIgG1のC領域へ融合される。

【0028】

ヒト化抗体は、FR中のアミノ酸置換、および移植されたCDR中の変化をともなう親和性成熟変異型を有するものを含んでいる。CDRまたはFR中の置換されたアミノ酸は、ドナーまたはレシピエント抗体中に存在するものに限定されない。他の実施形態において、さらなる本発明の抗体は、促進されたCDCおよび／またはADCC機能およびB細胞死滅を含む改良されたエフェクター機能をもたらす、Fc領域中のアミノ酸残基における変化を含む。本発明の他の抗体は、安定性を改善する特異的变化を有するものを含む。他の実施形態において、本発明の抗体は、エフェクター機能低下（例えばCDCおよび／またはADCC機能低下、および／またはB細胞死滅低下）をもたらすFc領域中のアミノ酸残基における変化を含む。

【0029】

いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストはDLL4イムノアドヘジンである。

【0030】

１つの態様において、本発明は、１つまたは複数のDLL4アンタゴニストおよび担体を含む組成物を提供する。１つの実施形態において、担体は薬学的に許容される。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは抗DLL4抗体である。

【0031】

１つの態様において、本発明は、有効量のDLL4アンタゴニストおよび薬学的に許容される担体を含む、腫瘍、癌および／または細胞増殖障害の治療における使用（該使用は抗血管形成剤の同時投与または連続投与を含む）のための組成物を提供する。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは抗DLL4抗体である。いくつかの実施形態において、抗血管形成剤は抗VEGF抗体（ベバシズマブのような）である。

【0032】

１つの態様において、本発明は、有効量のDLL4アンタゴニストおよび薬学的に許容される担体を含む、腫瘍、癌および／または細胞増殖障害の治療における使用（該使用は抗癌剤の同時投与または連続投与を含む）のための組成物を提供する。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは抗DLL4抗体である。いくつかの実施形態において、抗癌剤は化学療法剤である。いくつかの実施形態において、使用は、抗血管形成剤の同時投与または連続投与をさらに含む。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは抗DLL4抗体である。いくつかの実施形態において、抗血管形成剤は抗VEGF抗体（ベバシズマブのような）である。

【0033】

１つの態様において、本発明は、容器；および容器内に含まれる組成物（組成物は１つまたは複数のDLL4アンタゴニストまたはDLL4アゴニストを含む）を含む製品を提供する。

【0034】

１つの態様において、本発明は、１つまたは複数のDLL4アンタゴニストまたはDLL4アゴニストを含む組成物を含む第１の容器；および緩衝液を含む第２の容器を含むキットを提供する。１つの実施形態において、緩衝液は薬学的に許容される。１つの実施形態において、DLL4アンタゴニストは抗DLL4抗体である。

【0035】

別の態様において、本発明は、治療的有效量のDLL4アンタゴニストまたは薬学的に

10

20

30

40

50

許容される担体とD L L 4 アゴニストの混合を含む、組成物調製のための方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1a】図1：D L L 4 に仲介されるノッチシグナリングはE C 増殖を調節する、a - c、f、三次元フィブリンゲル中のH U V E C 出芽分析。抗D L L 4 抗体（Y W 2 6 . 8 2）またはD B Z は、H U V E C の出芽を促進した（a）。抗D L L 4 抗体またはD B Z によるH U V E C の三次元フィブリンゲル培養（7日間）におけるノッチ遮断（左）、または固定化D L L 4 によるH U V E C の二次元培養（36時間）におけるノッチ活性化（右）に反応したV E G F R 2 発現の定量的P C R 分析。抗D L L 4 抗体およびD B Z を、それぞれ5 μ g / ml および0 . 0 8 μ M で使用した（a - c、e - g）。

【図1b】K i 6 7 染色は、抗D L L 4 抗体またはD B Z がH U V E C の過剰増殖を引き起こすことを示した（b）。

【図1c】抗D L L 4 抗体またはD B Z は、S F 馴化培地の存在下におけるH U V E C の出芽を増加させた（c）。

【図1d】d、h、抗D L L 4 抗体の全身送達は、新生仔網膜においてE C の大量蓄積を引き起こした。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍率（上部）および高倍率（下部）の共焦点画像（d）。K i 6 7 染色から、抗D L L 4 抗体により処理された新生仔網膜におけるE C 増殖の増加が示される（h）。

【図1e】e、固定化D L L 4 によるノッチ活性化はH U V E C 増殖を阻害し、f、抗V E G F 抗体はD B Z の存在下または非存在下でH U V E C 出芽を阻害した。

【図1f】e、固定化D L L 4 によるノッチ活性化はH U V E C 増殖を阻害し、f、抗V E G F 抗体はD B Z の存在下または非存在下でH U V E C 出芽を阻害した。

【図1g】g、ノッチによるV E G F R 2 の調節。

【図1h】d、h、抗D L L 4 抗体の全身送達は、新生仔網膜においてE C の大量蓄積を引き起こした。網膜血管（イソレクチン染色）の低倍率（上部）および高倍率（下部）の共焦点画像（d）。K i 6 7 染色から、抗D L L 4 抗体により処理された新生仔網膜におけるE C 増殖の増加が示される（h）。

【図2a】図2：D L L 4 に仲介されるノッチシグナリングはE C 分化を調節する、a、フィブリンゲル中で増殖するH U V E C により形成された内腔様構造（白矢印）は、抗D L L 4 抗体またはD B Z の存在下において失われた。代わりに、筒先には細胞が非常に詰め込まれた（黒矢印）。

【図2b】b、ノッチによるT G F β 2 の調節。抗D L L 4 抗体またはD B Z によるH U V E C の三次元フィブリンゲル培養（7日間）におけるノッチ遮断（左）、または固定化D L L 4 によるH U V E C の二次元培養（36時間）におけるノッチ活性化（右）に反応したT G F β 2 発現の定量的P C R 分析。

【図2c】c、抗D L L 4 抗体は動脈発生を遮断する。アルファ平滑筋アクチン（A S M A）およびイソレクチンにより染色された新生仔マウス網膜の共焦点画像。図1dにおいて記載されるように、新生仔マウスを処理した。

【図2d】d、A S M A およびイソレクチンにより染色された成体マウス網膜の共焦点画像。8週齢マウスを、P B S または抗D L L 4 抗体（10mg / kg、1週間に2回）により2週間処理した。

【図3a】図3：D L L 4 およびノッチまたはV E G F の選択的な遮断は腫瘍血管形成を中断し、腫瘍増殖を阻害する、a - f、腫瘍モデルの結果：H M 7（a）、C o l o 2 0 5（b）、C a l u 6（c）、M D A - M B - 4 3 5（d）、M V - 5 2 2（e）およびW E H I 3（f）。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3b】腫瘍モデルの結果：H M 7（a）、C o l o 2 0 5（b）、C a l u 6（c）、M D A - M B - 4 3 5（d）、M V - 5 2 2（e）およびW E H I 3（f）。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3c】腫瘍モデルの結果：H M 7（a）、C o l o 2 0 5（b）、C a l u 6（c）

10

20

30

40

50

、MDA-MB-435 (d)、MV-522 (e) および WEHI 3 (f)。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3d】腫瘍モデルの結果：HM7 (a)、Colo205 (b)、Calu6 (c)、MDA-MB-435 (d)、MV-522 (e) および WEHI 3 (f)。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3e】腫瘍モデルの結果：HM7 (a)、Colo205 (b)、Calu6 (c)、MDA-MB-435 (d)、MV-522 (e) および WEHI 3 (f)。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3f】腫瘍モデルの結果：HM7 (a)、Colo205 (b)、Calu6 (c)、MDA-MB-435 (d)、MV-522 (e) および WEHI 3 (f)。標準誤差をとまなう平均の腫瘍容積が提供される。

【図3g】g-h、腫瘍血管の組織学的研究。対照、抗DLL4抗体および抗VEGFにより処理されたマウスからのEL4腫瘍切片における、抗CD31の免疫組織化学(g)。

【図3h】EL4腫瘍切片における、レクチン灌流および抗CD31の染色(h)。

【図3i】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3j】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3k】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3l】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3m】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3n】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3o】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図3p】i-p。腫瘍モデルSK-OV-3X1 (i)、LL2 (j)、EL4 (k)、H1299 (l)、SKMES-1 (m)、MX-1 (n)、SW620 (o) およびLS174T (p)の結果。

【図4-1】図4：DLL4/ノッチはマウス腸のホメオスタシスにおいて重要でない。対照(a、d、g、j)、抗DLL4抗体(10mg/kg、6週間毎週2回)(b、e、h、k)およびDBZ処理(30μmol/kg、5日間毎日)(c、f、i、l)マウスからの小腸の免疫組織化学的研究。ヘマトキシリン・エオシン(H&E)(a、b、c)およびアルシアンブルー染色(d、e、f)により示されるように、DBZは杯細胞によるTA集団の置換を引き起こした。この変化は、抗DLL4抗体処理には完全に存在しなかった。Ki67(g、h、i)およびHES-1(j、k、l)染色から、抗DLL4抗体が、DBZの効果を繰り返さないことがさらに確認された。

【図4-2】図4：DLL4/ノッチはマウス腸のホメオスタシスにおいて重要でない。対照(a、d、g、j)、抗DLL4抗体(10mg/kg、6週間毎週2回)(b、e、h、k)およびDBZ処理(30μmol/kg、5日間毎日)(c、f、i、l)マ

10

20

30

40

50

ウスからの小腸の免疫組織化学的研究。ヘマトキシリン・エオシン (H & E) (a、b、c) およびアルシアンブルー染色 (d、e、f) により示されるように、DBZ は杯細胞による TA 集団の置換を引き起こした。この変化は、抗 DLL4 抗体処理には完全に存在しなかった。Ki67 (g、h、i) および HES-1 (j、k、l) 染色から、抗 DLL4 抗体が、DBZ の効果を繰り返さないことがさらに確認された。

【図 5 a】図 5：抗 DLL4 抗体の特性評価、a、抗 DLL4 抗体 (YW26.82) のエピトープマッピング。C 末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (AP) 融合タンパク質として発現される、1 セットの DLL4 変異体の図式的な表示。融合タンパク質を含む 293T 細胞馴化培地を、精製抗 DLL4 抗体 (YW26.82、0.5 µg/ml) によりコーティングされた 96 ウェルマイクロタイタープレート上で検査した。結合された DLL4・AP を、基質としてワンステップ PNPP (ピアース (Pierce) 社)、および OD405 nm 吸光度測定を使用して検出した。

【図 5 b】b - d、DLL4 への YW26.82 の選択的結合。96 ウェルのヌンク・マキシソープ (Nunc MaxiSorp) プレートを、示されるような精製組換えタンパク質でコーティングした (1 µg/ml)。示された濃度での YW26.82 の結合を ELISA 分析により測定した。結合された抗体を、基質として TMB を使用する抗ヒト抗体 HRP コンジュゲートおよび OD450 nm の吸光度測定により検出した。抗 HER2 および組換え ErbB2 - ECD を、分析対照として使用した (b)。

【図 5 c】ベクター、全長 DLL4、Jag1 または DLL1 により一過性にトランスフェクションした 293 細胞の FACS 分析。YW26.82 の有意な結合は、DLL4 にトランスフェクションされた細胞でのみ検出された (上部パネル)。Jag1 および DLL1 の発現は、組換えラットノッチ1 - Fc (rrノッチ1 - Fc、中央パネル) および組換えラットノッチ2 - Fc (rrノッチ2 - Fc、下部パネル) の結合により、それぞれ確認された。YW26.82、rrノッチ1 - Fc または rrノッチ2 - Fc (R&D システム社) は 2 µg/ml で使用され、ヤギ抗ヒト IgG - PE (1:500、ジャクソン・イムノリサーチ (Jackson ImmunoResearch) 社) が後続した (c)。

【図 5 d】抗 DLL4 抗体は、~12 nM の計算された IC50 で、コートされた rノッチ1 への DLL4 - AP の結合を阻害したが、DLL1 - AP の結合を阻害しなかった (左パネル)。抗 DLL4 の抗体は、~8 nM の計算された IC50 で、コートされた rノッチ1 への DLL4 - His の結合を阻害したが、Jag1 - His の結合を阻害しなかった。 (右パネル) (d)。

【図 5 e】e、内在的に発現する DLL4 への YW26.82 の特異的結合。対照、または DLL4 特異的 siRNA によりトランスフェクションされた HUVEC の FACS 分析。YW26.82 は 2 µg/ml で使用され、ヤギ抗ヒト IgG - PE (1:500、ジャクソン・イムノリサーチ社) が後続した (e)。

【図 6】図 6：ノッチ活性化による DLL4 のアップレギュレーション。HUVEC を、DBZ の非存在下または存在下 (0.08 µM) において、固定化 C 末端 His - タグ付加ヒト DLL4 (アミノ酸 1 ~ 404) によって刺激した。刺激の 36 時間後に、内在性の DLL4 発現を抗 DLL4 の抗体による FACS 分析によって検討した。

【発明を実施するための形態】

【0037】

(発明の詳細な説明)

一般的な技術

本明細書において記載または参照される技術および手順は、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー出版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. A

10

20

30

40

50

usubel, et al. 編、(2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (アカデミック出版社 (Academic Press, Inc.)): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor 編 (1995)), Harlow and Lane 編 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney 編 (1987))において記載される広く利用される方法のような、当業者により通常の方法を用いて、一般に十分に理解され、通常は利用される。

【0038】

10

定義

本明細書において使用されるように、用語「DLL4」(同じ意味で「デルタ様4」と呼ばれる)は、特にまたは文脈上で他の方法で示されない場合には、任意の天然DLL4ポリペプチドまたは変異型(天然または合成にかかわらず)DLL4ポリペプチドを指す。用語「天然配列」は、具体的には、天然に存在する短縮型または分泌型(例えば細胞外ドメイン配列)、天然に存在する変異型形態(例えばオルタナティブスプライス型)および天然に存在する対立遺伝子変異型を包含する。用語「野生型DLL4」は、一般に天然に存在するDLL4タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。用語「野生型DLL4配列」は、一般に天然に存在するDLL4において見出されるアミノ酸配列を指す。

20

【0039】

本明細書において使用されるように、用語「ノッチ受容体」(同じ意味で「ノッチ」と呼ばれる)は、特にまたは文脈上で他の方法で示されない場合には、任意の天然ノッチ受容体ポリペプチドまたは変異型(天然または合成にかかわらず)ノッチ受容体ポリペプチドを指す。ヒトは、4つのノッチ受容体(ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3およびノッチ4)を有する。本明細書において使用されるように、用語ノッチ受容体は、ヒトノッチ受容体の任意の1つまたは4つすべてを含む。用語「天然配列」は、具体的には、天然に存在する短縮型または分泌型(例えば細胞外ドメイン配列)、天然に存在する変異型形態(例えばオルタナティブスプライス型)および天然に存在する対立遺伝子変異型を包含する。用語「野生型ノッチ受容体」は、一般に天然に存在するノッチ受容体タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。用語「野生型ノッチ受容体配列」は、一般に天然に存在するノッチ受容体において見出されるアミノ酸配列を指す。

30

【0040】

上で定義されるように、「DLL4核酸」は、DLL4ポリペプチドをコードするRNAもしくはDNA、またはそのようなDNAもしくはRNAへハイブリダイズし、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で安定的に結合したままであり、長さで約10ヌクレオチド以上のものである。ストリンジェントな条件は、(1)洗浄のために低イオン強度および高温を利用するもの(例えば50で0.15M NaCl/0.015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム)、または(2)ハイブリダイゼーション間にホルムアミドのような変性剤を使用するもの(例えば42で50%(体積/体積)ホルムアミドと共に、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.5、750mM NaCl₂、75mMクエン酸ナトリウム)である。

40

【0041】

「キメラDLL4」分子は、異種のポリペプチドへ融合または結合された、全長DLL4またはその1つもしくは複数のドメインを含むポリペプチドである。キメラDLL4分子は、一般に、天然に存在するDLL4と共通の少なくとも1つ生物学的特性を共有するだろう。キメラDLL4分子の一例は、精製目的のためにエピトプタグを付加されたものである。別のキメラDLL4分子は、DLL4イムノアドヘジンである。

【0042】

50

用語「D L L 4 イムノアドヘジン」は、用語「D L L 4 - イムノグロブリンキメラ」と共に同じ意味で使用され、イムノグロブリン配列とD L L 4 分子（天然または変異型）の少なくとも一部を組み合わせるキメラ分子を指す。イムノグロブリン配列は、好ましくはイムノグロブリン定常ドメイン（F c 領域）であるが、必ずしもそうではなくてもよい。イムノアドヘジンは、ヒト抗体の有益な化学的特性および生物学的特性の多くを有することができる。適切なヒト免疫グロブリンヒンジおよび定常ドメイン（F c）配列へ結合された、所望される特異性を有するヒトタンパク質配列からイムノアドヘジンを構築することができるので、対象となる結合特異性は完全にヒトの成分を使用して達成することができる。そのようなイムノアドヘジンは、患者に対して最小限の免疫原性であり、連用または反復使用に対して安全である。いくつかの実施形態において、F c 領域は天然配列のF c 領域である。いくつかの実施形態において、F c 領域は変異型F c 領域である。いくつかの実施形態において、F c 領域は機能的なF c 領域である。

10

20

30

40

50

【0043】

治療的使用のために記載されるホモ多量体のイムノアドヘジンの具体例は、細胞表面CD4へのHIVの結合阻害のためのCD4 - IgGイムノアドヘジンを含む。CD4 - IgGが分娩直前に妊婦に対して投与された第I相臨床試験から得られたデータは、このイムノアドヘジンがHIVの母体 - 胎児間の移行の予防において有用かもしれないことを示唆する（Ashkenazi et al., Intern. Rev. Immunol. 10: 219 - 227 (1993)）。腫瘍壊死因子（TNF）を結合するイムノアドヘジンも開発されている。TNFは、敗血症性ショックの主な仲介因子であることが示される炎症誘発性サイトカインである。敗血症性ショックのマウスモデルに基づいて、TNF受容体イムノアドヘジンは、敗血症性ショックの治療における臨床用途のための候補としての将来性を示した（Ashkenazi, A. et al., PNAS USA 88: 10535 - 10539 (1991)）。エンブレル（ENBREL）（登録商標）（エタネルセプト）（IgGのF c領域に融合させたTNF受容体配列を含むイムノアドヘジン）は、1998年11月2日に関節リウマチの治療のためにアメリカ食品薬品局（FDA）により承認された。関節リウマチの治療におけるエンブレル（登録商標）の新しい発展した使用は、2000年6月6日にFDAにより承認された。エンブレル（登録商標）を含むTNF遮断薬についての最近の情報については、Lovell et al., N. Engl. J. Med. 342: 763 - 169 (2000) および810 ~ 811ページの付随の論説；ならびに Weinblatt et al., N. Engl. J. Med. 340: 253 - 259 (1999)；Maini and Taylor, Annu. Rev. Med. 51: 207 - 229 (2000)の総説を参照。

【0044】

イムノアドヘジン構造の2つのアームが異なる特異性を有するならば、イムノアドヘジンは二重特異性抗体に対する類似により「二重特異性イムノアドヘジン」と呼ばれる。Dietrich et al., J. Immunol. Methods 162: 123 (1993)は、接着分子のE - セレクチンおよびP - セレクチン（各々のセレクチンは天然では異なる細胞タイプにおいて発現される）の細胞外ドメインを組み合わせるような二重特異性イムノアドヘジンを記載する。結合試験から、そのように形成された二重特異性免疫グロブリン融合タンパク質は、それが由来した単一特異性イムノアドヘジンに比べて、骨髄細胞系への促進された結合能力を有することが示された。

【0045】

用語「ヘテロアドヘジン」は、表現「キメラヘテロ多量体アドヘジン」と同じ意味で使用され、各キメラ分子が、多量体化ドメインにより、各々のヘテロ多量体の受容体単量体の細胞外ドメインのような生物学的に活性のある部分を組み合わせる、キメラ分子（アミノ酸配列）の複合体を指す。「多量体化ドメイン」は、ヘテロ多量体複体内でキメラ分子の安定した相互作用を促進する。多量体化ドメインは、免疫グロブリン配列、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域、またはキメラヘテロ多量体のキメラ分子間の分子間

ジスルフィド結合を形成する遊離チオールを介して相互作用してもよい。多量体化ドメインは免疫グロブリン定常領域を含んでもよい。加えて、立体相互作用が安定した相互作用を促進するように、多量体化領域は操作されてもよいだけでなく、単量体の混合物からホモ二量体よりもヘテロ二量体の形成をさらに促進する。「突起」は、第1のポリペプチドの接触面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えばチロシンまたはトリプトファン）に置換することによって構築される。突起に対して同一または類似したサイズの代償的な「くぼみ」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えばアラニンまたはスレオニン）に置換することによって、第2のポリペプチドの接触面上に任意に生成される。免疫グロブリン配列は、好ましくは免疫グロブリン定常ドメインであるが、必ずしもそうでなくてもよい。本発明のキメラにおける免疫グロブリン部分は、I g G₁、I g G₂、I g G₃もしくは、I g G₄ サブタイプ、I g A、I g E、I g DまたはI g Mから得られてもよいが、好ましくはI g G₁またはI g G₃である。

10

20

30

40

50

【0046】

用語「Fc領域」は、天然配列のFc領域および変異型Fc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように本明細書において使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかもしれないが、ヒトI g G重鎖Fc領域は、通常、位置Cys 226でのアミノ酸残基から、またはPro 230から、そのカルボキシル末端へのストレッチに定義される。Fc領域のC末端のリジン（EUのナンバリングシステムに従って残基447）は、例えば抗体の産生または精製の間に、または抗体重鎖をコードする核酸を組換えにより操作することによって除去されてもよい。したがって、そのままの抗体の組成物は、すべてのK 447残基が除去された抗体集団、K 447残基が除去されていない抗体集団、およびK 447残基を持つおよび持たない抗体の混合物を有する抗体集団、を含んでもよい。

【0047】

特別の指示のない限り、本明細書において、免疫グロブリン重鎖中残基のナンバリングは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中のようなEUインデックスの番号付けであり、特に参照することにより本明細書に組み入れられる。「KabataのEUインデックス」は、ヒトI g G1のEU抗体残基ナンバリングを指す。

【0048】

「機能的なFc領域」は、天然配列の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受容体結合；抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーション、などを含む。そのようなエフェクター機能は、一般に結合ドメイン（例えば抗体可変ドメイン）とFc領域が組み合わせられることを必要とし、例えば、本明細書において開示されるような様々な分析を使用して評価することができる。

【0049】

「天然配列のFc領域」は天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列に同一のアミノ酸配列を含む。天然配列のヒトFc領域は、天然配列のヒトI g G1のFc領域（非AアロタイプおよびAアロタイプ）；天然配列のヒトI g G2のFc領域；天然配列のヒトI g G3のFc領域；および天然配列のヒトI g G4のFc領域に加えて、その天然に存在する変異型を含む。

【0050】

「変異型Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは1つまたは複数のアミノ酸置換によって、天然配列のFc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、天然配列のFc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、変異型Fc領域は、天然配列のFc領域中にまたは親ポリペプチドのFc領域中に、少なくと

も1つのアミノ酸置換、例えば約1～約10のアミノ酸置換、および好ましくは約1～約5のアミノ酸置換を有する。本明細書において変異型Fc領域は、好ましくは天然配列のFc領域とおよび/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の相同性、最も好ましくはそれと少なくとも約90%の相同性、より好ましくはそれと少なくとも約95%の相同性を有するだろう。

【0051】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から同定および分離および/または回収されるものである。その天然環境の混入物成分は、抗体の診断的使用または治療的使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク性溶質または非タンパク性溶質を含んでもよい。好ましい実施形態において、抗体は、(1)ローリー法により決定されるような抗体の重量で95%以上まで、および最も好ましくは重量で99%以上、(2)スピニングカップシークエネーターの使用によりN末端または内部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、または(3)クマシーブルーまたは好ましくは銀染色を使用する還元条件または非還元条件下のSDS-PAGEで均質であるまで精製されるだろう。抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離された抗体は組み換え細胞内のそのままの状態の抗体を含む。しかしながら、通常は単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程により調製されるだろう。

10

【0052】

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、最も広い意味において同じ意味で使用され、モノクローナル抗体(例えば全長または完全な形のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば所望される生物学的活性を示す限りは、二重特異性抗体)を含み、特定の抗体フラグメントもまた含んでもよい(より詳しく本明細書において記載されるように)。抗体は、ヒト、ヒト化および/または親和性成熟されうる。

20

【0053】

用語「可変」は、可変ドメインの特定の部分が抗体の中の配列において広範囲に異なり、各々の特定の抗体の結合および特異性で特定の抗原に対して使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインの全体にわたって均一に分布しない。それは、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方において、相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中する。可変ドメインのうちの保存性の高い部分はフレームワーク(FR)と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、主として - シート立体配置を取り入れ、 - シート構造を接続、およびいくつかの場合において - シート構造の一部を形成する、ループを形成する3つのCDRによって接続される4つのFR領域を含む。各鎖中のCDRは、他の鎖からのCDRと共にFR領域により隣接して保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照)。定常ドメインは抗体を抗原への結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

30

40

【0054】

抗体のパパイン消化は、「Fab」フラグメントと呼ばれ、各々は単一の抗原結合部位を備えた2つの同一の抗原結合フラグメント、および残りの1つの「Fc」フラグメント(この名称は容易に結晶化する能力を反映する)を産生する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有しており、抗原をなお架橋することができるF(ab')₂フラグメントを産出する。

【0055】

「Fv」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。二本鎖Fv種において、この領域は、緊密な非共有結合性会合で1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv種において、軽鎖および重鎖が二本

50

鎖 F v 種のもものと類似した「二量体」構造で結合させることができるように、1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインは、柔軟なペプチドリンカーにより共有結合する。VH - VL 二量体の表面上の抗原結合部位を定義するように、各可変ドメインの3つのCDRは、この立体配置で相互作用する。まとめると、6つのCDRは、抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかしながら、完全な結合部位よりも低い親和性でだが、単一の可変ドメイン（すなわち抗原に対して特異的な3つのCDRのみしか含まない、Fvの半分）でさえ、抗原を認識し結合する能力を有している。

【0056】

Fabフラグメントは、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）もまた含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数残基の追加により、Fabフラグメントとは異なる。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有するFab'についての本明細書における名称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、それらの間にヒンジシステインを有するペアのFab'フラグメントとしてもともと産生された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングもまた公知である。

10

【0057】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる、2つの明らかに異なるタイプのものへ割り当てることができる。

20

【0058】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスへ割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの5つの主要なクラスの免疫グロブリンがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2（アイソタイプ）へとさらに分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する、重鎖定常ドメインは、 α 、 δ 、 ϵ 、および μ とそれぞれ呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。

【0059】

「抗体フラグメント」は、完全な形の抗体の一部のみを含み、その一部は、完全な形の抗体中に存在する場合にその一部に通常は関連する少なくとも1つの、好ましくは大部分またはすべての機能を好ましくは保持する。抗体フラグメントの具体例は、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；ダイアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含む。1つの実施形態において、抗体フラグメントは、完全な形の抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原を結合する能力を保持する。別の実施形態において、抗体フラグメント（例えばFc領域を含むもの）は、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能および補体結合のような、完全な形の抗体中にある場合にFc領域に通常は関連する生物学的機能の少なくとも1つを保持する。1つの実施形態において、抗体フラグメントは、完全な形の抗体に実質的に類似するインビボ半減期を有する一価抗体である。例えば、そのような抗体フラグメントは、フラグメントに対してインビボの安定性を付与することができるFc配列に連結された抗原結合アームを含んでもよい。

30

40

【0060】

用語「超可変領域」、「HVR」または「HV」は、本明細書において使用される場合、配列において超可変であり、および/または構造的に定義されるループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は6つの超可変領域の、3つのVH（H1、H2、H3）、および3つのVL（L1、L2、L3）を含む。多数の超可変領域の概要説明が使用されており、本明細書において包含される。Kabattの相補性決定領域（CDR）は配列可変性に基づき、最も一般に使用されるものである（Kabatt et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Servic

50

e, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia は、代わりに構造的ループの位置に言及する (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). AbM 超可変領域は、Kabat の CDR および Chothia の構造的ループの間の折衷案を表わし、オックスフォード・モレキュラー (Oxford Molecular) 社の AbM 抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」超可変領域は利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらの超可変領域の各々からの残基は以下に示される。

【0061】

【表 1 - 2】

10

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat ナンバリング)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia ナンバリング)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

20

超可変領域は「拡張された超可変領域」を以下のとおり含んでもよい：VL において 24 - 36 または 24 - 34 (L1)、46 - 56 または 50 - 56 (L2) および 89 - 97 (L3)、ならびに VH において 26 - 35 (H1)、50 - 65 または、49 - 65 (H2) および 93 - 102、94 - 102 または 95 - 102 (H3)。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々に対して、Kabat et al. (前出) に従ってナンバリングされる。

30

【0062】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書において定義されるような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0063】

本明細書において使用されるような用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団からの抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、モノクローナル抗体の産生の間に生じる可能性のある一般に少量で存在するそのような変異型を除いて、同一であり、および/または同種類のエピトープを結合する。そのようなモノクローナル抗体は、典型的には標的を結合するポリペプチド配列を構成する抗体を含み、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含む過程により得られた。例えば、選択過程は、ハイブリドーマクローン、ファージクローンまたは組換え DNA クローンのプールのような複数のクローンからの特有のクローンの選択でありえる。例えば、標的に対する親和性を改善するために、標的結合配列をヒト化するために、細胞培養でその産生を改善するために、インビボでその免疫原性を低下させるために、多重特異性抗体を生成するなどのために、選択された標的結合配列をさらに改変することができること、および改変された標的結合配列を含む抗体もまた本発明のモノクローナル抗体であることが理解されるに違いない。異なる決定基 (エピトープ) に対して作製された異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のうちの各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して作製

40

50

される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、他の免疫グロブリンが典型的には混入していないことで有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に抗体の均質集団から得られるような抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすることとして解釈しない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ方法を含む様々な技術により作製されてもよい（例えば Kohler et al., Nature, 256:495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー出版、第2版、1988年); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (エルゼビア(Elsevier)、ニューヨーク1981年))、組換えDNA法（例えば米国特許第4,816,567号を参照）、ファージディスプレイ技術（例えば Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); and Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)を参照）、およびヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座または遺伝子の一部またはすべてを有する動物におけるヒトまたはヒト様抗体の産生のための技術（例えば WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); 米国特許番号5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (すべてジェンファーム(GenPharm)社); 5,545,807; WO 1997/17852; 米国特許番号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; および 5,661,016; Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)を参照)。

【0064】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。大部分については、ヒト化抗体は、所望される特異性、親和性および受容能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒトの霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によりレシピエントの超可変領域からの残基が置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの実例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は対応する非ヒト残基により置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾はさらに抗体性能を改良するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループはすべてまたは実質的にすべて非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FRがすべてまたは実質的にすべてヒト免疫グロブリン配

列のFRである、少なくとも1つの、および典型的には2つの可変ドメインを実質的にすべて含むだろう。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)(典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域)の少なくとも一部もまた任意に含むだろう。より詳細には、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照。以下の総説論文、およびその中に引用される参照もまた参照: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

10

20

30

40

50

【0065】

「キメラ」抗体(免疫グロブリン)は、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同の重鎖および/または軽鎖の一部を有し、一方それらが所望される生物学的活性を示す限りそのような抗体のフラグメントに加えて、鎖の残りは、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である(米国特許第4,816,567号; および Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。本明細書において使用されるようなヒト化抗体はキメラ抗体のサブセットである。

【0066】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体フラグメントは、抗体のVHドメインおよびVLドメインを含み、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖で存在する。一般に、scFvポリペプチドは、抗原結合の所望される構造をscFvが形成することを可能にする、VHドメインとVLドメインとの間のポリペプチドリinkerをさらに含む。scFvの総説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)中のPluckthunを参照。

【0067】

「抗原」は抗体が選択的に結合できる所定の抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテンまたは他の天然に存在する化合物もしくは合成物化合物であってもよい。好ましくは、標的抗原はポリペプチドである。

【0068】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を備えた小抗体フラグメントを指し、そのフラグメントは、同じポリペプチド鎖(VH-VL)中で軽鎖可変ドメイン(VL)に結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同一鎖上の2つのドメイン間の対合が可能でないほど短いリンカーの使用により、ドメインは、別の鎖の相補ドメインとの対合を強いられ、2つの抗原結合部位を生成する。例えば、ダイアボディはより完全にEP 404,097; WO 93/11161; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中に記載される。

