

(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2014-525412

(P2014-525412A)

(43) 公表日 平成26年9月29日 (2014.9.29)

(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 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-526228 (P2014-526228)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月16日 (2012.8.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月14日 (2014.4.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/051220
 (87) 国際公開番号 W02013/025944
 (87) 国際公開日 平成25年2月21日 (2013.2.21)
 (31) 優先権主張番号 61/524,670
 (32) 優先日 平成23年8月17日 (2011.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者
 チャン, アリシア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サン フランシスコ,
 ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテ
 ッド

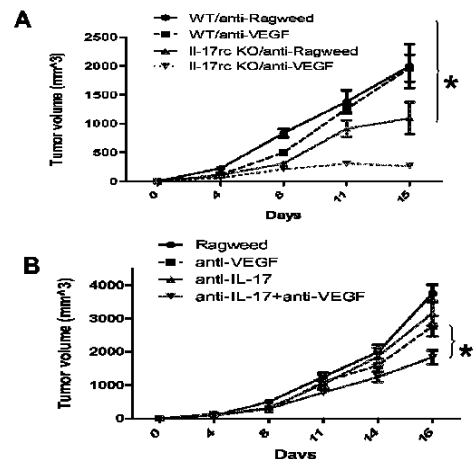
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 難治性腫瘍における血管新生の阻害

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍の血管新生の阻害に関する。特に、本発明は、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 治療に対して難治性の腫瘍において、例えば、抗 IL-17 抗体及び他のアンタゴニストなどの IL-17 アンタゴニストを用いた、腫瘍の血管新生の阻止又は治療及び腫瘍増殖の抑制に関する。

FIGURE 4



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以前に血管内皮増殖因子（VEGF）アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体に IL - 17 アンタゴニストの有効量を投与することを含む、腫瘍血管新生を阻害する方法であって、腫瘍が該 VEGF アンタゴニストによる治療に対して難治性である方法。

【請求項 2】

以前に VEGF アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体に IL - 17 アンタゴニストの有効量を投与することを含む、腫瘍増殖を抑制する方法であって、腫瘍が該 VEGF アンタゴニストによる治療に対して難治性である方法。

10

【請求項 3】

以前に VEGF アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体に IL - 17 アンタゴニストの有効量を投与することを含む、腫瘍治療の方法であって、腫瘍が該 VEGF アンタゴニストによる治療に対して難治性である方法。

【請求項 4】

VEGF アンタゴニストが抗 VEGF 抗体又はその断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

VEGF アンタゴニストが抗 VEGF 抗体又はその断片である、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 6】

VEGF アンタゴニストが抗 VEGF 抗体又はその断片である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

抗 VEGF 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペプチド又はその断片若しくは変異体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

抗 VEGF 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペプチド又はその断片若しくは変異体である、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 9】

抗 VEGF 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペプチド又はその断片若しくは変異体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

IL - 17 アンタゴニストが、抗 IL - 17 抗体若しくはその断片又は抗 IL - 17 受容体抗体若しくはその断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

IL - 17 アンタゴニストが、抗 IL - 17 抗体若しくはその断片又は抗 IL - 17 受容体抗体若しくはその断片である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

IL - 17 アンタゴニストが、抗 IL - 17 抗体若しくはその断片又は抗 IL - 17 受容体抗体若しくはその断片である、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記抗 IL - 17 抗体又はその断片が IL - 17 A 又は IL - 17 F 又は IL - 17 A 及び IL - 17 F に特異的に結合する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗 IL - 17 抗体又はその断片が IL - 17 A 又は IL - 17 F 又は IL - 17 A 及び IL - 17 F に特異的に結合する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗 IL - 17 抗体又はその断片が IL - 17 A 又は IL - 17 F 又は IL - 17 A 及び IL - 17 F に特異的に結合する、請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 16】

前記抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 16 に記載の方法

。

【請求項 20】

前記抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 17 に記載の方法

。

【請求項 21】

前記抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 18 に記載の方法

。

【請求項 22】

IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片は、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体若しくはその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管密度を減少させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片は、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体若しくはその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管密度を減少させる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 24】

IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片は、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体若しくはその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管密度を減少させる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 25】

腫瘍の血管新生の前記阻害が、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において前記腫瘍の平均血管密度を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %又は少なくとも 99 %減少させる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記腫瘍増殖の抑制が、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において前記腫瘍の平均血管密度を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %又は少なくとも 99 %減少させる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記腫瘍治療が、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において前記腫

10

20

30

40

50

瘍の平均血管密度を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %又は少なくとも 99 %減少させる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記平均血管密度が、前記腫瘍の全細胞面積に対する前記腫瘍の CD31 陽性細胞の面積の平均を採用して測定される、請求項 25 に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記平均血管密度が、前記腫瘍の全細胞面積に対する前記腫瘍の CD31 陽性細胞の面積の平均を採用して測定される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記平均血管密度が、前記腫瘍の全細胞面積に対する前記腫瘍の CD31 陽性細胞の面積の平均を採用して測定される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

前記腫瘍増殖の抑制が、IL-17 アンタゴニスト又は IL-17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において腫瘍体積を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %又は少なくとも 99 %減少させる、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記腫瘍治療が、IL-17 アンタゴニスト又は IL-17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において腫瘍体積を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %又は少なくとも 99 %減少させる、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 33】

腫瘍体積の前記減少が、コンピュータ断層撮影 (CAT スキャン)、磁気共鳴イメージング (MRI)、陽電子放出断層撮影 (PET) 又は単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) によって測定される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

腫瘍体積の前記減少が、コンピュータ断層撮影 (CAT スキャン)、磁気共鳴イメージング (MRI)、陽電子放出断層撮影 (PET) 又は単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) によって測定される、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 35】

前記ヒト被験体に抗 VEGF 抗体又はその断片を投与することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ヒト被験体に抗 VEGF 抗体又はその断片を投与することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ヒト被験体に抗 VEGF 抗体又はその断片を投与することを更に含む、請求項 3 に

50

記載の方法。

【請求項 38】

抗 V E G F 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

抗 V E G F 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

抗 V E G F 抗体が配列番号 1 の可変重鎖配列及び配列番号 2 の可変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片である、請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 41】

前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 44】

腫瘍が、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 45】

腫瘍が、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 46】

腫瘍が、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 47】

前記 I L - 17 アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の数又は頻度を決定することにより、腫瘍血管新生の前記阻害の有効性をモニタリングすることを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 48】

前記 I L - 17 アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の数又は頻度を決定することにより、前記腫瘍増殖の抑制の有効性をモニタリングすることを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 I L - 17 アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の数又は頻度を決定することにより、前記腫瘍治療の方法の有効性をモニタリングすることを更に含む、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 50】

G - C S F アンタゴニストの有効量を投与することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 51】

G - C S F アンタゴニストの有効量を投与することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 52】

50

G - C S F アンタゴニストの有効量を投与することを更に含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 G - C S F アンタゴニストが抗 V E G F 抗体又はその断片である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 G - C S F アンタゴニストが抗 V E G F 抗体又はその断片である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 G - C S F アンタゴニストが抗 V E G F 抗体又はその断片である、請求項 5 2 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がモノクローナル抗体である、請求項 5 5 に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記抗 G - C S F 抗体又はその断片がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項 5 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【発明の開示】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2011年8月17日出願の米国仮出願番号61/524,670の35 USC 119(e)の下での利益を主張し、内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、腫瘍の血管新生の阻害に関する。特に、本発明は、抗血管内皮増殖因子(V E G F)治療に対して難治性の腫瘍において、例えば、抗 I L - 1 7 抗体及び他のアンタゴニストなどの I L - 1 7 アンタゴニストを用いた、腫瘍の血管新生の阻止又は治療及び腫瘍増殖の抑制に関する。

40

【0 0 0 3】

発明の背景

現在では、既存の内皮からの新たな血管の形成を含む血管形成は様々な障害の病因に関与していることが十分に確立されている。これらには、固形腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化症、水晶体後線維増殖症、血管腫、慢性炎症、増殖性網膜症、例えば糖尿病性網膜症などの眼内新生血管症候群、加齢性黄斑変性症(A M D)、血管新生緑内障、移植された角膜組織及び他の組織の免疫拒絶、関節リウマチ、及び乾癬が含まれる。Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Ph

50

ysiol., 53: 217-239 (1991);及びGarner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710。

【 0 0 0 4 】

腫瘍増殖の場合、血管新生は、過形成から新形成への移行のため及び腫瘍の増殖および転移のため栄養を提供するために重要であると思われる。Folkman et al., Nature, 339: 58 (1989)。新血管新生は、正常細胞と比較して腫瘍細胞が増殖優位性と増殖自主性を獲得することを可能とする。腫瘍は通常、利用可能な毛細血管床からの距離に起因して数立方ミリメートルのサイズにのみ増殖することができる単一異常細胞として始まり、そして長期間更に増殖及び転移することなく「休止状態」で留まることができる。一部の腫瘍細胞は、次いで、内皮細胞を活性化するために血管新生の表現型へと転換し、増殖して新たな毛細血管に成熟する。これらの新しく形成された血管は原発性腫瘍の継続的増殖を可能にするだけでなく、転移性腫瘍細胞の転移及び再コロニー化を可能とする。従って、腫瘍切片における毛細血管の密度と、乳癌並びに他の幾つかの腫瘍における患者の生存率との間に相関が観察されている。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よく理解されていないが、腫瘍塊の新血管新生は多数の血管新生刺激因子及び阻害剤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)。

10

【 0 0 0 5 】

血管発達の過程は厳密に調節されている。今日まで、かなりの数の分子、大半は周囲の細胞によって産生される分泌因子が、EC分化、増殖、遊走及び索状構造への合体を調節することが示されている。例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)は、血管新生を刺激し血管透過性を誘導することに関与する重要な因子として同定されている。Ferrara et al., Endocr. Rev., 18: 4-25 (1997)。単一のVEGF対立遺伝子の欠失でさえも胚性致死を生じるという知見は、血管系の発達および分化においてこの因子が果たす置き換えられない役割を指し示している。更に、VEGFは、腫瘍及び眼内障害に関連する新血管新生の重要なメディエーターであることが示されている。Ferrara et al., Endocr. Rev., 上記。VEGFのmRNAは、検討された大部分のヒト腫瘍により過剰発現している。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)。

20

30

【 0 0 0 6 】

抗VEGF中和抗体による処置は幾つかの腫瘍細胞株の増殖を有意に阻害し、VEGF単独の遮断は血管新生の阻害を介して実質的に腫瘍増殖を抑制し得ることを示唆している(Kim et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, Nature 362 (1993)を参照。VEGF-Aを阻害することに加えて、VEGF受容体を遮断することを目的とした戦略はまた、腫瘍増殖の阻害をもたらす([Ellis and Hicklin, 2008], [Ferrara, 2004] and [Kerbel, 2008])。VEGF-Trap(アフリベルセプト、リジェネロン社)は、VEGFR1及びVEGFR2からの構造要素を含むキメラ可溶性受容体であり(Holashら、2002)、異種移植モデルにおける腫瘍増殖を阻害し、幾つかの腫瘍の治療用に現在臨床試験中である。

40

【 0 0 0 7 】

VEGFシグナル伝達経路を標的とする様々な小分子阻害剤が開発されている。これらは受容体チロシンキナーゼ、例えばBay 43-9006(ソラフェニブ; Nexavar(登録商標))(Kupsch et al., 2005)及びSU11248(スニチニブ; Sutent(登録商標))(O'Farrell et al., 2003)を含む。ソラフェニブはVEGFR-2及び-3、PDGFR-、Flt-3及びc-kitをも阻害するRafキナーゼ阻害剤

50

である(Fabian et al., 2005)。ソラフェニブは、進行性腎細胞癌(RCC)(Kane et al., 2006)及び手術不能な肝細胞癌(Lang, 2008)のためにFDAによって承認されている。同様に、スニチニブはVEGFR、PDGFR、c-kit及びFlt-3を含むいくつかの経路を阻害し、進行したRCC(van der Veldt et al., 2008)において及びイマチニブ抵抗性消化管間質性腫瘍(Smith et al., 2004)において有効性を示している。

【0008】

VEGF阻害剤は、進行した癌患者において臨床的有效性と生存優位性を実証したが、ほとんどの患者は結局は再発する。一般には抗血管新生剤、特にVEGF遮断薬に対する応答の減少の基礎となる細胞及び分子のメカニズムを解明するために集中的な研究が進められている(F. Shojaei and N. Ferrara, Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells, Cancer Res. 68 (2008), pp. 5501-5504)。

10

【0009】

抗VEGFに対する応答の減少は、腫瘍及び/又は非腫瘍(間質)の区画から生じ得る。腫瘍細胞とは対照的に、間質細胞は、遺伝的に安定であり、染色体異常を示さない(Hughes, 2008)。間質には、線維芽細胞、周皮細胞、間葉系幹細胞及び造血細胞を含む細胞の異種集団を含む。間質細胞は、腫瘍血管系への直接的な寄与(Santarelli et al., Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain, Neurosurgery 59 (2006), pp. 374-382、VEGF(Liangら、2006)及びMMP9(Coussensら、2000)及びSema4D(Sierraら、2008)の放出などの幾つかの可能なメカニズムを介して、又は腫瘍細胞から免疫監視を外すことによって腫瘍増殖を支える。

20

【0010】

多くの疾患及び障害における血管新生の役割を考慮すると、これらのプロセスを引き起こす生物学的作用の一以上を減少又は阻害する手段を有することが望まれる。本明細書に引用される全ての参考文献は、特許出願および刊行物を含み、その全体が参考により援用される。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、IL-17アンタゴニストの有効量を投与することにより以前にVEGFアンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体において、腫瘍の血管新生を阻害し、腫瘍増殖を抑制し、及び腫瘍を治療する方法を提供する。

30

【0012】

一実施態様において、以前に血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体にIL-17アンタゴニストの有効量を投与することを含む腫瘍血管新生を阻害する方法が意図される。別の実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニストは、抗IL-17抗体又はその断片、又は抗IL-17受容体抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、抗IL-17抗体又はその断片はIL-17A又はIL-17F又はIL-17A及びIL-17Fに特異的に結合する。更なる実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は前記VEGFアンタゴニストでの治療に難治性である。更に他の実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体又はその断片である。更に別の実施態様では、抗VEGF抗体は配列番号1の変重鎖配列及び配列番号2の変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片若しくは変異体である。一実施態様において、IL-17抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。別の実施態様において、IL-17抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

40

【0013】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管

50

密度を減少させる。上記に考慮される方法の更なる実施態様において、腫瘍の血管新生の前記阻害は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において前記腫瘍の平均血管密度を少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも35%、又は少なくとも40%、又は少なくとも45%、又は少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%又は少なくとも99%減少させる。更に別の実施態様において、上記に考慮される方法において、前記平均血管密度は、前記腫瘍の全細胞面積に対する前記腫瘍のCD31陽性細胞の面積の平均を採用して測定される。

10

【0014】

更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に抗VEGF抗体又はその断片を投与することを含む。上記に考慮される方法の更なる実施態様において、抗VEGF抗体は配列番号1の可変重鎖配列及び配列番号2の可変軽鎖配列を含むベバシズマブ又はその断片である。更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む。更に別の実施態様において、本方法は、G-CSFアンタゴニストの有効量を投与することを更に含む。別の実施態様において、前記G-CSFアンタゴニストは抗G-CSF抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

20

【0015】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である。

【0016】

別の実施態様において、上記に考慮される方法は、前記IL-17アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中のCD11b+Gr1+細胞の数又は頻度を決定することにより、腫瘍血管新生の前記阻害の有効性をモニタリングすることを更に含む。

30

【0017】

一実施態様において、以前に血管内皮増殖因子(VEGF)アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体にIL-17アンタゴニストの有効量を投与することを含む腫瘍増殖を抑制する方法が意図される。別の実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニストは、抗IL-17抗体又はその断片、又は抗IL-17受容体抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、抗IL-17抗体又はその断片はIL-17A又はIL-17F又はIL-17A及びIL-17Fに特異的に結合する。更なる実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は前記VEGFアンタゴニストでの治療に難治性である。更に他の実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体又はその断片である。更に別の実施態様では、抗VEGF抗体は配列番号1の可変重鎖配列及び配列番号2の可変軽鎖配列を含むベバシズマブ又はその断片若しくは変異体である。一実施態様において、IL-17抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。別の実施態様において、IL-17抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

40

【0018】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管密度を減少させる。上記に考慮される方法の更なる実施態様において、腫瘍増殖の前記抑制は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されな

50

かったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において腫瘍体積を少なくとも5%、又は少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも35%、又は少なくとも40%、又は少なくとも45%、又は少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%又は少なくとも99%減少させる。別の実施態様において、腫瘍体積の前記減少は、コンピュータ断層撮影（CATスキャン）、磁気共鳴イメージング（MRI）、陽電子放出断層撮影（PET）又は単一光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）によって測定される。

10

【0019】

更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に抗VEGF抗体又はその断片を投与することを更に含む。上記に考慮される方法の別の実施態様において、抗VEGF抗体は、ペバシズマブ又はその断片である。更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む。更に別の実施態様において、本方法は、G-CSFアンタゴニストの有効量を投与することを更に含む。別の実施態様において、前記G-CSFアンタゴニストは抗G-CSF抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

20

【0020】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である。

【0021】

別の実施態様において、上記に考慮される方法は、前記IL-17アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中のCD11b+Gr1+細胞の数又は頻度を決定することにより、腫瘍増殖の前記抑制の有効性をモニタリングすることを更に含む。

【0022】

一実施態様において、以前に血管内皮増殖因子（VEGF）アンタゴニストで治療された腫瘍を有するヒト被験体にIL-17アンタゴニストの有効量を投与することを含む腫瘍治療の方法が意図される。別の実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニストは、抗IL-17抗体又はその断片、又は抗IL-17受容体抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、抗IL-17抗体又はその断片はIL-17A又はIL-17F又はIL-17A及びIL-17Fに特異的に結合する。更なる実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は前記VEGFアンタゴニストでの治療に難治性である。更に他の実施態様では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体又はその断片である。更に別の実施態様では、抗VEGF抗体は配列番号1の可変重鎖配列及び配列番号2の可変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片若しくは変異体である。一実施態様において、IL-17抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。別の実施態様において、IL-17抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

30

40

【0023】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して前記腫瘍の平均血管密度を減少させる。上記に考慮される方法の更なる実施態様において、前記腫瘍治療は、IL-17アンタゴニスト又はIL-17抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において腫瘍体積を少なくとも5%

50

、又は少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも35%、又は少なくとも40%、又は少なくとも45%、又は少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%又は少なくとも99%減少させる。別の実施態様において、腫瘍体積の前記減少は、コンピュータ断層撮影（CATスキャン）、磁気共鳴イメージング（MRI）、陽電子放出断層撮影（PET）又は単一光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）によって測定される。

【0024】

更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に抗VEGF抗体又はその断片を投与することを更に含む。上記に考慮される方法の更なる実施態様において、抗VEGF抗体は配列番号1の可変重鎖配列及び配列番号2の可変軽鎖配列を含むペバシズマブ又はその断片である。更に別の実施態様において、本方法は、前記ヒト被験体に化学療法または放射線療法を受けさせることを更に含む。更に別の実施態様において、本方法は、G-CSFアンタゴニストの有効量を投与することを更に含む。別の実施態様において、前記G-CSFアンタゴニストは抗G-CSF抗体又はその断片である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はモノクローナル抗体である。更に別の実施態様において、前記G-CSF抗体又はその断片はヒト、ヒト化又はキメラ抗体である。

【0025】

一実施態様において、上記に考慮される方法において、腫瘍は、結腸、直腸、肝臓、肺、前立腺、乳房又は卵巣である。

【0026】

別の実施態様において、上記に考慮される方法は、前記IL-17アンタゴニストの投与前に前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料又は末梢血試料の数または頻度に対して前記ヒト被験体から得られた腫瘍試料中又は末梢血試料中のCD11b+Gr1+細胞の数又は頻度を決定することにより、前記腫瘍治療の有効性をモニタリングすることを更に含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、培養物中の抗VEGF感受性腫瘍細胞（Tib6）に対する抗VEGF耐性腫瘍細胞（EL4）の分泌タンパク質のプロファイルを示す。図1Aは、IL-17は、インビトロで抗VEGF感受性（Tib6）腫瘍細胞に対して抗VEGF耐性（EL4）腫瘍細胞で見いだされた最も豊富な分泌因子であることを示している。図1Bは、抗VEGF難治性EL4細胞および正常皮膚繊維芽細胞（NSF）の共培養物中でIL-6およびG-CSFレベルが上昇していることを示している。

【図2】図2は、GF-P標識化EL4腫瘍細胞が72時間正常な皮膚繊維芽細胞（NSF）と共培養され、続いて線維芽細胞から腫瘍細胞がFACS単離され、qRT-PCRにより遺伝子発現の解析がなされたことを示す。図2AはG-CSF（Csfs3）誘導性発現を示し、図2BはIL-6を誘導性発現示し及び図2Cは、IL-17誘導性発現を示している（単一培養細胞に対して抗VEGF耐性EL4細胞株と共培養したとき正常線維芽細胞において観察された）。プリソート分析を、FACSソーティングにより導入された潜在的アーティファクトの調製のために実施した。

【図3】図3は、IL-17中和は、共培養のEL4腫瘍細胞によって誘導される、線維芽細胞におけるEL4誘導されたG-CSF発現を阻害することを示している。

【図4】図4A及びBは、対照抗体（抗ブタクサ、10mg/kgを腹腔内（IP）、週二回）又は抗VEGF（10mg/kg、IP、週二回）で処置されたC57/BL6WT及びIL-17rc-/-マウスにおけるEL4腫瘍の増殖を示す。データは平均値±SEMとして示される。*は、抗VEGF抗体で処置されたWT及びIL-17rc-/-動物におけるEL4腫瘍間の有意な相違（ $P < 0.0001$ ）を示している。

10

20

30

40

50

【図5】図5は、対照抗ブタクサ抗体（Rag, 10mg/kg）又は抗VEGF抗体（B20, 10mg/kg）のどちらかで処置されたEL4担持WT及びIL-17rc-/-マウスにおける図5A：mG-CSF、図5B：BV8、及び図5C：IL-17Aの血清レベルを示す。データは平均値±SDとして示される。

【図6】図6は、担腫瘍マウスから単離され、Gr1+/CD11b+抗体で染色され、FACSでソートされた全血細胞を示す。免疫抑制未熟骨髓細胞がGr1+/CD11b+二重陽性細胞として定義される。

【図7】図7は、図6におけるのと同じデータを示し、ここでGr1+/CD11b+二重陽性細胞の数は図7A：血液、図7B：脾臓及び図7C：腫瘍において定量化される。

* * p < 0.0005、* p < 0.05。

【図8】図8は、LPSの存在下または非存在下で一晩培養し、続いてBV8（図8A）などの血管新生促進遺伝子、及びS100A8（図8B）；MMP9（図8C）；及びS100A9（図8D）などの腫瘍促進遺伝子の発現のためのqRT-PCR分析を行った担腫瘍マウスの脾臓から単離したGr1+細胞を示している。

【図9】図9は、対照抗体（抗ブタクサ）又は抗VEGF抗体（クローンB20）で処置され、緑色で示される抗CD31（内皮細胞）、青色で示される抗 Desmond（壁細胞）、及び赤色で示される抗平滑筋アクチン（SMA）で免疫染色されたWT及びIL-17rcのKO動物由来のEL4腫瘍を示し、ここで陽性染色はこの腫瘍型における細動脈に対応する。

【図10】図10は、細胞の全面積に対するCD31陽性細胞の平均面積として表される免疫染色の定量化として、図9と同じデータを示す。少なくとも5つの異なるマウス/群からの全腫瘍切断面が定量化のために用いられた。* p < 0.05。エラーバーは±SEMとして表される。

【図11】図11は、パラクリンIL-17の機能がVEGF処置に感受性であるTib6細胞株を用いた抗VEGF治療に対する不応性に必要とされる。抗VEGFで処置されたTib6-新生腫瘍細胞株（n=2）（実線）及び安定してmIL-17Aを発現するTib6-6腫瘍株（Tib6-IL-17；n=4）（破線）の腫瘍体積（相対体積（%）をy軸）の変化を示す。データは平均値±SEMとして示される。