【0069】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生産されるおよび/または本明細書において開示されるようなヒト抗体の作製のための技術のいずれかを使用して作製される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原を結合する残基を含むヒト化抗体を特異的に除外する。

【0070】

「親和性成熟」抗体は、それらの変化を持たない親抗体と比較して、抗原に対する抗体

の親和性の改善を結果的にもたらず、1つまたは複数のそのCDR中の1つまたは複数の変化を備えたものである。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモルまたはピコモルの親和性を有するだろう。親和性成熟抗体は当技術分野において公知の手順により産生される。Marks et al., Bio/Technology 10 : 779 - 783 (1992) は、VHおよびVLのドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載する。CDRおよび/またはフレームワーク残基のランダム変異誘発は以下により記載される: Barbas et al., Proc Natl. Acad. Sci., USA 91 : 3809 - 3813 (1994); Schier et al., Gene 169 : 147 - 155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155 : 1994 - 2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154 (7) : 3310 - 9 (1995); および Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226 : 889 - 896 (1992)。

【0071】

抗体「エフェクター機能」は抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異型Fc領域）に起因するそれらの生物学的活性を指し、抗体アイソタイプに応じて変化する。抗体エフェクター機能の具体例は、C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体）のダウンレギュレーション；およびB細胞活性化を含む。

【0072】

「抗体依存性細胞性細胞傷害」または「ADCC」は、特定の細胞傷害性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）上に結合される分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞へ特異的に結合することを可能にし、続いて細胞毒素により標的細胞を殺す、細胞傷害形態を指す。抗体は細胞傷害性細胞を「武装」させ、そのような死滅のために完全に必要とされる。ADCCの仲介のための一次細胞（NK細胞）はFcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞に関するFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 : 457 - 92 (1991) の464ページの表3に要約される。

対象となる分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号またはPresta米国特許6,737,056番に記載されるもののようなインビトロのADCC分析は行なわれてもよい。そのような分析のための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞を含んでいる。あるいはまたは加えて、対象となる分子のADCC活性は、例えばClynes et al., PNAS (USA) 95 : 652 - 656 (1998) 中に開示されるもののような動物モデルにおいてインビボで評価されてもよい。

【0073】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは複数のFcRを発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。好ましくは、細胞は少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを仲介するヒト白血球の具体例は末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞障害性T細胞および好中球を含み；PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は天然ソースから、例えば血液から単離されてもよい。

【0074】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。好ましいFcRは天然配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）を結合し、これらの受容体の対立遺伝子変異型およびオルタナティブスプライス型を含む、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIサブクラスを受容体を含むものである。FcRII受容体は、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「阻害性受容体」）を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインで異

10

20

30

40

50

なる、類似したアミノ酸配列を有する。受容体FcRIIAの活性化は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害性受容体FcRIIBはその細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITIM)を含む(総説M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)を参照)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)中で概説される。今後同定されるそれらを含む他のFcRは、用語「FcR」により本明細書において包含される。この用語は、新生仔受容体(胎児への母体IgGの移行に關与するFcRn)もまた含み(Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994))免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する。

【0075】

WO00/42072(Presta)は、改良または減少したFcRへの結合を備えた抗体変異型を説明する。特許公報の内容は、参照することにより特に本明細書に組み入れられる。Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照。

【0076】

FcRnへの結合を測定する方法は公知である(例えばGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。ヒトFcRnへのインビボでの結合およびヒト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もしくはトランスフェクションされたヒト細胞株、またはFc変異型ポリペプチドを投与された霊長類において分析できる。

【0077】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体の存在下における標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、それらの同種抗原へ結合される抗体(適切なサブクラス)へ補体系の第1の成分(C1q)の結合により開始される。補体活性化を評価するために、CDC分析を、例えばGazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)中に記載されるように、実行してもよい。

【0078】

改変されたFc領域アミノ酸配列および増加または低下したC1q結合能を有するポリペプチド変異型は、米国特許第6,194,551B1号およびWO99/51642中に記載される。それらの特許公報の内容は、参照することにより特に本明細書に組み入れられる。Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)もまた参照。

【0079】

用語「Fc領域含有ポリペプチド」は、Fc領域を含む、抗体またはイムノアドヘジン(下記の定義を参照)のようなポリペプチドを指す。Fc領域のC末端リジン(EUNANパリングシステムに従う残基447)は、例えば、ポリペプチドの精製の間に、またはポリペプチドをコードする核酸の組換え操作によって除去されてもよい。したがって、本発明に従うFc領域を有するポリペプチドを含む組成物は、K447を持つポリペプチド、すべてのK447が除去されたポリペプチド、またはK447残基を持つおよび持たないポリペプチドの混合物を含むことができる。

【0080】

「遮断」抗体または「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または低下させる抗体である。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、実質的にまたは完全に抗原の生物学的活性を阻害する。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

「長期」投与は、長期間最初の治療的効果（活性）を維持するように、短期様式とは対照的な継続的様式の薬剤の投与を指す。「間欠」投与は、中断なしで引き続いて行われな

【 0 0 8 2 】

「障害」または「疾患」は、物質／分子による治療または本発明の方法から利益を得る任意の状態である。これは、問題となる障害へ哺乳類を罹患しやすくする病理学的状態を含む長期および短期の障害または疾患を含んでいる。本明細書において治療される障害の非限定的具体例は悪性腫瘍および良性腫瘍；癌腫、芽細胞腫ならびに肉腫を含む。

【 0 0 8 3 】

用語「細胞増殖障害」および、「増殖障害」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。1つの実施形態において、細胞増殖障害は癌である。

【 0 0 8 4 】

「腫瘍」は、本明細書において使用されるように、悪性または良性にかかわらず、すべての新生細胞の成長および増殖、ならびにすべての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。本明細書において言及されるような、用語「癌」、「癌性」、「細胞増殖障害」「増殖障害」および「腫瘍」は相互に排他的ではない。

【 0 0 8 5 】

用語「癌」および「癌性」は、無秩序な細胞成長／増殖によって典型的には特徴づけられる、哺乳類における生理学的状態を指すかまたは説明する。癌の具体例は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 6 】

そのような癌のより詳細な具体例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌、膵臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、メラノーマおよび様々なタイプの頭頸部癌を含む。血管形成の調節異常は、本発明の組成物および方法によって治療できる多くの障害をもたらす。これらの障害は、非新生物性症状および新生物性症状の両方を含んでいる。新生物は、上で説明されたものを含むが、これらに限定されない。非新生物性障害は、所望されないまたは異常な肥大、関節炎、関節リウマチ（R A）、乾癬、乾癬性局面、類肉腫症、アテローム性動脈硬化、アテローム斑、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含む他の増殖性網膜症、後水晶体線維形成症、血管新生緑内障、加齢黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植後拒絶反応、網膜／脈絡膜血管新生、隅角の血管新生（ルベオーシス）、眼血管新生疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（A V M）、髄膜腫、血管腫、線維性血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷／A R D S、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性肺水、脳水腫（例えば、急性脳卒中／閉鎖性頭部外傷／外傷と関連する）、滑膜炎、R Aにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大型骨形成、骨関節炎（O A）、難治性腹水症、多嚢胞卵巣、子宮内膜症、体液のサードスペースへの移行に関する疾患（3 r d s p a c i n g o f f l u i d d i s e a s e）（膵炎、隔壁腔症候群、熱傷、腸疾患）、子宮筋腫、早産、I B Dのような慢性炎症（クローン病および潰瘍性大腸炎）、腎臓同種移植拒絶、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、所望されないまたは異常な組織量の増殖（非癌）、血友病性関節、肥厚性瘢痕、髪の毛の成長の阻害、オジェ・ウェーバー（O s i e r - W e b e r）症候群、化膿性肉芽腫後水晶体線維形成症、硬皮症、トラホーム、血管の癒着、関節滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心膜液貯留（心膜炎に関連するもののような）、ならびに胸水を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 8 7 】

本明細書において使用されるように、「治療」は、治療されている個体または細胞の自然経過を改変しようとする、臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理学の過程

10

20

30

40

50

の間のいずれかで実行することができる。治療の望ましい効果は、疾患の発生または再発の予防、病徴の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患進行率の低下、病状の改良または緩和、および寛解または予後の改善を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、疾患または障害の発生を遅延させるために使用される。

【0088】

「個体」は脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトである。哺乳類は、酪農動物（ウシのような）、競技動物、ペット（ネコ、イヌおよびウマのような）、霊長類、マウスおよびラットを含むが、これらに限定されない。

【0089】

治療目的の「哺乳類」は、ヒト、家畜および酪農動物、ならびにイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどのような、動物園動物、競技動物またはペット動物を含む、哺乳類として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳類はヒトである。

【0090】

「有効量」は、所望される治療的または予防的な結果を達成する、投与量でのおよび必要な期間での、有効な量を指す。

【0091】

物質／分子の「治療的有效量」は、病状、個体の年齢、性別および体重のような因子、ならびに物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストが個体において所望される反応を誘発する能力に従って変化してもよい。治療的有效量は、治療上有益な効果が、物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの任意の毒性効果または損傷効果を上回るものでもある。「予防的有效量」は、所望される予防的な結果を達成する、投与量でのおよび必要な期間での、有効な量を指す。典型的には、予防的用量が疾患の初期段階の前にまたは初期段階で、被験体において使用されるので、予防的有效量は治療的有效量よりも少ないが、必ずしもそうでなくてもよい。

【0092】

本明細書において使用されるような用語「細胞傷害剤」は、細胞の機能を阻害または防止する、および／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} および Lu の放射性同位体）、化学療法剤（例えばメトトレキサート、アドリアマイシン（*adriamycin*）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブチル、ダウノルビシンまたは他のインターカレーター、核酸分解酵素のような酵素およびそのフラグメント、抗生物質、ならびにそのフラグメントおよび／または変異型を含む、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の低分子毒素または酵素により活性のある毒素のような毒素）、および以下に開示される様々な抗腫瘍剤または抗癌剤を含むように意図される。他の細胞傷害剤は以下に記載される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0093】

「化学療法剤」は癌の治療において有用な化学化合物である。化学療法剤の具体例は、チオテパおよびサイトキサン（*CYTOXAN*）（登録商標）シクロスフォスファミド（*cyclophosphamide*）のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンのようなアルキルスルホネート；ベンゾドーパ（*benzodopa*）、カルボコン、メツレドーパ（*meturedopa*）およびウレドーパ（*uredopa*）のようなアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド（*triethylenephosphoramidate*）、トリエチレンチオホスホルアミド（*triethylenethiophosphoramidate*）およびトリメチローロメラミン（*trimethylolomelamine*）を含むエチレンイミンおよびメチラメルアミン（*methyramelamine*）；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン（*bullatacinone*））； -

10

20

30

40

50

9 - テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、マリノール (MARINOL) (登録商標)) ; - ラパコン ; ラパコール ; コルヒチン ; ベツリン酸 ; カンプトテシン (合成アナログのトポテカン (ハイカムチン (HYCAMTIN) (登録商標))、CPT-11 (イリノテカン、カンプトサル (CAMPOTOSAR) (登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン (scopolectin)、および 9 - アミノカン
 プトテシンを含む) ; プリオスタチン ; カリスタチン ; CC-1065 (そのアドゼレシ
 ン、カルゼレシンおよびビゼレシンの合成アナログを含む) ; ポドフィロトキシ
 ン ; ポドフィリン酸 ; テニポシド ; クリプトフィシン (特にクリプトフィシン 1 およびクリプト
 フィシン 8) ; ドラスチン ; デュオカルマイシン (合成アナログ、kW-2189 および C
 B1-TM1 を含む) ; エルーテロビン (eleutherobin) ; パンクラチスタ
 チン (pancratistatin) ; サルコジクチン (sarcodictyin)
 ; スポンジスタチン (spongistatin) ; クロラムブチル、クロルナファジン
 、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホス
 ファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビチ
 ン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、ブレドニ
 ムスチン、トロホスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタードのよう
 なナイトロジェンマスタード ; カルマスティン、クロロゾトシン、ホテムスチン (fo
 temustine)、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン (ranimnus
 tine) のようなニトロスウレア (nitrosurea) ; エンジン抗生物質 (例
 えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマール (gamma11) およびカリ
 ケアマイシンオメガール (omegal1) のような抗生物質 (例えば Agnew, C
 hem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994) を
 参照) ; ダイネミシン A を含む ダイネミシン ; エスペラミシン (esperamicin)
 ; に加えてネオカルチノスタチン発色団および関連した色素タンパク質エンジンアン
 ティオビオティック (antibiotic) 発色団)、アクラシノマイシン (acl
 acinomycin)、アクチノマイシン、アスラマイシン (authramycin)
 、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)
 、カルミノマイシン、カルジオリピン、クロモマイシニス (chromomycinis
 s)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L
 - ノルロイシン、アドリアマイシン (ADRIAMYCIN) (登録商標) ドキソルピシ
 ン (モルホリノ - アドリアマイシン、シアノモルホリノ - アドリアマイシンおよび 2 - ピ
 ロリノ (pyrrolino) - アドリアマイシンおよびデオキシアドリアマイシンを含
 む)、エピルピシン、エソルピシン (esorubicin)、イダルピシン、マルセロ
 マイシン (marcellomycin)、マイトマイシン C のようなマイトマイシン、
 ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、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、ケラマイシン (quelamycin)、rodorubicin、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシ
 ジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン ; メトトレキサートおよび 5 - フルオロ
 ウラシル (5-FU) のような抗代謝物質 ; デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブ
 テリン、トリメトレキサートのような葉酸アナログ ; フルダラビン、6 - メルカプトブリ
 ン、チアミプリン (thiamiprine)、チオグアニンのようなプリンアナログ ;
 アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキ
 シウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンのようなピリミジンア
 ナログ ; カルステロン、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、テストラクトンのようなアンドロゲン ; 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物質 (anti-adrenal) ; フロリン酸 (frolinic
 acid) のような葉酸リプレニッシャー ; アセグラトン ; アルドホスファミド配糖
 体 ; アミノレブリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル (bestra
 bucil) ; ビスアントレン (bisantrene) ; エダトラキセート (edat
 raxate) ; デホファミン (defofamine) ; デメコルチン ; ジアジコン ;

エルフォルニチン (elfornithine) ; 酢酸エリブチニウム (elliptinium) ; エボチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシウレア ; レンチナン ; ロニダイニン (lonidainine) ; メイタンシンのようなメイタンシノイドおよびアンサマイトシン ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール (mopidamol) ; 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 ; ロソキサントロン ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; PSK (登録商標) ポリサッカライド複合体 (JHS ナチュラル・プロダクツ (Natural Products) 社、ユージーン、オレゴン) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクオン ; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特に T - 2 毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridin) A およびアングイジン (anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン (エルディシン (ELDISINE) (登録商標)、フィルデシン (FILDESIN) (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール ; ビボプロマン ; ガシトシン (gacytosine) ; アラビノシッド (「アラ C」) ; チオテバ ; タキソイド、例えばタキソール (TAXOL) (登録商標) パクリタキセル (ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・オンコロジー (Bristol-Myers Squibb Oncology) 社、プリンストン、ニュージャージー)、アブラキサン (ABRAXANE) (商標) クレモフォル不含、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方 (アメリカン・ファーマシューティカル・パートナーズ (American Pharmaceutical Partners) 社、シャンバーグ、イリノイ)、およびタキソテル (TAXOTERE) (登録商標) doxetaxel (ローヌ・プーラン・ローラー (Rhône-Poulenc Rorer) 社、アントニー、フランス) ; クロランブシル (chloranbucil) ; ゲムシタピン (ジェムザール (GEMZAR) (登録商標)) ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; シスプラチンおよびカルボプラチンのような白金アナログ ; ビンブラスチン (ベルバン VELBAN (登録商標)) ; 白金 ; エトボシド (VP - 16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチン (オンコビン (ONCOVIN) (登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボビン (leucovorin) ; ビノレルビン (ナベルビン (NAVELBINE) (登録商標)) ; ノバントロン ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロネート ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイン酸のようなレチノイド ; カペシタビン (ゼローダ (XELODA) (登録商標)) ; 上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体 ; 加えて CHOP (シクロホスファミド、ドキソルピシン、ピンクリスチンおよびブレドニゾロンの組合せ療法の略語) および FOLFOX (5 - FU およびロイコボビンと組合せるオキサリプラチン (エロキサチン (ELOXATIN) (商標)) による治療計画の略語) のような上述の 2 つまたは複数の組合せ、を含む。

【0094】

さらにこの定義に含まれるものは、癌の増殖を促進できるホルモンの効果を調節、低下、遮断、または阻害するように作用する抗ホルモン剤であり、しばしば全身投与形態、または全身的治療である。それらはホルモン自体であってもよい。具体例は、(例えば) タモキシフェン (ノルパデックス (NOLVADEX) (登録商標) タモキシフェンを含む)、エビスタ (EVISTA) (登録商標) ラロキシフェン、ドロロキシフェン、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)、LY1 17018、オナプリストン (onapristone)、およびフェアストン (FARESTON) (登録商標) トレミフェンを含む抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) ; 抗プロゲステロン ; エストロゲン受容体のダウンレギュレーター (ERD) ; 卵巣を抑制または停止するように機能する薬剤、例えばリュプロン (LUPRON) (登録商標) およびエリガード (ELIGARD) (登録商標) 酢酸ロイプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンお

10

20

30

40

50

よびトリプトレリンのような黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト；フルタミド、ニルタミドおよびピカルタミドのような他の抗アンドロゲン；および酵素アロマトラーゼを阻害するアロマトラーゼ阻害剤（例えば4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、メゲース（MEGASE）（登録商標）酢酸メゲストロール、アロマシン（AROMASIN）（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタニー（formestane）、ファドロゾール、リビゾール（RIVISOR）（登録商標）ボロゾール、フェマール（FEMARA）（登録商標）レトロゾールおよびアリミデックス（ARIMIDEX）（登録商標）アナストロゾールのような、副腎におけるエストロゲン産生を調節するもの）を含む。さらに化学療法剤のそのような定義は、クロドロネート（例えばボネフォス（BONEFOS）（登録商標）またはオスタック（OSTAC）（登録商標））、ジドロカル（DIDROCAL）（登録商標）エチドロネート、NE-58095、ゾメタ（ZOMETA）（登録商標）ゾレドロン酸／ゾレドロナート、フォサマックス（FOSAMAX）（登録商標）アレンドロネート、アレディア（ARELIA）（登録商標）パミドロネート、スケリッド（SKELID）（登録商標）チルドロネートまたはアクトネル（ACTONEL）（登録商標）リセドロネートのようなビスホスホネート；トロキサシタピン（1，3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）に加えて；アンチセンスオリゴヌクレオチド（特に例えばPKC、Raf、H-Rasおよび表皮増殖因子受容体（EGF-R）のような異常な細胞増殖に関係するシグナル経路中の遺伝子の発現を阻害するもの）；セラトープ（THERATOPE）（登録商標）ワクチンおよび遺伝子療法ワクチンのようなワクチン（例えばアロベクチン（ALLOVECTIN）（登録商標）ワクチン、リューベクチン（LEUVECTIN）（登録商標）ワクチン、バキシド（VAXID）（登録商標）ワクチン）；ルルトテカン（LURTOTECAN）（登録商標）トポイソメラーゼ1阻害剤；アバレリクス（ABARELIX）（登録商標）rmRH；ラパチニブトシル酸（GW572016としてもまた公知のErbb-2およびEGFRのデュアルチロシンキナーゼ低分子阻害剤）；および上述の任意のものの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含む。

【0095】

「増殖阻害剤」は、本明細書において使用された場合、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞（DLL4を発現する細胞のような）の増殖を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、増殖阻害剤は、S期にある細胞（DLL4を発現する細胞のような）のパーセンテージを著しく低下させるものでありえる。増殖阻害剤の具体例は、G1期停止およびM期停止を誘導する薬剤のような、細胞周期進行（S期以外の場所での）を遮断する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン、ならびにドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシドおよびブレオマイシンのようなトポイソメラーゼII阻害剤を含んでいる。G1期を停止する薬剤は、さらにS期停止へと波及し、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-フルオロウラシルおよびアラCのようなDNAアルキル化剤である。さらに詳しい情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, 編、(WBサンダース(Saunders)：フィラデルフィア、1995年)チャプター1、Murakami et al. による表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」、特にページ13において見出すことができる。タキサン（パクリタキセルおよびドセタセル）は両者ともセイヨウイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパのイチイに由来するドセタセル（タキシテール（TAXOTERE）（登録商標）、ローヌ・プーラン・ローラー社）は、パクリタキセル（タキソール（TAXOL）（登録商標）、プリストル・マイヤーズ・スクイブ社）の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進および解重合の防止によって微小管を安定化し、それは細胞中の有糸分裂の阻害をもたらす。

【0096】

10

20

30

40

50

「ドキシソルピシン」はアントラサイクリン系抗生物質である。ドキシソルピシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0097】

「眼内血管新生疾患」は、眼の血管新生により特徴づけられる疾患である。眼内血管新生疾患の具体例は、増殖性網膜症、脈絡膜血管新生(CNV)、加齢黄斑変性(AMD)、糖尿病性および他の虚血関連の網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォンヒッペル-リンダウ病、眼のヒストプラズマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)を含む網膜静脈閉塞、角膜血管新生、網膜血管新生などを含むが、これらに限定されない。

10

【0098】

疾患の「病理」は、患者の健康を損なう現象をすべて含む。癌については、これは異常または制御できない細胞増殖および転移、隣接の細胞の正常な機能の妨害、異常レベルでのサイトカインまたは他の分泌物の放出、炎症反応または免疫反応の抑制または増悪などを含むが、これらに限定されない。

【0099】

1つまたは複数のさらなる治療剤との「組合せ」での投与は、同時(併用)投与および任意の順番での連続投与を含む。

【0100】

本明細書において使用されるような「担体」は、用いられる投与量および濃度でそれらに暴露されている細胞または哺乳類に対して無毒である、薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤を含む。生理学的に許容される担体は、しばしば水溶性のpH緩衝液である。生理学的に許容される担体の具体例は、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量(約10残基以下の)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジンのようなアミノ酸；単糖、二糖類、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成カウンターイオン；および/またはツイーン(TWEEN)(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)およびプルロニクス(PLURONICS)(商標)のような非イオン性界面活性剤を含む。

20

30

【0101】

「リポソーム」は、哺乳類へ薬物(DLL4ポリペプチドまたはそれに対する抗体のような)の送達に有用である、様々なタイプの脂質、リン脂質および/または界面活性剤からなる小さな小胞である。リポソームの成分は一般に、二重層形成(生体膜の脂質配置に類似する)で配置される。

【0102】

用語「VEGF」および「VEGF-A」は、Leung et al. Science, 246:1306 (1989), Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), and, Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5):853-865 (2001)により説明されるように、天然に存在する対立遺伝子およびそのプロセシングされた型と共に、165アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子および関連する121、145、183、189および206アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子を指すように同じ意味で使用される

40

「VEGFアンタゴニスト」は、1つまたは複数のVEGF受容体へのその結合を含むVEGF活性を、中和、遮断、阻害、停止、減少または妨害してできる分子を指す。VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体およびその抗原結合フラグメント、VEGFに特異的に結合することによって1つまたは複数の受容体へのその結合を隔離する受容体分子

50

および誘導体、抗VEGF受容体抗体およびVEGFRチロシンキナーゼの低分子阻害剤のようなVEGF受容体アンタゴニスト、ならびに融合タンパク質（例えばVEGFトラップ（リジェネロン（Regeneron）社）、VEGF121ゲロニン（ペレグリン（Peregrine）社））を含む。VEGFアンタゴニストは、VEGFのアンタゴニスト変異型、VEGFに向けられたアンチセンス分子、RNAアプタマー、およびVEGFまたはVEGF受容体に対するリボザイムもまた含む。

【0103】

「抗VEGF抗体」は十分な親和性および特異性によりVEGFに結合する抗体である。抗VEGF抗体は、VEGF活性が関与する疾患または症状を標的および妨害することで治療剤として使用することができる。例えば、米国特許6,582,959および6,703,020；WO98/45332；WO96/30046；WO94/10202、WO2005/044853；EP 0666868B1；米国特許出願20030206899、20030190317、20030203409、20050112126、20050186208および20050112126；Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004)；およびWO2005012359を参照。抗VEGF抗体は、通常VEGF-BまたはVEGF-Cのような他のVEGFホモログにも、PlGF、PDGFまたはbFGFのような他の増殖因子にも結合しない。「rhumAb VEGF」または「アバスチン（登録商標）」としてもまた公知の抗VEGFの抗体「ベバシズマブ（BV）」は、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)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る。それは、受容体へのヒトVEGFの結合を遮断するマウス抗hVEGFモノクローナル抗体A.4.6.1から変異させた、ヒトIgG1フレームワーク領域および抗原結合相補性決定領域を含む。大部分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%はヒトIgG1に由来し、配列の約7%はマウス抗体A4.6.1に由来する。ベバシズマブは、約149,000のダルトンの分子量を有しており糖鎖が付加する。抗VEGF抗体フラグメント「ラニズマブ」（「ルセンチス（Lucentis）（登録商標）」としてもまた公知）を含む、ベバシズマブおよび他のヒト化抗VEGF抗体は、2005年2月26日に発行された米国特許第6,884,879号にさらに記載されている。

10

20

30

【0104】

DLL4ポリペプチドに関する、用語「生物学的活性」および「生物学的に活性のある」は、DLL4に関連した物理的/化学的性質および生物学的機能を指す。いくつかの実施形態において、DLL4の「生物学的活性」は、以下の1つ以上を含んでいる：ノッチ受容体（例えばノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4）の結合、ノッチ受容体の活性化、およびノッチ受容体下流の分子シグナリングの活性化。この文脈において、用語「調節する」は、促進および阻害の両方を含む。

【0105】

「DLL4アンタゴニスト」は、例えば、ノッチ受容体活性化の減少または遮断、ノッチ受容体下流の分子シグナリングの減少または遮断、DLL4へのノッチ受容体の結合の破壊または遮断、および/または内皮細胞増殖の促進、および/または内皮細胞分化の阻害、および/または動脈分化の阻害を含む、DLL4の活性を中和、遮断、阻害、停止、減少または妨害できる分子を指す。DLL4アンタゴニストは、抗体およびその抗原結合フラグメント、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、核酸、生体有機分子、ペプチド模倣薬、薬物およびその代謝物質、転写制御配列および翻訳制御配列、ならびに同種のものを含む。アンタゴニストは、タンパク質の低分子阻害剤、および融合タンパク質、タンパク質に特異的に結合することによってその標的へのその結合を隔離する受容体分子および誘導体、タンパク質のアンタゴニスト変異型、siRNA分子、タンパク質に向けられたアンチセンス分子、タンパク質に向けられたRNAアプタマー、ならびにタンパク質に対するリボザイムもまた含

40

50

む。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、D L L 4 と結合し、D L L 4 の生物学的活性を中和、遮、阻害、停止、減少または妨害する分子である。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、ノッチ受容体（ノッチ 1、ノッチ 2、ノッチ 3 および / または ノッチ 4 のような）と結合し、D L L 4 の生物学的活性を中和、遮断、阻害、停止、減少または妨害する分子である。いくつかの実施形態において、D L L 4 アンタゴニストは、ノッチ受容体活性化の減少または遮断、ノッチ受容体下流の分子シグナリングの減少または遮断、D L L 4 へのノッチ受容体の結合の破壊または遮断、および / または内皮細胞増殖の促進、および / または内皮細胞分化の阻害、および / または動脈分化の阻害、および / または腫瘍の血管灌流の阻害、および / または腫瘍、細胞増殖障害または癌の治療および / または予防；および / または D L L 4 発現および / または活性および / または治療に関連した障害の治療または予防、またはノッチ受容体発現および / または活性に関連した障害の予防の 1 つまたは複数のいずれかを含むが、これらに限定されない、D L L 4 に関連する効果の 1 つまたは複数の態様を調節する。

10

20

30

40

50

【0106】

用語「抗新生物組成物」は、少なくとも 1 つの活性のある治療剤（例えば「抗癌剤」）を含む、癌の治療において有用な組成物を指す。治療剤（本明細書において「抗新生物剤」と呼ばれる抗癌剤）の具体例は、例えば化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、放射線療法において使用される薬剤、抗血管形成剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、毒素、ならびに癌を治療する他の薬剤、例えば、抗 V E G F 中和抗体、V E G F アンタゴニスト、抗 - H E R - 2、抗 C D 2 0、表皮増殖因子受容体（E G F R）アンタゴニスト（例えばチロシンキナーゼインヒビター）、H E R 1 / E G F R 阻害剤、エルロチニブ、C O X - 2 阻害剤（例えばセレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4 または V E G F 受容体の 1 つまたは複数に結合するアンタゴニスト（例えば中和抗体）、血小板由来増殖因子（P D G F）および / または幹細胞因子（S C F）に対する受容体チロシンキナーゼ阻害剤（例えばメシル酸イマチニブ（グリーベック（G l e e v e c）（登録商標）ノバルティス（N o v a r t i s）社））、T R A I L / A p o 2 L、ならびに他の生物活性薬剤および有機化学薬剤などを含むが、これらに限定される。

【0107】

本願において使用されるような用語「プロドラッグ」は、親薬物と比較して腫瘍細胞に対してそれほど細胞傷害性ではなく、より活性のある親形態へと酵素的に活性化または変換することができる、薬学的に活性のある物質の前駆体または誘導体の形態を指す。例えば W i l m a n、" P r o d r u g s i n C a n c e r C h e m o t h e r a p y " B i o c h e m i c a l S o c i e t y T r a n s a c t i o n s , 1 4 , p p . 3 7 5 - 3 8 2 , 6 1 5 t h M e e t i n g B e l f a s t (1 9 8 6)、S t e l l a e t a l , " P r o d r u g s : A C h e m i c a l A p p r o a c h t o T a r g e t e d D r u g D e l i v e r y , " D i r e c t e d D r u g D e l i v e r y , B o r c h a r d t e t a l . 編、ページ 2 4 7 - 2 6 7、ヒューマナ出版（H u m a n a P r e s s）1 9 8 5 年を参照。本発明のプロドラッグは、リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、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、糖鎖付加プロドラッグ、- ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5 - フルオロサイトシンおよびより活性のある細胞傷害性不含薬物に変換可能な他の 5 - フルオロウリジンプロドラッグを含むが、これらに限定されない。本発明で使用するプロドラッグ形態へと誘導体化することができる細胞毒性薬の具体例は、上で説明される化学療法剤を含むが、これらに限定されない。

【0108】

「血管形成因子または血管形成剤」は、血管の発生を刺激する（例えば、血管形成、血管内皮細胞の増殖、血管の安定性、および / または脈管形成などを促進する）増殖因子で

ある。例えば血管形成因子は、例えばVEGFおよびVEGFファミリーの一員、PlGF、PDGFファミリー、線維芽細胞増殖因子ファミリー(FGF)、TIEリガンド(アンジオポイエチン)、エフリン、ANGPTL3、DLL4などを含むが、これらに限定されない。それは、創傷治癒を促進する因子(成長ホルモン、インスリン様増殖因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮増殖因子(EGF)、CTGFおよびそのファミリーの一員、ならびにTGF- α およびTGF- β のような)もまた含むだろう。例えばKlagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Allitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003)(例えば、表1にリストしてある血管形成因子); および Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)を参照。

【0109】

「抗血管形成剤」または「血管形成阻害剤」は、血管形成、脈管形成または不適当な血管透過性を直接的または間接的のいずれかで阻害する、低分子量物質、ポリヌクレオチド(例えば抑制性RNA(RNAiまたはsiRNA)を含む)、ポリペプチド、単離タンパク質、組換えタンパク質、抗体、またはそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を指す。例えば抗血管形成剤は、上で定義されるような血管形成剤に対する抗体または他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体、VEGF受容体に対する抗体、VEGF受容体シグナリングを遮断する低分子(例えばPTK787/ZK2284、SU6668、スーテント(SUTENT)(登録商標)/SU 11248(スニチニブリンゴ酸塩)、AMG706、または例えば国際特許出願WO 2004/113304に記載されるもの)である。抗血管形成剤は、天然の血管形成阻害剤(例えばアンジオスタチン、エンドスタチンなど)もまた含む。例えば、Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003)(例えば、表3に悪性メラノーマにおける抗血管形成療法をリストする); Ferrara & Allitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003)(例えば表2に抗血管形成因子をリストする); および Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)(例えば、表1に臨床試験において使用される抗血管形成剤をリストする)を参照。

【0110】

本発明の方法および組成物

本発明は、ノッチ受容体経路のデルタ様4(同じ意味で「DLL4」と呼ばれる)活性化を調節する薬剤による処理によって血管発生が阻害されるという発見に部分的に基づく。DLL4アンタゴニストによる処理は、腫瘍血管を含む血管において、内皮細胞(EC)増殖の増加、不適切な内皮細胞分化および不適切な動脈発生をもたらした。驚くべきことに、抗DLL4抗体による処理はいくつかの異なる癌において腫瘍増殖の阻害をもたらした。理論により束縛されるものではないが、EC増殖の増加およびEC分化の低下は、不適切な腫瘍血管機能をもたらし、腫瘍増殖の阻害を引き起こすと考えられている。したがって、DLL4アンタゴニストは、癌の治療のために広く有効なアプローチを示すと考えられる。

【0111】

したがって、本発明は血管形成に関与する過程の調節(例えば、促進または阻害)のための、および癌のような血管形成に関連する病理学的症状を標的とする使用のための方法、組成物、キットおよび製品を提供する。

10

20

30

40

50

【0112】

本発明に従って、DLL4モジュレーターおよび/またはDLL4モジュレーターと他の治療剤の組合せは、様々な障害の治療のために使用できることが検討される。

【0113】

したがって本発明は、ノッチ受容体（ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3および/またはノッチ4のような）のDLL4による活性化を阻害するために、有効量のDLL4アンタゴニスト（抗DLL4抗体またはDLL4イムノアドヘジンのような）を使用する、血管形成阻害のための方法を包含する。別の態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量のDLL4アンタゴニスト投与を含む、血管形成阻害のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは、内皮細胞増殖の促進、内皮細胞分化の阻害、動脈発生の阻害および/または血管灌流の低下を可能にする。別の態様において、本発明は、そのような治療を必要とする被験体への有効量のDLL4アンタゴニストの投与を含む、内皮細胞増殖刺激、内皮細胞分化阻害、動脈発生阻害および/または腫瘍血管灌流阻害のための方法を提供する。

【0114】

DLL4アンタゴニスト（抗DLL4の抗体のような）により治療される腫瘍性疾患の具体例は、用語「癌」および「癌性」の下で本明細書において説明されたものを含むが、これらに限定されない。本発明において有用なアンタゴニストによる治療を適用可能な非新生物性症状は、例えば、所望されないまたは異常な肥大、関節炎、関節リウマチ（RA）、乾癬、乾癬性局面、類肉腫症、アテローム性動脈硬化、アテローム斑、心筋梗塞からの浮腫、糖尿病性網膜症および末熟児網膜症を含む他の増殖性網膜症、後水晶体線維形成症、血管新生緑内障、加齢黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植後拒絶反応、網膜/脈絡膜血管新生、隅角の血管新生（ルベオシス）、眼血管新生疾患、血管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、線維性血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性肺水、脳水腫（例えば、急性脳卒中/閉鎖性頭部外傷/外傷に関連する）、滑膜炎、RAにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大性骨形成、骨関節炎（OA）、難治性腹水症、多嚢胞卵巣、子宮内膜症、体液のサードスペースへの移行に関する疾患（脾炎、隔壁腔症候群、熱傷、腸疾患）、子宮筋腫、早産、IBDのような慢性炎症（クローン病および潰瘍性大腸炎）、腎臓同種移植拒絶、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、所望されないまたは異常な組織量の増殖（非癌）、肥満、脂肪組織量増殖、血友病性関節、肥厚性瘢痕、髪成長の阻害、オジェ・ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫後水晶体線維形成症、硬皮症、トラホーム、血管の癒着、関節滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心膜液貯留（心膜炎に関連するもののような）、ならびに胸水であるが、これらに限定されない。DLL4アンタゴニスト（抗DLL4の抗体のような）により治療される障害のさらなる具体例は、上皮障害または心臓障害を含む。

【0115】

DLL4のモジュレーター（例えばDLL4のアゴニストまたは活性化因子）は、病理学的障害の治療のために利用することができる。いくつかの実施形態において、血管形成の阻害が所望される場合には、DLL4のモジュレーター（例えばDLL4のアゴニスト）は、病理学的障害の治療において利用することができる。血管形成または血管新生および/または肥大が所望される場合には、DLL4のモジュレーター（例えばDLL4アゴニスト）は、例えば、血管外傷、創傷、裂傷、切開、熱傷、潰瘍（例えば糖尿病性潰瘍、圧迫潰瘍、血友病患者潰瘍、静脈瘤性潰瘍）、組織増殖、体重増加、末梢動脈障害、分娩誘導、髪増殖、水疱性表皮剥離症、網膜萎縮、骨折、骨脊椎固定術、半月板破裂などを含むが、これらに限定されない病理学的障害の治療のためにもまた使用することができる。

【0116】

組合せ療法

上で示されるように、本発明は、DLL4アンタゴニスト（抗DLL4の抗体のような）またはDLL4アゴニストが別療法と共に投与される、組合せ療法を提供する。例えば

、様々な新生物性症状または非新生物性症状を治療するために、D L L 4 アンタゴニストは抗癌薬剤または抗血管形成剤との組合せにおいて使用される。1つの実施形態において、新生物性症状または非新生物性症状は、異常または所望されない血管形成に関連する病理学的障害によって特徴づけられる。D L L 4 アンタゴニストは、それらの目的のために有効な他の薬剤と共に連続的にまたは組合せで、同じ組成物中にまたは個別の組成物のいずれかとして投与することができる。あるいはまたは加えて、D L L 4 の複数の阻害剤を投与することができる。

【0117】

D L L 4 アンタゴニスト（またはD L L 4 アゴニスト）および他の治療剤（例えば抗癌薬剤、抗血管形成剤）の投与は、同時に（例えば、単一の組成物、または同じ投与経路またはもしくは異なる投与経路を使用する2つまたは複数の異なる組成物として）行うことができる。あるいはまたは加えて、投与は、任意の順序で連続して行うことができる。あるいはまたは加えて、工程は、任意の順序で連続および同時の両方で、組合せとして実行することができる。

10

【0118】

特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、2つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。例えば、抗癌薬剤を最初に投与し、D L L 4 アンタゴニストが後続してもよい。しかしながら、同時投与またはD L L 4 アンタゴニストを最初に投与することもまた検討される。したがって1つの態様において、本発明は、抗血管形成剤（抗V E G Fのような）の投与が後続する、D L L 4 アンタゴニスト（抗D L L 4 の抗体のような）の投与を含む方法を提供する。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、2つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。

20

【0119】

D L L 4 アンタゴニスト（またはD L L 4 アゴニスト）と共に一緒に投与される治療剤の有効量は、医師または獣医の裁量によるものであるだろう。投与量および調整は治療される症状の最高の処置を達成するために行う。用量は使用される治療剤のタイプおよび治療されている特異的な患者のような因子にさらに依存するだろう。抗癌剤のために適切な投与量は、現時点で使用されるものであり、抗癌剤とD L L 4 アンタゴニストを組み合わせた作用（相乗作用）のために低下させることができる。特定の実施形態において、阻害剤の組合せは、単一の阻害剤の有効性を強化する。用語「強化する」は、その一般的用量または承認された用量での治療剤の有効性の改善を指す。本明細書において医薬組成物と題するセクションも参照。

30

【0120】

典型的には、D L L 4 アンタゴニストおよび抗癌剤は、腫瘍、癌または細胞の増殖障害のような病理学的障害を遮断または低下させるために、同一の疾患または類似した疾患のために適切である。1つの実施形態において、抗癌剤は抗血管形成剤である。

【0121】

癌に関連する抗血管形成療法は、腫瘍増殖を維持する栄養物質の供給のために必要とされる腫瘍血管の発生の阻害を目指した癌治療戦略である。血管形成が原発腫瘍の増殖および転移の両方に関与するので、本発明によって提供される抗血管形成治療は、二次的部位での腫瘍の転移の予防と同様に、原発部位での腫瘍の新生物的増殖を阻害することができる。したがって他の治療による腫瘍の攻撃を可能にする。

40

【0122】

多くの抗血管形成剤が同定され、本明細書においてリストされた（例えば定義の下でリストされた）もの、および例えばCarmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); and Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003)によるものを含んで、当技術分野で公知である。米国特許出願US 20030055006もまた参照。1つの実施形態において、D L L 4 アンタゴ

50

ニストは、例えば、可溶性 V E G F 受容体（例えば V E G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3、ニューロピリン（例えば N R P 1、N R P 2））フラグメント、V E G F または V E G F R を遮断できるアプタマー、中和抗 V E G F R 抗体、V E G F R チロシン キナーゼ（R T K）の低分子量の阻害剤、V E G F のためのアンチセンス戦略、V E G F または V E G F 受容体に対するリボザイム、V E G F のアンタゴニスト変異型；およびその任意の組合せを含むが、これらに限定されない、抗 V E G F 中和抗体（またはフラグメント）および / または他の V E G F アンタゴニストまたは V E G F 受容体アンタゴニストとの組合せで使用される。あるいはまたはさらに、2 つまたは複数の血管形成阻害剤は、任意で、V E G F アンタゴニストおよび他の薬剤に加えて患者に同時投与されてもよい。特定の実施形態において、1 つまたは複数の追加治療剤（例えば抗癌剤）は、D L L 4 アンタゴニスト、V E G F アンタゴニストおよび抗血管形成剤と共に一緒に投与することができる。

10

【0123】

本発明の特定の態様において、D L L 4 アンタゴニスト（または D L L 4 アゴニスト）との組合せ腫瘍治療法のために有用な他の治療剤は、他の癌治療法、例えば手術、放射線治療（例えば放射性物質の照射または投与を含む）、化学療法、本明細書においてリストされるおよび当技術分野において公知の抗癌剤による治療、またはその組合せを含む。あるいはまたはさらに、本明細書において開示される同一の抗原または 2 つまたは複数の異なる抗原を結合する 2 つまたは複数の抗体は、患者に同時投与することができる。時には、患者に対して 1 つまたは複数のサイトカインを投与することもまた有用かもしれない。

20

【0124】

化学療法剤

1 つの態様において、本発明は、D L L 4 アンタゴニスト（または D L L 4 アゴニスト）および / または血管形成阻害剤ならびに 1 つまたは複数の有効量の化学療法剤の投与によって、障害（腫瘍、癌または細胞増殖障害のような）を治療する方法を提供する。様々な化学療法剤は本発明の組合わせ治療法において使用されてもよい。検討される化学療法剤の例示的および非限定的リストは、「定義」の下で本明細書において提供される。D L L 4 アンタゴニストおよび化学療法剤の投与は、同一または異なる投与経路を使用して、例えば、単一の組成物または 2 つまたは複数の異なる組成物として同時に行うことができる。あるいはまたはさらに、投与は、任意の順序において、連続して行うことができる。あるいはまたはさらに、工程は、任意の順序において、連続および同時の療法で、組合せとして実行することができる。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、2 つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。例えば、化学療法剤を最初に投与し、D L L 4 アンタゴニストが後続してもよい。しかしながら、同時投与または D L L 4 アンタゴニストを最初に投与することもまた検討される。したがって 1 つの態様において、本発明は、化学療法剤の投与が後続する、D L L 4 アンタゴニスト（抗 D L L 4 の抗体のような）の投与を含む方法を提供する。特定の実施形態において、分～日から週～月にわたる間隔は、2 つまたは複数の組成物の投与の間に存在できる。

30

【0125】

当業者により理解されるように、化学療法剤の適切な用量は一般に、化学療法薬が単独または他の化学療法との組合せで投与される、臨床治療法において既に用いられる用量の付近であるだろう。治療される条件に依存して、投与量の変動が恐らく生じるだろう。治療を行う医師は、個別の被験体のために適切な用量を決定することができるだろう。

40

【0126】

再発腫瘍増殖

本発明は、再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖の阻害または予防のための方法および組成物もまた提供する。再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖は、1 つまたは複数の現在利用可能な治療法（例えば化学療法のような癌治療法、放射線療法、手術、ホルモン療法および / または生物学的療法 / 免疫療法、抗 V E G F 抗体療法、特に特定の癌のための標準治療レジメン）を受けているかまたはそれらにより治療された患者が、治療には臨床的に適

50

切ではないか、またはこれらの患者が追加の有効な治療法を必要とするように、患者はもはや療法からいかなる有益な効果を受けない、症状を説明するために使用される。本明細書において使用されるように、この語句は「反応しない/抵抗性のある」患者の症状もまた指すことができ、例えば、それは治療法に反応しさらに副作用のある、抵抗性を発達させる、治療法に反応しない、治療法に十分に反応しない、などの患者を説明する。様々な実施形態において、癌細胞の数が有意に低下しない、または増加した、または腫瘍サイズが有意に低下しない、または増加した、またはさらなる癌細胞のサイズもしくは数の減少が達成されない場合、癌は再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖である。癌細胞が再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖かどうかの決定は、そのような文脈において「再発」または「抵抗性がある」または「反応しない」の当技術分野で許容される意味を使用して、癌細胞での治療の実効性の分析のための当技術分野において公知の任意の方法により、インビボまたはインビトロのいずれかで行うことができる。抗VEGF治療に耐性の腫瘍は再発腫瘍増殖の具体例である。

10

20

30

40

50

【0127】

本発明は、被験体中の再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を遮断または低下させるために1つまたは複数のDLL4アンタゴニスト（またはDLL4アゴニスト）を投与することによって、被験体において再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を遮断または低下させる方法を提供する。特定の実施形態において、アンタゴニストは癌治療に後続して投与することができる。特定の実施形態において、DLL4アンタゴニストは癌治療法と同時に投与される。あるいはまたはさらに、DLL4アンタゴニスト療法は、別の癌治療法と任意の順序で交互に実行することができる。本発明は、さらに癌に罹患しやすい患者における癌の発症または再発を予防するために1つまたは複数の阻害性抗体を投与する方法を包含する。一般に、被験体は、同時に癌治療を受けていたか、または受けている。1つの実施形態において、癌治療法は抗血管形成剤（例えばVEGFアンタゴニスト）による治療である。抗血管形成剤は当技術分野において公知のもの、および本明細書における定義の下で見出されるものを含む。1つの実施形態において、抗血管形成剤は、抗VEGF中和抗体またはフラグメント（例えばヒト化A4、6、1、アバスチン（AVASTIN）（登録商標）（ジェネンテック（Genentech）社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア）、Y0317、M4、G6、B20、2C3など）である。例えば米国特許第6,582,959号、第6,884,879号、第6,703,020号；WO98/45332；WO96/30046；WO94/10202；EP0666868B1；米国特許出願第20030206899号、第20030190317号、第20030203409号、および第20050112126号；Popkov et al, Journal of Immunological Methods 288:149-164（2004）；ならびにWO2005012359を参照。追加剤は、再発腫瘍増殖または再発癌細胞増殖を遮断または低下させるためにVEGFアンタゴニストおよびDLL4アンタゴニストと一緒に投与ことができ、例えば、本明細書における組合せ療法と題されたセクションを参照。

【0128】

DLL4

DLL4は膜貫通型タンパク質である。細胞外領域は、すべてのノッチリガンドの間で保存され受容体結合のために必要なDSLドメインに加えて、8つのEGF様リピートを含んでいる。予測されるタンパク質は、膜貫通領域、およびいかなる触媒モチーフを欠く細胞質尾部もまた含んでいる。ヒトDLL4タンパク質は685アミノ酸タンパク質であり、以下の領域を含む：シグナルペプチド（アミノ酸1～25）；MNNL（アミノ酸26～92）；DSL（アミノ酸155～217）；EGF様（アミノ酸221～251）；EGF様（アミノ酸252～282）；EGF様（アミノ酸284～322）；EGF様（アミノ酸324～360）；EGF様（アミノ酸366～400）；EGF様（アミノ酸402～438）；EGF様（アミノ酸440～476）；EGF様（アミノ酸480～518）；膜貫通（アミノ酸529～551）；細胞質ドメイン（アミノ酸552～

685)。DLL4の核酸およびアミノ酸配列は当技術分野において公知であり、本明細書においてさらに議論される。DLL4をコードする核酸配列は、DLL4の所望される領域のアミノ酸配列を使用してデザインすることができる。あるいは、DLL4のcDNA配列（またはそのフラグメント）を使用することができる。ヒトDLL4のアクセッション番号はNM_019074であり、マウスDLL4のアクセッション番号はNM_019454である。

【0129】

DLL4はノッチ受容体を結合する。進化的に保存されたノッチ経路は、出生後の自己複製器官系と同様に、多くの発生過程の重要な調節因子である。無脊椎動物から哺乳動物まで、ノッチシグナリングは、無数の細胞運命決定を介して細胞を導き、増殖、分化およびアポトーシスに影響を及ぼす(Miele and Osborne, 1999)。ノッチファミリーは、DSL遺伝子ファミリー(ショウジョウバエ(*Drosophila*)からのデルタおよびセレート、ならびにシー・エレガンス(*C. elegans*)からのLag-2に対して命名される)の膜結合型リガンドにより活性化される、構造的に保存された細胞表面受容体からなる。哺乳類は、4つの受容体(ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4)および5つのリガンド(Jag1、Jag2、DLL1、Dll3およびDLL4)を有する。隣接細胞上に提示されたりリガンドによる活性化に際して、ノッチ受容体は連続したタンパク質分解による切断を受ける。これはノッチ細胞内ドメイン(NICD)の放出を引き起こし、それは核の中へ移動し、DNA結合タンパク質(CSL[CBF1/Su(H)/Lag-1に対して])としてもまた公知のRBP-Jk)および他の転写コファクターとの転写複合体を形成する。ノッチ活性化の一次標的遺伝子はHES(ヘアリー/エンハンサーオブスプリット)遺伝子ファミリーおよびHES関連遺伝子(Hey、CHF、HRT、HESR)を含み、次にそれは組織および細胞のタイプに特異的な様式で下流の転写エフェクターを調節する(Iso et al., 2003; Li and Harris, 2005)。

【0130】

DLL4モジュレーター

DLL4のモジュレーターは、DLL4の、例えば、アゴニストおよびアンタゴニストの活性を調節する分子である。用語「DLL4アゴニスト」は、DLL4のペプチドおよび非ペプチドアナログ(本明細書において説明される多量体化DLL4のような)を指し、およびもし他の薬剤が天然のノッチ受容体(例えばノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4)を介するシグナリング能力を有していれば、それらを指すように使用される。用語「アゴニスト」は、ノッチ受容体の生物学的役割の文脈において定義されている。特定の実施形態で、アゴニストは、上で定義されるように、ノッチ受容体(例えばノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4)の結合、ノッチ受容体の活性化、およびノッチ受容体下流の分子シグナリングの活性化のようなDLL4の生物学的活性を持つ。いくつかの実施形態において、DLL4アゴニストは、内皮細胞増殖を阻害、上皮細胞分化を促進、および/または動脈発生を促進する。いくつかの実施形態において、DLL4アゴニストは血管発生を阻害する。

【0131】

DLL4モジュレーターは当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書において記述および例示される。検討されるDLL4アンタゴニスト(抗DLL4抗体およびDLL4イムノアドヘジンのような)の例示的および非限定的リストは、「定義」の下で本明細書において提供される。

【0132】

本発明において有用なモジュレーターは、当技術分野で公知の様々な分析により、それらの物理的/化学的性質および生物学的機能について特性を評価することができる。いくつかの実施形態において、DLL4アンタゴニストは任意の1つまたは複数の以下のものについて特性を評価される：DLL4への結合、ノッチ受容体への結合、ノッチ受容体活性化の減少または遮断、ノッチ受容体下流の分子シグナリングの減少または遮断、DLL

4 へのノッチ受容体結合の破壊または遮断、および/または内皮細胞増殖の促進、および/または内皮細胞分化の阻害、および/または動脈分化の阻害、および/または腫瘍血管灌流の阻害、および/または腫瘍、細胞増殖障害または癌の治療および/または予防; および/または D L L 4 の発現および/または活性に関連した障害の治療または予防、および/またはノッチ受容体の発現および/または活性に関連した障害の治療または予防。いくつかの実施形態において、D L L 4 アゴニストは任意の 1 つまたは複数の以下のものについて特性を評価される: ノッチ受容体 (例えばノッチ 1、ノッチ 2、ノッチ 3、ノッチ 4) の結合、ノッチ受容体の活性化、ノッチ受容体下流の分子シグナリングの活性化、内皮細胞増殖の阻害、上皮細胞分化の促進、および/または動脈発生の促進。D L L 4 のアンタゴニストおよびアゴニストを特性を評価する方法は、当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書において記述および例示される。

10

【0133】

抗体

D L L 4 抗体は当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書において記述および例示される。抗 D L L 4 抗体は、好ましくはモノクローナルである。本明細書において提供される抗 D L L 4 抗体の F a b、F a b'、F a b' - S H および F (a b')₂ フラグメントもまた、本発明の範囲内に包含される。これらの抗体フラグメントは、酵素による消化のような従来手段により生成することができるか、または組換え技術により産生されてもよい。そのような抗体フラグメントはキメラまたはヒト化されたものであってもよい。これらのフラグメントは以下に示される診断および治療目的に対し有用である。

20

【0134】

モノクローナル抗体は実質的に均質の抗体の集団から得られ、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在してもよい天然に存在する可能性のある変異を除いて同一である。したがって、修飾語「モノクローナル」は、個別の抗体の混合物ではないような抗体の性質を示す。

【0135】

抗 D L L 4 モノクローナル抗体は、K o h l e r e t a l . , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) により最初に記述されたハイブリドーマ方法を使用して作製することができるか、または組換え D N A 法 (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号) により作製されてもよい。

30

【0136】

ハイブリドーマ法では、マウスまたはハムスターのような他の適切な宿主動物は、免疫のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生可能なリンパ球を誘導するために免疫される。D L L 4 に対する抗体は、一般に D L L 4 およびアジュバントの皮下 (s c) または腹腔内 (i p) の複数の注射により動物中で作製される。D L L 4 は当技術分野において周知の方法を使用して調製されてもよく、それらのうちのいくつかは本明細書においてさらに記述される。例えば、D L L 4 の組換えによる産生が記載される。1 つの実施形態において、動物は、免疫グロブリン重鎖の F c 部分に融合させた D L L 4 の細胞外ドメイン (E C D) を含む D L L 4 の誘導體により免疫される。好ましい実施形態において、動物は D L L 4 - I g G 1 融合タンパク質により免疫される。動物は、モノフォスホリルリピド A (M P L) / トレハロースジクリノミコレート (d i c r y n o m y c o l a t e) (T D M) (リビ・イムノケム・リサーチ (R i b i I m m u n o c h e m . R e s e a r c h) 社、ハミルトン、モンタナ) と共に D L L 4 の免疫原性コンジュゲートまたは誘導體に対して通常免疫され、溶液は複数の部位で皮内注射される。2 週間後に、動物はブーストされる。7 ~ 1 4 日後に動物は採血され、血清は抗 D L L 4 の力価について分析される。力価がプラトーに達するまで、動物をブーストする。

40

【0137】

あるいは、リンパ球はインビトロで免疫されてもよい。次にリンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適切な融合する薬剤を使用し

50

て、ミエローマ細胞と融合される。(Goding , Monoclonal Antibodies : Principles and Practice、59～103ページ(アカデミックプレス(Academic Press)、1986年))。

【0138】

したがって調製されたハイブリドーマ細胞を播種し、未融合の親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻害する、1つまたは複数の物質を好ましくは含む適切な培養液中で増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPR T)を欠損していれば、ハイブリドーマのための培養液は典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT培地)を含むだろう。

10

【0139】

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を維持し、HAT培地のような培地に感受性のあるものである。これらの中で、好ましいミエローマ細胞株は、ソーク研究所細胞分配センター(Salk Institute Cell Distribution Center)、サンディエゴ、カリフォルニア、アメリカから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍に由来するもののようなマウスミエローマ株、ならびに米国培養菌保存施設(American Type Culture Collection)、ロックヴィル、メリーランド、アメリカから入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞である。ヒトミエローマおよびマウス-ヒトのヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記述された。(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51～63ページ(マルセル・デッカー、ニューヨーク、1987年))。

20

【0140】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養液は、DLL4に対して作製されたモノクローナル抗体の産生について分析される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、または放射免疫分析(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着分析(ELISA)のようなインビトロの結合分析により決定される。

30

【0141】

モノクローナル抗体の結合能は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキャチャード解析により決定することができる。

【0142】

所望される特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈手順によりサブクローン化し、標準方法により増殖してもよい。(Goding , Monoclonal Antibodies : Principles and Practice、59～103ページ(アカデミックプレス、1986年))。この目的のために適切な培養培地は、例えばD-MEMまたはRPMI-1640培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物中で腹水癌としてインビボで増殖してもよい。

40

【0143】

サブクローンにより分泌される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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーのような通常の免疫グロブリン精製法により、培養液、腹水または血清から適切に分離される。

【0144】

抗DLL4抗体は、所望される活性を備えた合成抗体クローンについてスクリーニングするために組合わせライブラリーを使用することによって、作製することができる。原理

50

上、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合された抗体可変領域 (Fv) の様々なフラグメントを提示するファージを含む、ファージライブラリーのスクリーニングによって選択される。そのようなファージライブラリーは、所望される抗原に対する親和性クロマトグラフィーにより選別される。所望される抗原に結合できる Fv フラグメントを発現するクローンは、抗原に吸着され、したがってライブラリー中の非結合クローンから分離される。次に結合クローンは抗原から溶出され、抗原吸着 / 溶出の追加のサイクルによりさらに濃縮できる。任意の抗 D L L 4 抗体は、対象となるファージクローンからの Fv 配列、および Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest、第 5 版、NIH 出版 (NIH Publication)、ベテスダ、メリーランド (1991)、1 - 3 巻、91 - 3242 中に記載される適切な定常領域 (Fc) 配列を使用して、対象となるファージクローンについて選択するために適切な抗原スクリーニング手順のデザイン、続いて全長の抗 D L L 4 抗体クローンの構築によって得ることができる。

10

20

30

40

50

【0145】

抗体の抗原結合ドメインは、約 110 アミノ酸の 2 つの可変 (V) 領域から (各々 1 つの軽鎖 (VL) および重鎖 (VH) から) 形成され、両方は 3 つの超可変ループまたは相補性決定領域 (CDR) を示す。可変ドメインは、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 - 455 (1994) 中に記載されるように、VH および VL が短く柔軟なペプチドを介する共有結合で結合される一本鎖 Fv (scFv) フラグメントとして、または各々が定常ドメインに融合されて非共有結合で相互作用する Fab フラグメントとしてのいずれかで、ファージ上で機能的に提示することができる。本明細書において使用されるように、ファージクローンをコードする scFv、およびファージクローンをコードする Fab は、「Fv ファージクローン」または「Fv クローン」とまとめて呼ばれる。

【0146】

VH および VL の遺伝子のレパートリーは、個別にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりクローニングしファージライブラリーにおいて無作為に再結合することができ、次に Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 - 455 (1994) 中に記載されるように、抗原結合クローンを探索できる。免疫ソースからのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対して高親和性抗体を提供する。あるいは、ナイーブレパートリーは、Griffiths et al., EMBO J., 12: 725 - 734 (1993) により記述されるように、いかなる免疫なしに、広範囲の非自己抗原およびさらに自己抗原に対するヒト抗体の単一ソースを提供するためにクローニングすることができる。最終的に、ナイーブレパートリーは、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 - 388 (1992) により記述されるように、再構成されていない V 遺伝子セグメントのクローニングによって、ならびに高度に可変的な CDR 3 領域をコードするためおよびインビトロの再構成を遂行するためにランダム配列を含む PCR プライマーを使用することによって、幹細胞から合成的に作製することもできる。

【0147】

線状ファージを、マイナーなコートタンパク質 pIII への融合によって抗体フラグメントを提示するために使用する。抗体フラグメントは、例えば Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) によって記述されるように、VH および VL のドメインが柔軟なポリペプチドスパーサーによって同一のポリペプチド鎖上に結合される一本鎖 Fv フラグメントとして提示することができるか、または、例えば Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133 - 4137 (1991) 中に記載されるように、野生型コートタンパク質のうちのいくつかを置き換えることによってファージ表面上に提示されるようになる Fab - コートタンパク質構造の集合で、1 つの鎖が pIII に融合され、

他方が細菌の宿主細胞ペリプラスムの中へ分泌される F a b フラグメントとして提示することができる。

【 0 1 4 8 】

一般に、抗体遺伝子フラグメントをコードする核酸は、ヒトまたは動物から採取される免疫細胞から得られる。抗 D L L 4 のクローンに偏ったライブラリーが所望されるならば、被験体を抗体反応を生成するために D L L 4 により免疫し、脾臓細胞および / または循環 B 細胞、他の末梢血リンパ球 (P B L) をライブラリー構築のために回収する。好ましい実施形態において、抗 D L L 4 のクローンに偏ったヒト抗体遺伝子フラグメントのライブラリーは、D L L 4 免疫が D L L 4 に対するヒト抗体を産生する B 細胞を生じさせるように、機能的なヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを保有する (および機能的な内在性の抗体産生システムを欠損する) トランスジェニックマウスにおいて、抗 D L L 4 抗体反応の生成によって得られる。以下にヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの生成を記載する。

10

【 0 1 4 9 】

抗 D L L 4 の反応細胞集団についてのさらなる濃縮は、D L L 4 に特異的な膜結合型抗体を発現する B 細胞を単離するために適切なスクリーニング法を使用することによって (例えば D L L 4 親和性クロマトグラフィーによる細胞分離またはフロー活性化細胞分取 (f l o w - a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g) (F A C S) が後続する蛍光色素標識 D L L 4 への細胞の吸着によって) 得ることができる。

20

【 0 1 5 0 】

あるいは、免疫されていないドナーからの脾臓細胞および / または B 細胞または他の P B L の使用は、可能な抗体レパートリーのよりよい表示を提供し、D L L 4 が抗原性でない任意の動物 (ヒトまたは非ヒト) 種を使用して、抗体ライブラリーの構築をさらに可能にする。インビトロの抗体遺伝子構築を組み入れるライブラリーについては、再構成されていない抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供するために、幹細胞を被験体から採取する。対象となる免疫細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、オオカミ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、およびトリ種などのような様々な動物種から得ることができる。

【 0 1 5 1 】

核酸をコードする抗体可変遺伝子セグメント (V H および V L のセグメントを含む) は、対象となる細胞から回収され増幅される。再構成された V H および V L 遺伝子ライブラリーの場合では、所望される DNA は、O r l a n d i e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) , 8 6 : 3 8 3 3 - 3 8 3 7 (1 9 8 9) 中に記載されるように、リンパ球からのゲノム DNA または m R N A の単離、続いて再構成された V H および V L 遺伝子の 5 ' 端および 3 ' 端に一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって得ることができ、その結果として発現について多様な V 遺伝子レパートリーが作製される。V 遺伝子は、O r l a n d i e t a l . (1 9 8 9) および W a r d e t a l . , N a t u r e , 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6 (1 9 8 9) 中に記載されるように、成熟 V ドメインをコードするエクソンの 5 ' 末端でのバックプライマー、および J 部位内にあるフォワードプライマーにより、c D N A およびゲノム DNA から増幅できる。しかしながら c D N A からの増幅については、バックプライマーは J o n e s e t a l . , B i o t e c h n o l . , 9 : 8 8 - 8 9 (1 9 9 1) 中に記載されるようにリーダーエクソン中に、およびフォワードプライマーは S a s t r y e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) , 8 6 : 5 7 2 8 - 5 7 3 2 (1 9 8 9) 中に記載されるように定常領域内にあってもよい。相補性を最大にするために、O r l a n d i e t a l . (1 9 8 9) または S a s t r y e t a l . (1 9 8 9) 中に記載されるように、プライマー中に縮重を取り込むことができる。好ましくは、ライブラリー多様性は、例えば、M a r k s e t a l . , J . M o l . B i o l . , 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7 (1 9 9 1) の方法において記載されるように、または O r u m e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 1 : 4 4 9 1 - 4 4 9 8

30

40

50

(1993)の方法において記載されるように、免疫細胞核酸サンプル中に提示されるすべての利用可能なVHおよびVLの構成を増幅するために、各V遺伝子ファミリーに標的化されたPCRプライマーを使用することによって最大にされる。増幅されたDNAの発現ベクターへのクローニングのために、Orlandi et al. (1989)において記載されるように、まれな制限部位を1つの末端でタグとして、またはClackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)において記載されるように、タグ付加プライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内に導入できる。