【図12】図12はC57BL/6 WTマウス（n=8）及びG-CSFR-/-マウス（n=8）におけるEL4腫瘍の増殖曲線を示す。パネルAは、腫瘍接種の24時間後に開始した抗VEGFまたは対照抗ブタクサ抗体による処置を示す。G-CSFR-/-宿主に対して担腫瘍WTにおいて、循環に入り、腫瘍を浸潤するCD11b+Gr1+細胞のレベルの定量をフローサイトメトリー分析（パネルB）によって測定した。データは平均値±SEMとして表され、*はスチューデントのt検定によりp < 0.05を示す。

【図13】図13は、TH17細胞は腫瘍微小環境内におけるCD11b+Gr1+細胞の補充及び活性化を介して抗VEGF処置に対する耐性を媒介することを示す。パネルAは、WT及びIL-17rc-/-マウスにおいて対照（-RW）および抗VEGF抗体の投与後に時間に対する同系皮下ルイス肺癌（LLC）の腫瘍体積を示す。パネルBは、対照、IL-17A（-IL17A）に対する中和抗体、抗VEGF、又は-IL17A及び併用した抗VEGFの投与後の同系CT26腫瘍体積を示す。全データは平均値±SEMとして表され、*は両側スチューデントのt検定によりp < 0.05を示す。

【図14】図14は、染色後フローサイトメトリーによる定量後にWT及びIL-17rc-/-（KO）で増殖するLLC腫瘍からのCD4+（パネルA）及びCD4+IL-17A+IL-22+産生腫瘍浸潤リンパ球（TIL）（パネルB）の割合を示す。

【図15】図15のパネルAは実施例8に記載したようにCD4+及びCD8+TILの定量化を示す。CD3+集団のうちCD4+IL-17+IL-22+の割合はフローサイトメトリーにより定量された（パネルB）。-RW及び-VEGFの投与後のWT及びKO宿主中のIL-17Aの腫瘍レベルはELISAにより測定された（パネルC）。全データは平均値±SEMとして表され、*は両側スチューデントのt検定によりp < 0.05を示す。

10

20

30

40

50

【図 16】図 16 は、処置後の L L C 腫瘍内の G - C S F のレベルは E L I S A により（パネル A）、続いて腫瘍浸潤性 C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の数により（パネル B）測定され、B v 8 のレベルは E L I S A により測定された（パネル C）ことを示す。全データは平均値 \pm S E M として表され、* は両側スチューデントの t 検定により $p < 0.05$ を示す。

【図 17】図 17 は、フローサイトメトリーにより定量した腫瘍関連内皮細胞の数を示す。群あたり $n = 5 - 8$ 。全データは平均値 \pm S E M として表され、* * は両側スチューデントの t 検定により $p < 0.005$ を示す。

【0028】

本発明の詳細な記述

本発明を詳細に説明する前に、本発明は、特定の組成物または生物系に限定されるものではなく、当然に変わりうると理解されるべきである。更に当然のことながら、本明細書で使用される用語は、特定の実施態様のみを説明する目的のためであり、限定することを意図するものではない。この明細書及び添付される特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、本内容が明確に指示しない限り、複数の参照対象を含む。従って、例えば、「分子」への言及は、必要に応じて 2 つ以上のそのような分子の組み合わせなどを含む。

【0029】

A. 定義

通常、ポリペプチド「変異体」（すなわち本明細書において開示される任意のポリペプチドの変異体）は、対応する天然配列のポリペプチドと少なくともおよそ 80 % のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。このような変異体は、例えば、ポリペプチドの N - および / または C 末端で、一又は複数のアミノ酸（天然に生じるアミノ酸および / または天然に生じないアミノ酸）残基が付加又は欠失しているポリペプチドを含む。通常、変異体は、天然配列のポリペプチドと少なくともおよそ 80 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ 90 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ 95 % 以上のアミノ酸配列同一性を有する。また、変異体は、一般的に生物学上活性な天然配列のポリペプチド断片（例えば部分配列、切断配列など）を含む。

【0030】

本明細書での「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとして、選択した配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、A L I G I N - 2 又は M e g a l i g n（D N A S T A R）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較プログラム A L I G N - 2 を使用することによって以下に記載のように得られる。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、米国著作権事務所、ワシントン D . C . , 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 の下で登録され、ジェネンテク社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公に入手可能である。A L I G N - 2 プログラムは、デジタル U N I X の V 4 . 0 D など、U N I X オペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、A L I G N - 2 プログラムによって設定され変動しない。

【0031】

ここでの目的のために、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する %アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列 B と、又は

10

20

30

40

50

それに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる)は次のように計算される:

分率 X/Y の 100 倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラム A L I G N - 2 により、 A と B のそのプログラムのアラインメントにおいて完全に一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、 A の B に対する%アミノ酸配列同一性は、 B の A に対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0032】

本明細書中で用いられる「アンタゴニスト」なる用語は、リガンドの場合には一又は複数のレセプターへの結合、又はレセプターの場合には一又は複数のリガンドへの結合を含む、本発明のタンパク質の活性を中和、遮断(ブロック)、阻害、抑止、低減又は干渉することができる分子を指す。アンタゴニストには、抗体及びその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖類、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理学的薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳制御配列などが含まれる。また、アンタゴニストには、本発明のタンパク質の小分子インヒビター、及び融合タンパク質、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結合を隔離するレセプター分子及び誘導体、タンパク質のアンタゴニスト変異体、本発明のタンパク質に対するアンチセンス分子、RNA アプタマー、及び本発明のタンパク質に対するリボザイムが含まれる。

【0033】

「遮断(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低減させるものである。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、実質的に又は完全に阻害する。

【0034】

本明細書で使用される「腫瘍血管新生を阻害する」なる用語は、新規血管形成を誘導する腫瘍の能力の阻害、又は既存の血管系を補充する腫瘍の能力を阻害することを指す。

【0035】

本明細書で用いられる「腫瘍増殖を抑制する」なる用語は、治療後に更に増殖せず及び/又は転移しない腫瘍を指す。本明細書に記載されるように、腫瘍血管新生が阻害されるときに腫瘍増殖を抑制することができる。本明細書で使用される場合、腫瘍増殖の前記抑制は、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、前記ヒト被験体において腫瘍体積を少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少なくとも 60 %、又は少なくとも 65 %、又は少なくとも 70 %、又は少なくとも 75 %、又は少なくとも 80 %、又は少なくとも 85 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 減少させる。更に、本明細書で使用される場合、腫瘍体積の前記減少は、全て当該技術分野でよく知られた技術である、コンピュータ断層撮影(CAT スキャン)、磁気共鳴イメージング(MRI)、陽電子放出断層撮影(PET)又は単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)によって測定される。

【0036】

「腫瘍の平均血管密度が減少する」なる用語は、腫瘍の増殖をサポートする腫瘍脈管構造の量や濃度を特定の測定可能な量だけ阻害又は抑制することを意味し、血管密度の低下がアンタゴニストによってもたらされる場合、IL - 17 アンタゴニスト又は IL - 17 抗体又はその断片の有効量を投与されなかったヒト被験体における腫瘍と比較して、少なくとも 5 %、又は少なくとも 10 %、又は少なくとも 15 %、又は少なくとも 20 %、又は少なくとも 25 %、又は少なくとも 30 %、又は少なくとも 35 %、又は少なくとも 40 %、又は少なくとも 45 %、又は少なくとも 50 %、又は少なくとも 55 %、又は少な

くとも60%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%又は少なくとも99%だけ減少する。本明細書で使用される場合、「平均血管密度」は、前記腫瘍の全細胞面積に対する前記腫瘍のCD31陽性細胞の面積の平均を採用して測定される。

【0037】

本明細書中で用いられる「VEGF」なる用語は天然配列の血管内皮性増殖因子及びその変異体を指す。

【0038】

本明細書中で用いる「VEGF」又は「VEGF-A」なる用語は、Leung等 Science, 246:1306 (1989)、Houck等 Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)、及びRobinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5): 853-865 (2001)によって記載されているように、天然配列の165アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子と、関連した121-、145-、183-、189-、及び206-アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子、並びにそれらの天然に生じる対立遺伝子型及びプロセシング型、並びにその変異体を意味する。VEGF-Aは、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F及びPLGFを含む遺伝子ファミリーの一部である。VEGF-Aは、VEGFR-1(Flt-1)及びVEGFR-2(Flk-1/KDR)の2つの高親和性レセプターチロシンキナーゼに主に結合する。この後者はVEGF-Aの血管内皮細胞増殖促進シグナルの主な伝達物質である。また、「VEGF」又は「VEGF-A」なる用語は、マウス、ラット又は霊長類などの非ヒト動物腫瘍由来のVEGFも意味する。時には特定の種由来のVEGFは、ヒトVEGFはhVEGF、マウスVEGFはmVEGFなどの用語で表される。また、「VEGF」なる用語は、165アミノ酸のヒト血管内皮細胞増殖因子のアミノ酸8~109、又は1~109を含むポリペプチドの切断型ないしはその断片を意味する。そのようなVEGF型を指すときは、本明細書では、例えば、「VEGF(8-109)」、「VEGF(1-109)」又は「VEGF165」と表す。「切断した(切断型の)」天然のVEGFのアミノ酸位置は、天然のVEGF配列に示される数で示す。例えば、切断型の天然VEGFのアミノ酸位置17(メチオニン)は、天然のVEGF中の位置17(メチオニン)でもある。切断型の天然VEGFは天然配列のVEGFに匹敵するKDR及びFlt-1レセプター結合親和性を有する。

【0039】

「VEGFアンタゴニスト」は、一又は複数のVEGFレセプターへの結合を含む、天然配列VEGFの活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は干渉することができる分子(ペプチジル又は非ペプチジル)を指す。VEGFアンタゴニストには、抗VEGF抗体及びその抗原結合性断片、VEGFに特異的に結合することによって一又は複数のレセプターへの結合を隔離するレセプター分子及び誘導体(例えば、可溶性VEGFレセプタータンパク質、又はそのVEGF結合断片、又はキメラVEGFレセプタータンパク質)、VEGFRチロシンキナーゼの小分子インヒビターなどの抗VEGFレセプター抗体及びVEGFレセプターアンタゴニスト、及び融合タンパク質、例として、VEGF-Trap(Regeneron)、VEGF₁₂₁-ゲロニン(Peregrine)が含まれる。また、VEGFアンタゴニストには、VEGFのアンタゴニスト、VEGFに対するアンチセンス分子、RNAアプタマー、及びVEGFないしはVEGFレセプターに対するリボザイムが含まれる。さらに、本発明の方法に有用なVEGFアンタゴニストには、VEGFを特異的に結合するペプチジルないしは非ペプチジル化合物、例えば、抗VEGF抗体ないしその抗原結合性断片、ポリペプチド、又はVEGFに特異的に結合する抗体変異体又はその断片；VEGFポリペプチドをコードする核酸分子の少なくとも断片に相補性があるアンチセンス核酸塩基のオリゴマー；VEGFポリペプチドをコードする核酸分子の少なくとも断片に相補性がある小RNA；VEGFを標的とするリボザイム；VEGFに対するペプチボディ；及びVEGFアプタマーが含まれる。一実施態様では、VEGFアンタゴニストは、VEGFの発現レベル又は生物学的活性を少なくとも10%、20%

、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上低減するか、又は阻害する。他の実施態様では、VEGFアンタゴニストによって阻害されるVEGFは、VEGF(8-109)、VEGF(1-109)又はVEGF₁₆₅である。