【0152】

合成的に再配列されたV遺伝子のレパートリーはV遺伝子セグメントからインビトロで得ることができる。大部分のヒトVH遺伝子セグメントはクローニングおよび配列決定されており(Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)中で報告される)、マッピングされており(Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)中で報告される);クローニングされたセグメント(H1およびH2ループの主要なコンフォメーションをすべて含む)は、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)中で記載されるように、多様な配列および長さのH3ループをコードするPCRプライマーにより多様なVH遺伝子レパートリーを生成するために使用することができる。VHレパートリーは、Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)中で記載されるように、単一長の長いH3ループ中に集中するすべての配列多様性をともなって作製することもできる。ヒトVおよびVセグメントはクローニングおよび配列決定され(Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)中で報告される)、合成軽鎖レパートリーを作製するために使用することができる。合成V遺伝子レパートリー(VHおよびVLのフォールド、ならびにL3およびH3の長さの範囲に基づく)は、かなりの構造多様性の抗体をコードするだろう。V遺伝子をコードするDNAの増幅に続いて、生殖細胞系V遺伝子セグメントは、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)の方法に従って、インビトロで再構成することができる。

【0153】

抗体フラグメントのレパートリーは、いくつかの手段でVHおよびVLの遺伝子レパートリーをとともに組み合わせることによって構築できる。各レパートリーは異なるベクターにおいて生成することができ、ベクターは、Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)中で記載されるように例えばインビトロで、またはインビボで組合わせ感染(例えばWaterhouse et al., Nucleic Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)中で記載されるloxPシステム)によって、再結合される。インビボの組換えアプローチは、大腸菌(E. coli)形質転換率により課されたライブラリーサイズに対する制限を克服するために、Fabフラグメントの二本鎖の性質を利用する。ナイーブVHおよびVLレパートリーは、個別に、1つはファージミドの中におよび他方はファージベクターの中にクローニングされる。次に、各細胞が異なる組合せを含み、ライブラリーサイズが存在する細胞(約 10^{12} クローン)の数のみにより限定されるように、2つのライブラリーはファージミド含有細菌のファージ感染により組み合わせられる。VHおよびVLの遺伝子が単一レプリコン上に再結合され、ファージピリオンの中に共にパッケージにされるように、両方のベクターはインビボ組換えシグナルを含む。これらの巨大なライブラリーは、多数の十分な親和性の多様な抗体を提供する(約 10^{-8} Mの K_d^{-1})。

【0154】

あるいは、レパートリーは、例えばBarbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)

中で記載されるように、同一のベクターの中に連続してクローニングされてもよいが、または例えばClackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)中で記載されるように、PCRによりともにアセンブルされ次にクローニングされてもよい。PCRアセンブリーは、一本鎖Fv(scFv)レパトリーを形成するように柔軟なペプチドスパーサーをコードするDNAにVHおよびVLのDNAを結合するために使用することもできる。さらに別の技術において、「細胞中PCRアセンブリー」は、Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)中で記載されるように、PCRによってリンパ球内でVHおよびVLの遺伝子を組み合わせ、次に連鎖遺伝子のレパトリーをクローニングするために使用される。

10

【0155】

ナイーブライブラリー(天然または合成)によって産生される抗体は、中程度の親和性(約 $10^6 \sim 10^7$ M⁻¹のK_d-1)でありえるが、親和性成熟もまた、Winter et al. (1994)、前出中で記載されるように、二次的なライブラリーの構築およびそれからの再選択によってインビトロで模倣できる。例えば、変異は、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)の方法またはGram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)の方法中のエラップローンポリメラーゼ(Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)中に報告される)を使用することによって任意にインビトロで導入することができる。さらに、親和性成熟は、選択された個々のFvクローンおよびより高い親和性クローンのためのスクリーニングにおいて、例えば対象となるCDRにまたがるランダム配列を保有するプライマーによるPCRを使用して、1つまたは複数のCDRをランダムに変異させることによって実行することができる。WO9607754(1996年3月14日に公開された)は、軽鎖遺伝子のライブラリーを生成するために、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域中の変異誘発を誘導する方法について記述した。別の有効なアプローチは、Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)中で記載されるように、免疫されていないドナーから得られる天然に存在するVドメイン変異型のレパトリーを備えたファージディスプレイによって選択されたVHまたはVLのドメインを再結合し、数ラウンドの鎖の再シャフリングにおいてより高い親和性をスクリーニングすることである。この技術は、 10^{-9} Mの範囲の親和性を持つ抗体および抗体フラグメントの産生を可能にする。

20

30

【0156】

DLL4の核酸およびアミノ酸配列は当技術分野において公知であり、本明細書においてさらに議論される。DLL4をコードするDNAは、当技術分野において公知の様々な方法によって調製することができる。これらの方法は、トリエステル法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法およびH-ホスホン酸法のような、Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)中で記載されていた方法のうちのいずれかによる化学合成を含むが、これらに限定されない。1つの実施形態において、発現宿主細胞に好ましいコドンが、DLL4をコードするDNAのデザインにおいて使用される。あるいは、DLL4をコードするDNAは、ゲノムまたはcDNAライブラリーから単離できる。

40

【0157】

DLL4をコードするDNA分子の構築に続いて、DNA分子はプラスミドのような発現ベクターの発現制御配列に操作可能に結合され、制御配列はベクターにより形質転換された宿主細胞に認識される。一般に、プラスミドベクターは、宿主細胞と適合する種由来する複製配列および制御配列を含む。ベクターは、通常、形質転換細胞中で表現型による選択を提供できるタンパク質をコードする配列に加えて、複製部位を保有する。原核生物および真核生物の宿主細胞の発現のために適切なベクターは当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書においてさらに記述される。酵母のような真核生物または哺乳

50

類のような多細胞生物に由来する細胞が使用されてもよい。

【0158】

任意で、DLL4をコードするDNAは、宿主細胞による発現産物の培養液の中への分泌をもたらす、分泌リーダー配列に操作可能に結合される。分泌リーダー配列の具体例は、stII、エコチン(ecotin)、lamB、ヘルペスGD、lpp、アルカリフォスファターゼ、インペルターゼ、およびアルファ因子を含む。さらに、本明細書における使用のために適切なものはプロテインAの36アミノ酸リーダー配列である(Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985))。

【0159】

宿主細胞は、トランスフェクションされ、本発明の上記の発現ベクターまたはクローニングベクターにより好ましくは形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望される配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に調節される通常の培養液中で培養される。

10

【0160】

トランスフェクションは、任意のコード配列が実際に発現されてもされなくても、宿主細胞による発現ベクターの獲得を指す。トランスフェクションの多数の方法が当業者に公知である(例えばリン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション)。このベクターの操作の任意の徴候が宿主細胞内に生じる場合、トランスフェクションの成功は一般に認識される。トランスフェクションのための方法は当技術分野において周知であり、いくつかは本明細書においてさらに記述される。

20

【0161】

形質転換は、DNAが染色体外のエLEMENTとして、または染色体の成分によって複製可能なように、生物の中にDNAを導入することを意味する。使用される宿主細胞に依存して、形質転換はそのような細胞に適切な標準技術を使用して行われる。形質転換のための方法は当技術分野において周知であり、いくつかは本明細書においてさらに記述される。

【0162】

Sambrook et al., 前出中で一般に記載されるように、DLL4を産生するために使用される原核生物の宿主細胞は培養できる。

30

【0163】

DLL4を産生するために使用される哺乳類宿主細胞は、様々な培地において培養でき、当技術分野において周知であり、それらのうちのいくつかは本明細書において記述される。

【0164】

この開示において言及された宿主細胞は、宿主動物内にある細胞に加えて、インビトロの培養の細胞も包含する。

【0165】

DLL4の精製は当技術分野で認められている方法を使用して、遂行されてもよく、それらのうちのいくつかは本明細書において記述される。

40

【0166】

精製されたDLL4は、ファージディスプレイクロンの親和性クロマトグラフ分離における使用のために、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、様々なアクリル共重合体、ヒドロキシルメタクリレートゲル、ポリアクリル酸およびポリメタクリル酸共重合体、ナイロン、中性担体およびイオン担体ならびに同種のもののような適切なマトリックスに結合することができる。マトリックスへのDLL4タンパク質の結合はMethods in Enzymology, vol. 44 (1976)中で記載される方法によって遂行することができる。ポリサッカライドマトリックス(例えばアガロース、デキストラン、セルロース)にタンパク質リガンドを結合するために一般に用いられる技術は、ハロゲン化シアンによる担体の活性化、および続いて行なわれるペプチドリガンドの脂肪族第一アミンまたは芳香族第一アミンの活性化されたマト

50

リックスへのカップリングを含んでいる。

【0167】

あるいは、D L L 4 は吸着プレートのウェルをコーティングするために使用されるか、吸着プレートに固定された宿主細胞上で発現されるか、または細胞選別において使用されるか、またはストレプトアビジンコートビーズによる捕捉のためのビオチンにコンジュゲートされるか、またはファージディスプレイライブラリーをパニングする他の当技術分野において公知の方法での使用が可能である。

【0168】

ファージライブラリーサンプルは、吸着剤によるファージ粒子の少なくとも一部の結合のために適切な条件下で固定化D L L 4 と接触させられる。通常は、p H、イオン強度、温度および同種のものを含む条件は生理学的条件を模倣するように選択される。固相に結合されたファージは洗浄され、例えばBarbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978 - 7982 (1991) 中で記載されるように酸によって、または例えばMarks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) 中で記載されるようにアルカリによって、または例えばClackson et al., Nature, 352: 624 - 628 (1991) の抗原競合方法に類似する手順でのD L L 4 抗原競合によって次に溶出される。ファージは、単一ラウンドの選択で20 ~ 1,000倍濃縮される。さらに、濃縮されたファージは、細菌培養において増殖可能であり、さらなる選択ラウンドにかけることができる。

【0169】

選択効率は、洗浄の間の解離速度を含む多くの因子、および単一ファージ上の複数の抗体フラグメントが抗原と同時に接触できるかに依存する。速い解離速度（および弱い結合能）を備えた抗体は、短い洗浄、多価性のファージディスプレイ、および固相における抗原の高いコーティング密度を使用することによって保持することができる。高密度は、多価性の相互作用を介するファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合を促進する。遅い解離速度（および十分な結合能）を備えた抗体の選択は、Bass et al., Proteins, 8: 309 - 314 (1990) およびWO 92/09690 中で記載されるように、長い洗浄および1価のファージディスプレイの使用、ならびにMarks et al., Biotechnol., 10: 779 - 783 (1992) 中で記載されるように、抗原の低コーティング密度によって促進することができる。

【0170】

D L L 4 について異なる親和性のファージ抗体（わずかに異なる親和性のものでさえ）の間で選択することは可能である。しかしながら、選択された抗体のランダム変異（例えば上で記述された親和性成熟技術のうちのいくつかにおいて実行されるように）は、多くの変異体（大部分は抗原へ結合し、少数はより高い親和性で結合する）を生じさせるだろう。D L L 4 を限定することにより、まれな高い親和性ファージを競合により選び出せる。より高い親和性変異体をすべて保持するために、ファージを過剰のビオチン化D L L 4 と共に（しかしD L L 4 についての標的モル結合定数よりも低いモル濃度の濃度でのビオチン化D L L 4 と共に）インキュベートすることができる。次に高親和性結合ファージを、ストレプトアビジンをコートした常磁性粒子によって捕捉することができる。そのような「平衡捕捉」は、抗体が、2倍以上高い親和性ほどの変異体クローンの単離を可能にする感度により、より低い親和性のファージの大過剰量から抗体の結合親和性に従って選択されることを可能にする。固相に結合されたファージの洗浄において使用される条件もまた、解離速度に基づいて識別するように操作できる。

【0171】

抗D L L 4 クローンは活性選択されてもよい。1つの実施形態において、本発明は、ノッチ受容体（ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3および/またはノッチ4のような）とD L L 4 との間の結合を遮断するが、ノッチ受容体と第2のタンパク質との間の結合を遮断しな

い、抗 D L L 4 抗体を提供する。そのような抗 D L L 4 抗体に対応する F v クローンは、(1) 上で記述されるようなファージライブラリーから抗 D L L 4 クローンを分離すること、および任意で適切な細菌宿主における集団の増殖によりファージクローンの単離集団を増幅することと；(2) 遮断活性および非遮断活性がそれぞれ所望される D L L 4 および第 2 のタンパク質を選択することと；(3) 固定化 D L L 4 へ抗 D L L 4 ファージクローンを吸着させることと；(4) 第 2 のタンパク質の結合決定基と重複または共有される D L L 4 結合決定基を認識する、任意の所望されないクローンを溶出するために第 2 のタンパク質の過剰量を使用することと；(5) 工程 (4) 後に吸着されたままであるクローンを溶出することと、によって選択することができる。任意で、所望される遮断 / 非遮断特性のクローンは、本明細書において記述される選択手順の 1 回または複数回の繰り返しによりさらに濃縮することができる。

10

【 0 1 7 2 】

ハイブリドーマ由来モノクローナル抗体またはファージディスプレイ F v クローンをコードする DNA は、通常の手順を使用して (例えばハイブリドーマまたはファージの DNA 鋳型から対象となる重鎖および軽鎖のコード領域を特異的に増幅するようにデザインされたオリゴヌクレオチドプライマーの使用によって)、容易に単離および配列決定される。一旦単離されたならば、DNA は発現ベクターの中へ入れることができ、次に組換え宿主細胞中で所望されるモノクローナル抗体の合成を得るために、大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、またはその他に免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞のような宿主細胞の中にトランスフェクションされる。抗体をコードする DNA の細菌における組み換え発現に対して総説記事は、S k e r r a e t a l . , C u r r . O p i n i o n i n I m m u n o l , 5 : 2 5 6 (1 9 9 3) および P l u c k t h u n , I m m u n o l . R e v s , 1 3 0 : 1 5 1 (1 9 9 2) を含む。

20

【 0 1 7 3 】

F v クローンをコードする DNA は、完全または部分的な長さの重鎖および / または軽鎖をコードするクローンを形成するために、重鎖および / または軽鎖の定常領域をコードする、公知の DNA 配列 (例えば、適切な DNA 配列は K a b a t e t a l . 、前出から得ることができる) と組み合わせることができる。任意のアイソタイプの定常領域 (I g G 、 I g M 、 I g A 、 I g D および I g E の定常領域を含む) をこの目的のために使用することができ、そのような定常領域は任意のヒトまたは動物種から得ることができることが認識されるだろう。1 つの動物 (ヒトのような) 種の可変ドメイン DNA に由来し、次に「ハイブリッド」の全長重鎖および / または軽鎖についてのコード配列を形成するために別の動物種の定常領域 DNA に融合した F v クローンは、本明細書において使用されるような「キメラ」抗体および「ハイブリッド」抗体の定義に含まれている。好ましい実施形態において、すべてヒトの、完全または部分的な長さの重鎖および / または軽鎖についてのコード配列を形成するために、ヒト可変 DNA に由来する F v クローンは、ヒト定常領域 DNA に融合される。

30

【 0 1 7 4 】

ハイブリドーマに由来する抗 D L L 4 抗体をコードする DNA は、例えばハイブリドーマクローンに由来する相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインについてのコード配列を置換することによってもまた修飾することができる (例えば M o r r i s o n e t a l , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 (1 9 8 4) の方法におけるように) 。ハイブリドーマもしくは F v のクローンに由来する抗体またはフラグメントをコードする DNA 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についてのコード配列のすべてまたは一部を共有結合で結合することによってさらに修飾することができる。この様式において、F v クローンまたはハイブリドーマクローンに由来する抗体の結合特異性を有する、「キメラ」抗体または「ハイブリッド」抗体が調製されている。

40

【 0 1 7 5 】

50

抗体フラグメント

本発明は抗体フラグメントを包含する。特定の状況において、抗体全体ではなく、抗体フラグメントを使用するという優位性がある。フラグメントのより小さなサイズは迅速な除去を可能にし、固形腫瘍への接近の改良を引き起こしてもよい。

【0176】

様々な技術は抗体フラグメントの産生のために開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは完全な形の抗体のタンパク分解を介して得られた。(例えばMorimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992);、Brennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照)。しかしながら、これらのフラグメントは、今や、組換え宿主細胞によって直接産生することができる。Fab、FvおよびScFv抗体フラグメントはすべて大腸菌中で発現させてそれから分泌させることができ、それによりこれらのフラグメントの容易な大量産生を可能にする。抗体フラグメントは上で議論された抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントは、直接大腸菌から回収され、F(ab')₂フラグメントを形成するために化学的に結合することができる。(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチに従って、F(ab')₂フラグメントは、組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。サルベージ受容体結合のエピトープ残基を含む、増加したインビボ半減期を備えたFabおよびF(ab')₂のフラグメントは、米国特許第5,869,046号に記載されている。抗体フラグメントの産生のための他の技術は当業者に明らかである。他の実施形態において、選択の抗体は一本鎖Fvフラグメント(s c F v)である。WO 93/16185;米国特許第5,571,894号;および第5,587,458号を参照。Fvおよびs F vは、定常領域を欠いており、完全な形の結合部位を備えた唯一の種であり;したがってそれらはインビボ使用中の非特異的結合の低下に適切である。s F v融合タンパク質は、s F vのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでエフェクタータンパク質の融合をもたらすように構築されてもよい。Antibody Engineering、Borrebaeck編、前出を参照。抗体フラグメントは、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもまたよい。そのような直鎖状抗体フラグメントは単一特異性または二重特異性であってもよい。

【0177】

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は、当技術分野において公知である。例えばヒト化抗体は、その中に非ヒトソースから1つまたは複数のアミノ酸残基を導入することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は多くの場合「インポート」残基と呼ばれ、典型的には「インポート」可変ドメインから採用される。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列の超可変領域配列で置換することによって、Winterおよび共同研究者の方法(Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536)に従って、本質的には実行することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、非ヒト種からの対応する配列によって置換された、完全な形のヒト可変ドメインよりも実質的に少ないキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの超可変領域残基および恐らくいくつかのFR残基がゲッ歯類抗体中の類似した部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

【0178】

ヒト化抗体の作製において使用されるヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖の両方)の選択は抗原性を低下させるのに非常に重要である。いわゆる「最良適合」法に従って、ゲッ

歯類抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体からスクリーニングされる。次にげっ歯類の配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のためのヒトフレームワークとして認められる。(Sims et al. (1993) J. Immunol. 151 : 2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196 : 901)。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同一のフレームワークはいくつかの異なるヒト化された抗体に使用されてもよい(Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 4285; Presta et al. (1993) J. Immunol, 151 : 2623)。

10

【0179】

抗体が、抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性の保持と共にヒト化されることはさらに重要である。この目標を達成するために、1つの方法に従って、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元模型を使用して、親配列および様々な予想されるヒト化製品の分析の過程により調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは一般に利用可能で、当業者によく知られている。候補の免疫グロブリン配列の推定三次元コンフォメーション構造を例証および提示するコンピュータプログラムは、利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能と関連した残基の可能性の高い役割の分析(すなわち候補免疫グロブリンがその抗原を結合する能力に影響を及ぼす残基の分析)を可能にする。このように、標的抗原に対する親和性の増加のような所望される抗体特性が達成されるように、FR残基はレシピエント配列およびインポート配列から選択し組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接そして最も実質的に関与する。

20

【0180】

ヒト抗体

ヒト抗DLL4抗体は、上で記述されるような公知のヒト定常ドメイン配列に、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クローン可変ドメイン配列を組み合わせることによって構築することができる。あるいは、ヒトモノクローナル抗DLL4抗体はハイブリドーマ方法により作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒトミエローマおよびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えばKozbor J. Immunol, 133 : 3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (マルセル・デッカー、ニューヨーク、1987年); およびBoerner et al., J. Immunol, 147 : 86 (1991)により記述されている。

30

【0181】

内在性の免疫グロブリン産生の非存在下において、ヒト抗体の全レパートリーを、免疫に際して、産生可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を今や産生することができる。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖J領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失が、内在性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジに際してヒト抗体の産生をもたらすだろう。例えばJakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 2551 (1993); Jakobovits et al, Nature, 362 : 255 (1993); Bruggermann et al, Year in Immunol, 7 : 33 (1993)を参照。

40

【0182】

遺伝子シャフリングもまた非ヒト(例えばげっ歯類)抗体からヒト抗体を得るために使用することができ、ヒト抗体は出発の非ヒト抗体に類似する親和性および特異性を有する。この方法(それは「エピトープインプリンティング」とも呼ばれる)に従って、上で記

50

述されるようなファージディスプレイ技術により得られる非ヒト抗体フラグメントの重鎖または軽鎖の可変領域のいずれかは、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置換され、非ヒト鎖/ヒト鎖のs c F vまたはF a bキメラの集団を生成する。抗原による選択は非ヒト鎖/ヒト鎖のキメラs c F vまたはF a bの単離をもたらし、そこではヒト鎖は、一次ファージディスプレイクローン中の対応する非ヒト鎖の除去に際して破壊された抗原結合部位を回復し、すなわちエピトープは、ヒト鎖パートナーの選択を支配する（インプリントする）。この過程を残存する非ヒト鎖を置き換えるために繰り返する場合、ヒト抗体が得られる。（1993年4月1日に公開されたP C T W O 93/06213を参照）。従来のC D R移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術は、非ヒト起源のF R残基またはC D R残基を持たない完全ヒト抗体を提供する。

10

【0183】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性があるモノクローナル、好ましくはヒトまたはヒト化抗体である。本事例において、結合特異性のうちの1つはD L L 4についてであり、他方は他の抗原についてである。例示的な二重特異性抗体は、D L L 4タンパク質の2つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体は、D L L 4を発現する細胞へ細胞傷害剤を局在させるためにもまた使用されてよい。これらの抗体は、D L L 4を結合するアーム、および細胞傷害剤（例えばサボリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン）を結合するアームを持つ。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えばF（a b'）₂二重特異性抗体）として調製することができる。

20

【0184】

二重特異性抗体を作製する方法は、当技術分野において公知である。伝統的には、2つの重鎖が異なる特異性を有する場合には、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの共発現に基づく（M i l s t e i n a n d C u e l l o , N a t u r e , 305: 537（1983））。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組合せのために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10の異なる抗体分子の可能な混合物を産生し、このうちの1つのみが適正な二重特異性構造を有する。正しい分子の精製（それは親和性クロマトグラフィー工程により通常行われる）はかなり煩わしく、産物収率は低い。類似した手順は、1993年5月13日に公表されたW O 93/08829、およびT r a u n e c k e r e t a l , E M B O J . , 10: 3655（1991）中で開示される。

30

【0185】

異なるより好ましいアプローチに従って、所望される結合特異性（抗体-抗原結合部位）を備えた抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は、好ましくは、ヒンジ領域、C H 2領域およびC H 3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖の定常ドメインによるものである。少なくとも1つの融合に存在する第1の重鎖定常領域（C H 1）（軽鎖結合に必要な部位を含む）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合および（所望されるならば）免疫グロブリン軽鎖をコードするD N Aは、個別の発現ベクターの中へ挿入され、適切な宿主生物の中に共トランスフェクションされる。これは、構築において使用される3つのポリペプチド鎖の不均等な比率により最適収率が提供される場合に、実施形態における3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率の調整において高い融通性を提供する。しかしながら、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等比率での発現が高収率をもたらす場合、または比率が特に重要でない場合、1つの発現ベクター中に2つまたは3つのポリペプチド鎖についてのコード配列をすべて挿入することができる。

40

【0186】

このアプローチの好ましい実施形態において、二重特異性抗体は、1つのアーム中の第1の結合特異性を備えたハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペア（第2の結合特異性を提供する）からなる。二重特

50

異性分子の2分の1のみでの免疫グロブリン鎖鎖の存在により分離の容易な手段が提供されるので、この非対称構造が、不要な免疫グロブリン鎖の組合せからの、所望される二重特異性化合物の分離を促進することが見出された。このアプローチはWO 94 / 04690中で開示される。二重特異性抗体を生成するさらなる詳細については、例えばSureshet al, Methods in Enzymology, 121 : 210 (1986)を参照。

【0187】

別のアプローチに従って、ペアの抗体分子の間の接触面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にするように操作できる。好ましい接触面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の接触面からの1つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖（例えばチロシンまたはトリプトファン）と置換される。大きな側鎖と同一または類似したサイズの代償的な「くぼみ」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸（例えばアラニンまたはスレオニン）に置換することによって、第二の抗体分子の接触面上に生成される。これは、ホモ二量体のような他の不要な最終生成物を超えてヘテロ二量体の収率を増加させるためのメカニズムを提供する。

10

【0188】

二重特異性抗体は、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲート抗体のうちの1つはアビジンに、他方はビオチンに結合できる。そのような抗体は、例えば不要な細胞に対して免疫細胞を標的とするために（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の治療のために（WO 91 / 00360、WO 92 / 00373およびEP 03089）提案された。ヘテロコンジュゲート抗体は任意の都合のよい架橋方法を使用して作製されてもよい。適切な架橋剤は当技術分野において周知であり、多数の架橋技術に加えて米国特許第4,676,980号中で開示される。

20

【0189】

抗体フラグメントからの二重特異性抗体の生成ために技術もまた文献中で記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学結合を使用して調製することができる。Brennan et al., Science, 229 : 81 (1985)は、F(ab')₂フラグメントを生成するために完全な形の抗体をタンパク質分解的に切断する手順について記述する。近傍のジチオールを安定化しおよび分子間ジスルフィド形成を防止するために、これらのフラグメントは、ジチオール錯化剤の亜ヒ酸ナトリウムの存在下において還元される。次に、生成されたF(ab')₂フラグメントはチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。次にF(ab')₂-TNB誘導体のうちの1つはメルカプトエチルアミンによる還元によってF(ab')₂-チオールに再変換され、二重特異性抗体を形成するために等モル量の他のF(ab')₂-TNB誘導体と共に混合される。産生される二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のために薬剤として使用できる。

30

【0190】

最近の進歩により、二重特異性抗体を形成するために化学的に結合できるF(ab')₂-SHフラグメントの大腸菌からの直接的な回収が容易にされた。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175 : 217-225 (1992)により、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生が記述される。各F(ab')₂フラグメントは、大腸菌から別々に分泌され、二重特異性抗体を形成するためにインビトロの指向性化学カップリングを行なった。このように形成された二重特異性抗体は、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の溶解作用を引き起こすことに加えて、HER2受容体を過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に対して結合することができた。

40

【0191】

組換え細胞培養から二重特異性抗体フラグメントを直接作製し単離するために様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して産生される。Kostelny et al., J. Immunol, 148 (5) :

50

1547-1553 (1992)。FosおよびJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、2つの異なる抗体のFab'部分に遺伝子融合によって結合された。抗体ホモ二量体を単量体の形成のためにヒンジ領域で還元し、次に抗体ヘテロ二量体を形成するために再酸化した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生のためにもまた利用できる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって記述された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントの作製のための代替メカニズムを提供する。このフラグメントは、同一鎖上の2つのドメイン間の対合が可能でないほど短いリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(VL)に結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、1つのフラグメントのVHおよびVLのドメインは、別のフラグメントの相補的なVLおよびVHドメインと共に対合するように強いられ、その結果として、2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用によって二重特異性抗体フラグメントを作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照。

【0192】

2以上の価数を備えた抗体が検討される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)。

【0193】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって二価抗体よりも速く細胞内に取り込まれ(および/または異化され)てもよい。本発明の抗体は、3つ以上の抗原結合部位(例えば四価抗体)を備えた多価抗体(それらはIgMクラス以外である)になりえ、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生することができる。多価抗体は二量体化ドメインおよび3つ以上の抗原結合部位を含みうる。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む(またはそれらからなる)。この場合において、抗体はFc領域およびFe領域に対して3つ以上の抗原結合部位アミノ末端を含むだろう。本明細書において好ましい多価抗体は、3~約8、好ましくは4つの抗原結合部位を含む(またはそれらからなる)多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(および好ましくは2つのポリペプチド鎖)を含み、ポリペプチド鎖は2つまたは複数の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを含んでもよく、ここで、VD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1およびX2はアミノ酸またはポリペプチドを表わし、nは0または1である。例えば、ポリペプチド鎖は、VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖;またはVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を含んでもよい。本明細書における多価抗体は、好ましくはさらに少なくとも2(好ましくは4)つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含む。本明細書における多価抗体は、例えば約2~約8つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでもよい。本明細書で検討される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを含み、任意でさらにCLドメインを含む。

【0194】

抗体変異型

いくつかの実施形態において、本明細書において記述される抗体のアミノ酸配列修飾が検討される。例えば、抗体の結合能および/または他の生物学的特性を改善することは望ましいかもしれない。抗体のアミノ酸配列変異型は、抗体核酸の中に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。そのような修飾は、例えば抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはその中への挿入、および/またはその置換を含む。もし最終的なコンストラクトが所望される特性を持つならば、欠失、挿入および置換の任意の組合せは最終コンストラクトに達するように作製される。配列作製時に、被験体抗体アミノ酸配列中にアミノ酸変化を導入してもよい。

【0195】

変異誘発のために好ましい位置にある抗体の特定の残基または領域の有用な同定法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085 によって記述されるような「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれるものである。ここで、残基または標的残基のグループは同定され（例えば arg、asp、his、lys および glu のような荷電残基）、抗原とのアミノ酸の相互作用に影響するように中性アミノ酸または負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）により置換される。次に置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置を、置換の部位でまたはそれに対して、さらなるまたは他の変異を導入することによって改良する。したがって、アミノ酸配列変異の導入のための部位は前もって定義されるが、変異の性質それ自体は前もって定義される必要がない。例えば与えられた部位での変異の遂行を解析するために、アラニンスキャニング変異誘発またはランダム変異誘発は標的のコードンまたは領域で行われ、発現された免疫グロブリンは所望される活性についてスクリーニングされる。

10

【0196】

アミノ酸配列挿入は、単一のアミノ酸残基または複数のアミノ酸残基の配列内挿入だけでなく、1 残基～100 以上の残基を含むポリペプチド長にわたるアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合を含んでいる。末端挿入の具体例は、N 末端メチオニル残基を備えた抗体または細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗体分子の他の挿入の変異型は、抗体の血清半減期を増加させる酵素（例えば ADEPT について）またはポリペプチドの抗体の N 末端または C 末端への融合を含んでいる。

20

【0197】

ポリペプチドの糖鎖付加は典型的には N 結合型または O 結合型である。N 結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン（ここで X はプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素による結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、可能な糖鎖付加部位を生成する。O 結合型糖鎖付加は、ヒドロキシアミノ酸（5-ヒドロキシプロリンまたは 5-ヒドロキシリシン）が使用されてもよいが、最も一般的にはセリンまたはスレオニン）への糖（N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうちの 1 つ）の結合を指す。

30

【0198】

抗体への糖鎖付加部位の追加は、それが上記のトリペプチド配列の 1 つ以上を含むように、アミノ酸配列を改変することによって都合よく遂行される（N 結合型糖鎖付加部位のため）。その変化は、もとの抗体の配列への 1 つまたは複数のセリンまたはスレオニン残基の追加によってまたは置換によってもまた行われてよい（O 結合型糖鎖付加部位のため）。

【0199】

抗体が Fc 領域を含む場合には、それに結合された炭水化物が改変されてもよい。例えば、抗体の Fc 領域に結合されたフコースを欠損する成熟糖鎖構造を有する抗体は、米国特許出願第 US 2003/0157108 号 (Presta, L.) 中に記載されている。US 2004/0093621 (協和醗酵工業 (Kyowa Hakko Kogyo) 株式会社) もまた参照。抗体 Fc 領域に結合された炭水化物中の分岐型 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を備えた抗体は、WO 2003/011878、Jean-Mairet et al. および米国特許第 6,602,684 号、Umana et al. 中で参照される。抗体 Fc 領域に結合されるオリゴサッカライド中の少なくとも 1 つのガラクトース残基を備えた抗体は、WO 1997/30087、Patel et al. 中で報告される。その Fc 領域に結合された改変炭水化物の抗体に関する、WO 1998/58964 (Raju, S.) および WO 1999/22764 (Raju, S.) もまた参照。修飾された糖鎖付加をともなう抗原結合分子に関

40

50

するUS 2005/0123546 (Umana et al.) もまた参照。

【0200】

本明細書における好ましい糖鎖付加変異型はFc領域を含み、Fc領域に結合する糖鎖構造はフコースを欠損する。そのような変異型はADCC機能を改善した。任意で、さらにFc領域は、ADCCをさらに改善する1つまたは複数のその中のアミノ酸置換、例えばFc領域の位置298、333、および/または334(残基のEunnanバリング)での置換を含む。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体に関連した公報の具体例は、US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)を含む。脱フコシル化抗体を産生する細胞株の具体例は、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)); 米国特許出願第US 2003/0157108 A1号、Presta, L.; およびWO 2004/056312 A1, Adams et al., 特に実施例11で)、および-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細胞のようなノックアウト細胞株(Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))を含んでいる。

10

20

30

【0201】

別のタイプの変異型はアミノ酸置換変異型である。これらの変異型は、抗体分子中に異なる残基により置換された少なくとも1つのアミノ酸残基を有している。置換変異誘発のために最も興味のある部位は超可変領域を含むが、FR変化も検討される。保存的置換は「好ましい置換」の標題の下に表2において示される。そのような置換が生物学的活性における変化をもたらすならば、次に、より本質的な変化、表2中で示される「例示的な置換」、またはアミノ酸クラスに関してさらに以下で記載されるようなものを導入してもよく、産物はスクリーニングされる。

【0202】

【表 2】

表2

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

抗体の生物学的特性の本質的な調節は、(a) 例えばシートまたはヘリカルコンフォメーションとしての置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位での分子の荷電または疎水性、または(c) 側鎖の容積、の維持に対するそれらの効果が有意に異なる置換の選択によって遂行される。天然に存在する残基は一般的な側鎖特性に基づいたグループへと分けられる：(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；(3) 酸性：asp、glu；(4) 塩基性：his、lys、arg；(5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：gly、pro；および(6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0203】

非保存的な置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの別のクラスとの交換を要する。

【0204】

10

20

30

40

50

1つのタイプの置換変異型は、親抗体（例えばヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。一般に、さらなる開発のために選択された結果として生じる変異型は、それらが生成された親抗体と比較して生物学的特性は改善されているだろう。そのような置換変異型の生成のための都合のよい手段はファージディスプレイを使用する親和性成熟を含んでいる。簡潔には、いくつかの超可変領域部位（例えば6～7部位）は、各部位ですべての可能なアミノ酸置換を生成するように変異させられる。このように生成された抗体は、各粒子内にパッケージにされたM13の遺伝子III産物への融合として、線状ファージ粒子から提示される。次にファージで提示された変異型は、本明細書において開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば結合能）についてスクリーニングされる。調節のための候補の超可変領域部位を同定するために、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基の同定に、アラニンスキャニング変異誘発を実行できる。あるいはまたはさらに、抗体および抗原との間の接触点を同定する抗原抗体複合体の結晶構造を解析することは有用かもしれない。そのような接触残基および隣接残基は本明細書において詳述される技術に従う置換のための候補である。一旦そのような変異型が生成されれば、変異型のパネルは、本明細書において記述されるようなスクリーニングにかけられ、抗体はさらなる開発のために、1つまたは複数の関連する分析における優れた特性により選択されてもよい。

10

【0205】

抗体のアミノ酸配列変異型をコードする核酸分子は、当技術分野において公知の様々な方法によって調製される。これらの方法は、天然源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列変異型の場合において）、またはオリゴヌクレオチドを仲介した（または部位特異的）変異誘発、PCR変異誘発、および以前に調製された変異型または抗体の非変異型バージョンのカセット式変異誘発による調製を含むが、これらに限定されない。

20

【0206】

免疫グロブリンポリペプチドのFc領域中に1つまたは複数のアミノ酸修飾を導入し、その結果としてFc領域変異型を生成することは望ましい。Fc領域変異型は、ヒンジのシステインを含む1つまたは複数のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域配列（例えばヒトIgG₁、IgG₂、IgG₃またはIgG₄のFc領域）を含んでもよい。

【0207】

30

この記述および当技術分野の教示に従って、いくつかの実施形態において、野生型の対応する抗体と比較して（例えばFc領域において）、方法で使用される抗体が1つまたは複数の変化を含むことができるように検討される。これらの抗体は、それらの野生型相当物と比較して、治療的有用性のために必要とされる同一の特性を、それにもかかわらず実質的に保持するだろう。例えば、WO99/51642において例えば記載されるように、改変された（すなわち改良または減少された、のいずれか）C1q結合および/または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらすFc領域中の特定の変化を作製できると考えられる。Fc領域変異型の他の具体例に関する、Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; およびWO94/29351もまた参照。WO00/42072 (Presta) およびWO 2004/056312 (Lowman) は、FcRに対して改良された結合または減少した結合を有する抗体変異型について記述する。これらの特許公報の内容は、参照することにより本明細書に特に組み入れられる。Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) もまた参照。増加した半減期および新生仔Fc受容体（FcRn）（胎児に対する母体IgGの移行に関与する）に対する改良された結合を備えた抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) およびKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)）は、US2005/0014934 A1 (Hinton et al.) 中で記載されている。これらの抗体は、FcRnに対するFc領域の結合を改善する1つまたは複数の

40

50

その中の置換を備えたFc領域を含む。改変されたFc領域アミノ酸配列および増加または低下したC1q結合能を備えたポリペプチド変異型は、米国特許第6,194,551 B1号、WO99/51642中で記載される。それらの特許公報の内容は、参照することにより特に本明細書に組み入れられる。Idusogie et al., J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000)もまた参照。

【0208】

抗体誘導体

抗体は、当技術分野において公知であり容易に利用可能な追加の非タンパク性部分を含むようにさらに修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化のために適切な部分は水溶性重合体である。水溶性重合体の非限定的具体例は、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共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(ホモ重合体またはランダム共重合体のいずれか)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレン(propylene)グリコールホモ重合体、プロリプロピレン(prolypropylene)オキサイド/エチレンオキサイド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにその混合物を含むが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために製造における長所を有するだろう。重合体は任意の分子量であってもよく、分岐または直鎖状であってもよい。抗体に対して結合された重合体の数は変化してもよく、1つ以上の重合体が結合されるならば、それらは同一分子または異なる分子でありえる。一般に、誘導体化のために使用される重合体の数および/またはタイプは、抗体誘導体が定義された条件下の治療法において使用されるかどうかなどにかかわらず、特定の特性または改良されるべき抗体の機能を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて決定することができる、

所望される特性を備えた抗体のためのスクリーニング

抗体は、当技術分野において公知の様々な分析により、それらの物理的/化学的特性および生物学的機能について特性を評価することができる。いくつかの実施形態において、抗体は、任意の1つまたは複数の、DLL4への結合、ノッチ受容体活性化の減少または遮断、ノッチ受容体下流の分子シグナリングの減少または遮断、DLL4へのノッチ受容体結合の破壊または遮断、および/または内皮細胞増殖の促進、および/または内皮細胞分化の阻害、および/または動脈分化の阻害、および/または腫瘍血管灌流の阻害、および/または腫瘍、細胞増殖障害または癌の治療および/または予防;および/またはDLL4の発現および/または活性に関連した障害の治療または予防、および/またはノッチ受容体の発現および/または活性に関連した障害の治療または予防について特性を評価される。

【0209】

精製された抗体は、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィーおよびババイン消化を含むが、これらに限定されない、一連の分析によりさらに特性を評価することができる。

【0210】

本発明の特定の実施形態において、本明細書において産生された抗体は、それらの生物学的活性について解析される。いくつかの実施形態において、本発明の抗体はそれらの抗原結合活性について検査される。当技術分野において公知であり、本明細書において使用することができる抗原結合分析は、ウエスタンブロット、放射免疫分析、ELISA(酵素結合免疫吸着分析)、「サンドイッチ」免疫分析、免疫沈降分析、蛍光性免疫分析およびプロテインA免疫分析のような技術を使用する、任意の直接的または競合的結合分析を含むが、これらに限定されない。例示的な抗原結合分析は、以下の実施例セクションにお

いて提供される。

【0211】

本明細書において記述される特有の特性を持つ抗D L L 4抗体は、任意の都合のよい方法により所望される特性について抗D L L 4のハイブリドーマクローンをスクリーニングすることによって得ることができ、それらのうちのいくつかは本明細書において記述され例示される。例えば、D L L 4へのノッチ受容体の結合を遮断するかまたは遮断しない抗D L L 4モノクローナル抗体が所望されるならば、候補抗体は、競合的結合E L I S Aのような結合競合分析において検査することができ、その場合プレートウェルはD L L 4によりコートされ、対象となるノッチ受容体の過剰量中で、抗体の溶液はコートされたプレート上に重ねられ、結合した抗体は酵素により検出される（例えば結合した抗体のH R P
10
コンジュゲート抗I g抗体またはビオチン化抗I g抗体との接触および例えばストレプトアビジンH R Pおよび/または過酸化水素によるプレートの現像によるH R P発色反応の現像およびE L I S Aプレートリーダーによる490nmでの分光測光によるH R P発色反応の検出）。

【0212】

1つの実施形態において、抗体はすべてのエフェクター機能ではなくいくつかを持つ改変された抗体であり、インビボ抗体の半減期は重要であるが、特定のエフェクター機能（補体およびA D C Cのような）は不必要または有害であるという点で、この抗体を多数の適用のための望ましい候補にする。特定の実施形態において、生産された免疫グロブリンのF c活性は望ましい特性のみが維持されていることを保証するために測定される。イン
20
ビトロのおよび/またはインビボ細胞毒性分析は、C D Cおよび/またはA D C C活性の減少/枯渇を確認するために行なうことができる。例えば、F c受容体（F c R）結合分析は抗体がF c R結合を欠損している（従ってA D C C活性が欠損している可能性の高い）が、F c R n結合能力を保持することを保証するために行なうことができる。A D C Cの仲介のための主要な細胞（N K細胞）はF c R I I Iのみを発現するが、単球はF c R I、F c R I IおよびF c R I I Iを発現する。造血細胞でのF c R発現は、R a v e t c h a n d K i n e t , A n n u . R e v . I m m u n o l 9 : 4 5 7 - 9 2 （1991）の464ページの表3に要約される。対象となる分子のA D C C活性を評価するインビトロの分析の一例は、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されている。そのような分析のために有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（P B M C）およびナチュラルキラー（N K）細胞を含んでいる。
30
あるいはまたはさらに、対象となる分子のA D C C活性は、例えばC l y n e s e t a l . P N A S （U S A）95:652-656（1998）中で開示されるもののような動物モデルにおいてインビボで評価されてもよい。C 1 q結合分析もまた、抗体がC 1 qを結合することができず従ってC D Cの活性を欠損することを確認するために行なわれてもよい。補体活性化を評価するために、C D Cの分析は、例えばG a z z a n o - S a n t o r o e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 202:163（1996）に記載されるように実行されてもよい。F c R n結合およびインビボクリアランス/半減期の定量もまた、当技術分野において公知の方法（例えば実施例セクションに記載されるもの）を使用して実行することができる。
40

【0213】

ベクター、宿主細胞および組換え法

抗体の組換え産生のために、それをコードする核酸は単離され、さらなるクローニング（D N Aの増幅）または発現のための複製可能ベクターへと挿入される。抗体をコードするD N Aは、通常の手順（例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブの使用によって）を使用して、容易に単離および配列決定される。多数のベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物（一般に哺乳類）起源である。任意のアイソタイプの定常領域（I g GおよびI g M、I g A、I g DおよびI g E定常領域を含む）をこの目的のために使用することができ、その
50

ような定常領域は任意のヒトまたは動物種から得ることができることが認識される。

【0214】

a. 原核生物の宿主細胞を使用する抗体の生成：

i. ベクター構築抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は標準の組換え技術を使用して得ることができる。望ましいポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離および配列決定されてもよい。あるいはポリヌクレオチドは、ヌクレオチドシンセサイザーまたはPCR技術を使用して合成することができる。一旦得られたならば、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製および発現できる組換えベクターへと挿入される。当技術分野において利用可能であり、公知の多数のベクターは本発明のために使用できる。適切なベクターの選択は、ベクターへと挿入される核酸のサイズおよびベクターにより形質転換される特定の宿主細胞に主に依存するだろう。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはその両方）、およびそれが存在する特定の宿主細胞との適合性に依存して、様々な成分を含む。ベクター成分は一般に、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種核酸挿入物および転写終結配列を含むが、これらに限定されない。

10

【0215】

一般に、宿主細胞に適合する種に由来するレプリコンおよび制御配列を含むプラスミドベクターは、これらの宿主に関連して使用される。ベクターは、通常、形質転換細胞における表現型による選択を提供することができるマーキング配列に加えて、複製部位を保有する。例えば、典型的には、大腸菌はpBR322（大腸菌種に由来するプラスミド）を使用して形質転換される。pBR322は、アンピシリン（Amp）およびテトラサイクリン（Tet）抵抗性をコードする遺伝子を含んでおり、したがって形質転換細胞の同定のための容易な手段を提供する。pBR322、その誘導体または他の微生物のプラスミドまたはバクテリオファージは、微生物による内在性タンパク質の発現のために使用することができるプロモーターもまた含むかまたは含むように修飾されてもよい。特定の抗体の発現のために使用されるpBR322誘導体の具体例は、Carter et al、米国特許第5,648,237号に詳細に記載される。

20

【0216】

さらに、宿主微生物に適合するレプリコンおよび制御配列を含むファージベクターは、形質転換ベクターとしてこれらの宿主に関連して使用することができる。例えば、GEM（商標）-11のようなバクテリオファージは、大腸菌LE392のような感受性宿主細胞の形質転換に使用できる組換えベクターの作製において利用されてもよい。

30

【0217】

発現ベクターはポリペプチド成分の各々をコードする、2つまたは複数のプロモーター-シストロンペアを含んでもよい。プロモーターは、その発現を調節するシストロンに対して上流に（5'）置かれる翻訳されない調節配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導可能で構成的である2つのクラスに分類される。誘導可能プロモーターは、培養条件の変化（例えば栄養物質の存在もしくは非存在、または温度の変化）に反応して、その制御下でシストロンの転写を増加したレベルで開始するプロモーターである。

40

【0218】

様々な可能な宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素の消化を介してソースDNAからプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクターに挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAへ操作可能に結合することができる。天然のプロモーター配列および多数の異種プロモーターの両方が、標的遺伝子の直接的な増幅および/または発現に対して使用されてもよい。いくつかの実施形態において、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、異種プロモーターは一般に、発現させる標的遺伝子のより多量の転写およびより高い収率を可能にするので、異種プロモーターが利用される。

【0219】

50

原核生物宿主との使用のために適切なプロモーターは、PhoAプロモーター、 β -ガラクトマーゼ (galactamase) およびラクトースプロモーターシステム、トリプトファン (trp) プロモーターシステム、およびtacまたはtrcプロモーターのようなハイブリッドプロモーターを含む。しかしながら、細菌において機能的な他のプロモーター (他の公知の細菌またはファージのプロモーターのような) は、同様に適切である。それらのヌクレオチド配列が公表されており、その結果として、当業者が、任意の必要な制限部位を供給するためにリンカーまたはアダプターを使用して、標的の軽鎖および重鎖 (Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269) をコードするシストロンへ、それらを操作可能にライゲーションすることを可能にする。

10

【0220】

本発明の1つの態様において、組換えベクター内の各シストロンは、膜を横切って発現されるポリペプチドの移行を導く分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分であってもよいが、またはそれはベクターへと挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であってもよい。本発明のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識およびプロセッシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) 配列であるべきである。異種ポリペプチドに固有のシグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核生物の宿主細胞のために、シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippまたは耐熱性毒素II (STII) リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpAおよびMBPからなる群から選択される原核生物のシグナル配列によって置換される。本発明の1つの実施形態において、発現系の両方のシストロンにおいて使用されるシグナル配列は、STIIシグナル配列またはその変異型である。

20

【0221】

別の態様において、本発明に記載の免疫グロブリンの産生が宿主細胞の細胞質中で生じる場合があり、したがって各シストロン内に分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点で、免疫グロブリン軽鎖および重鎖は、細胞質内で機能的な免疫グロブリンを形成するように発現され、折畳まれ、集合させられる。特定の宿主株 (例えば大腸菌trxB-株) は、ジスルフィド結合形成のために好ましい細胞質条件を提供し、その結果として、発現されたサブユニットタンパク質の適切な折畳みおよび集合を可能にする。Proba

30

【0222】

抗体の発現のために適切な原核生物の宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性菌のような、古代細菌および真性細菌を含んでいる。有用な菌の具体例は、エシェリヒア (Escherichia) 属 (例えば大腸菌)、杆菌 (例えば枯草菌 (B. subtilis))、腸内細菌またはシュードモナス (Pseudomonas) 種 (例えば緑膿菌 (P. aeruginosa))、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) またはセラチア・マルセッサンス (Serratia marcescans)、クレブシエラ (Klebsiella) 属、プロテウス (Proteus) 属、シゲラ (Shigella) 属、リゾビウム (Rhizobia) 属、ビトレオシラ (Vitreoscilla) 属またはパラコッカス (Paracoccus) 属を含んでいる。1つの実施形態において、グラム陰性細胞が使用される。1つの実施形態において、大腸菌細胞は宿主として本発明のために使用される。大腸菌株の具体例は、遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kanR (米国特許第5,639,635号) を有する株33D3を含む、株W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987) ページ1190~1219; ATCC登録番号27,325) およびその誘導体を含む。大腸菌294 (ATCC 31,446)、大腸菌B、大腸菌 1

40

50

776 (ATCC 31, 537) および大腸菌 RV308 (ATCC 31, 608) のような、他の株およびその誘導体もまた適切である。これらの実施例は、限定するものではなく例示的である。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のいずれかの誘導体を構築する方法は、当技術分野において公知であり、例えば Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990) 中で記載される。細菌細胞中のレプリコンの複製可能性を考慮に入れて、適切な細菌を選択することが一般に必要である。例えば、pBR322、pBR325、pACYC177 または pKN410 のような周知のプラスミドがレプリコンを供給するために使用される場合、大腸菌、セラチア菌またはサルモネラ菌種は、宿主として適切に使用できる。典型的には、宿主細胞は最小限の量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、望ましくは追加のプロテアーゼ阻害剤を細胞培養中に取り入れてもよい。

10

【0223】

ii. 抗体産生

宿主細胞は上記の発現ベクターにより形質転換され、形質転換体を選択するプロモーターの誘導または望ましい配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に調節した通常の培養液中で培養される。

【0224】

形質転換は、DNA が染色体外のエLEMENTとして、または染色体の成分によって複製可能なように、原核生物の宿主の中にDNAを導入することを意味する。使用される宿主細胞に依存して、形質転換はそのような細胞に適切な標準技術を使用して行われる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は、堅牢な細胞壁バリアを含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための別の方法は、ポリエチレングリコール/DMSOを用いる。さらに使用される別の技術は、エレクトロポレーションである。

20

【0225】

ポリペプチドを産生するために使用される原核細胞は、当技術分野において公知であり、選択された宿主細胞の培養のために適切な培地中で増殖される。適切な培地の具体例は、必要な栄養サプリメントを加えたルリア培養液(LB)を含む。いくつかの実施形態において、培地は、発現ベクターを含む原核細胞の増殖を選択的に可能にする、発現ベクターの構築に基づいて選ばれた選択薬剤もまた含む。例えば、アンピシリンは、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のための培地に加えられる。

30

【0226】

炭素、窒素および無機リン酸塩源に加えて、任意の必要なサプリメントもまた、単独、または複合窒素源のような別のサプリメントまたは培地との混合物として導入され、適切な濃度で含まれてもよい。任意で、培養液は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリールおよびジチオトレイトールからなる群から選択される1つまたは複数の還元剤を含んでもよい。

【0227】

原核生物の宿主細胞は適温で培養される。大腸菌増殖のために、選択温度は例えば約20 ~ 約39 にわたり、より好ましくは約25 ~ 約37、さらにより好ましくは約30 である。培地のpHは、主に宿主生物に依存して、約5 ~ 約9にわたる任意のpHであってもよい。大腸菌については、pHは好ましくは約6.8 ~ 約7.4、およびより好ましくは約7.0 である。

40

【0228】

誘導可能プロモーターが発現ベクター中で使用されるならば、タンパク質発現はプロモーターの活性化のために適切な条件下で誘導される。本発明の1つの態様において、PhoAプロモーターはポリペプチドの転写制御のために使用される。したがって、形質転換された宿主細胞は誘導のためにリン酸塩制限培地中で培養する。好ましくは、リン酸塩制限培地は、C.R.A.P培地である(例えばSimmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。当技術分野において公知であるように、様々な他の誘導因子は、用いられるベクターコ

50

ンストラクトに従って使用されてもよい。

【0229】

1つの実施形態において、発現された本発明のポリペプチドは、宿主細胞のペリプラスムの中に分泌され、ペリプラスムから回収される。タンパク質回収は、一般に浸透圧ショック、超音波処理または溶解のような手段によって微生物を破壊することを典型的には必要とする。一旦細胞が破壊されれば、細胞残屑または完全な細胞を遠心分離または濾過によって除去してもよい。タンパク質は、例えば親和性樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製されてもよい。あるいは、タンパク質は培養培地の中に輸送され、その中に単離できる。細胞は培養から撤去されてもよく、培養上清は産生タンパク質のさらなる精製のために濾過および濃縮される。発現ポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) およびウエスタンブロット分析のような一般に公知の方法を使用して、さらに単離および同定できる。

10

【0230】

本発明の1つの態様において、抗体産生は発酵プロセスによって大量に行われる。様々な大規模流加発酵手順が組換えタンパク質の産生のために利用可能である。大規模発酵は少なくとも1000リットルの収容能力、好ましくは約1,000~100,000リットルの収容能力を有する。これらの発酵槽は、酸素および栄養物質、特にグルコース (好ましい炭素/エネルギー源) を分散するために攪拌羽根を使用する。小規模発酵は、容積収容能力で最高およそ100リットルであり、約1リットル~約100リットルにわたる発酵槽中の発酵を一般に指す。

20

【0231】

発酵過程において、細胞が望ましい密度 (例えば約180~220のOD550、この段階では細胞は初期定常期である) まで適切な条件下で増殖した後に、タンパク質発現の誘導は典型的には開始される。当技術分野において公知であり上で記載されるような様々な誘導因子は、用いられるベクターコンストラクトに従って使用されてもよい。細胞は誘導の前に、短い期間増殖されてもよい。さらに長いまたは短い誘導時間を使用してもよいが、通常細胞は約12~50時間誘導される。

【0232】

ポリペプチド産生の収率および質を改善するために、様々な発酵条件は調節することができる。例えば分泌された抗体ポリペプチドの適切な集合および折畳みを改善するために、Dsbタンパク質 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、またはDsbG) またはFkpA (シャペロン活性をとまなうペプチジルプロリルシス、トランス-イソメラーゼ) のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する追加のベクターは、宿主原核細胞を共形質転換するために使用できる。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞に産生された異種タンパク質の適切な折畳みおよび溶解を促進することが実証されている。Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou et al.、米国特許第6,083,715号; Georgiou et al.、米国特許6,027,888番; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210。

30

40

【0233】

発現された異種タンパク質のタンパク質分解を最小限にするために (特にタンパク質分解感受性のもの)、タンパク質分解酵素を欠損した特定の宿主株を本発明のために使用できる。例えば宿主細胞株は、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVIおよびその組合せのような公知の細菌プロテアーゼをコードする遺伝子中の遺伝子変異をもたらすように調節されてもよい。いくつかの大腸菌のプロテアーゼ欠損株は利用可能であり、例えばJoly et al. (1998)、前出; Georgiou et al.、米国特許第5

50

、264、365号；Georgiou et al.、米国特許第5,508,192号；Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)中で記載されている。

【0234】

1つの実施形態において、タンパク質分解酵素を欠損して、1つまたは複数のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドにより形質転換された大腸菌株は、発現系における宿主細胞として使用される。

【0235】

i i i . 抗体精製

当技術分野において公知の標準タンパク質精製方法を用いることができる。以下の手順は適切な精製法の例示である：免疫親和性またはイオン交換カラムによる分画、エタノール沈澱、逆相HPLC、シリカまたはDEAEのような陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸沈澱、および例えばセファデックスG-75を使用するゲル濾過。

【0236】

1つの態様において、固相上の固定化プロテインAは全長抗体産物の免疫親和性精製のために使用される。プロテインAは、抗体のFc領域に対する高親和性により結合するスタフィロコッカス・アウレアス (Staphylococcus aureus) からの41kD細胞壁タンパク質である。Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAが固定化される固相は、好ましくはガラスまたはシリカの表面を含むカラム、より好ましくは、細孔性ガラスカラムまたはケイ酸カラムである。いくつかの適用において、カラムは混入物の非特異性の接着を防止しようとして、グリセロールのような試薬によりコートされた。

【0237】

精製の第1の工程として、プロテインAに対する対象となる抗体の特異的結合を可能にするために、上で記述されるような細胞培養に由来する調製品は、プロテインA固定化固相上に適用される。次に非特異的に固相に結合された混入物を除去するために、固相を洗浄する。最終的に対象となる抗体を溶出によって固相から回収する。

【0238】

b . 真核生物宿主細胞を使用する抗体の生成：

ベクター成分は、一般に以下の1つまたは複数を含むが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列。

【0239】

(i) シグナル配列成分

真核生物宿主細胞で使用するベクターは、シグナル配列、または対象となる成熟タンパク質もしくはポリペプチドのN末端で特異的な切断部位を有する他のポリペプチドもまた含んでもよい。好ましくは選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識およびプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）配列である。哺乳類細胞発現では、ウイルス性分泌リーダー（例えば単純ヘルペスgDシグナル）と同様に、哺乳類シグナル配列も利用可能である。

【0240】

そのような前駆体領域のためのDNAは、抗体をコードするDNAに対するリーディングフレーム中でライゲーションされる。

【0241】

(i i) 複製起点

一般に、複製起点成分は哺乳類発現ベクターのために必要ではない。例えば、初期プロモーターを含んでいるという理由で、SV40起点は典型的には使用されてもよい。

【0242】

(i i i) 選択遺伝子成分

10

20

30

40

50

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択可能なマーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含んでもよい。典型的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリン、に対する耐性を付与するか、(b)場合により、栄養要求性の欠損を相補するか、または(c)複合培地から利用可能でない重要な栄養物質を供給する、タンパク質をコードする。

【0243】

選択スキームの1つの具体例は、宿主細胞の増殖を停止するために薬物を利用する。異種遺伝子により結果よく形質転換される細胞は、薬剤抵抗性を付与するタンパク質を産生し、したがって選択レジメンから生存する。そのような優性選択の具体例は、薬剤のネオマイシン、ミコフェノール酸およびヒグロマイシンを使用する。

10

【0244】

哺乳類細胞のために適切な選択マーカーの別の具体例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよび-II、好ましくは霊長類のメタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどのような抗体核酸を取り込むのに有能な細胞の識別を可能にするものである。

【0245】

例えば、DHFR選択遺伝子により形質転換された細胞は、DHFRの競合的なアンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含む培養液中ですべての形質転換体を培養することによって最初に同定される。野生型DHFRが用いられる場合の適切な宿主細胞は、DHFR活性欠損チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(例えばATCC CRL-9096)である。

20

【0246】

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、およびアミノグリコシド3'-フォスフォトランスフェラーゼ(APH)のような別の選択可能なマーカーにより形質転換または共形質転換された宿主細胞(特に内在性のDHFRを含む野生型宿主)は、アミノグリコシド系抗生物質(例えばカナマイシン、ネオマイシン、G418)のような選択可能マーカーのための選択薬剤を含む培地中での細胞増殖によって選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照。

【0247】

(iv)プロモーター成分

30

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、宿主生物によって認識され操作可能に抗体ポリペプチド核酸に結合されるプロモーターを含む。プロモーター配列は真核生物については公知である。実質的には、すべての真核細胞遺伝子は、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写開始から70~80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域(ここでNは任意のヌクレオチド)である(配列番号:3)。大部分の真核細胞遺伝子の3'末端は、コード配列の3'末端へのポリAテイルの追加のためのシグナルのAATAAA配列である(配列番号:4)。これらの配列はすべて、真核細胞発現ベクターの中へ適切に挿入される。

【0248】

40

哺乳類宿主細胞中のベクターからの抗体ポリペプチド転写は、もしかかるプロモーターが宿主細胞システムに適合すれば、例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(アデノウイルス2のような)、ウシバビローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアンウイルス40(SV40)のようなウイルスゲノムから、異種の哺乳類のプロモーター(例えばアクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター)から、熱ショックプロモーターから、得られたプロモーターによって制御される。

【0249】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点もまた含むSV40制限断片として都合よく得られる。ヒトサイトメガロウイルスの前初期プロ

50

モーターは、HindIII-E制限断片として都合よく得られる。ベクターとしてウシパピロマウイルスを使用して、哺乳類宿主中でDNAを発現するためのシステムは、米国特許第4,419,446号中で開示される。このシステムの修飾は米国特許4,601,978番中で記載されている。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復はプロモーターとして使用できる。

【0250】

(v) エンハンサーエレメント成分

本発明の抗体ポリペプチドをコードするDNAのより高等な真核生物による転写は、ベクターの中へエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増加される。多数のエンハンサー配列が、哺乳類遺伝子（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン）から今や公知である。しかしながら典型的には、真核生物細胞ウイルスからのエンハンサーを使用するだろう。具体例は、複製起点（bp 100～270）の後期側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオマウイルスエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーを含む。真核生物プロモーターの活性化のためのエレメントの増強に関するYaniv, Nature 297:17-18 (1982)もまた参照。エンハンサーは抗体ポリペプチドをコードする配列に対して5'または3'の位置でベクターの中につながれてもよいが、好ましくはプロモーターから5'部位に位置する。

10

【0251】

(vi) 転写終結成分

真核生物宿主細胞中で使用される発現ベクターは、典型的には転写の終了のために、およびmRNAの安定化のために必要な配列もまた含むだろう。そのような配列は、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'および時々3'の非翻訳領域から一般に利用可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAのうちの非翻訳部分中でポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含んでいる。1つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026およびその中で開示される発現ベクターを参照。

20

【0252】

(vii) 宿主細胞の選択および形質転換

本明細書のベクターにおけるDNAのクローニングまたは発現のために適切な宿主細胞は、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書において記述されるより高等な真核細胞を含んでいる。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖はルーチンの手順となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の具体例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（浮遊培養中の増殖のためにサブクローン化された293細胞または293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巢細胞／-DHFR（CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）；サル腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；パッファローラット肝細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳房腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞癌株（Hep G2）。である。

30

40

【0253】

宿主細胞は、抗体産生のための上記の発現ベクターまたはクローニングベクターにより

50

形質転換され、プロモーターの誘導形質転換体の選択、または望ましい配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に調節した通常の培養液中で培養される。

【0254】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養されてもよい。ハムF10 (シグマ (Sigma) 社)、最小必須培地 (MEM)、シグマ社)、RPMI-1640 (シグマ社) およびダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、シグマ) のような市販で入手可能な培地は、宿主細胞の培養のために適切である。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、
10
米国特許第4,767,704号;第4,657,866号;第4,927,762号;第4,560,655号;もしくは第5,122,469号; WO 90/03430; WO 87/00195;または米国特許Re.30,985中で記載される培地のいずれかは、培養培地として宿主細胞のために使用されてもよい。これらの培地のいずれかは、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の増殖因子 (インスリン、トランスフェリンまたは表皮増殖因子のような)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩のような)、緩衝剤 (ヘブスのような)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジンのような)、抗生物質 (ゲンタマイシン (GENTAMYCIN) (商標) 薬物のような)、微量エレメント (通常マイクロモル範囲の最終的な濃度で存在する無機化合物として定義される) およびグルコースまたは実効エネルギー源を追加されてもよい。他
20
の必要なサプリメントもまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれてもよい。温度、pH および同種のもののような培養条件は、発現のために選択された宿主細胞により以前に使用されたものであり、当業者には明らかである。

【0255】

(ix) 抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内で産生されるか、または直接培地の中に分泌されうる。第1の工程として、抗体が細胞内で産生されるならば、微粒子残屑 (宿主細胞または溶解されたフラグメントのいずれか) は、例えば遠心分離または限外濾過によって除去される。抗体が培地の中に分泌される場合には、一般にそのような発現系から上清は、市販で入手可能なタンパク質濃縮フィルター (例えばアミコン (Amicon) 社または
30
ミリポア (Millipore) 社ペリコン (Pellicon) 限外濾過ユニット) を使用して、最初に濃縮される。PMSFのようなプロテアーゼ阻害剤はタンパク質分解を阻害する前述の工程のいずれかの中に含まれてもよく、抗生物質は外因性汚染菌の増殖を防止するために含まれてもよい。