【0040】

「抗VEGF抗体」又は「VEGFに結合する抗体」なる用語は、抗体がVEGFを標的とした診断上の薬剤及び/又は治療上の薬剤として有用であるために十分な親和性と特異性を有してVEGFに結合することができる抗体を指す。例えば、本発明の抗VEGF抗体は、VEGF活性が関与する疾患及び症状を標的とし、干渉する際の治療上の薬剤として有用でありうる。例として米国特許第6582959号、同第6703020号；国際公開第98/45332号；国際公開第96/30046号；国際公開第94/10202号、国際公開第2005/044853号；；欧州特許第0666868号B1；米国特許公開第20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、同第20050112126号、同第20050186208号及び同第20050112126号；Popkov等、Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；及び国際公開第2005012359号を参照のこと。選択した抗体は通常、VEGFに対して十分に強い結合親和性を有し、例えば、抗体は100 nM - 1 pMの間のK_d値でhVEGFを結合しうる。抗体親和性は、例えば、表面プラスモン共鳴をベースとしたアッセイ（PCT出願公開番号WO2005/012359に記載のあるBIACoreアッセイなど）；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）；及び、競合アッセイ（例えばRIAのもの）によって決定されうる。例えば治療としての有効性を評価するために、抗体を他の生物学的な活性アッセイに用いてもよい。このようなアッセイは当分野で公知であり、標的抗原と抗体の使用目的に依存する。例として、HUVEC阻害アッセイ；腫瘍細胞増殖阻害アッセイ（例えば国際公開第89/06692号に記載のもの）；抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体媒介性細胞障害（CDC）アッセイ（米国特許第5500362号）；及び、アゴニスト活性又は造血アッセイ（国際公開第95/27062号を参照）などがある。抗VEGF抗体は通常、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D又はVEGF-Eなどの他のVEGFホモログにも、PLGF、PDGF又はbFGFなどの他の増殖因子にも結合しないだろう。一実施態様では、抗VEGF抗体には、ハイブリドーマATCC HB 10709によって産生されるモノクローナル抗VEGF抗体A4.6.1と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体；Presta等 (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599に従って産生される組み換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体であり、限定するものではないが「ベバシズマブ(BV)」とも「rhumaVEGF」又は「AVASTIN(登録商標)」としても知られる抗体が含まれる。ベバシズマブは、ヒトVEGFのそのレセプターへの結合をブロックするマウスの抗hVEGFモノクローナル抗体A4.6.1からの変異したヒトのIgG1フレームワーク領域と抗原結合性相補性決定領域を含む。フレームワーク領域のほとんどを含め、ベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ93%は、ヒトのIgG1に由来し、配列のおよそ7%はマウスの抗体A4.6.1に由来する。ベバシズマブは、およそ149000のダルトンの分子量を有し、グリコシル化されている。ベバシズマブ及び他のヒト化抗VEGF抗体は、2005年2月26日に発行の米国特許第6884879号にさらに記載されている。

【0041】

本明細書で提供される方法、用途及び組成物の何れかにおいて、抗VEGF抗体は、VEGF特異的アンタゴニスト、例えば本明細書に記載されるVEGF受容体分子またはキメラVEGF受容体分子で置換されていてもよい。本明細書で提供される方法、用途及び組成物のある実施態様において、抗VEGF抗体はベバシズマブである。抗VEGF抗体、又はその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、完全ヒト抗体、又はヒト化抗体であり得る。本発明の方法において有用な抗体の例は、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、G6抗体、B20抗体及びその断片が含まれる。ある実施態様において、抗VEGF抗体は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有する。

10

20

30

40

50

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F T N Y G M N W V R
Q A P G K G L E W V G W
I N T Y T G E P T Y A A D F K R R F T F S L D T S K S T A Y L Q M N S L R A
E D T A V Y Y C A K Y P
H Y Y G S S H W Y F D V W G Q G T L V T V S S (配列番号1)

及び以下のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域:

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q
K P G K A P K V L I Y F
T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C
Q Q Y S T V P W T F G Q
G T K V E I K R (配列番号2)。

10

【0042】

幾つかの実施態様において、抗VEGF抗体は、以下のアミノ酸配列: G Y T F T N Y G M N (配列番号3)を含むCDRH1、以下のアミノ酸配列: W I N T Y T G E P T Y A A D F K R (配列番号4)を含むCDRH2、以下のアミノ酸配列: Y P H Y Y G S S H W Y F D V (配列番号5)を含むCDRH3、以下のアミノ酸配列: S A S Q D I S N Y L N (配列番号6)を含むCDRL1、以下のアミノ酸配列: F T S S L H S (配列番号7)を含むCDRL2、及び以下のアミノ酸配列: Q Q Y S T V P W T (配列番号8)を含むCDRL3を含む。

20

【0043】

更なる好ましい抗体は、PCT出願公開番号WO2005/012359に記載されているように、G6又はB20シリーズの抗体(たとえば、G6-23、G6-31、B20-4.1)が含まれる。更に好ましい抗体については、米国特許第7,060,269号、第6,582,959号、第6,703,020号;第6,054,297号;国際公開第98/45332号;国際公開第96/30046号;国際公開第94/10202号;欧州特許出願公開第0666868B1号;米国特許出願公開第2006009360号、第20050186208号、第20030206899号、第20030190317号、第20030203409号、及び第20050112126号;及びPopkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)を参照。

30

【0044】

本発明に係る「G6シリーズ抗体」は、PCT公開番号WO2005/012359の、図7、図24~26、及び34~35の何れか一項に記載のG6抗体又はG6由来抗体の配列に由来する抗VEGF抗体であり、その全開示は、参照により本明細書に援用される。また、開示全体が参照により本明細書に援用されるPCT公開番号WO2005/044853も参照のこと。一実施態様において、G6シリーズ抗体は、残基F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83およびQ89を含むヒトVEGF上の機能的なエピトープに結合する。

【0045】

本発明に係る「B20シリーズ抗体」は、PCT公開番号WO2005/012359の、図27~29の何れか一項に記載のB20抗体又はB20由来抗体の配列に由来する抗VEGF抗体であり、その全開示は、参照により本明細書に援用される。また、PCT公開番号WO2005/044853および米国特許出願第60/991,302を参照いただき、これらの特許出願の内容は参照により本明細書に組み込まれる。一実施態様において、B20シリーズ抗体は、残基F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103、及びC104を含むヒトVEGF上の機能的なエピトープに結合する。

40

【0046】

「造血幹/前駆細胞」又は「未分化造血細胞」は、より関係しているか、又は成熟した血液細胞種を形成するように分化することができるものである。「リンパ系の血液細胞系統」は、リンパ球(B細胞又はT細胞)を形成するように分化することができるそれらの

50

造血前駆細胞である。同様に「リンパ球新生」はリンパ球の形成である。「赤血球血液細胞系統」は、赤血球(erythrocytes、red blood cells)を形成するように分化することができるそれらの造血前駆細胞であり、「赤血球新生」は赤血球の形成である。

【0047】

本明細書中の目的のために、「骨髓血液細胞系統」なる表現は、上記のリンパ系及び赤血球血液細胞系統以外の、すべての造血始原細胞を包含し、「骨髓造血」は血液細胞(リンパ球及び赤血球以外の)の形成を伴う。

【0048】

骨髓細胞群は、Gr1+/CD11b+ (又はCD11b+Gr1+)又はGr1+/Mac-1+である骨髓免疫細胞が豊富でありうる。これらの細胞は、マクロファージ系統の骨髓性細胞用のマーカーであるCD11bと、顆粒球用のマーカーであるGr1を発現する。Gr1+/CD11b+は、例えばGr1+に対する抗体による免疫吸着パニングによって選択されてもよい。

10

【0049】

「骨髓系細胞減少薬剤」又は「骨髓性細胞減少剤」は、骨髓性細胞群を減少させるか又は除去する薬剤を指す。一般的に、骨髓性細胞減少剤は、骨髓性細胞、CD11b+Gr1+、単球、マクロファージなどを減少させるか又は除去する。骨髓性細胞減少薬剤の例には、限定するものではないが、Gr1+アンタゴニスト、CD11bアンタゴニスト、CD18アンタゴニスト、エラスターゼインヒビター、MCP-1アンタゴニスト、MIP-1アンタゴニストなどが含まれる。

20

【0050】

本明細書中で用いられる「Gr1アンタゴニスト」なる用語は、Gr1に結合して、Gr1の生物学的な活性を阻害するか又は実質的に減少させる分子を指す。Gr1アンタゴニストの非限定的な例には、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖類、核酸、バイオ有機分子、ペプチド模倣薬、製薬的薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳制御配列などが含まれる。本発明の一実施態様では、Gr1アンタゴニストは、抗体、特にヒトのGr1を結合する抗Gr1抗体である。

【0051】

本明細書中で用いられる「CD11bアンタゴニスト」なる用語は、CD11bに結合して、CD11bの生物学的活性を阻害するか又は実質的に減少させる分子を指す。通常、アンタゴニストは、細胞表面にCD11bサブユニットを発現する細胞(例えば未成熟骨髓系細胞)が持つ内皮へ結合する能力を(部分的にないしは完全に)ブロックするであろう。CD11bアンタゴニストの非限定的な例には、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖類、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、製薬的薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳制御配列などが含まれる。本発明の一実施態様では、CD11bアンタゴニストは、抗体、特にヒトのCD11bを結合する抗CD11b抗体である。典型的なCD11b抗体には、MY904(米国特許第4840793号); 1B6c(Zhang等, Brain Research 698:79-85 (1995)を参照); CBRN1/5及びCBRM1/19(国際公開第94/08620号)が含まれる。

30

【0052】

「URCGP」は、抗VEGF耐性腫瘍のCD11b+Gr+1細胞において上方制御されるタンパク質を指す。URCGPには、限定するものではないが、好中球エラスターゼ、CD14、expi、IL-13R、LDLR、TLR-1、RLF、Endo-Lip、SOCS13、FGF13、IL-4R、IL-11R、IL-1RII、IFN-TM1、TNFRSF18、WNT5A、分泌キャリア膜1、HSP86、EGFR、EphRB2、GPCR25、HGF、アンギオポエチン様-6、Eph-RA7、セマフォリンV1b、ニューロトロフィン5、クローディン-18、MDC15、ECM及びADAMTS7Bが含まれる。ある実施態様では、URCGPは、IL-13R、TLR-1、Endo-Lip、FGF13及び/又はIL-4Rを指す。

40

【0053】

50

「DRCGP」は、抗VEGF耐性腫瘍のCD11b+Gr1+細胞において下方制御されるタンパク質を指す。DRCGPには、限定するものではないが、THBS1、Crea7、アクアポリン-1、溶質キャリアファミリタンパク質(SCF38)、アポリポタンパクE(APOE)、脂肪酸結合タンパク質(FABP)、NCAM-140、フィブロネクチンIII型、WIP、CD74、ICAM-2、Jagged1、Itga4、ITGB7、TGF-BII-R、TGFbIEP、Smad4、BMPR1A、CD83、Dectin-1、CD48、E-セレクトイン、IL-15、サイトカインシグナル伝達4のサプレッサー、Cytor4及びCX3CR1が含まれる。ある実施態様では、DRCGPはTHBS1及び/又はCrea7を指す。

【0054】

10

「URRTP」は、抗VEGF耐性腫瘍において上方制御されるタンパク質を指す。URRTPには、限定するものではないが、Notch2、DMD8、MCP-1、ITGB7、G-CSF、IL-8R、MIP2、MSCA、GM-CSF、IL-1R、Meg-SF、HSP1A、IL-1R、G-CSFR、IGF2、HSP9A、FGF18、ELM1、Ledgfa、スカベンジャーレセプタータイプA、マクロファージC-タイプレクチン、Pigr3、マクロファージSRT-1、Gプロテイン-結合レセプター、ScyA7、IL-1R2、IL-1誘導型タンパク質、IL-1、及びILIX前駆物質が含まれる。ある実施態様では、URRTPはMSCA、MIP2、IL-8R及び/又はG-CSFを指す。

【0055】

20

「DRRTP」は、抗VEGF耐性腫瘍において下方制御されるタンパク質を指す。URRTPには、限定するものではないが、IL10-R2、Erb-2.1、カベオリン3、Semcap3、INTG4、THBSP-4、ErbB3、JAM、Eng、JAM、Eng、JAM-2、Pecam1、Tlr3、TGF-B、FIZZ1、Wfs1、TP14A、EMAP、SULF-2、細胞外基質2、CTFG、TFPI、XCP2、Ramp2、ROR-、エフリンB1、SPARC-様1及びセマフォリンAが含まれる。ある実施態様では、DRRTPはIL10-R2、THBSP-4及び/又はJAM-2を指す。

【0056】

「生物学的試料」なる用語は、任意の動物からの身体試料を指すが、好ましくは哺乳動物からのもの、より好ましくはヒトからのものである。このような試料は、血液、血清、血漿、骨髄、硝子体体液、リンパ体液、関節液、濾胞液、精液、羊水、乳汁、全血液、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、汗、粘液および組織培養液のような体液、並びにホモジナイズした組織のような組織抽出物、及び細胞抽出物を含む。本明細書において好適な生体試料は、血清、血漿、尿又は骨髄試料である。