【0256】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、および親和性クロマトグラフィー (好ましい精製法は親和性クロマトグラフィーである) を使用して精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAはヒト 1、2または4重鎖に基づいて、抗体
40
を精製するために使用することができる (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。プロテインGはすべてのマウスアイソタイプおよびヒト 3に対して推奨される (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和性リガンドが結合されるマトリックスは、多くの場合アガロースであるが、他のマトリックスは利用可能である。細孔性ガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンのような機械的に安定したマトリックスは、アガロースで達成できるよりも速い流速およびより短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合には、ベイカーボンド (Bakerbond) A BX (商標) 樹脂 (J.T. ベイカー (Baker) 社 (フィリップスバーグ、ニュージャージー)) が、精製のために有用である。イオン交換カラム上の分画、エタノール沈澱
50

、逆相 H P L C、シリカ上のクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース (S E P H A R O S E) (商 標) 上のクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂上のクロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラムのような)、クロマトフォーカシング、 S D S - P A G E および硫酸沈澱のようなタンパク質精製のための他の技術もまた、回収される抗体に依存して利用可能である。

【 0 2 5 7 】

任意の予備的な精製工程に続いて、対象となる抗体および混入物を含む混合物は、約 2 . 5 ~ 4 . 5 間の p H の溶出緩衝液を使用して、好ましくは低い塩濃度 (例えば約 0 ~ 0 . 2 5 M の塩から) で実行される低 p H 疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけられてもよい。

10

【 0 2 5 8 】

免疫コンジュゲート

本発明は、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素 (例えば細菌、真菌、植物、動物起源の酵素により活性のある毒素、またはそのフラグメント) または放射性同位体 (すなわち放射性コンジュゲート) のような細胞傷害剤にコンジュゲートされた抗 D L L 4 の抗体を含む、免疫コンジュゲート (同じ意味で「抗体 - 薬物コンジュゲート」または「 A D C 」と呼ばれる) を検討する。

【 0 2 5 9 】

コンジュゲートしていない薬物剤の全身投与が除去されようとする腫瘍細胞だけでなく正常細胞に対する許容できないレベルの毒性をもたらす場合、細胞傷害剤または細胞静止剤 (すなわち癌の治療において腫瘍細胞を殺すかまたは阻害する薬剤 (S y r i g o s a n d E p e n e t o s (1 9 9 9) A n t i c a n c e r R e s e a r c h 1 9 : 6 0 5 - 6 1 4 ; N i c u l e s c u - D u v a z a n d S p r i n g e r (1 9 9 7) A d v . D r g D e l . R e v . 2 6 : 1 5 1 - 1 7 2 ; 米国特許第 4 , 9 7 5 , 2 7 8 号) の局所送達のための抗体薬物コンジュゲートの使用は、腫瘍に対する薬物部分の標的化された送達およびその中での細胞内蓄積を可能にする (B a l d w i n e t a l . , (1 9 8 6) L a n c e t p p . (M a r . 1 5 , 1 9 8 6) : 6 0 3 - 0 5 ; T h o r p e , (1 9 8 5) “ A n t i b o d y C a r r i e r s O f C y t o t o x i c A g e n t s I n C a n c e r T h e r a p y : A R e v i e w , ” i n M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s ' 8 4 : B i o l o g i c a l A n d C l i n i c a l A p p l i c a t i o n s , A . P i n c h e r a e t a l . (編) , ページ 4 7 5 - 5 0 6) 。それによって最小の毒性で最高の有効性が求められる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方は、これらの戦略において有用なものとして報告された。 (R o w l a n d e t a l . , (1 9 8 6) C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . , 2 1 : 1 8 3 - 8 7) 。これらの方法において使用される薬剤はダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびビンデシンを含む (R o w l a n d e t a l . , (1 9 8 6) 前出) 。抗体毒素コンジュゲートにおいて使用される毒素は、ジフテリア毒素のような細菌毒素、リシンのような植物毒素、ゲルダナマイシンのような低分子毒素 (M a n d l e r e t a l (2 0 0 0) J o u r , o f t h e N a t . C a n c e r I n s t . 9 2 (1 9) : 1 5 7 3 - 1 5 8 1 ; M a n d l e r e t a l (2 0 0 0) B i o o r g a n i c & M e d . C h e m . L e t t e r s 1 0 : 1 0 2 5 - 1 0 2 8 ; M a n d l e r e t a l (2 0 0 2) B i o c o n j u g a t e C h e m . 1 3 : 7 8 6 - 7 9 1) 、メイタンシノイド (E P 1 3 9 1 2 1 3 ; L i u e t a l . , (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 8 6 1 8 - 8 6 2 3) 、およびカリケアマイシン (L o d e e t a l (1 9 9 8) C a n c e r R e s . 5 8 : 2 9 2 8 ; H i n m a n e t a l (1 9 9 3) C a n c e r R e s . 5 3 : 3 3 3 6 - 3 3 4 2) を含む。毒素は、チューブリン結合、D N A 結合またはトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムによって、それらの細胞傷害性

20

30

40

50

効果および細胞静止効果をもたらす。いくつかの細胞毒性薬は、高分子の抗体またはタンパク質受容体リガンドにコンジュゲートした場合に不活性またはそれほど活性がない傾向がある。

【0260】

ゼバリン (ZEVALIN) (登録商標) (イブリツモマブ・チウクセタン、バイオジェン/アイデック (Biogen/Idec) 社) は、チオ尿素リンカーキレーターによって結合された正常なBリンパ球および悪性Bリンパ球の表面上に見出されるCD20抗原に対して作製されたマウスIgG1カップモノクローナル抗体ならびに放射性同位元素の ^{111}In または ^{90}Y からなる抗体-放射性同位元素コンジュゲートである (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) に対する活性を有するが、投与は大部分の患者において重篤かつ持続的血球減少をもたらす。マイロターゲット (MYLOTARG) (商標) (ゲムツズマブ・オゾガミシン、ワイス・ファーマシューティカルズ (Wyeth Pharmaceuticals) 社) (カリケアマイシンに結合されたhuCD33抗体からなる抗体薬物コンジュゲート) は、注入による急性骨髄白血病の治療のために2000年に承認された (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 第5079233号; 第5585089号; 第5606040号; 第5693762号; 第5739116号; 第5767285号; 第5773001号)。カンツズマブ・メルタンシン (cantuzumab mertansine) (イミュノジェン (Immunogen) 社) (ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬物部分 (DM1) に結合されたhuCD242抗体からなる抗体薬物コンジュゲート) は、結腸癌、膵臓癌、胃癌および他のもののようなCanAgを発現する癌の治療のための第II相試験へ進んでいる。MLN-2704 (ミレニウム・ファルマ (Millennium Pharm.) 社、BZLバイオロジーズ (Biologies) 社、イミュノジェン社) (メイタンシノイド薬物部分 (DM1) に結合された抗前立腺特異的膜抗原 (PSMA) モノクローナル抗体からなる抗体薬物コンジュゲート) は、前立腺腫瘍の可能な治療のために開発中である。オーリスタチンペプチド、オーリスタチンE (AE) およびモノメチルオーリスタチン (MMAE) (ドラスチンの合成アナログ) は、キメラモノクローナル抗体cBR96 (癌表面のルイスYに特異的) およびcAC10 (血液悪性腫瘍表面のCD30に特異的) にコンジュゲートされ (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)、治療のために開発中である。

【0261】

免疫コンジュゲートの生成に有用な化学療法剤は本明細書において記述される (例えば上記)。使用することができる、酵素により活性のある毒素およびそのフラグメントは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖 (緑膿菌から)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンシン (dianthin) タンパク質、フィトラカ・アメリカナ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ゴーヤ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン、クロチン、サバオナリア・オフィシナリス (sapaonarria officinalis) 阻害剤、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 (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) およびトリコテセンを含む。例えば1993年10月28日に公開されたWO 93/21232を参照。様々な放射性核種は、放射性コンジュゲート抗体の産生のために利用可能である。具体例は、 ^{212}Bi 、 ^{131}I

I、¹³¹I n、⁹⁰Yおよび¹⁸⁶Reを含む。抗体と細胞傷害剤のコンジュゲートは、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオールプロピオネート (S P D P)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能性誘導体 (アジブイミド酸ジメチル H C l のような)、活性エステル (スペリン酸ジスクシンイミジルのような)、アルデヒド (グルタルアルデヒドのような)、ビス - アジド化合物 (ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミンのような)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンのような)、ジイソシアナート (トルエン 2 , 6 - ジイソシアナートのような) およびビス活性フッ素化合物 (1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンのような) のような様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。例えば V i t e t t a e t a l . , S c i e n c e , 2 3 8 : 1 0 9 8 (1 9 8 7) に記載されるようにリシン免疫毒素を調製できる。炭素 1 4 で標識された 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ペンタ酢酸 (M X - D T P A) は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合のための例示的なキレート剤である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 を参照。

10

【 0 2 6 2 】

抗体と、カリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスチン、オーロスタチン (a u r o s t a t i n)、トリコテセンおよび C C 1 0 6 5、ならびに毒素活性がある毒素の誘導体のような 1 つまたは複数の低分子毒素のコンジュゲートもまた本明細書において検討される。

20

【 0 2 6 3 】

i . メイタンシンおよびメイタンシノイド

いくつかの実施形態では、免疫コンジュゲートは、1 つまたは複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされる抗体 (全長またはフラグメント) を含む。

【 0 2 6 4 】

メイタンシノイドはチューブリン重合の阻害により作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初に東アフリカの低木メイテナス・セラタ (M a y t e n u s s e r r a t a) から単離された。(米国特許第 3 , 8 9 6 , 1 1 1 号)。続いて、特定の微生物がメイタンシノイド (メイタンシノールおよび C - 3 メイタンシノールエステルのような) を産生することもまた見い出された (米国特許第 4 , 1 5 1 , 0 4 2 号)。合成メイタンシノールならびにその誘導体およびアナログは、例えば米国特許第 4 , 1 3 7 , 2 3 0 号 ; 第 4 , 2 4 8 , 8 7 0 号 ; 第 4 , 2 5 6 , 7 4 6 号 ; 第 4 , 2 6 0 , 6 0 8 号 ; 第 4 , 2 6 5 , 8 1 4 号 ; 第 4 , 2 9 4 , 7 5 7 号 ; 第 4 , 3 0 7 , 0 1 6 号 ; 第 4 , 3 0 8 , 2 6 8 号 ; 第 4 , 3 0 8 , 2 6 9 号 ; 第 4 , 3 0 9 , 4 2 8 号 ; 第 4 , 3 1 3 , 9 4 6 号 ; 第 4 , 3 1 5 , 9 2 9 号 ; 第 4 , 3 1 7 , 8 2 1 号 ; 第 4 , 3 2 2 , 3 4 8 号 ; 第 4 , 3 3 1 , 5 9 8 号 ; 第 4 , 3 6 1 , 6 5 0 号 ; 第 4 , 3 6 4 , 8 6 6 号 ; 第 4 , 4 2 4 , 2 1 9 号 ; 第 4 , 4 5 0 , 2 5 4 号 ; 第 4 , 3 6 2 , 6 6 3 号 ; および第 4 , 3 7 1 , 5 3 3 号中で開示される。

30

【 0 2 6 5 】

以下の理由から、メイタンシノイド薬物部分は抗体薬物コンジュゲートの好ましい薬物部分である : (i) 発酵または化学的修飾 (発酵産物の誘導体化) による調製が比較的容易、(i i) 非ジスルフィドリンカーを介する抗体への結合のために適切な官能基での誘導体化に適用可能、(i i i) 血漿中で安定、および (i v) 様々な腫瘍細胞株に対して有効である。

40

【 0 2 6 6 】

メイタンシノイドを含む免疫コンジュゲートを同様に作製する方法およびそれらの治療上の使用は、例えば米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号、第 5 , 4 1 6 , 0 6 4 号およびヨーロッパ特許 E P 0 4 2 5 2 3 5 B 1 中で開示され、これらの開示は特に参照することにより本明細書に組み入れられる。L i u e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 8 6 1 8 - 8 6 2 3 (1 9 9 6) は、ヒト結腸直腸癌に対して作製されたモノクローナル抗体 C 2 4 2 に結合された D M 1 と呼ば

50

れるメイタンシノイドを含む免疫コンジュゲートについて記述した。コンジュゲートは培養結腸癌細胞に対して細胞傷害性が高いことが見出され、インビボの腫瘍増殖分析において抗腫瘍活性を示した。Charl et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)は、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞株表面の抗原に結合するマウス抗体A7に、またはHER-2/neu癌遺伝子を結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1に、メイタンシノイドがコンジュゲートされる免疫コンジュゲートについて記述する。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞傷害性は、1つの細胞あたり 3×10^5 のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3でインビトロで検査された。薬物コンジュゲートは、遊離メイタンシノイド薬物に類似する細胞傷害性度を達成し、1つの抗体分子あたりメイタンシノイド分子の数を増加させることにより、細胞傷害性度を増加できるかもしれない。A7-メイタンシノイドコンジュゲートは、マウスにおいて全身的な低細胞傷害性を示した。

10

20

30

40

50

【0267】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれかの生物学的活性を有意に減少せずに、抗体をメイタンシノイド分子に化学的に結合することにより調製されている。例えば米国特許第5,208,020号を参照（その開示は参照することにより本明細書に特に組み入れられる）。毒素1分子/抗体でさえ、そのままの抗体の使用以上に細胞傷害性を促進すると予想されるが、1抗体分子あたりコンジュゲートされる平均3~4のメイタンシノイド分子は、抗体の機能または溶解度に悪影響を与えずに、標的細胞の細胞傷害性の増強に有効性を示した。メイタンシノイドは当技術分野において周知であり、公知の技術により合成または天然源から単離することができる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5,208,020号、ならびに上記で言及された他の特許および非特許公報中で開示される。好ましいメイタンシノイドは、様々なメイタンシノールエステルのようなメイタンシノール分子の芳香環でまたは他の位置で修飾されるメイタンシノールおよびメイタンシノールアナログである。

【0268】

例えば、米国特許第5,208,020号またはヨーロッパ特許0425235B1、Charl et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)、および2004年10月8日に出願された米国特許出願第10/960,602号中で開示されたものを含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートの作製のための当技術分野において公知の多数の連結基があり、この開示は参照することにより特に本明細書に組み入れられる。2004年10月8日に出願された米国特許出願第10/960,602号中で開示されるように、リンカー成分SMCCを含む抗体-メイタンシノイドコンジュゲートが調製されてもよい。連結基はジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基またはエステラーゼ不安定基を含み、上で記載された特許中で開示されたように、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。追加の連結基は、本明細書において記述および例示される。

【0269】

抗体とメイタンシノイドのコンジュゲートは、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(SPD P)、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-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジブイミド酸ジメチルHCLのような)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルのような)、アルデヒド(グルタルアルデヒドのような)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミンのような)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンのような)、ジイソシアナート(トルエン2,6-ジイソシアナートのような)およびビス活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンのような)のような様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製されてもよい。特に好ましいカップリング剤は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(SPD P)(Carlsson et al., Biochem. J. 173: 7

23-737 (1978))、およびジスルフィド結合を提供するN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)を含む。

【0270】

リンカーは、結合のタイプに依存して、様々な位置でメイタンシノイド分子に結合されてもよい。例えば、エステル結合は通常のカップリング技術を使用して、ヒドロキシル基との反応により形成されてもよい。反応は、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されるC-14位、ヒドロキシル基で修飾されるC-15位、およびヒドロキシル基を有するC-20位で生じてもよい。好ましい実施形態において、結合は、メイタンシノールまたはメイタンシノールアナログのC-3位で形成される。

【0271】

ii. オーリスタチンおよびドラスチン

いくつかの実施形態において、免疫コンジュゲートは、ドラスチンまたはドロスチン(dolostatin)ペプチドのアナログおよび誘導体(オーリスタチン)にコンジュゲートされる抗体を含む(米国特許第5635483号;第5780588号)。ドラスチンおよびオーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、および核および細胞分裂(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)を妨害し、抗癌活性(US 5663149)および抗真菌活性(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965)を有することが示された。ドラスチンまたはオーリスタチンの薬物部分は、ペプチドの薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を介して抗体に結合されてもよい(WO 02/088172)。

【0272】

例示的なオーリスタチン実施形態は、2004年11月5日に出願された「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、米国特許出願第10/983,340号中で開示された、N末端結合モノメチルオーリスタチン薬物部分DEおよびDFを含み、この開示は全体を参照するにより特に組み入れられる。

【0273】

典型的には、ペプチドベースの薬物部分は、2つまたは複数のアミノ酸および/またはペプチドフラグメントとの間のペプチド結合の形成により調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えばペプチド化学の分野において周知の液相合成方法(E. Schroder and K. Lubke, 「The Peptides」(1巻)、ページ76~136、アカデミックプレス、1965年を参照)に従って調製することができる。オーリスタチン/ドラスチン薬物部分は以下の方法に従って調製されてもよい: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863. Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; 「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、2004年11月5日に出願された米国特許出願第10/983,340号もまた参照、その全体を参照することにより本明細書に組み入れられる(例えば、リンカー、およびリンカーにコンジュゲートするMMAEおよびMMAFのようなモノメチルバリン化合物を調製する方法を開示する)。

【0274】

iii. カリケアマイシン

他の実施形態において、免疫コンジュゲートは、1つまたは複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされる抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、サブピコモル濃度で二本鎖DNAの切断を生ずることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲート調製品については、米国特許5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001、5,877,296を参照（すべてアメリカン・サイアナミッド（American Cyanamid）社）。使用されてもよいカリケアマイシンの構造的なアナログは、1I、2I、3I、N-アセチル-1I、PSAGおよびI1を含むが、これらに限定されない（Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342（1993）, Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928（1998）およびアメリカン・サイアナミッド社の前述の米国特許）。抗体をコンジュゲートできる別の抗腫瘍薬物は、抗葉酸剤のQFAである。カリケアマイシンおよびQFAの両方は細胞内作用部位を有しており、容易に細胞膜を通過しない。したがって、抗体を介した内部移行によるこれらの薬剤の細胞の取り込みは、それらの細胞傷害効果を非常に促進する。

【0275】

i v . 他の細胞傷害剤

抗体にコンジュゲートすることができる他の抗腫瘍剤は、BCNU、ストレプトゾシン（streptozocin）、ビンクリスチンおよび5-フルオロウラシル、米国特許5,053,394、5,770,710中で記載されるまとめてLL-E33288複合体として公知の薬剤ファミリー、エスペラマイシン（米国特許5,877,296）も同様に含む。

【0276】

使用することができる、酵素により活性のある毒素およびそのフラグメントは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖（緑膿菌から）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアシンタンパク質、フィトラカ・アメリカナタンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、ゴーヤ阻害剤、クルシン、クロチン、サバオナリア・オフィシナリス阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンを含む。例えば1993年10月28日に公開されたWO 93/21232を参照。

【0277】

さらに本発明は、抗体と、核酸分解活性（例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNaseのような、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ）を備えた化合物との間で形成される免疫コンジュゲートを検討する。

【0278】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は高放射能原子を含んでもよい。様々な放射性同位体は、放射性コンジュゲートされた抗体の産生のために利用可能である。具体例は、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} およびLuの放射性同位体を含んでいる。コンジュゲートが検出のために使用される場合、それはシンチグラフ検査のための放射性原子（例えば tc^{99m} または I^{123} ）、または核磁気共鳴（NMR）画像（磁気共鳴画像、mriとしてもまた公知）のためのスピン標識（再びヨウ素123、ヨウ素131、インジウム111、フッ素19、炭素13、窒素15、酸素17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄のような）を含んでもよい。

【0279】

放射性標識または他の標識は、公知の手段でコンジュゲートに取り込まれてもよい。例えば、ペプチドは生合成されてもよいし、または例えば水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用して、化学的アミノ酸合成により合成されてもよい。 tc^{99m} または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} および In^{111} のような標識は、ペプ

10

20

30

40

50

チドのシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム90はリジン残基を介して結合することができる。イオドゲン (I O D O G E N) 法 (F r a k e r e t a l (1 9 7 8) B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 8 0 : 4 9 - 5 7) は、ヨウ素123を組み入れるために使用することができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chat al、CRC出版社1989) は、他の方法について詳細に記述する。

【0280】

抗体と細胞傷害剤のコンジュゲートは、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 (S P D P) 、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 - カルボキシラート (S M C C) 、イミノチオラン (I T) 、イミドエステルの二官能性誘導体 (アジブイミド酸ジメチルHClのような) 、活性エステル (スペリン酸ジスクシンイミジルのような) 、アルデヒド (グルタルアルデヒドのような) 、ビス - アジド化合物 (ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミンのような) 、ビス - ジアゾニウム誘導体 (ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンのような) 、ジイソシアナート (トルエン2 , 6 - ジイソシアナートのような) およびビス活性フッ素化合物 (1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンのような) のような様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製されてもよい。例えば、V i t e t t a e t a l . , S c i e n c e 2 3 8 : 1 0 9 8 (1 9 8 7) 中で記載されるように、リシン免疫毒素は調製することができる。炭素14で標識された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ペンタ酢酸 (M X - D T P A) は、抗体に放射性ヌクレオチドの結合のための例示的なキレート剤である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6を参照。リンカーは、細胞中の細胞毒性薬の放出を促進する「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (C h a r i e t a l , C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 (1 9 9 2) ; 米国特許第5 , 2 0 8 , 0 2 0 号) を使用してもよい。

【0281】

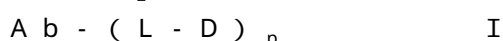
化合物は、以下の架橋剤試薬により調製されたADCを特に検討するが、これらに限定されない：市販で入手可能である (例えば、ピアース・バイオテクノロジー (P i e r c e B i o t e c h n o l o g y) 社、ロックフォード、イリノイ、米国から) 、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルフォ - E M C S、スルフォ - G M B S、スルフォ - K M U S、スルフォ - M B S、スルフォ - S I A B、スルフォ - S M C C、およびスルフォ - S M P B、ならびにS V S B (スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン) ベンゾアート。2003 - 2004 Applications Handbook and Catalog、467 - 498ページを参照。

【0282】

v . 抗体薬物コンジュゲートの調製

抗体薬物コンジュゲート (A D C) において、抗体 (A b) は、リンカー (L) を介して1つまたは複数の薬物部分 (D) (例えば1つの抗体あたり約1 ~ 約20の薬物部分) にコンジュゲートされる。式IのADCは、以下のものを含む当業者に公知の有機化学反応、条件および試薬を用いて、いくつかの経路により調製されてもよい：(1) 共有結合を介してA b - Lを形成するための二価リンカー試薬との抗体の求核基の反応、続いて薬物部分Dとの反応；および(2) 共有結合を介してD - Lを形成するための二価リンカー試薬との薬物部分の求核基の反応、続いて抗体の求核基との反応。ADCを調製する追加の方法は本明細書において記述される。

【0283】



リンカーは1つまたは複数のリンカー成分からなってもよい。例示的なリンカー成分は

6 - マレイミドカプロイル (「MC」)、マレイミドプロパノイル (「MP」)、バリン - シトルリン (「val - cit」)、アラニン - フェニルアラニン (「ala - phe」)、p - アミノベンジルオキシカルボニル (「PAB」)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルチオ) ペンタノアート (「SPP」)、N - 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 カルボキシラート (「SMCC」)、および N - スクシンイミジル (4 - ヨード - アセチル) アミノベンゾアート (「SIAB」) を含んでいる。追加のリンカー成分は当技術分野において公知であり、いくつかは本明細書において記述される。2004年11月5日に出願された「Monomethyl valine Compounds Capable of Conjugation to Ligands」、米国特許出願第10/983,340号もまた参照、それらの内容はその全体の参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0284】

いくつかの実施形態において、リンカーはアミノ酸残基を含んでもよい。例示的なアミノ酸リンカー成分はジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドを含んでいる。例示的なジペプチドは、バリン - シトルリン (vcまたはval - cit)、アラニン - フェニルアラニン (afまたはala - phe) を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン - バリン - シトルリン (gly - val - cit) およびグリシン - グリシン - グリシン (gly - gly - gly) を含む。アミノ酸リンカー成分を含むアミノ酸残基は、シトルリンのようなマイナーなアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸類似体に加えて、天然に存在するアミノ酸を含む。アミノ酸リンカー成分は、特定の酵素 (例えば腫瘍関連のプロテアーゼ、カテプシン B、C および D、またはプラスミンプロテアーゼ) による酵素的切断のためのそれらの選択性においてデザインおよび最適化することができる。

20

【0285】

抗体上の求核基は以下のものを含むが、これらに限定されない: (i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基 (例えばリジン)、(iii) 側鎖チオール基 (例えばシステイン)、および (iv) 抗体に糖鎖が付加する場合、糖ヒドロキシル基またはアミノ基。アミン基、チオール基およびヒドロキシル基は求核性であり、リンカー部分上の求電子基およびリンカー試薬と共有結合を形成するための反応が可能であり、以下のものを含む: (i) NHS エステル、HOBt エステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物のような活性エステル; (ii) アルキル、およびハロアセトアミドのようなハロゲン化ベンジル; (iii) アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基およびマレイミド基。特定の抗体は還元可能な鎖間ジスルフィド (すなわちシステイン架橋) を有する。抗体は、DTT (ジチオトレイトール) のような還元剤の処理によって、リンカー試薬による結合に対して反応性となる。各システイン架橋はしたがって理論上、2つの反応性チオール求核分子を形成するだろう。追加の求核基は、2つのイミノチオランとリジンの反応を介して抗体へ導入することができ (Traut の試薬)、アミンのチオールへの変換を結果として生じる。反応性チオール基は、1、2、3、4 またはそれ以上のシステイン残基の導入により、抗体 (またはそのフラグメント) へ導入されてもよい (例えば1つまたは複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含む変異抗体を調製する)。

30

40

【0286】

抗体薬物コンジュゲートも、求電子部分 (リンカー試薬または薬物上の求核性置換基と反応することができる) を導入する抗体の修飾によって産生されてもよい。糖鎖が付加した抗体の糖は、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応するアルデヒド基またはケトン基を形成するために、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤により酸化されてもよい。結果として生じるイミンシッフ塩基は安定した結合を形成してもよいし、または安定したアミン結合を形成するために、例えばホウ化水素試薬によって還元されてもよい。1つの実施形態において、ガラクトース酸化酵素またはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの糖鎖付加抗体の炭水化物部分の反応は、薬物上の適切な基と反応できるタンパク質のカルボニル (アルデヒドおよびケトン) 基をもたらしてもよい (Hermanson、Biocon

50

j u g a t e T e c h n i q u e s)。別の実施形態において、N末端のセリン残基またはスレオニン残基を含むタンパク質は、メタ過ヨウ素酸ナトリウム（第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの産生を結果として生じる）と反応することができる（G e o g h e g a n & S t r o h , (1 9 9 2) B i o c o n j u g a t e C h e m . 3 : 1 3 8 - 1 4 6 ; U S 5 3 6 2 8 5 2)。薬物部分またはリンカー求核分子とそのようなアルデヒドを反応させることができる。

【0287】

同様に、薬物部分上の求核基は以下のものを含むが、これらに限定されない：アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、オキシム基、ヒドラジン基、チオセミカルバゾン基、ヒドラジンカルボキシラート基およびアリールヒドラジド基であり、これらはリンカー部分上の求電子基およびリンカー試薬と共有結合を形成するための反応が可能であり、以下のもの含む：(i) N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物のような活性エステル；(i i) アルキル、およびハロアセトアミドのようなハロゲン化ベンジル；(i i i) アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基およびマレイミド基。

10

【0288】

あるいは、抗体および細胞傷害剤を含む融合タンパク質は、例えば組換え技術またはペプチド合成によって作製されてもよい。DNAの長さは、互いに隣接する、またはコンジュゲートの望ましい特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離された、コンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域を含んでもよい。

20

【0289】

さらに別の実施形態において、抗体は、腫瘍前標的化の利用のために「受容体」にコンジュゲート（ストレプトアビジンのような）されてもよく、抗体受容体コンジュゲートは患者に投与され、クリアリング剤を使用する循環からの未結合コンジュゲートの除去および次に細胞傷害剤（例えば放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートされた「リガンド」（例えばアビジン）の投与が続く。

【0290】

D L L 4 ポリペプチドに対する共有結合修飾

ポリペプチドのアンタゴニストまたはアゴニスト（例えばポリペプチドアンタゴニストフラグメント、D L L 4 融合分子（例えばD L L 4 イムノアドヘジン）、抗D L L 4 抗体）の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれている。適用可能なならば、それらは、化学合成、またはポリペプチドの酵素切断もしくは化学切断によって作製されてもよい。ポリペプチドの他のタイプの共有結合修飾は、選択された側鎖またはNもしくはC末端残基と反応できる有機誘導体化剤とポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基を反応させることによって、または増大するポリペプチド鎖へ修飾されたアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を組み入れること例えば、E l l m a n e t a l . M e t h . E n z y m . 2 0 2 : 3 0 1 - 3 3 6 (1 9 9 1) ; N o r e n e t a l . S c i e n c e 2 4 4 : 1 8 2 (1 9 8 9) ; ならびに米国特許出願公報20030108885および20030082575によって、分子へ導入される。

30

【0291】

システイニル残基は、最も一般的には、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチルの誘導体を生ずるために、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドのような - ハロアセタート（および対応するアミン）と反応させる。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、 - プロモ - - (5 - イミドゾイル) プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、N - アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル2 - ピリジルジスルフィド、p - クロロマーキュリーベンゾアート、2 - クロロマーキュリー - 4 - ニトロフェノールまたはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によってもまた誘導体化される。

40

【0292】

この薬剤がヒスチジル側鎖について比較的特異的であるので、ヒスチジル残基はp H

50

5.5 ~ 7.0 でジエチルピロ炭酸塩との反応によって誘導体化される。p 臭化プロモフェナシル もまた有用であり；反応は典型的には pH 6.0 で 0.1 M のカコジル酸ナトリウム中で実行される。

【0293】

リシニル残基およびアミノ末端残基はコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させられる。これらの薬剤による誘導体化は、リシニル残基の荷電を逆転する効果を有する。

- アミノ含有残基の誘導体化のために適切な他の試薬は、ピコリンイミド酸メチル、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロポロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオンのようなイミドエステル、およびグリオキシラートとのトランスアミナーゼによる触媒反応を含む。

【0294】

アルギニル残基は、1つまたは複数の従来の試薬、とりわけフェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の pKa が高いために、アルカリ性条件下での反応の実行を必要とする。更に、これらの試薬は、アルギニン-アミノ基だけでなくリジン基と反応してもよい。

【0295】

チロシル残基の特異的な修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基ヘスペクトル標識を導入することに特に利益があれば行われてもよい。最も一般的には、N-アセチルイミジゾール (imidazole) およびテトラニトロメタンを、それぞれ O-アセチルチロシル種および 3-ニトロ誘導体を形成するために使用する。チロシル残基は、放射免疫分析における使用のための標識タンパク質を調製するために ¹²⁵I または ¹³¹I を使用してヨウ化される。

【0296】

カルボキシル側基 (アスパルチルまたはグルタミル) は、カルボジイミド (R-N=C=N-R') (式中 R および R' は 1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは 1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドのような異なるアルキル基である) との反応によって選択的に修飾される。更に、アスパルチル残基およびグルタミル残基はアンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換される。

【0297】

グルタミニルおよびアスパラギニルの残基は、しばしば対応するグルタミルおよびアスパルチル残基へそれぞれ脱アミド化される。これらの残基は中性または塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化形態は、本発明の範囲以内にある。

【0298】

他の修飾は、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリル残基またはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジンの側鎖の - 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、ならびに任意の C末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0299】

別のタイプの共有結合修飾は本発明のポリペプチドへ化学的にまたは酵素により配糖体を結合することを含む。これらの手順は、それらが N または O 結合型糖鎖付加のための糖鎖付加能力を有する宿主細胞のポリペプチドの産生を必要としないという点で有利である。使用される結合する様式に依存して、糖は (a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) システインの遊離スルフヒドリル基のような遊離スルフヒドリル基、(d) セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基のような遊離ヒドロキシル基、(e) フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンの芳

10

20

30

40

50

香族残基のような芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基、へ結合されてもよい。これらの方法は、1987年9月11日に公表されたWO 87/05330およびAppl. and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)中で記載されている。

【0300】

本発明のポリペプチド上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的にまたは酵素により遂行されてもよい。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または同等の化合物に対するポリペプチドの暴露を必要とする。この処理は、ポリペプチドは完全な形のままであるが、結合糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)以外の大部分またはすべての糖の切断をもたらす。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) and by Edge et al. Anal. Biochem., 118:131 (1981)によって記述される。炭水化物部分の(例えば抗体上の)酵素的な切断は、Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138:350 (1987)によって記述されるような様々なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。