30

【0057】

「抗体」という用語は最も広義に使用され、モノクローナル抗体(完全長又は無傷のモノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多価抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片(以下を参照)を具体的に包含する。

40

【0058】

他に示されない限り、「多価抗体」なる表現は、3つ以上の抗原結合部位を含む抗体を指すために本明細書を通して使用される。多価抗体は、3つ以上の抗原結合部位を有するように典型的に操作されており、一般的に天然配列のIgM又はIgA抗体ではない。

【0059】

「抗体断片」は、一般にはインタクトな抗体の抗原結合部位を含み、よって抗原に結合する能力を保持しているインタクトな抗体の一部のみを含む。本定本定義に包含される抗体断片の例には、(i)VL、CL、VH及びCH1ドメインを持つFab断片；(ii)CH1ドメインのC末端に一又は複数のシステイン残基を持つFab断片であるFab'断片；(iii)VH及びCH1ドメインを持つFd断片；(iv)CH1ドメインの

50

C末端に一又は複数のシステイン残基とVH及びCH1ドメインを持つFd'断片；(v)抗体の単一アームのVL及びVHドメインを持つFv断片；(vii)VHドメインからなるdAb断片(Ward等, Nature 341, 544-546 (1989))；(viii)単離されたCDR領域；(ix)ヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって結合された2つのFab'断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(x)単鎖抗体分子(例えば単鎖Fv；scFv)(Bird等, Science 242:423-426 (1988)；及びHuston等, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(xi)同一のポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む、2つの抗原結合部位を持つ「ダイアボディー(dibodies)」(例えば、欧州特許公報第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)；(xii)相補的軽鎖ポリペプチドと共に一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む「線形抗体」(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)；及び米国特許第5641870号)が含まれる。

10

【0060】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を一般的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。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、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作ることができ、それらの技術には例えばハイブリドーマ法(例えば、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)；Hongo等, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988)；Hammerling等: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ法(例えば、Clarkson等, Nature, 352:624-628 (1991)；Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)；Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)；Lee等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)；及びLee等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全部を有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生する技術(例えば、国際公開第1998/24893号；国際公開第1996/34096号；国際公開第1996/33735号；国際公開第1991/10741号；Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等, Nature, 362:255-258 (1993)；Bruggemann等, Year in Immuno., 7:33 (1993)；米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；及び同第5,661,016号；Marks等, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)；Longerg等, Nature, 368:856-859 (1994)；Morrison, Nature, 368:812-813 (1994)；Fishwild等, Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996)；及びLongerg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995

20

30

40

50

))が含まれる。

【0061】

本発明のモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種に由来する又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同であるが、その（それらの）鎖の残部は別の種に由来する又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそのような抗体の断片（但し、それらが所望の生物学的活性を示すことを条件とする）であり得る（米国特許第4816567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984)）。

【0062】

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配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び性能を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などのヒト以外の種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非・ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体はレシピエント抗体又はドナー抗体において見いだされない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに改良するために作成される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、超可変ループの全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれをも含むであろう。更なる詳細については、Jones et al., Nature, 321:522-525(1986)；Reichmann et al., Nature, 332:323-329(1988)；および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)を参照。また、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)；及び米国特許第6,982,321号及び同第7,087,409号も参照。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001)も参照。抗原刺激にตอบสนองして抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無能になっているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによってヒト抗体を調製することができる（例として、XENOMOUSETM技術に関する米国特許第6075181号及び同第6150584号を参照）。また、例えば、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術によって生成したヒト抗体に関するLi等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)も参照のこと。

【0063】

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)及びLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)に記載されている。

【0064】

ヒト抗体は、抗原チャレンジにตอบสนองして、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSETM技術を記載している、米国特許第6,075,181号及び6,150,58

10

20

30

40

50

4号；HUMAB（登録商標）技術を記載している米国特許第5,770,429号；K-M MOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第7,041,870号及び、VELOCIMOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号）も参照のこと。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

【0065】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)； Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及びBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)を参照）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している）及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している）に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）もまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)に記載される。

10

20

【0066】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。

【0067】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域はFRによって極く近傍と一緒に保持され、他の鎖からの高頻度可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

30

【0068】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、VH（H1、H2、H3）に3つ、及びVL（L1、L2、L3）に3つの6つのHVRを含む。HVRは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」（CDR）由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び/又は抗原認識に関与している。典型的な超可変ループはアミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）、及び96-101（H3）で生じる。（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。典型的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24-34、L2の50-56、L3の89-97、H1の31-35B、H2の50

40

50

- 65、及びH3の95 - 102で生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。VHのCDR1の例外を除いて、CDRは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「SDR」をも含む。SDRは、略称(abbreviated-)CDR、又はa-CDRと呼ばれる、CDRの領域内に含まれている。典型的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3)は、アミノ酸残基L1の31-34、L2の50-55、L3の89-96、H1の31-35B、H2の50-58、及びH3の95-102で生じる。(Almagro and Fransson, Front.Biosci.13:1619-1633 (2008)を参照)。特に断らない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、上掲のKabatらに従い、本明細書において番号が付けられる。多数のHVRの描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, 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している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVRは、カバットHVRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford Molecular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」HVRは、利用できる複合体結晶構造の解析に基づく。これらのHVRの各々からの残基は以下の表1に記される。

表1 - Kabat, AbM及びChothiaに準じた残基の比較

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 番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0069】

HVRは、次のような「拡大HVR」を含むことができる：VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)。可変ドメイン残基には、これら各々を定義するために、Kabat等、上掲に従って番号を付した。

【0070】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRのドメインで構成される：FR1、FR2、FR3、及びFR4。従って、HVR及びFR配列は一般にVH(又はVL)の以下の配列に現れる：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H

3 (L 3) - F R 4。

【 0 0 7 1 】

「カバット (K a b a t) による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、上掲のカバット等の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインの F R 又は H V R 内の短縮又は挿入に相当する 2、3 のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖 F R 残基 8 2 の後に挿入された残基 (例えばカバットによる残基 8 2 a、8 2 b 及び 8 2 c など) と、H 2 の残基 5 2 の後に単一アミノ酸の挿入 (K a b a t による残基 5 2 a) を含んでもよい。残基の K a b a t 番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

10

【 0 0 7 2 】

本明細書及び特許請求の範囲すべてにわたって、一般的に、可変ドメインの残基を指す場合にはカバット番号付けシステムを用いる (およそ、軽鎖の残基 1 - 1 0 7 と重鎖の残基 1 - 1 1 3) (例として、Kabat 等, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。一般的に、免疫グロブリン重鎖定常領域内の残基を指す場合には、「E U 番号付けシステム」又は「E U インデックス」を用いる (E U インデックスはKabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において報告されており、出典明記によって本明細書中に特別に組み込まれる)。本明細書中で特に述べない限り、抗体の可変ドメイン内の残基の数の参照は、カバット番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する。本明細書中で特に述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基の数の参照は、E U 番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する (例として、米国特許仮出願第 6 0 / 6 4 0 3 2 3 号、E U 番号付けについての図を参照)。

20

【 0 0 7 3 】

免疫グロブリンの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体 (イムノグロブリン) は異なるクラスが割り当てられる。イム免疫グロブリンには 5 つの主なクラスがある : I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M、更にそれらは、I g G 1 (非 A 及び A アロタイプを含む)、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、及び I g A 2 等のサブクラス (アイソタイプ) に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、一般に、例えば Abbas 等 Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000) に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質ないしペプチドとの共有的なしは非共有的な結合によって形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

30

【 0 0 7 4 】

任意の脊椎動物種からの抗体 (イムノグロブリン) の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) 及びラムダ (λ) と呼ばれる 2 つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

40

【 0 0 7 5 】

「F c 領域」なる用語は、インタクト抗体のパパイン消化によって生成されうる免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するために使用される。F c 領域は天然配列 F c 領域又は変異形 F c 領域であってもよい。免疫グロブリン重鎖の F c 領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒト I g G 重鎖 F c 領域はおよそ C y s 2 2 6 の位置又はおよそ P r o 2 3 0 からの位置のアミノ酸残基から F c 領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。F c 領域の C 末端リジン (E U 番号付けシステムによれば残基 4 4 7) は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべての

50

K 4 4 7 残基が除去された抗体群、K 4 4 7 残基が除去されていない抗体群、及び K 4 4 7 残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。免疫グロブリンの F c 領域は一般に、C H 2 ドメインと C H 3 ドメインの 2 つの定常ドメインを含み、場合によって C H 4 ドメインを含む。

【 0 0 7 6 】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記によって本明細書中に特別に援用される上掲の K a b a t 等の E U インデックスのものである。「K a b a t の E U インデックス」はヒト I g G 1 E U 抗体の残基番号を指す。

【 0 0 7 7 】

本明細書中の「F c 領域鎖」は、F c 領域の 2 つのポリペプチド鎖の 1 つを意味する。

【 0 0 7 8 】

ヒト I g G F c 領域の「C H 2 ドメイン」(「C g 2」ドメインとも呼ばれる)は、通常、約 2 3 1 位のアミノ酸残基から約 3 4 0 位のアミノ酸残基まで延びている。C H 2 ドメインは、別のドメインと親密な対にならないという点で独特である。代わりに、2 つの N 結合分岐炭水化物鎖が、無傷の天然 I g G 分子の 2 つの C H 2 ドメインの間に挿入される。炭水化物はドメイン - ドメイン対の代替物を提供し、C H 2 ドメインの安定化を助けることができると推測される。Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)。ここで、C H 2 ドメインは天然配列の C H 2 ドメイン又は変異体 C H 2 ドメインとすることができる。

【 0 0 7 9 】

「C H 3 ドメイン」は、F c 領域における C 末端から C H 2 ドメインまでの範囲(つまり、I g G の約 3 4 1 位のアミノ酸から約 4 4 7 位のアミノ酸)を含む。ここでは、C H 3 領域は、天然配列の C H 3 ドメインか、又は変異体 C H 3 ドメイン(例えば、その一鎖に「突出部(protoberance)」が導入され、それに対応して他の鎖に「空洞」が導入された C H 3 ドメイン: 出典明記によって特別に本明細書中に援用される米国特許第 5 8 2 1 3 3 3 号参照)とすることができる。このような変異体 C H 3 ドメインを使用して本明細書に開示する多重特異性(例えば二重特異性)抗体をつくることができる。

【 0 0 8 0 】

「ヒンジ領域」は、通常、ヒト I g G 1 の約 G l u 2 1 6 又は約 C y s 2 2 6 から約 P r o 2 3 0 まで延びていると定義される(Burton, Molec. Immunol.22:161-206, 1985)。他の I g G アイソタイプのヒンジ領域は、同じ位置に内部重鎖 S - S 結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することにより I g G 1 と整列させることができる。本明細書のヒンジ領域は、天然配列のヒンジ領域か、又は変異体ヒンジ領域とすることができる。変異体ヒンジ領域の 2 つのポリペプチド鎖は、通常、1 つのポリペプチド鎖につき少なくとも 1 つのシステイン残基を保持しており、よって 2 つの変異体ヒンジ領域のポリペプチド鎖は 2 つの鎖の間にジスルフィド結合を形成することができる。本発明の好ましいヒンジ領域は、天然配列のヒトヒンジ領域、例えば天然配列のヒト I g G 1 ヒンジ領域である。

【 0 0 8 1 】

「機能的 F c 領域」は、天然配列 F c 領域の少なくとも 1 つの「作動体機能」を有する。例示的「エフェクター機能」には、C 1 q 結合、補体依存性細胞障害作用(C D C)、F c レセプター結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(A D C C)、食作用、細胞表面レセプター(例えば B 細胞レセプター; B C R)の下方制御などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、通常、F c 領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、そのような抗体のエフェクター機能を評価するための当技術分野で既知の様々なアッセイを使用して評価される。

【 0 0 8 2 】

「天然配列の F c 領域」は、天然に見出される F c 領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒト F c 領域は、天然配列のヒト I g G 1 F c 領域(非 A - 及び A - アロタイプ); 天然配列のヒト I g G 2 F c 領域; 天然配列のヒト I g G 3 F

10

20

30

40

50

c 領域；及び天然配列のヒト I g G 4 F c 領域；並びに、これらの自然に生じる変異体が含まれる。

【0083】

「インタクトな」抗体は、抗原 - 結合可変領域、並びに軽鎖定常ドメイン (C_L) 及び重鎖定常ドメイン、C H₁、C H₂ 及び C H₃ を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン (例えば、ヒト天然配列定常ドメイン) 又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、インタクトな抗体は、一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0084】

「親抗体」又は「野生型」抗体は、本明細書中で開示する抗体変異体と比較して一又は複数のアミノ酸配列の変更が無いアミノ酸配列を含む抗体である。ゆえに、一般に親抗体は、本明細書中で開示する抗体変異体の対応する高頻度可変領域のアミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なる少なくとも一の高頻度可変領域を有する。親抗体は、天然の配列 (すなわち、天然に生じる) 抗体 (天然に生じる対立変異体を含む)、又は天然に生じる配列の既存のアミノ酸配列修飾 (例えば挿入、欠失及び/又は他の変更) を有してもよい。開示内容全体を通して、「野生型」、「WT」、「wt」、及び「親」ないしは「親の」抗体は交換可能に用いられる。

【0085】

ここで用いる「抗体変異体」又は「変異抗体」は、親抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する抗体を指す。好ましくは、抗体変異体は、天然に見られないアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインを含む。このような変異体は、必然的に親抗体と100%未満の配列同一性又は類似性がある。好適な実施態様では、抗体変異体は、親抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインの何れかのアミノ酸配列と、およそ75%から100%未満、より好ましくはおよそ80%から100%未満、より好ましくはおよそ85%から100%未満、より好ましくはおよそ90%から100%未満、最も好ましくはおよそ95%から100%未満のアミノ酸配列同一性又は類似性があるアミノ酸配列を有するであろう。抗体変異体は一般に、一又は複数の高頻度可変領域内又は該領域に隣接して一又は複数のアミノ酸改変を有するものである。

【0086】

「変異体 F c 領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により、天然配列の F c 領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。ある実施態様において、変異体 F c 領域は、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域に比べて少なくとも一のアミノ酸置換、例えば、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域において、約1から約10のアミノ酸置換、好ましくは約1から約5のアミノ酸置換、例えば、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域において、約1から約10のアミノ酸置換、好ましくは約1から約5のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体 F c 領域は、典型的には、天然配列の F c 領域及び/又は親ポリペプチドの F c 領域と、例えば少なくともおよそ80%の同一性を有するか、又は少なくともおよそ90%の配列同一性を、又は少なくともおよそ95%の配列又はそれ以上の同一性を有するものである。

【0087】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域 (天然配列 F c 領域又はアミノ酸配列変異体 F c 領域) に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q 結合及び補体依存性細胞障害 (CDC) ; Fc レセプター結合性 ; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (ADCC) ; 貪食作用 ; 細胞表面レセプター (例えば、B 細胞レセプター) のダウンレギュレーション ; 及び B 細胞活性化が含まれる。

【0088】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞 (例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球及びマクロファージ) 上に存在する Fc レセプター (FcRs) と結合した分泌 Ig により、これらの細胞障害エフェクター細胞が

10

20

30

40

50

抗原 - 担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。A D C C、N K細胞を媒介する初代細胞は、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及びF c R I I Iを発現する。造血細胞におけるF c Rの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)の464ページの表3に要約されている。対象の分子のA D C C活性をアッセイするために、米国特許第5 5 0 0 3 6 2号又は同第5 8 2 1 3 3 7号に記載されているようなインビトロA D C Cアッセイを実施することができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(P B M C)およびナチュラルキラー(N K)細胞が含まれる。代わ代わりとして、又は更に、対象の分子のA D C C活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

10

【0089】

「ヒトエフェクター細胞」は、一又は複数のF c Rを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。ある実施態様では、その細胞が少なくともF c R I I I Iを発現し、A D C Cエフェクター機能を実行する。A D C Cを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(P B M C)、ナチュラルキラー(N K)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、P B M CとN K細胞が一般的に好まれる。エフェクター細胞はその天然源、例えば本明細書中に記載の血液又はP B M Cから単離してもよい。

【0090】

「F c レセプター」又は「F c R」は、抗体のF c領域に結合するレセプターを記載するものである。いくつかの実施態様では、F c Rは天然ヒトF c Rである。いくつかの実施態様では、F c Rは、I g G抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、F c R I、F c R I I及びF c R I I Iサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。F c R I I Iレセプターには、F c R I I I A(「活性型レセプター」)及びF c R I I I B(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターF c R I I I Aは、細胞質ドメインに免疫受容活性化チロシンモチーフ(I T A M)を含んでいる。活性化レセプターF c R I I I Bは、その細胞質ドメインに、免疫受容抑制性チロシンモチーフ(I T I M)を含む。(例えば、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); 及びde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に総説される。他のF c Rは、将来同定されるべきものを含み、本明細書にて用語「F c R」により網羅される。

20

30

【0091】

また、「F c レセプター」又は「F c R」なる用語には、母性I g Gの胎児への移送(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol.24:249 (1994))及び免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプターF c R nも含まれる。F c R nへの結合を測定する方法は既知である(例えば、Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); 国際公開第2 0 0 4 / 9 2 2 1 9号(Hinton et al.)を参照)。

40

【0092】

インビボでのヒトF c R nへの結合とヒトF c R n高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトF c R nを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又は変異形F c領域を有するポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。国際公開公報2 0 0 0 / 4 2 0 7 2 (Presta)にF c Rへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。例としてShields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

【0093】

50

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系（C1q）の第1補体が、同族抗原と結合した（適切なサブクラスの）抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等、J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体（変異形Fc領域を有するポリペプチド）は、米特許第6194551号B1及び国際公開第1999/51642号に記述される。また例としてIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

【0094】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。一実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他, J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins他, J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0095】

ここでの「可動（フレキシブル）リンカー」とはペプチド結合によって結合した2又はそれ以上のアミノ酸残基を含むペプチドを意味し、それによって結合された（例えば2つのFd領域のような）2つのポリペプチドに対してより大なる回転自由度を提供する。そのような回転自由度により、可動リンカーによって結合された2又はそれ以上の抗原結合部位がそれぞれより効率的に標的抗原（一又は複数）に接近できるようになる。適切な可動リンカーペプチド配列の例には、gly-ser、gly-ser-gly-ser（配列番号：34）、ala-ser、及びgly-gly-gly-ser（配列番号：35）が含まれる。

【0096】

「二量体化ドメイン」は少なくとも2つのアミノ酸残基（一般にはシステイン残基）又は少なくとも2つのペプチド又はポリペプチド（これは同じか異なったアミノ酸配列を持ちうる）の結合(association)によって形成される。ペプチド又はポリペプチドは共有的及び/又は非共有的結合（一又は複数）によって互いに相互作用しうる。ここでの二量体化ドメインの例には、Fc領域；ヒンジ領域；CH3ドメイン；CH4ドメイン；CH1-CL対；出典明示によりここに取り込まれる米国特許第5821333号に記載されたような、遺伝子操作された「ノブ(knob)」及び/又は「隆起(protruberance)」を持つ「インターフェース」；ロイシンジッパー（例えば、jun/fosロイシンジッパー、Kostelny等, J. Immunol., 148:1547-1553 (1992)を参照；又は酵母GCN4ロイシンジッパー）；イソロイシンジッパー；レセプター二量体対（例えばインターロイキン-8レセプター（IL-8R）；及びインテグリンヘテロ二量体、例えばLFA-1及びGPIIb/IIIa）、又はその二量体化領域（一又は複数）；二量体リガンドポリペプチド（例えば、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、インターロイキン-8（IL-8）、血管内皮細胞成長因子（VEGF）、VEGF-C、VEGF-D、PDGFメンバー、及び脳由来神経栄養因子（BDNF）；Arakawa等, J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994)及びRadziejewski等 Biochem. 32(48): 1350 (1993)を参照）、又はその二量体化領域（一又は複数）；ジスルフィド結合を形成可能なシステイン残基対；ペプチド又はポリペプチドの間にジスルフィド結合が形成可能なようにそれぞれが少なくとも一つのシステイン残基（例えば約1、2又は3から約10のシステイン残基）を有するペプチド又はポリペプチドの対（以下、「合成ヒンジ」）；及び抗体

可変ドメインが含まれる。ここでの最も好適な二量体化ドメインはFc領域又はヒンジ領域である。

【0097】

抗体の「機能的抗原結合部位」は標的抗原に結合することができるものである。抗原結合部位の抗原結合親和性は、必ずしも抗原結合部位が由来する親抗体ほど強くないが、しかし、抗原に結合する能力は、抗原への抗体結合を評価するための公知の種々の方法の何れかを用いて測定可能でなければならない。更に本明細書において多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は、定量的に同じである必要はない。ここの多量体抗体に対して、機能的抗原結合部位の数は超遠心分離分析法を使用して評価することができる。分析のこの方法によれば、多量体抗体に対する標的抗原の異なった比率を組み合わせ、複合体の平均分子量は機能的結合部位の異なった数を仮定して計算される。これらの理論値を、機能的結合部位の数を評価するために得られた実際の実験値と比較する。

10

【0098】

指定された抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、同じ抗原に結合する他の抗体とは区別したその抗体の生物学的特徴の一以上を有するものである。

【0099】

対象の抗体が結合する抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のものなどの常套的な交差遮断(cross-blocking)アッセイを行ってもよい。

20

【0100】

「エピトープ」という用語は、タンパク質抗原上の(モノクローナル又はポリクローナル)抗体との結合部位を指すために使用される。

【0101】

本明細書で用いられるように、「治療」(及び「治療する(treat)」又は「治療している(treating)」など文法上の変形)は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。具体的には、治療は、細胞変性又は損傷の病理状態、例えば骨髄系細胞の動員及び/又は腫瘍血管形成と関連する疾患又は症状の病理状態を直接的に防止し、遅延させ又は減少等させうる。

30

【0102】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【0103】

本明細書で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての新生細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性の細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」という用語はここで意味するように相互排他的ではない。

40

【0104】

用語「癌」及び「癌性」は、無秩序な細胞成長/細胞増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を記述する。癌の例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。そのような癌のより具体的な例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫を含む、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、白血病、及びその他のリンパ増

50

殖性疾患、及び様々な型の頭頸部癌を包含する。

【0105】

「耐性腫瘍」なる用語は、少なくともVEGFアンタゴニストを含む癌治療に対して癌治療の間を通して十分に反応しない、又は反応がない、ないしは反応が低減している癌、癌細胞又は腫瘍を指す。また、耐性腫瘍は、本明細書中において耐性があると診断された腫瘍（また、本明細書中では「抗VEGF耐性腫瘍」と称される）を指す。ある実施態様では、少なくともVEGFアンタゴニストを含む療法に感受性がある腫瘍と比較して、耐性腫瘍ではCD11b + Gr1 + 細胞の増加がある。

【0106】

「抗新生物性組成物」なる用語は、少なくとも一の活性な治療剤、例えば「抗癌剤」を含む癌の治療に有用な組成物を指す。治療剤（抗癌剤）の例には、限定するものではないが、例えば化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害性剤、放射線療法において使用する薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、毒素、及び癌を治療するための他の薬剤、例えば抗VEGF中和抗体、VEGFアンタゴニスト、抗G-CSFアンタゴニスト、インターフェロン、IL-17を含むサイトカイン、又はIL-17レセプター、又はVEGFレセプターアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、及び他のバイオ活性がある有機化学的薬剤などが含まれる。それらの組合せも本発明に包含される。

【0107】

用語「細胞分裂阻害剤」とは、インビトロ又はインビボの何れかにおいて、細胞の増殖を停止する化合物又は組成物を指す。従って、細胞分裂阻害剤は、S期の細胞の割合を有意に減少させるものであってもよい。細胞分裂阻害剤の更なる例は、G0/G1停止又はM期停止を誘導することによって、細胞周期の進行を遮断する薬剤を含む。ヒト化抗Her2抗体のトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））はG0/G1停止を誘導する細胞分裂阻害剤の例である。古典的なM期ブロッカーには、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン、及び例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどのトポイソメラーゼII阻害剤が含まれる。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編、第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、ローン・ブーラン ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、プリストル・マイヤー スクウィブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。この用語は、放射性同位体（例えば、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 及び ^{177}Lu の放射性同位体）、化学治療薬、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素を含むように意図されている。