10

【0301】

本発明のポリペプチドの別のタイプの共有結合修飾は、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号または第4,179,337号中で示される様式で、ポリペプチドを様々な非タンパク性重合体(例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン)のうちの1つへの結合を含む。

20

【0302】

医薬製剤

抗体を含む治療製剤は、水溶液、凍結乾燥製剤または他の乾燥製剤の形態で、望ましい程度の純度を有する抗体を、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤(Remington: The Science and Practice of Pharmacy第20版、2000年)と混合することによって、保存のために調製される。許容される担体、賦形剤または安定剤は用いられる投与量および濃度でレシipientに対して無毒であり、リン酸塩およびクエン酸塩およびヒスチジンおよび他の有機酸のような緩衝剤;アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤;防腐剤(オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム;フェノールアルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール;メチルパラベンまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン;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;およびm-クレゾールのような);低分子量(約10残基以下の)ポリペプチド;血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質;ポリビニルピロリドンのような親水性重合体;グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンのようなアミノ酸;単糖、二糖類、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物;EDTAのようなキレート剤;ショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールのような糖;ナトリウムのような塩を形成する対イオン;金属複合体(例えばZnタンパク質複合体);および/またはツイーン(商標)、ブルロニクス(商標)またはポリエチレングリコール(PEG)のような非イオン性界面活性剤。を含む。

30

40

【0303】

治療されている特定の徴候のために必要なように、本明細書における製剤は、好ましくは互いに影響しない相補的な活性を備えた1つ以上の活性化化合物もまた含んでよい。そのような分子は、意図した目的のために有効な量の組合せで適切に存在する。

【0304】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術によって、または界面重合法によって調製

50

されたマイクロカプセル（例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メタクリル酸メチル) マイクロカプセル) 中に、コロイド状薬物送達システム（例えばリボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル剤）、またはマクロエマルジョンで、トラップされてもまたよい。そのような技術は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版、2000年中で開示される。

【0305】

インビボの投与のために使用される製剤は滅菌されてなくてはならない。これは、滅菌された濾過膜による濾過によって容易に遂行される。

10

【0306】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の適切な具体例は、免疫グロブリンを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含んでおり、このマトリックスは、造形品（例えばフィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの具体例は、ポリエステル、ハイドロゲル（例えばポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性のエチレン酢酸ビニール、リュプロンデポ（LUPRON DEPOT）（商標）（乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフェア）のような分解性の乳酸-グリコール酸共重合体、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン酢酸ビニールおよび乳酸-グリコール酸のような重合体は100日以上にわたって分子の放出を可能にするが、特定のハイドロゲルはより短い期間にわたりタンパク質を放出する。封入された免疫グロブリンが生体中で長い間残存する場合、それらは37

20

での水分への暴露の結果として変性または凝集し、生物学的活性の欠損および免疫原性の可能な変化を結果として生じる。関係するメカニズムに依存して、安定化のために合理的な戦略を考案できる。例えば、凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド交換を介する分子間S-S結合形成であると分かったならば、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、水分含量の制御、適切な添加剤の使用、および特異的なポリマーマトリックス組成物の開発によって達成されてもよい。

【0307】

30

本発明において有用な薬剤は遺伝子療法によって被験体に導入できることをさらに検討した。遺伝子療法は、被験体への核酸の投与によって実行される治療法を指す。遺伝子療法適用において、遺伝子は、例えば欠陥遺伝子の置換のために、治療上有効な遺伝子産物のインビボの合成を達成するために細胞へ導入される。「遺伝子療法」は、永続効果が単一の処理によって達成される従来の遺伝子療法、および治療上有効なDNAまたはmRNAの1回または連続投与を伴う遺伝子治療剤の投与、の両方を含む。アンチセンスRNAおよびDNAは、インビボで特定の遺伝子の発現を遮断するための治療剤として使用することができる。例えば実施例中で記載されるDLL4-SiRNAを参照。細胞膜による取り込みの限定によって低細胞内濃度がもたらされるにもかかわらず、短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらが阻害剤として作用する細胞へ取り込めることは既に示されている(Zamecnik et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986))。オリゴヌクレオチドは、例えばそれらの負に荷電したホスホジエステル基を非荷電基で置換することによって、それらの取り込みを促進するように修飾できる。遺伝子療法の方法の一般的な総説については、例えばGoldspiel et al, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-2

40

50

17 (1993); および May TIBTECH 11 : 155 - 215 (1993) を参照。当技術分野において一般に公知の使用できる組換え DNA 技術の方法は、Ausubel et al. eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons)、ニューヨーク; および Kriegl er (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual、ストックトン・プレス (Stockton Press)、ニューヨーク中に記載されている。

【0308】

投与量および投与

10

分子は、ボラス投与としてまたは長期間にわたる連続的な点滴による静脈内投与のような公知の方法に沿って、腹腔内経路、筋肉内経路、脳脊髄内経路、皮下経路、関節内経路、滑液内経路、鞘内経路、経口経路、局所経路、吸入経路、および / または皮下投与によって、ヒト患者に対して投与される。

【0309】

特定の実施形態において、本発明の治療は、DLL4 アンタゴニストと1つまたは複数の抗癌薬剤 (例えば抗血管形成剤) の組合わせ投与を含む。1つの実施形態において、追加の抗癌薬剤 (例えば1つまたは複数の異なる抗血管形成剤および1つまたは複数の化学療法剤など) は存在する。本発明は、さらに複数の阻害剤 (例えば同一の抗原に対する複数の抗体または異なる癌で活性のある分子に対する複数の抗体) の投与を検討する。1つの実施形態において、異なる化学療法剤のカクテルは、DLL4 アンタゴニストおよび / または1つまたは複数の抗血管形成剤と共に投与される。組合わせ投与は、個別の製剤または単一の医薬製剤を使用する、共投与、および / またはいずれか順番における連続投与を含む。例えば、DLL4 アンタゴニストは、先行するか、後続するか、抗癌剤の投与と交互であるか、またはそれと同時に与えられてもよい。1つの実施形態において、両方の (またはすべての) 活性薬剤が同時にそれらの生物学的活性を発揮する期間が存在する。

20

【0310】

疾患の予防または治療のために、DLL4 アンタゴニストの適切な投与量は、治療される疾患のタイプ (上で定義されたように)、疾患の重症度および過程、阻害剤が予防または治療目的のために投与されるか、以前の治療法、患者の病歴および阻害剤に対する反応、ならびに主治医の裁量、に依存するだろう。阻害剤は、患者に対して一度にまたは一連の治療にわたって適切に投与される。組合せ療法レジメンにおいて、本発明の組成物は治療の有効量または治療上相乗的な量で投与される。本明細書において使用されるように、治療の有効量は、本発明の組成物の投与、および / または DLL4 アンタゴニストと1つまたは複数の他の治療剤の共投与が、標的とする疾患または症状の減少または阻害をもたらすようなものである。薬剤の組合せ投与の効果は相加的でありえる。1つの実施形態において、投与の結果は相乗的效果である。治療上相乗的な量は、特定の疾患に関連する状態または病徴を相乗的にまたは有意に減少または除去するのに必要な、DLL4 アンタゴニストおよび1つまたは複数の他の治療剤 (例えば血管形成阻害剤) の量である。

30

【0311】

40

疾患のタイプおよび重症度に依存して、例えば1つまたは複数の個別投与によっても、または連続的な点滴によっても、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば $0.1 \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$) の DLL4 アンタゴニストまたは血管形成阻害剤は、患者に対する投与のための最初の候補投与量である。典型的な毎日投与量は、上で言及された因子に依存して、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ またはそれ以上にわたる。数日またはそれ以上にわたる連続投与については、状態に依存して、病徴の望ましい抑制が生じるまで治療を継続する。しかしながら、他の投与量レジメンが有用かもしれない。典型的には、臨床医は投与量が必要な生物学的作用を提供するまで分子を投与するだろう。本発明の治療法の進行は、従来技術および分析で容易にモニタリングされる。

【0312】

50

例えば、血管形成阻害剤（例えばアバスチン（登録商標）（ジェネンテック社）のような抗 V E G F の抗体）のための調製および投薬のスケジュールは、製造者の指示に従って使用されてもよい、または当業者により経験的に決定されてもよい。別の具体例において、そのような化学療法剤のための調製および投薬のスケジュールは、製造者の指示に従って使用されてもよい、または当業者により経験的に決定されてもよい。化学療法のための調製および投薬のスケジュールは、Chemotherapy Service、M. C. Perry 編、ウィリアムズ・アンド・ウィルキンズ（Williams & Wilkins）、ボルティモア、メリーランド（1992）中にも記載される。

【0313】

治療の有効性

本発明の治療の有効性は、新生物または非新生物の障害の評価において一般に使用される様々な評価項目により測定することができる。例えば癌治療は、例えば腫瘍退縮、腫瘍の重量またはサイズの縮小、進行に対する時間、生存の期間、無増悪生存率、全奏功率、反応の期間、および生活の質によって評価できるが、これらに限定されない。本明細書において記述される抗血管形成剤が腫瘍血管を標的とし、必ずしも新生細胞自体を標的とするのではないので、それらは特有のクラスの抗癌剤を表わし、したがって薬剤に対する臨床反応の特有の測定および定義を必要とする。例えば、50%以上の腫瘍縮小は、2次元解析における反応を示すための標準カットオフである。しかしながら、阻害剤は、原発腫瘍の縮小を伴わないで、転移拡散の阻害をもたらしてもよいし、または単に腫瘍静止効果を発揮してもよい。したがって、治療法の有効性の決定に対するアプローチ（例えば血管形成の血漿または尿マーカーの測定、および放射性画像診断による反応の測定を含む）を用いることができる。

【0314】

以下の具体例は例示的な目的のみのために提供され、本発明の範囲を任意の手段で限定するようには意図されない。

【0315】

本明細書中に引用されたすべての特許および文献参照の開示は、それら全体を参照することによって本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0316】

実施例において言及される市販で入手可能な試薬は、特別の指示の無い限り、製造者の指示に従って使用された。以下の実施例においておよび明細書の全体にわたってATCCアクセッション番号によって同定される細胞のソースは、米国培養菌保存施設、マナッサス、バージニア20108である。実施例において引用された参照は、実施例の後にリストされる。本明細書において引用された参照はすべて、参照することによって本明細書に組み入れられる。

【0317】

実施例1：材料および方法

以下の材料および方法が実施例において使用された。

【0318】

HUVECフィブリンゲルビーズ分析。HUVECフィブリンゲルビーズ分析の詳細が記述されている（Nakatsu, M. N. et al. Microvasc Res 66, 102-12 (2003)）。簡潔には、サイトデックス（Cytodex）3ビーズ（アマシャム・ファルマシア・バイオテク（Amersham Pharmacia Biotech）社）は、1ビーズあたり350~400HUVECでコートされた。HUVECをコートされたビーズ約200個を、12ウェル組織培養プレートの1ウェルの中のフィブリンクロット中に埋め込んだ。8×10⁴SF細胞をクロットの上にプレートした。免疫染色および画像診断のために、分析を7日目~9日目の間で終了した。いくつかの実験において、HUVECの出芽を、ピオチン-抗-CD31（クローンWM59、イーバイオサイエンス（eBioscience）社）およびストレプア

10

20

30

40

50

ビジン (streptavidin) - Cy3 による染色によって可視化された。HUV E C 核染色のために、フィブリンゲルを 2 % パラホルムアルデヒド (PFA) 中で一晚固定し、4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI、シグマ社) で染色した。Ki67 染色については、最上層 SF を除去するためにフィブリンゲルを 5 分間 10 × トリプシン - EDTA で処理し、PBS 中 10 % FBS で中和し、4 % PFA 中で一晚固定した。次にフィブリンゲルを PBST 中 10 % ヤギ血清で 4 時間ブロッキングし、ウサギ抗マウス Ki67 (即時使用可能、クローン Sp6、ラブ・ビジョン (Lab Vision) 社) で一晚インキュベートし、続いて抗ウサギ IgG - Cy3 (ジャクソン・イムノリサーチ (Jackson ImmunoResearch) 社) により二次検出した。一晚のインキュベーションはすべて 4 で行われた。

10

【0319】

マウス新生仔網膜研究。同腹子からの新生仔 CD1 マウスは、P1 および P3 に PBS または YW26.82 (10 mg / kg) により腹腔内注射された。眼を P5 に回収し、PBS 中 4 % PFA で一晚固定した。解剖した網膜を、PBST 中 10 % ヤギ血清で 3 時間ブロッキングし、次に一次抗体で一晚でインキュベートした。一次カクテルは、ビオチン化イソレクチン B4 (25 μg / ml、バンデイレア・シンプリシフォリア (Bandeiraea simplicifolia) ; シグマ社) および以下の 1 つを含んだ: PBL EC 中 10 % 血清と共に (PBS pH 6.8 中で、1 % トリトン X - 100、0.1 mM CaCl₂、0.1 mM MgCl₂、0.1 mM MnCl₂)、ウサギ抗マウス Ki67 (1:1、即時使用可能、クローン Sp6、ラブ・ビジョン社)、またはマウスの Cy3 コンジュゲート抗 - SMA (1:2000、シグマ - アルドリッチ (Sigma - Aldrich) 社)。次に網膜を PBST 中で洗浄し、アレクサ (Alexa) 488 ストレプトアビジン (1:200; モレキュラー・プローブス (Molecular Probes) 社) および Cy3 - 抗ウサギ IgG (1:200; ジャクソン・イムノリサーチ社) の二次抗体の組合せと共に一晚インキュベートした。染色が完了した後、網膜を PBS 中 4 % PFA により後固定した。一晚のインキュベーションはすべて 4 で行った。平らにマウントされた網膜の画像を共焦点蛍光顕微鏡によって捕捉した。

20

【0320】

腫瘍モデル。メスのベージュヌードマウス (8 ~ 10 週齢) を使用した。皮下腫瘍を得るために、マウスに、50 % マトリゲル (matrigel) (BD バイオサイエンス) を含む 0.1 ml の細胞懸濁物を右後部横腹の中へ注射した。5 × 10⁶ ヒト結腸癌 HM7 細胞、10 × 10⁶ ヒト結腸癌 Colo205 細胞、10 × 10⁶ ヒト肺癌 Calu6 細胞、10 × 10⁶ ヒト肺癌 MV - 522 細胞、10 × 10⁶ マウス白血病 WEHI - 3 細胞、10 × 10⁶ マウスリンパ腫 EL4 細胞、10 × 10⁶ ヒト卵巣癌 SK - OV - 3 X1 細胞、10 × 10⁶ マウス肺癌 LL2 細胞、10 × 10⁶ 白血病 / リンパ腫 EL4 細胞または 10 × 10⁶ 非小細胞肺癌 H1299 細胞を、各マウスの中へ注射した。ヒト黒色腫 MDA - MB - 435 モデルのために、50 % マトリゲルを含む 0.1 ml の細胞 (5 × 10⁶) 懸濁物をマウス乳腺脂肪体の中へ注射した。抗 DLL4 の抗体 YW26.82 を腹腔内経路で投与した (10 mg / kg 体重、毎週 2 回)。以下の腫瘍モデルについては、各試験マウスの右横腹に皮下腫瘍フラグメント (1 mm) を移植した: 非小細胞肺癌 SKMES - 1、ヒト乳癌 MX - 1、ヒト結腸直腸癌 SW620 およびヒト腺癌 LS174T。腫瘍増殖を測径器測定によって定量した。腫瘍容積 (mm³) は、長さ (l) および幅 (w) の測定および体積 (V = l w² / 2) の計算によって決定された。10 ~ 15 匹の動物が各群に含まれていた。治療群の統計比較は両側スチューデントの t 検定を使用して実行された。

30

40

【0321】

腫瘍血管の標識および免疫組織化学。マウスをイソフルランにより麻酔をかけた。FITC に標識されたトマト (Lycopersicon Esculentum) レクチン (150 μl の 0.9 % NaCl 中 150 μg; ベクター・ラボラトリーズ) は、静脈注

50

射され、全身的な灌流の前に5分間循環させた。血管をPBS中1%PFAで経心臓的に3分間灌流した。腫瘍を除去し、同一の固定液中の浸漬によって2時間後固定し、続いて凍結保護のために30%ショ糖中で一晩のインキュベーションし、次にOCT中に包埋した。切片(厚さ4 μ m)を抗マウスのCD31(1:50、BDファーマーゲン(Pharmin-gen)社)、続いてアレクサ594ヤギ抗ラットIgG(1:800、モレキュラー・プローブ社)で染色した。

【0322】

マウス腸の組織学および免疫組織化学。ホルマリン固定しパラフィン包埋したマウス小腸組織を、3 μ m厚さで切片にした。腸細胞タイプの組織化学的識別を、製造者(ポリサイエンティフィック(PolyScientific)社)によって推奨されるようにアルシアンブルーにより実行した。抗Ki67の染色のために、切片をターゲットレトリバルソリューション(Target Retrieval Solution)(S1700、ダコ(DAKO)社)により前処理し、ウサギ抗Ki67(1:200、クローンSP6、ネオマーカーズ(Neomarkers)社)とインキュベートした。7.5g/ml(ベクター・ラブ(Vector Labs)社)の二次ヤギ抗ウサギを、ベクタステイン(Vectastain)のABCのエリート・キット(ベクター・ラブ)により検出した。Ki67染色した切片のすべてを、マイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。HES-1染色のために、抗ラットのHES-1(クローンNM1、MBL、インターナショナル(International)社)、続いてTSA-HRPを使用した。

【0323】

RNA干渉。ヒトDLL4を標的とするSMARTpool小型干渉RNA(siRNA)二重鎖、およびSiコントロール非標的siRNA#2を、ダーマコン(Dharmacon)社から購入した。siRNA二重鎖(50nM)のトランスフェクションを、オプティメム(Opti-mem)-1およびリポフェクタミン(Lipofectamine)2000(インビトロゲン(Invitrogen)社)を使用して、40%の密集度のHUVECで行った。FACS分析を、siRNAトランスフェクション48時間後に行った。4つの抗DLL4のSMARTプールsiRNAの配列は以下のとおりだった：

CAACTGCCCTTATGGCTTTTTT(配列番号：5)(オリゴ1、センス)
、
AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT(配列番号：6)(オリゴ1、アンチセンス)、
CAACTGCCCTTCAATTTCATT(配列番号：7)(オリゴ2、センス)
、
TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT(配列番号：8)(オリゴ2、アンチセンス)、
TGACCAAGATCTCAACTACTT(配列番号：9)(オリゴ3、センス)
、
GTAGTTGAGATCTTGGTCATT(配列番号：10)(オリゴ3、アンチセンス)、
GGCCAACCTATGCTTGTGAATT(配列番号：11)(オリゴ4、センス)
、
TTCACCAAGCATAGTTGGCCTT(配列番号：12)(オリゴ4、アンチセンス)。

【0324】

ノッチリガンド：ノッチブロッキングELISA。96ウェルマイクロタイタープレート、0.5 μ g/mlの組換えラットノッチ1-Fc(rrノッチ1-Fc、R&Dシステムズ(Systems)社)でコートした。DLL4-AP(ヒト胎盤アルカリフォスファターゼに融合したDLL4のアミノ酸1~404)を含む馴化培地を、分析におい

10

20

30

40

50

て使用した。馴化培地を調製するために、293細胞を、フューゲン(Fugen) 試薬(ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ(Roche Molecular Biochemicals)社)によりDLL4-APを発現するプラスミドで一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションの5日後、馴化培地を採取し、濾過し、4℃で保存した。0.15~25 µg/mlに量を変更した精製抗体を、最大限に達成可能なコートされたrrノッチ1-Fcへの結合の50%を付与する希釈で、DLL4-AP馴化培地と共に室温で1時間ブレインキュベーションした。次に抗体/DLL4-AP混合物を、室温で1時間rrノッチ1-Fcコートプレートに加え、その後プレートをPBS中で数回洗浄した。結合されたDLL4-APを、基質としてワンステップPNPP(ピアース社)およびOD405nm吸光度測定を使用して検出した。同一の分析をDLL1-AP(ヒトDLL1、アミノ酸1~445)で実行した。類似した分析を、精製されたDLL4-His(C末端His-タグ付加ヒトDLL4、アミノ酸1~404)およびJag1-His(R&Dシステム社)で実行した。結合されたHis-タグ付加リガンドを、マウス抗Hisモノクローナル抗体(1 µg/ml、ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ社)、ビオチン化ヤギ抗マウス(ジャクソン・イムノリサーチ社)およびストレプトアビジンAP(ジャクソン・イムノリサーチ社)により検出した。

【0325】

RNA抽出およびリアルタイム定量的RT-PCR。二次元培養におけるHUVECからの全RNA抽出を、製造者の指示の通りにRNエージー(RNeasy)ミニキット(キアゲン(Qiagen)社)を使用して行った。フィブリンゲル中で増殖するHUVECから全RNAを抽出するために、フィブリンゲルを、最上層線維芽細胞の除去のため10×トリプシン-EDTA(ギブコ(Gibco)社)で5分間処理し、続いてPBS中10%のFBSにより中和した。次にゲルクロットを組織培養ウェルから取り出し、余分な体液を除去するためにマイクロチューブ中で遠心分離(5分間10K)にかけた。結果として生じるゲル「沈殿」は溶解緩衝剤(RNエージーミニキット)で溶解し、二次元培養中のHUVECでのようにさらに処理された。RNAの質は、RNA 6000ナノチップスおよびアジレント2100バイオアナライザー(アジレント・テクノロジー(Agilent Technologies)社)を使用して評価された。リアルタイム定量的RT-PCR反応は、7500リアルタイムPCRシステム(アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社)を使用して、3回繰り返して行った。ヒトGAPDHを参照遺伝子として正規化のために使用した。発現レベルは、3つの別個の定量から、対照と比較して平均(±SEM)倍mRNAの変化として表現される。フォワードプライマーおよびリバースプライマー、ならびにVEGFR2、TGFB2およびGAPDHについてのプローブ配列は、以下のとおりであった。

【0326】

TGFB2

フォワード: GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (配列番号: 13)

リバース: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (配列番号: 14)

プローブ: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AA A AT (配列番号: 15)

VEGFR2

フォワード: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (配列番号: 16)

リバース: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (配列番号: 17)

プローブ: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CA G A (配列番号: 18)

GAPDH

フォワード: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (配列番号: 1

10

20

30

40

50

9)

リバーズ : G A A G G T G A A G G T C G G A G T C (配列番号 : 2 0)

プローブ : C A A G C T T C C C G T T C T C A G C C (配列番号 : 2 1)

)

実施例 2 : ファージ抗 D L L 4 抗体の生成合成ファージ抗体ライブラリーは、重鎖および軽鎖の相補性決定領域 (C D R) 内の多様性の導入によって、単一フレームワーク (ヒト化抗 E r b B 2 抗体、4 D 5) 上に構築された (L e e , C V . e t a l . J M o l B i o l 3 4 0 , 1 0 7 3 - 9 3 (2 0 0 4) ; L i a n g , W . C . e t a l . J B i o l C h e m 2 8 1 , 9 5 1 - 6 1 (2 0 0 6)) 。 ナイブライブラリーによるプレートパニングは、マキシソープイムノプレートに固定化された H i s - タグ付加ヒト D L L 4 (アミノ酸 1 ~ 4 0 4) に対して実行された。4 ラウンド濃縮した後に、ランダムにクローンを採集し、特異的結合物をファージ E L I S A を使用して同定した。結果として生じる h D L L 4 結合クローンを、種交差クローンを同定するために H i s - タグ付加マウス D L L 4 タンパク質でさらにスクリーニングした。各々の陽性のファージクローンについては、重鎖および軽鎖の可変領域を、全長 I g G 鎖を発現するように操作された p R K 発現ベクターへサブクローン化した。重鎖および軽鎖のコンストラクトを 2 9 3 細胞または C H O 細胞へと共トランスフェクションし、発現された抗体はプロテイン A 親和性カラムを使用して、無血清培地から精製された。精製された抗体は、D L L 4 とラットノッチ 1 - F c との間の相互作用の遮断について E L I S A により検査され、全長ヒト D L L 4 またはマウス D L L 4 のいずれかを発現する安定細胞株への結合について F A C S により検査された。親和性成熟については、対象となる最初のクローンに由来する C D R ループ (C D R - L 3 、 C D R - H 1 および C D R - H 2) の 3 つの異なる組合せを備えたファージライブラリーを、各選択位置を非野生型残基に変異させるか、または約 5 0 : 5 0 頻度で野生型として維持されるように、ソフトランダム化戦略によって構築した (L i a n g e t a l . , 2 0 0 6 、 上記) 。次に高親和性クローンは、次第にストリンジェンシーを増加させて、ヒトおよびマウスの H i s - タグ付加 D L L 4 タンパク質の両方に対する液相パニングを 4 ラウンド行なって同定された。

10

20

30

40

50

【 0 3 2 7 】

実施例 3 : 抗 D L L 4 抗体の特性評価

抗 D L L 4 モノクローナル抗体 Y W 2 6 . 8 2 のエピトープマッピング : 抗 D L L 4 のモノクローナル抗体 2 6 . 8 2 は、ヒト D L L 4 細胞外ドメイン (E C D) の E G F 様リピート番号 2 (E G L 2) に存在する結合決定基を認識した。E G L 2 は、ヒト D L L 4 の E C D のアミノ酸 2 5 2 ~ 2 8 2 を含む。簡潔には、D L L 4 の E C D 変異はアルカリフォスファターゼ融合タンパク質として発現され、抗体への結合が評価された。図 5 a は、C 末端ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (A P) 融合タンパク質として発現された、1 セットの D L L 4 変異の図式的表示を示す。カッコ内は、融合タンパク質中に含まれる D L L 4 配列を示す。融合タンパク質を含む 2 9 3 T 細胞馴化培地を、精製抗 D L L 4 モノクローナル抗体 (Y W 2 6 . 8 2 、 0 . 5 μ g / m l) でコートした 9 6 ウェルマイクロタイタープレート上で検査した。結合された D L L 4 . A P を、基質としてワンステップ P N P P (ピアース社) および O D 4 0 5 n m の吸光度測定を使用して検出した。モノクローナル抗体 Y W 2 6 . 8 2 は、D L L 4 の E G L 2 ドメインを含むコンストラクトを結合し、D L L 4 の E G L 2 ドメインを欠くコンストラクトを結合しなかった。これは、抗 D L L 4 のモノクローナル抗体 Y W 2 6 . 8 2 がヒト D L L 4 E C D の E G L 2 ドメインのエピトープを認識することを実証した。

【 0 3 2 8 】

モノクローナル抗体 Y W 2 6 . 8 2 は、選択的にマウスおよびヒトの D L L 4 に結合する。9 6 ウェルのヌンク・マキシソーププレートを、指示されるように (1 μ g / m l) 精製組換えタンパク質でコートした。指示された濃度の Y W 2 6 . 8 2 の結合を E L I S A 分析によって測定した。結合された抗体を、基質として T M B および O D 4 5 0 n m の

吸光度測定を使用して、抗ヒト抗体HRPコンジュゲートにより検出した。抗HER2および組換えErbb2-ECDFを分析対照として使用した(図5b)。この実験の結果を図5b中で示す。モノクローナル抗体YW26.82は、ヒトおよびマウスのDLL4を結合し、ヒトDLL1およびヒトJAG1に検出可能な量で結合しなかった。これらの結果は、モノクローナル抗体YW26.82がDLL4に選択的に結合することを実証した。

【0329】

ベクター、全長DLL4、Jag1またはDLL1により一過性にトランスフェクションされた293細胞のFACS分析により、モノクローナル抗体YW26.82がDLL4に選択的に結合することもまた実証された。図5c中で示されるように、YW26.82の有意な結合はDLL4でトランスフェクションされた細胞でのみ検出された(上部のパネル)。有意な結合はDLL1またはJag1でトランスフェクションされた細胞で検出されなかった。Jag1およびDLL1の発現は、組換えラットノッチ1-Fc(rrノッチ1-Fc、中央パネル)および組換えラットノッチ2-Fc(rrノッチ2-Fc、下部パネル)の結合によってそれぞれ確認された。YW26.82、rrノッチ1-Fcまたはrrノッチ2-Fc(R&Dシステム)は2 μ g/mlで使用され、ヤギ抗ヒトIgG-PE(1:500、ジャクソン・イムノリサーチ社)が後続した。

10

【0330】

競合実験は、モノクローナル抗体YW26.82が、他のノッチリガンドではなく、DLL4とノッチの相互作用を効果的に選択的に遮断することを実証した。図5d中で示されるように、抗DLL4モノクローナル抗体は、計算されたIC50(~12nM)で、DLL4-AP(DLL1-APではなく)のコートされたrノッチ1への結合を遮断した(左側パネル)。抗DLL4のモノクローナル抗体は、計算されたIC50(~8nM)で、DLL4-His(Jag1-Hisではなく)のコートされたrノッチ1への結合を遮断した(右側パネル)。

20

【0331】

抗DLL4モノクローナル抗体YW26.82は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において内在的に発現されるDLL4へ特異的に結合した。対照またはDLL4に特異的なsiRNAによりトランスフェクションされたHUVECのFACS分析が実行された。YW26.82は2 μ g/mlで使用され、ヤギ抗ヒトIgG-PE(1:500、ジャクソン・イムノリサーチ)が後続した。この実験の結果は図5e中で示される。結合は、トランスフェクションされていないHUVEC(対照)、および対照siRNAによりトランスフェクションされたHUVECで観察された。これとは対照的に、DLL4 siRNAによりトランスフェクションされたHUVECにおいて、結合は有意に減少した。これらの実験は、抗DLL4のモノクローナル抗体YW26.82がHUVEC中で内在的に発現されたDLL4に特異的に結合することを実証した。

30

【0332】

実施例4:抗DLL4抗体による治療によりインビトロの内皮細胞増殖は増加した。共培養されたヒト皮膚線維芽細胞(SF)細胞の存在下においてフィブリンゲル中で増殖するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、明瞭な内腔様構造を備えた出芽を生成する(Nakatsu, M. N. et al. Microvasc Res 66, 102-12 (2003))。抗DLL4抗体YW26.82の追加は、出芽の長さおよび数を著しく増加させた(図1a)。タンパク質複合体の-セクレターゼ活性によって触媒されるノッチのタンパク質分解によるプロセッシングは、ノッチ活性化の間の必須工程である(Baron, M. Semin Cell Dev Biol 14, 113-9 (2003))。興味深いことには、-セクレターゼ阻害剤ジベンザゼピン(DBZ)(van Es, J. H. et al. Nature 435, 959-63 (2005); Milano, J. et al. Toxicol Sci 82, 341-58 (2004))は、HUVEC出芽に同一の効果を有していた。これらの2つの処理の別個のメカニズムを考慮すると、出芽の促進は、ノッチ

40

50

シグナリングの減衰に明らかに起因した。Ki 67 染色により、EC 出芽促進は細胞増殖の増加のためであることが明らかにされた (図 1 b)。もとのフィブリンゲル分析において、HUVEC 出芽および続いて起こる内腔形成は共培養された SF 細胞によって維持される。SF 細胞を馴化培地に置換することによって、抗 DLL4 のモノクローナル抗体および DBZ の両方は HUVEC 出芽をなお促進でき (図 1 c)、DLL4 / ノッチシグナリングの EC 自律性の役割を支持する。逆の実験では、固定化 DLL4 タンパク質によるノッチの活性化は、有意な増殖阻害をもたらした (図 1 e)。これらの結果は、DLL4 / ノッチシグナリングの活性化状態が EC 増殖に密接に関連していることを示唆する。

【0333】

実施例 5：抗 DLL4 抗体による処理はインビボの内皮細胞増殖を増加させた。

10

【0334】

マウス出生後早期の網膜は、十分に定義された事象の順序で型通りの血管パターンを発達させる。(Stone, J. & Dreher, Z. J Comp Neurol 255, 35 - 49 (1987); Gerhardt, H. et al. J Cell Biol 161, 1163 - 77 (2003); Fruttiger, M. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 522 - 7 (2002))。新生仔網膜での EC の増殖と関連した DLL4 の顕著で動的な発現は、DLL4 の網膜血管発生の調節における可能な役割を示唆する (Claxton, S. & Fruttiger, M. Gene Expr Patterns 5, 123 - 7 (2004))。YW26.82 の全身的な送達は、網膜血管の重大な変化をもたらした。EC の大量の蓄積が網膜で生じ、原始血管の形態を持ったシート様構造を生成した (図 1 d)。EC における Ki 67 標識の著しい増加が観察され、EC 増殖の増加が示された (図 1 h)。したがって、新生仔マウスでの DLL4 遮断に際しての網膜 EC のこの過剰増殖性表現型は、インビトロの結果に確証を与えた。