【0108】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞の増殖をインビトロ及び/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期でHip発現細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール（登録商標）、及びトポII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダ

10

20

30

40

50

カルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、及びアラ - Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, 第1章, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0109】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物を指す。化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標)); スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン(piposulfan); アジリジン類、例えばベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa); アルトレトアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類; アセトゲニン(特にブラタシン及びブラタシノン); デルタ - 9 - テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標)); ラパチヨーネ; ラパコール; コルヒチン; ベツリン酸; カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT - 11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標)を含む)、アセチルカンプトセシン、スコボレクチン(scopolectin)及び9 - アミノカンプトセシン; プリオスタチン; カリスタチン; CC - 1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン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(podophyllinic acid); テニボシド; クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8); ドラストチン; ドウオカルマイシン(合成アナログ、KW - 2189及びCB1 - TM1を含む); エロイテロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン; スポンギスタチン; クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チオホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード; カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas); 抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン1I及びカリケアマイシンI1(例えばNicolaou et al., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照); CDP323、経口 - 4インテグリン阻害剤; ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン; エスペラマイシン; 並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、ドキソルピシンHCLリポソーム注射剤(DOXIL(登録商標)、リポソームドキソルピシンTLC D - 99(MYOCET(登録商標))、ペグ化リポソームドキソルピシン(CAELYX(登録商標)、及びデオキシドキソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin); 代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、ゲ

ムシタピン(gemcitabine) (G E M Z A R (登 録 商 標))、テガフル(tegafur) (U F T O
 R A L (登 録 商 標))、カペシタピン(capecitabine) (X E L O D A (登 録 商 標))、エ
 ポチロン(epothilone)、及び 5 - フルオロウラシル (5 - F U) ; 葉酸アナログ、例えば
 デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメ
 トレキセート(trimetrexate) ; プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6
 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン ; ピリミジンアナログ、例えばアンシ
 タビン、アザシチジン(azacitidine)、6 - アザウリジン(azauridine)、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、エノシタビン(enocitabine)、フ
 ロキシウリジン(floxuridine) ; アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プ
 ロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(t
 estolactone) ; 抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン ; 葉酸リ
 プレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid) ; アセグラトン ; アル
 ドホスファミドグリコシド ; アミノレプリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン(amsacri
 ne) ; ベストラブシル(bestrabucil) ; ビサントレン(bisantrene) ; エダトラキセート(eda
 traxate) ; デフォファミン(defofamine) ; デメコルシン(demecolcine) ; ジアジコン(dia
 ziquone) ; エルフォルニチン(elfornithine) ; 酢酸エリブチニウム(elliptinium) ; エポチ
 ロン ; エトグルシド(etoglucid) ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダ
 イニン(lonidainine) ; メイタンシン(maytansine) 及びアンサマイトシン類(ansamitocins
) のようなメイタンシノイド類(maytansinoids) ; ミトグアゾン(mitoguazone) ; ミトキサ
 ントロン ; モピダンモール(mopidanmol) ; ニトラクリン(nitracrine) ; 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(losoxantron) ; 2 - エチル
 ヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登 録 商 標) 多糖類複合体(JHS Natural Products,
 Eugene, OR) ; ラゾキサン(razoxane) ; リゾキシシン(rhizoxin) ; シゾフィラン ; スピロゲ
 ルマニウム(spirogermanium) ; テニユアゾン酸(tenuazonic acid) ; トリアジコン(triazi
 quone) ; 2 , 2 ' , 2 ' ' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン(trichothecene
 s) (特に、T - 2 トキシシン、ベラキュリン A (verracurin A)、ロリジン A (roridin A) 及
 びアングイジン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン (E L D I S I N E (登 録 商 標) 、
 F I L D E S I N (登 録 商 標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン (m a n n o m u s t
 i n e) ; ミトブロニトール ; ミトラクトール(mitolactol) ; ビボブロマン(pipobroman)
 ; ガシトシン(gacytosine) ; アラビノシド (「 A r a - C 」) ; チオテパ ; タキソイド、
 例えばパクリタキセル (T A X O L (登 録 商 標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナ
 ノ粒子製剤 (A B R A X A N E ^{T M})、及びドキセタキセル (T A X O T E R E (登 録 商
 標)) ; クロランブシル ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセート ; プ
 ラチナ剤、例えばシスプラチン、オキサリプラチン (例えば E L O X A T I N (登 録 商 標
)) 及びカルボプラチン ; ピンカ類でチューブリン重合の微小管形成を阻害するもの、例
 えばビンブラスチン (V E L B A N (登 録 商 標)、ピンクリスチン (O N C O V I N (登
 録 商 標))、ビンデシン (E L D I S I N E (登 録 商 標)、F I L D E S I N (登 録 商 標
))、及びビノレルビン (N A V E L B I N E (登 録 商 標)) ; エトボシド (V P - 1 6
) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ロイコボビン(leucovovin) ; ノバントロン(nov
 antrone) ; エダトレキセート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロナート (i
 b a n d r o n a t e) ; トポイソメラーゼ阻害薬 R F S 2 0 0 0 ; ジフルオロメチロー
 ルニチン (D M F O) ; レチノイン酸などのレチノイド、例えば、ベキサロテン (T A R
 G R E T I N (登 録 商 標)) ; ビスホスホネート、例えばクロドロネート (例えば B O N
 E F O S (登 録 商 標) 又は O S T A C (登 録 商 標))、エチドロロン酸 (D I D R O C A L
 (登 録 商 標))、N E - 5 8 0 9 5、ゾレドロロン酸 / ゾレドロネート (Z O M E T A (登
 録 商 標))、アレンドロネート (F O S A M A X (登 録 商 標))、パミドロロン酸 (A R E
 D I A (登 録 商 標))、チルドロン酸 (S K E L I D (登 録 商 標))、又はリセドロロン酸
 (A C T O N E L (登 録 商 標)) ; トロキサシタビン(troxacitabine) (1 , 3 - ジオキ
 ソランヌクレオシドシトシン類似体) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細
 胞増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば P K C

- 、R a f、及びH - R a s、及び上皮増殖因子受容体（E G F - R）；T H E R A T O P E（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばA L L O V E C T I N（登録商標）ワクチン、L E U V E C T I N（登録商標）ワクチン、及びV A X I D（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害薬（例えばL U R T O T E C A N（登録商標））；r m R H（例えばA B A R E L I X（登録商標））；B A Y 4 3 9 0 0 6（ソラフェニブ；B a y e r）；S U - 1 1 2 4 8（スニチニブ、S U T E N T（登録商標）、P f i z e r）；ペリフォシン(perifosine)、C O X - 2阻害剤（例えばセレコキシブ又はエトリコキシブ）、プロテオゾーム阻害剤（例えばP S 3 4 1）；ボルテゾミブ（V E L C A D E（登録商標））；C C I - 7 7 9；チピファルニブ(tipifarnib)（R 1 1 5 7 7）；オラフィニブ(orafenib)、A B T 5 1 0；B C L - 2阻害剤、例えばオブリメルセンナトリウム(oblimersen sodium)（G E N A S E N S E（登録商標））；ピクサントロン；E G F R阻害剤（以下の定義を参照）；チロシンキナーゼ阻害剤；セリン - スレオニンキナーゼ阻害剤、例えばラパマイシン（シロリムス、R A P A M U N E（登録商標））；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばロナファエニブ（S C H 6 6 3 6, S A R A S A R^{T M}）；及び上述したものの何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組合せ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルビン、ビンクリスチン、及びプレドニソロンの併用療法の略称であるC H O P；及び5 - F U及びロイコボリンとオキサリプラチン（E L O X A T I N^{T M}）を組合せた治療法の略称であるF O L F O Xが含まれる。

【0110】

ここで定義された化学療法剤には、癌の増殖を促進しうるホルモンの作用を調節、低減、遮断、又は阻害するように働く「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療剤」が含まれる。それらはそれ自体がホルモンであってもよく、限定するものではないが、混合アゴニスト/アンタゴニストプロファイルを持つ抗エストロゲン、例えばタモキシフェン（N O L V A D E X（登録商標））、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（F A R E S T O N（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)（E V I S T A（登録商標））、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、及びS E R M 3などの選択的なエストロゲン受容体調節因子（S E R M）；アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン類、例えばフルベストラント（F A S L O D E X（登録商標））、及びE M 8 0 0（このような薬剤はエストロゲン受容体（E R）二量体化をブロックし、D N A結合を阻害し、E R代謝回転を増加させ、及び/又はE Rレベルを抑制しうる）；アロマターゼインヒビター、例えば、ホルメスタン及びエキセメスタン（A R O M A S I N（登録商標））などのステロイド系アロマターゼインヒビター、及びアナストロゾール（A R I M I D E X（登録商標））、レトロゾール（F E M A R A（登録商標））及びアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマターゼインヒビター、及びボロゾール（R I V I S O R（登録商標））、メゲストロールアセテート（M E G A S E（登録商標））、ファドロゾール及び4（5）- イミダゾールを含む他のアロマターゼインヒビター；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えばロイプロリド（L U P R O N（登録商標））及びE L I G A R D（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン、及びトリプトレリン；性ステロイド、例えばプロゲステロン、例えばメゲストロールアセテート及びメドロキシプロゲステロンアセテート、エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロール及びプレマリン、及びアンドロゲン/レチノイド、例えばフルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸及びフェンレチニド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御因子（E R D）；抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド；及び上記の何れかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体；並びに、上記のうちの2以上の組合せを含む。

【0111】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含

まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子 - 及び - ；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子（例えば、VEGF、VEGF - B、VEGF - C、VEGF - D、VEGF - E）、胎盤由来成長因子（PLGF）、血小板由来成長因子（PDGF、例えばPDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFD）；；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF - 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF - 及びTGF - 等のトランスフォーミング成長因子（TGFs）；インシュリン様成長因子 - I 及びII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘発因子；インターフェロン - 、 - 、及び - 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（CSFs）、例えばマクロファージ - CSF（M - CSF）；顆粒球 - マクロファージ - CSF（GM - CSF）；及び顆粒球 - CSF（G - CSF）；インターロイキン（ILs）、例えばIL - 1、IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 19、IL - 20 - IL - 30；セクレトグロビン/ウテログロビン；オンコスタチンM（OSM）；；腫瘍壊死因子、例えばTNF - 及びTNF - ；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。本明細書で用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

【0112】

「血管新生因子又は薬剤」は、血管の発達を刺激する、例えば、血管新生、血管内皮細胞増殖、血管及び/又は脈管形成の安定性などを促進する増殖因子である。例えば、血管新生因子には、限定するものではないが、例えば、VEGF及びVEGFファミリーのメンバー、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、ANGPTL4などが含まれる。また、創傷治癒を促す因子、例として、成長ホルモン、インスリン様成長因子 - I（IGF - I）、VIGF、上皮細胞増殖因子（EGF）、CTGF、及びそのファミリーのメンバー、及びTGF - 及びTGF - が含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)（例えば、血管新生因子を列挙する表1）；及びSato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)を参照。

【0113】

「抗血管新生剤」又は「血管新生インヒビター」は、小分子量物質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、単離されたタンパク質、組換えタンパク質、抗体、又はこれらのコンジュゲートないし融合タンパク質を指し、直接又は間接的に、血管新生、脈管形成又は望ましくない血管透過を阻害するものである。例えば、抗血管新生剤は、上記に定義するように、血管新生剤に対する抗体又は他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体、VEGFレセプターに対する抗体、VEGFレセプターシグナル伝達を遮断する小分子（例えばPTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248（リンゴ酸スニチニブ）、AMG706）である。また抗血管新生剤には、天然の血管新生インヒビター、例えばアンジオスタチン、エンドスタチンなどが含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)（例えば、悪性メラノーマの抗血管新生療法を列挙する表3）；Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)（例えば、抗血管新生因子を列挙する表2）；及び、Sato *Int. J.*

Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)(例えば、臨床試験で用いられる抗血管新生剤を挙げる表 1)を参照。