20

【0335】

実施例 6：上皮細胞増殖の調節における DLL4 / ノッチの本質的な役割

VEGF は、EC のいくつかの基本的態様を制御する (Ferrara, N. Exs, 209 - 31 (2005); Coultas, L. et al. Nature 438, 937 - 45 (2005))。しかしながら、動静脈 (AV) 分化および階層的血管構成のような複雑な血管過程 (明らかに追加の高度に統合されたシグナリング経路を要求する事象) へと VEGF シグナリングがどのように組み込まれるかはそれほど理解されない。ゼブラフィッシュにおける遺伝学的研究は、VEGF が動脈内皮分化の間のノッチ経路の上流で作用することを示唆する (Lawson, N. D. et al. Development 128, 3675 - 83 (2001))。我々は、HUVEC の VEGF 刺激が DLL4 の表面発現の増加をもたらすことを見出し (データ不掲載)、VEGF 刺激による DLL4 mRNA のアップレギュレーションに対する最近の報告と一致している (Patel, N. S. et al. Cancer Res 65, 8690 - 7 (2005))。興味深いことに、DLL4 それ自体はノッチ活性化に続いてアップレギュレートされ (図 6)、DLL4 がノッチ経路に対して VEGF シグナリングを効果的に中継する正のフィードバックメカニズムが示唆される。簡潔には、HUVEC は、DBZ (0.08 μ M) の非存在下または存在下において、固定化 C 末端 His - タグ付加ヒト DLL4 (アミノ酸 1 ~ 404) によって刺激された。刺激の 36 時間後に、内在性の DLL4 発現は抗 DLL4 抗体による FACS 分析によって検討された。

30

40

【0336】

特に、ノッチシグナリングの遮断から結果として生じる EC の過剰増殖は、なお VEGF に依存した。三次元フィブリンゲル培養において、抗 VEGF モノクローナル抗体による処理は、DBZ の存在下または非存在下のいずれかで大部分の EC 出芽を消失させ (図 1 f)、過剰増殖性の挙動が、部分的には、促進された VEGF シグナリングのためである可能性が出てきた。実際は、YW26.82 または DBZ によるノッチの遮断は VEG

50

F R 2 のアップレギュレーションをもたらした (図 1 g)。反対に、固定化 D L L 4 によるノッチの活性化は V E G F R 2 の発現を抑制した (図 1 g)。したがって、V E G F は D L L 4 / ノッチ経路の上流に作用することができるが、D L L 4 / ノッチは V E G F R 2 発現を負に調節することを介して反応を微調整できる。

【 0 3 3 7 】

実施例 7 : 抗 D L L 4 の抗体による処理は内皮細胞分化を遮断し、動脈発生を遮断する。D L L 4 / ノッチの拮抗は、E C 増殖の増加に加えて、フィブリンゲル中の E C 出芽の劇的な形態学的変化をもたらした。多細胞内腔様構造はほとんど存在せず (図 2 a)、不完全な E C 分化が示唆された。モノクローナル抗体 Y W 2 6 . 8 2 に処理された網膜において、動脈および静脈が放射状に交差にする特徴的パターンは著しく破壊された。抗 - 平滑筋アクチン (A S M A) 染色 (網膜動脈に関連する) は、全く存在しなかった (図 2 c)。この観察は、D L L 4 + / - 胚における不完全な動脈発生に著しく類似した。異なる角度からのこれらの結果は、E C 分化の調節における D L L 4 / ノッチの本質的な役割を強調した。

10

【 0 3 3 8 】

実施例 8 : T F G 発現はノッチの活性化状態に関連づけられた。

【 0 3 3 9 】

ノッチ経路に類似して、T G F シグナリングは背景依存であり、細胞分化、増殖および増殖阻害に対して多様で、しばしば反対の効果を有する。さらに T G F 経路は血管過程に関係する (U r n e s s , L . D . e t a l , N a t G e n e t 2 6 , 3 2 8 - 3 1 (2 0 0 0) ; O s h i m a , M . e t a l , D e v B i o l 1 7 9 , 2 9 7 - 3 0 2 (1 9 9 6) ; L a r s s o n , J . e t a l . E m b o J 2 0 , 1 6 6 3 - 7 3 (2 0 0 1))。例えば、アクチビン受容体様キナーゼ 1 (A L K 1) (E C 特異的なタイプ I T G F 受容体) の欠損は、卵黄嚢中の原始的な E C 網、および動静脈機能不全 (A V M) (欠陥ノッチシグナリングを持ったマウスに共有される表現型) をもたらした (U r n e s s , L . D . e t a l , N a t G e n e t 2 6 , 3 2 8 - 3 1 (2 0 0 0) ; I s o , T . e t a l , A r t e r i o s c l e r T h r o m b V a s e B i o l 2 3 , 5 4 3 - 5 3 (2 0 0 3))。このことは、我々にこれらの 2 つの経路の間の可能な関係を調査させた。T G F 2 の発現 (図 2 b) はノッチの活性化状態に厳密に関連づけられることが見出され、T G F 経路はノッチ経路の下流に作用することが示唆された。これらまとめると、我々の結果は、「シグナリングルーター」として貢献する D L L 4 / ノッチ軸が、D L L 4 発現の調節を介して V E G F シグナリングを統合し、E C 分化を促進するために T G F 経路を取るというモデルを支持する。

20

30

【 0 3 4 0 】

実施例 9 : 抗 D L L 4 抗体による処理はインビボの腫瘍増殖を阻害した。

【 0 3 4 1 】

腫瘍血管形成の間の D L L 4 / ノッチシグナリングの可能な役割を直接検討するために、前臨床腫瘍モデルにおける腫瘍増殖に対する D L L 4 の遮断の効果を研究した (図 3 a ~ d)。H M 7、C o l o 2 0 5 および C a l u 6 の異種移植腫瘍モデル (図 3 a ~ c) において、Y W 2 6 . 8 2 処理は、腫瘍確立後 (腫瘍サイズで 250 mm^3) に開始された。3 つのモデルすべてにおいて、対照群と処理群との間の増殖率の分離は、投与 3 日後に明らかになった。処理群の腫瘍容積は 2 週間の処理にわたって静止したままだった。抗 D L L 4 のモノクローナル抗体は、皮下腫瘍に加えて、マウス乳腺脂肪体中で増殖する腫瘍もまた阻害した。M D A - M B - 4 3 5 腫瘍モデルにおいて、腫瘍細胞注入 1 4 日後に処理を開始した。対照群と処理群との間の腫瘍成長曲線の差は、投薬後に 6 日以内に明らかであり、処理の継続にしたがってますます有意になった (図 3 d)。

40

【 0 3 4 2 】

前臨床腫瘍モデルにおける多数の腫瘍増殖に対する D L L 4 および / または V E G F の遮断の効果もまた研究した。(図 3 e ~ f ; i p)。M V - 5 2 2 および W E H I 3 の異

50

種移植腫瘍モデルにおいて、YW26.82処理および/または抗VEGF処理は腫瘍確立後(腫瘍サイズで 250 mm^3)に開始された。MV-522モデルにおいて、YW26.82および抗VEGFの処理の両方は腫瘍増殖を個別に阻害したが、2つの処理の組合せが最も有効だった。WEHI3モデルにおいて、抗VEGFの処理は腫瘍増殖に対する効果を示さなかったが、YW26.82による処理は腫瘍増殖に有意な阻害を示した。SK-OV-3X1、LL2、EL4、H1299、SKMES-1、MX-1、SW620およびLS174Tモデルにおいて、YW26.82処理(5mg/kg、腹腔内、毎週2回)および/または抗VEGF処理(5mg/kg、腹腔内、毎週2回)は、腫瘍の確立後に投与された。これらのモデルの各々において、YW26.82処理は単独で腫瘍増殖を阻害した。更に、これらモデルのすべてにおいて組合せが検査された場合、YW26.82は抗VEGFとの組合せで有効性の促進を示した。

10

【0343】

実施例10:抗DLL4抗体による処理は腫瘍内皮細胞増殖を増加させた。

【0344】

腫瘍増殖阻害の観点から、EL4マウスのリンパ腫腫瘍モデルを血管の組織学研究のために使用した。抗DLL4モノクローナル抗体処理が内皮細胞密度の劇的な増加をもたらすことが見出された(図3g)。これとは対照的に、抗VEGFは全く逆の効果を有していたが(図3g)、両方の処理はこのモデルにおいて類似した有効性を示した。

【0345】

実施例11:抗DLL4の抗体による処理は腫瘍血管灌流を阻害した。

20

【0346】

DLL4/ノッチ経路のインビトロでの遮断によりECの内腔様構造の形成が低下したので(図2a)、抗DLL4モノクローナル抗体による処理が、腫瘍血管の類似した障害をもたらす、効率的な血管灌流に影響したかどうか調べられた。FITC-レチン(lectin)による全身的な灌流により、抗DLL4モノクローナル抗体の処理が腫瘍血管のレクチン標識の著しい減少をもたらすことが明らかにされた(図3h)。特に、ALK1欠損マウスにおける動静脈の機能不全が異常な血液循環をもたらすことが示された(Urness, L. D. et al., Nat Genet 26, 328-31 (2000))。AV分化におけるDLL4/ノッチシグナリングの重大な役割を考慮すると、胚および出生後早期の網膜の両方において、抗DLL4モノクローナル抗体は、腫瘍ECの細胞運命の特殊化に影響を与えて、不完全な方向性の血管灌流をもたらす。実際、抗DLL4モノクローナル抗体で処理されたColo205腫瘍において、高EC密度が生存可能な腫瘍細胞の低含量に関連する領域があり、低血管機能に関わっていた。血管イメージング技術を利用するさらなる研究が、正確な血管障害に対する洞察を得るために必要である。

30

【0347】

実施例12:DLL4/ノッチはマウス腸のホメオスタシスにおいて重要でない。

【0348】

ノッチの全体的な阻害に関する主な関心事は、出生後の自己再生システムのホメオスタシスの調節におけるノッチシグナリングの多面的な役割を考慮すると、それが有害かもしれないということである。例えば、ノッチシグナリングは腸において未分化の腺窩前駆細胞を維持するために必要とされる(van Es, J. H. et al., Nature 435, 959-63 (2005); Fre, S. et al., Nature 435, 964-8 (2005))。実際は、-セクレターゼ阻害剤(それらは無差別にノッチ活性をすべて遮断する)は、腺窩コンパートメント内の杯細胞の大量の増加のためにげっ歯類中で不要な副作用をもたらす(Milano, J. et al., Toxicol Sci 82, 341-58 (2004); Wong, G. T. et al., J Biol Chem 279, 12876-82 (2004))。免疫組織化学分析によって抗DLL4モノクローナル抗体により処理されたマウスの小腸を調べた。DBZ処理とは対照的に、6週間の処理後に、上皮腺窩

40

50

細胞分化または増殖曲線の差は抗DLL4モノクローナル抗体群および対照群との間で同定されなかった(図4)。更に、抗DLL4モノクローナル抗体は、迅速に分裂する一時的な増幅(TA)集団におけるノッチ標的遺伝子HES-1の発現を変化させなかった(図4)。これらの結果は、DLL4/ノッチシグナリングが血管系に主として限定されるという考えを支持する。

【0349】

実施例13：抗DLL4抗体による処理は成体の網膜血管に影響を与えない。

【0350】

DLL4の遮断は新生仔マウスにおいて網膜血管発生に対して重大な影響を及ぼしたが、抗DLL4抗体の投与は成体の網膜血管に対して目に見える影響を及ぼさない(図2d)。したがって、DLL4/ノッチシグナリングは活発な血管形成の間の重大であるが、正常な血管維持においてそれほど重要でない役割を果たす。この考えに一致して、抗DLL4モノクローナル抗体の処理の過程の間に、最大8週間の10mg/kgで1週あたり2回投与された場合、明らかな体重減少または動物死は癌を持ったマウスにおいて観察されなかった。腫瘍モデルにおいて、抗DLL4モノクローナル抗体および抗VEGFは、腫瘍血管に対して逆効果を示し、重複しない作用機序を示唆する。

【0351】

前述の明文化された明細書は、当業者が本発明の実行を可能にするのに十分であると考えられる。しかしながら、本明細書において示され記述されたものに加えて、本発明の様々な修飾は、前述の記述に当業者に明らかになり、添付された請求項の範囲以内にあるだ

10

20

【図1a】

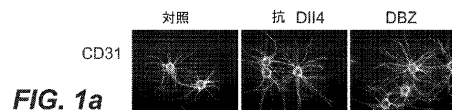


FIG. 1a

【図1b】

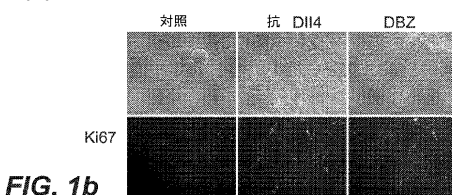


FIG. 1b

【図1c】

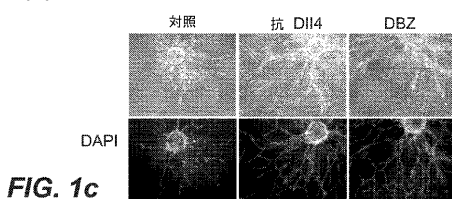


FIG. 1c

【図1d】

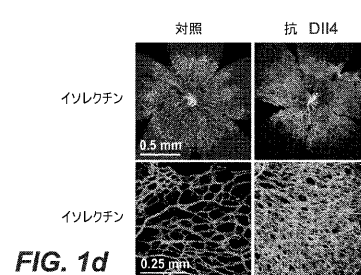


FIG. 1d

【図1e】

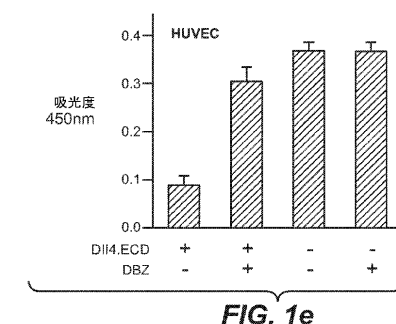


FIG. 1e

【図 1 f】

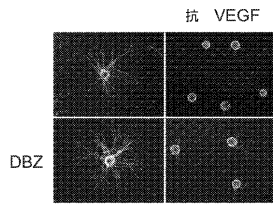


FIG. 1f

【図 1 g】

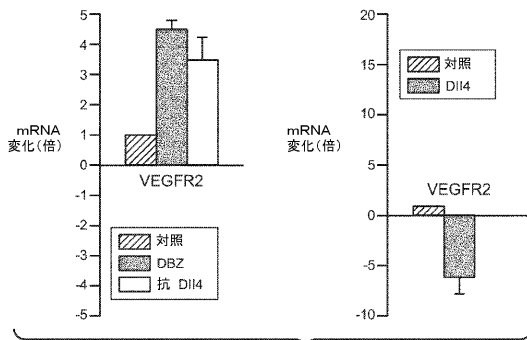


FIG. 1g

【図 1 h】

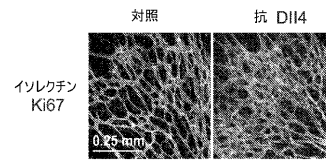


FIG. 1h

【図 2 a】

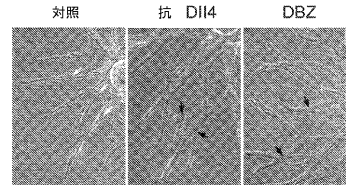


FIG. 2a

【図 2 b】

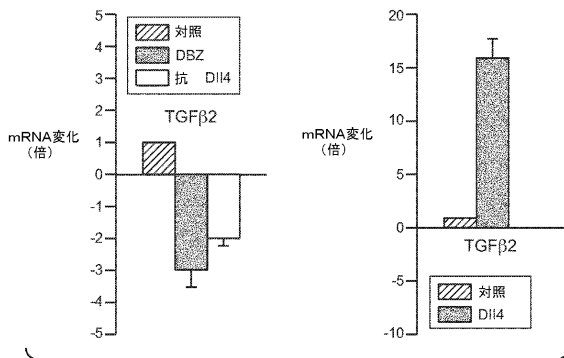


FIG. 2b

【図 2 c】

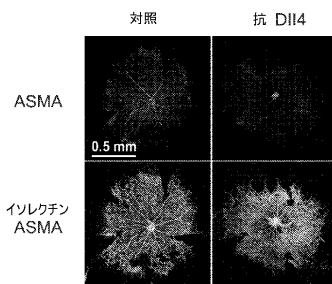


FIG. 2c

【図 2 d】

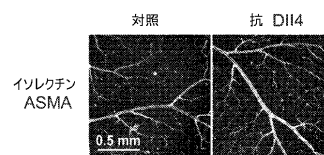


FIG. 2d

【図 3 a】

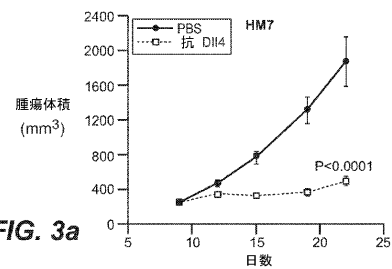


FIG. 3a

【図 3 b】

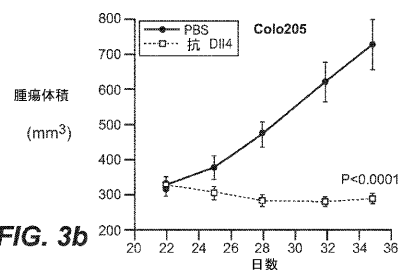


FIG. 3b

【図 3 c】

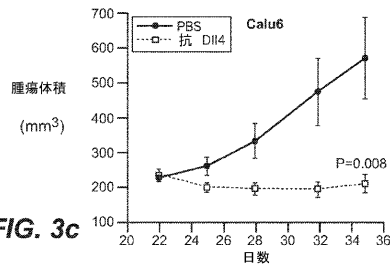


FIG. 3c

【図 3 d】

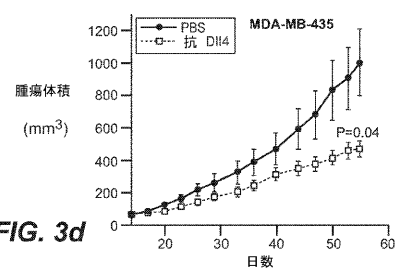


FIG. 3d

【図 3 e】

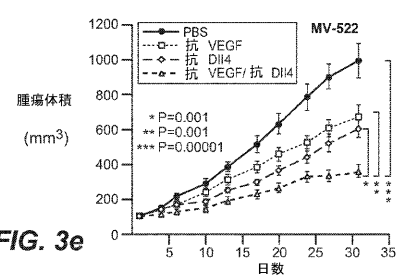


FIG. 3e

【図 3 f】

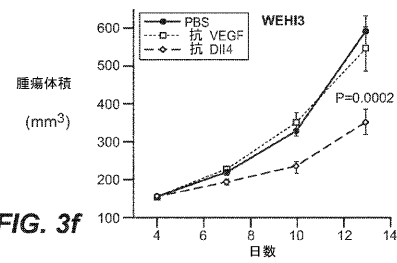


FIG. 3f

【図 3 g】

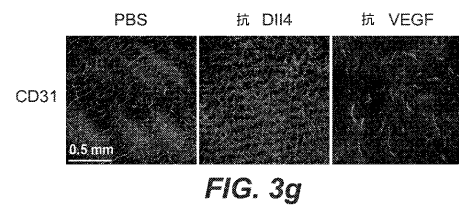


FIG. 3g

【図 3 h】

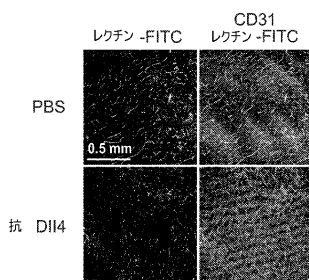


FIG. 3h

【図 3 i】

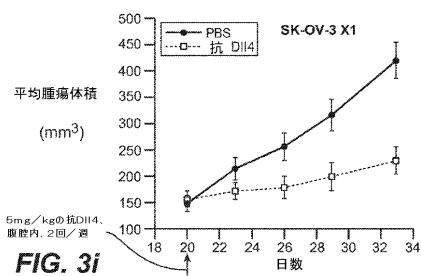


FIG. 3i

【図 3 j】

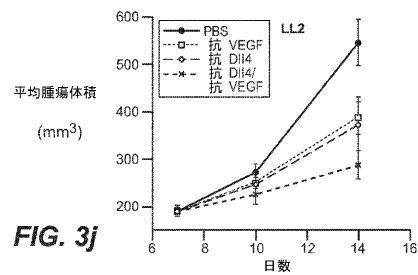


FIG. 3j

【図 3 k】

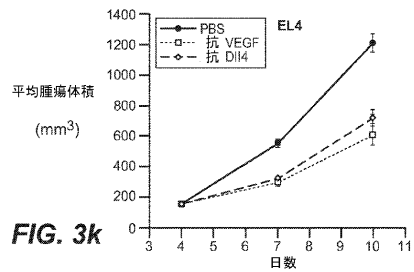
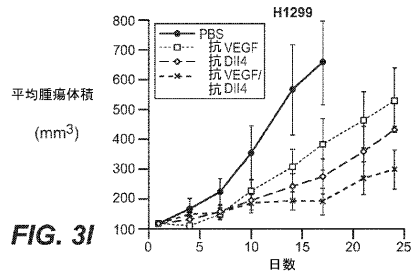
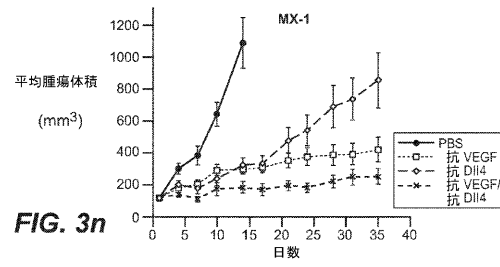


FIG. 3k

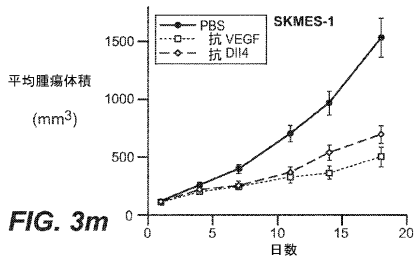
【図 3 l】



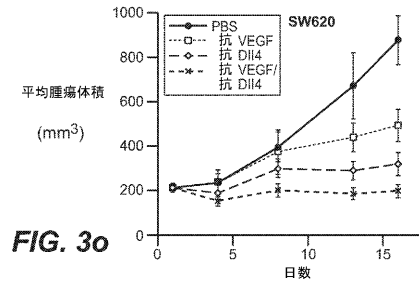
【図 3 n】



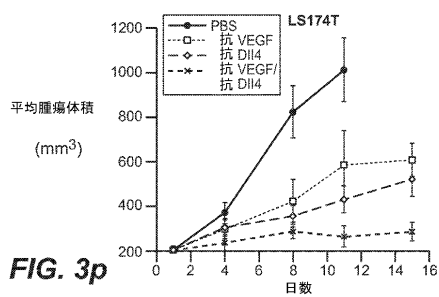
【図 3 m】



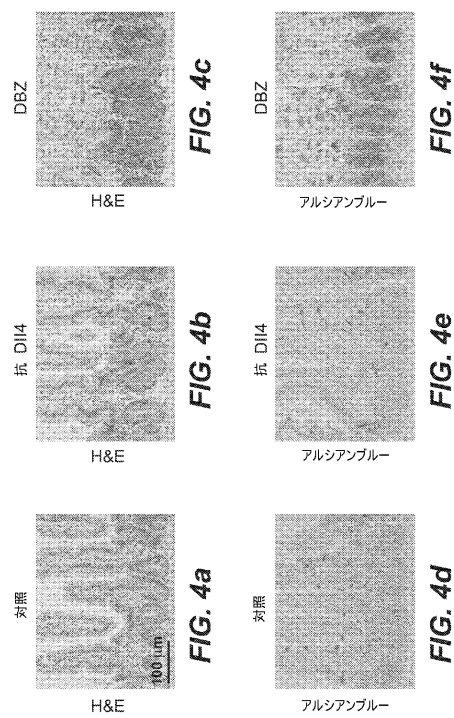
【図 3 o】



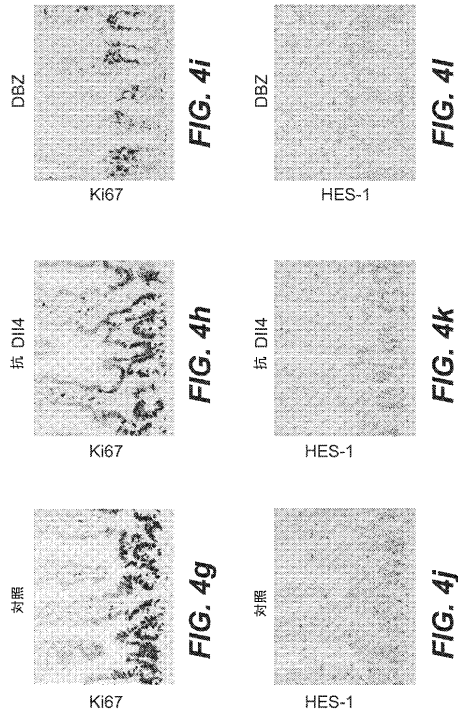
【図 3 p】



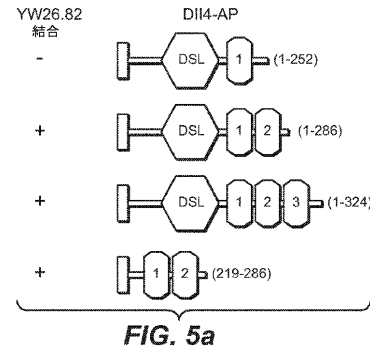
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 5 a】



【図 5 b】

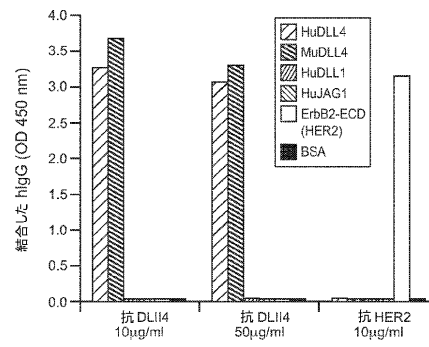


FIG. 5b

【図 5 c】

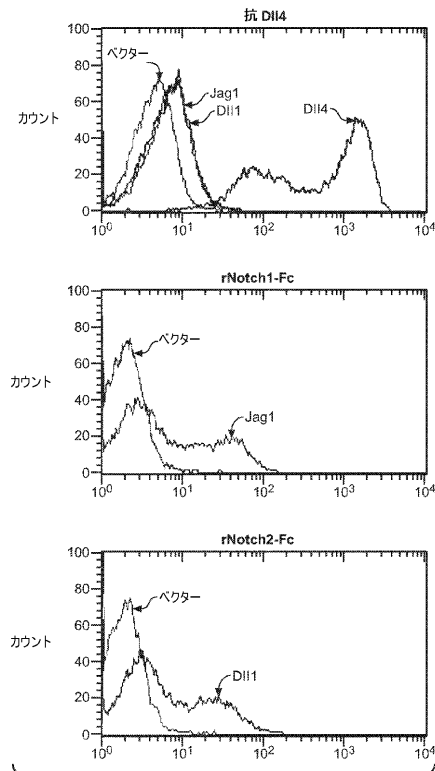


FIG. 5c

【図 5 d】

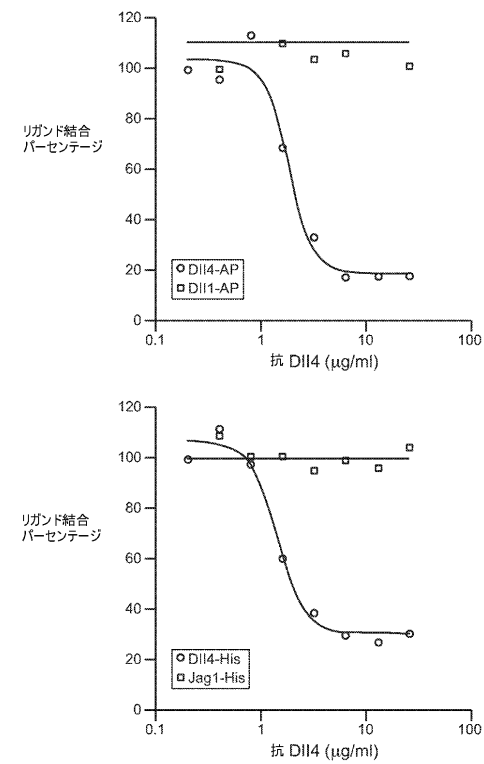
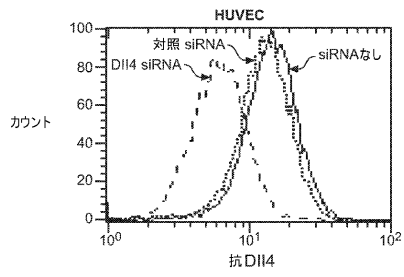
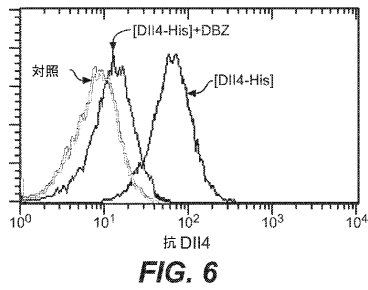


FIG. 5d

【図 5 e】



【図 6】



【配列表】

2009539870000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/070516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 A61K39/395

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dl14) is critical for tumor growth and angiogenesis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721</p> <p>& 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006</p> <p>ISSN: 0197-016X</p> <p>abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-5, 10-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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.

a document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 November 2007

Date of mailing of the international search report

06/12/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-9016

Authorized officer

Kania, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/070516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATEL NILAY S ET AL: "Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 8690-8697, XP002452160 ISSN: 0008-5472 the whole document	6
A	REHMAN AASIA O ET AL: "Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 16, no. 6, May 2006 (2006-05), pages 293-300, XP002457721 ISSN: 0962-8924	
A	WILLIAMS CASSIN KIMMEL ET AL: "Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function" BLOOD, vol. 107, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 931-939, XP002457722 ISSN: 0006-4971	
A	TAVARES MARIA J ET AL: "Inhibition of vascular endothelium by the Notch-ligand delta-4 unveils a novel therapeutic target." BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 531a, XP009091788 & 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971	
A	MAILHOS CAROLINA ET AL: "Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 69, no. 2-3, December 2001 (2001-12), pages 135-144, XP002452161 ISSN: 0028-0836	
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/070516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLAXTON S ET AL: "Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries" GENE EXPRESSION PATTERNS, ELSEVIER, vol. 5, no. 1, November 2004 (2004-11), pages 123-127, XP004631657 ISSN: 1567-133X cited in the application -----	5,19
P,X	NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1032-1037, XP002457724 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-4,6-9, 20-25
P,X	RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1083-1087, XP002457725 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-4, 6-18, 20-25
P,X	LOBOV I B ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 9, February 2007 (2007-02), pages 3219-3224, XP002457726 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-9, 20-25
P,X	US 2006/134121 A1 (THURSTON GAVIN [US] ET AL) 22 June 2006 (2006-06-22) the whole document -----	1-4,7,8, 10-14, 16-18, 20-25
E	WO 2007/070671 A (REGENERON PHARMA [US]; NOGUERA IRENE [US]; THURSTON GAVIN [US]; GALE N) 21 June 2007 (2007-06-21) the whole document -----	1-4, 9-15,17, 18,20-25
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SAINSON R C A ET AL: "Anti-D114 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395, XP002457727 ISSN: 1471-4914 -----	
T	THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth" NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM, vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331, XP002457728 ISSN: 1474-175X 1474-1768 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/070516

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

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/070516

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006134121	A1	22-06-2006	NONE	
WO 2007070671	A	21-06-2007	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 5/16 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 5/16	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 15/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 15/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
	A 6 1 P 17/14	
	A 6 1 P 17/00	
	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	C 0 7 K 16/18	

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

(72)発明者 ヤン , ミンホン

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 , ナンタケット ストリート 4 1 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA80 CA11 GA11 HA14 HA17
 4C084 AA17 AA20 MA52 MA55 MA56 MA66 NA05 NA14 ZA332 ZA362
 ZA422 ZA452 ZA592 ZA662 ZA812 ZA892 ZA922 ZA962 ZB082 ZB112
 ZB152 ZB211 ZB262 ZB272 ZB352 ZC062 ZC202 ZC352
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43 BB44 CC22 CC23 EE01
 GG01 GG08 GG10
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74