【0114】

本明細書中で用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書において治療される哺乳動物の免疫系を抑制するか又は隠すために作用する物質を指す。これには、サイトカイン産生を抑制する物質、自己抗原発現を下方制御又は抑制する物質、又は、MHC抗原をマスキングする物質が含まれる。このような薬剤の例には、2-アミノ-6-アリル-5-置換ピリミジン(米国特許第4665077号を参照)；非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)；ガンシクロビル、タクロリムス、糖質コルチコイド、例として、コルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、例として、シクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リボキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト；プリンアンタゴニスト、例として、アザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF)；アルキル化剤、例として、シクロホスファミド；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタールアルデヒド(MHC抗原をマスキングするもの、米国特許第4120649号に記載)；MHC抗原及びMHC断片に対する抗イディオタイプ抗体；シクロスポリンA；ステロイド、例として、副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質コルチコイド類似体、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾン及びデキサメサゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例えばメトトレキサート(経口又は皮下)；ヒドロキシクロロキン；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカインないしはサイトカインレセプター抗体、例えば抗インターフェロン- α 、 β 又は γ 抗体、抗腫瘍壊死因子- α 抗体(インフリキシマブ又はアダリムマブ)、抗TNF- α イムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子- β 抗体、抗インターロイキン2抗体及び抗IL-2レセプター抗体；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗L3T4抗体；異種性の抗リンパ球グロブリン；パン-T抗体、好ましくは抗CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日に発行の国際公開第1990/08187号)；ストレプトキナーゼ；TGF- β ；ストレプトドルナーゼ；宿主のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；デオキシスベルグアリン；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプター断片(Offner等、Science, 251: 430-432 (1991)；国際公開第1990/11294号；laneway, Nature, 341: 482 (1989)；及び国際公開第1991/01133号)；及び、T細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)、例えばT10B9が含まれる。

【0115】

一又は複数の更なる治療薬「と組み合わせ(と併用して)」の投与は、同時(同時発生的)及び任意の順序での連続投与を含む。

【0116】

本明細書で用いられる「担体」は薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤を含み、被検体に非毒性であり、有効成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0117】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【0118】

本明細書中で用いる「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」なる表現は相互に交換可能に用いられ、かかる標記は子孫を含む。よって、「形質転換体」や「形質転換細胞」のような用語には、初代対象細胞と何世代移行したかを問わずそれから由来した培養物とを含む。全ての子孫が、意図的な突然変異あるいは意図せざる突然変異のため、正確に同一のDNA内容であるわけではないことも理解される。「子孫」なる用語は、最初に形質転換された細胞又は細胞株に続くすべての世代のいずれか及びすべての子孫を指す。最初に形質転換された細胞に対してスクリーニングされたものと同じ機能あるいは生物活性を

有する突然変異子孫も含まれる。区別しての標記を意図している場合は、文脈から明らか
なはずである。

【0119】

組成物及び方法

本発明は、IL-17経路は、少なくとも一のVEGFアンタゴニスト、例えば抗VEGF抗体の投与を含む治療に対する腫瘍の耐性につながる腫瘍微小環境における細胞及び分子事象において重要で潜在的に支配的な役割を果たしているとする認識に少なくとも部分的に基づいている。宿主間質細胞に対する腫瘍からのIL-17シグナル伝達は、炎症促進性及び/又は血管新生促進性サイトカイン、例えばG-CSF及びBv8などのレベルを調節することができる。

10

【0120】

最近の研究では、抗VEGF療法に対する不応性の媒介においてCD11b+Gr1+骨髄系細胞を直接関与させている。(Shojaei, F., et al., Nature Biotechnol 25:911-200 (2007))。CD11b+Gr1+骨髄系細胞の動員および活性化により抗VEGF治療に耐性が生じることが示された(Shojaei et al 2009)。また、腫瘍保持マウスから単離された骨髄由来のCD11b+Gr1+骨髄系細胞は、CD11b+Gr1+細胞の移動を刺激した抗VEGF耐性(抗VEGF感受性でない腫瘍)からの条件培地において、抗VEGF治療に対する耐性を腫瘍に与えることが示されている。

【0121】

本明細書において開示される実験データは、IL-17が腫瘍発達中に骨髄由来のCD11b+Gr1+免疫抑制性未熟骨髄細胞の動員を制御することができ、よって局所的に腫瘍血管形成を促進することを示している。したがって、IL-17は、VEGFアンタゴニストによる治療に耐性がある腫瘍の治療のための有望な標的である。

20

【0122】

A. 抗IL-17抗体の作成

本発明の結合および活性のアッセイによって同定される抗体は、組換えDNA技術の技術を含む公知の方法によって製造されうる。

【0123】

(i) 抗原調製

場合によって、他の分子にコンジュゲートした可溶性抗原ないしその断片は、抗原を生成するための免疫原として用いられうる。レセプターなどの膜貫通分子のために、その断片(例えばレセプターの細胞外ドメイン)が免疫原として用いられうる。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞を免疫源として用いてもよい。このような細胞は、天然の供与源(例えば癌細胞株)から得られてもよいし、膜貫通分子を発現するように組換え体技術によって形質転換されている細胞であってもよい。抗体を調製するために有用な他の抗原及びその形態は当分野の技術者に明らかであろう。

30

【0124】

(ii) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連する抗原とアジュバントを複数回の皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生されることが好ましい。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、SOCl₂、又はR及びR₁が異なるアルキル基であるR₁N=C=NRへ、関連する抗原をコンジュゲートさせるために有用である。

40

【0125】

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100µg又は5µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に

50

皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5から1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7から14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物を、同じ抗原であるが異なるタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なる架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートにより追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0126】

(iii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495(1975年)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作成されてもよく、あるいは組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)によって作成されてもよい。ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスター又はマカクザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次いで、リンパ球をポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【0127】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失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、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0128】

好適な骨髓腫細胞は、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な高レベルの発現を支援し、HAT培地などの培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーク・インステイテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、メリーランド、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0129】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくはハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

【0130】

所望の特異性、親和性、及び/又は活性な抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫

10

20

30

40

50

瘍として、インビボで増殖させることができる。

【0131】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的なイムノグロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

【0132】

モノクローナル抗体をコードする DNA は、常法を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の好適な供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNA を発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外ではイムノグロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体の組み換え産生を以下に詳細に記載する。

10

【0133】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554 (1990) に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。

【0134】

Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 及び Marks 等, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991) は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性 (nM 範囲) のヒト抗体の生成 (Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)) を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

20

【0135】

また、DNA は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン (CH 及び CL) のコード配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって (米国特許第 4816567 号; Morrison 等, *Proc.Nat.Acad.Sci., USA*, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾することができる。

30

【0136】

典型的には、前記の非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する 1 つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0137】

(iv) ヒト化及びヒト抗体

ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター (Winter) 及び共同研究者 [Jones 等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類 CDR 又は CDR 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4816567 号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの CDR 残基及び場合によっては幾つかの FR 残基が齧歯類抗体の類似する部位か

40

50

らの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0138】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

10

【0139】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好適な方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を調査すると、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

20

【0140】

あるいは、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 及びDuchosal等 Nature 355:258 (1992)を参照されたい。また、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリからも得られる(Hoogenboom等, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan等 Nature Biotech 14:309 (1996))。抗体ファージディスプレイライブラリからのヒト抗体の生成は以下に更に記載する。

30

【0141】

(v) 抗体断片

抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。以下の実施例に記載のような他の実施態様では、F(ab')₂は、F(ab')₂分子のアセンブリを促すように、ロイシンジッパーGCN4を用いて形成される。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片を生成するための他の方法は、当業

40

50

者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖 F v 断片 (s c F v) である。国際公開 9 3 / 1 6 1 8 5 号を参照のこと。

【 0 1 4 2 】

(v i) 多重特異性抗体

多重特異性抗体は、通常異なる抗原に由来する少なくとも 2 つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する。このような分子は通常 2 つの異なるエピトープを結合するだけであるが (すなわち二重特異性抗体、 B s A b) 、本明細書中で用いられる場合には三重特異性抗体などの更なる特異性を有する抗体がこの表現に包含される。B s A b の例には、I L - 1 7 に対する一アームと、V E G F 又は G - C S F に対する他のアームとを有するものが含まれる。

10

【 0 1 4 3 】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている (Millstein 等 , Nature , 305:537-539(1983)) 。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は 1 0 個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第 9 3 / 0 8 8 2 9 号及び Traunecker 等 , EMBO J. 10:3655-3659(1991) に開示されている。異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗原 - 抗体結合部位) を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2 及び C H 3 領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (C H 1) を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしている D N A を、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、構成に使用される 3 つのポリペプチド鎖の等しくない比率が抗体の最適な収率をもたらす態様において、3 つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きなフレキシビリティが与えられる。しかし、少なくとも 2 つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率があまり影響がないときは、2 又は 3 個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

20

30

【 0 1 4 4 】

この手法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対 (第二の結合特異性を提供する) とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第 9 4 / 0 4 6 9 0 号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えば Suresh 等 , Methods in Enzymology , 121:210 (1986) を参照されたい。

40

【 0 1 4 5 】

国際公開第 9 6 / 2 7 0 1 1 号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーの割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体の定常ドメインの C H 3 ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第 1 抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖 (例えばチロシン又はトリプトファン) と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの (例えばアラニン又はスレオニン) と置き換えることにより第 2 の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

50

【0146】

二重特異性抗体には、交差結合又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートの一抗体はアビジンにカップリングし、他方の抗体はビオチンにカップリングしていてもよい。例えば、このような抗体は、望ましくない細胞へ免疫系細胞を標的化するため（米国特許第4676980号）、そしてHIV感染の治療のため（国際公開91/00360、国際公開92/200373）に提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体は従来のいずれかの交差結合法を用いて作製されてもよい。好適な交差結合剤は当分野で周知であり、多くの交差結合技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

【0147】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, Science, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(ab')断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F(ab')-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF(ab')-チオールに再変換し、他のF(ab')-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0148】

F(ab')-SH断片は、大腸菌から直接回収することもできるし、化学的に結合して二重特異性抗体を形成させることもできる。Shalaby等, J.Exp.Med., 175:217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各F(ab')断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。

【0149】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する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生成されている。Kostelny等, J.Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF(ab')部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能とするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン(VL)に連結した重鎖可変ドメイン(VH)を含む。従って、一つの断片のVH及びVLドメインは他の断片の相補的VL及びVHドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する別の戦略もまた報告されている。Gruber等, J.Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0150】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J.Immunol. 147:60(1991)。

【0151】

(vii) エフェクター機能工学

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、抗体の有効性を向上させることは望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成されたホモ二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞

10

20

30

40

50

障害性 (A D C C) を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つホモ二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されているヘテロ二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように操作して、それにより補体溶解及びA D C C能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【0152】

(v i i i) 抗体 - サルベージレセプター結合エピトープ融合

本発明のある実施態様において、例えば腫瘍浸透性を増大させるためにインタクト抗体よりも抗体断片を使用することが望ましい。この場合、その血清半減期を増大させるために抗体断片を改変することが望ましい。これは、例えば、抗体断片にサルベージレセプター結合エピトープを組み込むことにより (例えば、抗体断片中の適当な領域の突然変異により、あるいはついで抗体断片の何れかの末端又は中央に、例えばDNA又はペプチド合成により融合されるペプチドタグ内にエピトープを組み込むことにより)、達成しうる。

【0153】

サルベージレセプター結合エピトープは、好ましくは、Fcドメインの一又は二のループ由来の一又は複数の任意のアミノ酸残基が抗体断片の類似位置に転移している領域を構成する。更により好ましくは、Fcドメインの一又は二のループ由来の3以上の残基が転移する。またより好ましくは、エピトープはFc領域の (例えばIgGの) CH2ドメインから得られ、抗体のCH1、CH3、又はVH領域、又はそのような領域の一より多くに転移する。あるいは、エピトープは、Fc領域のCH2ドメインから得られ、抗体断片のCL領域又はVL領域、又はその両方に転移する。

【0154】

(i x) 抗体の他の共有結合性修飾

抗体の共有結合性修飾は本発明の範囲内にある。それらは、適用可能であれば、抗体の化学合成により、又は酵素的又は化学的切断によりなされうる。抗体の共有結合性修飾の他のタイプは、選択される側鎖又はN若しくはC末端の残基と反応できる有機誘導体化剤と抗体の標的とするアミノ酸領域を反応させることにより分子中に導入される。共有結合性修飾は米国特許第5534615号に記載されており、出典明記によって特別に本明細書中に援用される。抗体の共有結合性修飾の好適なタイプは、抗体を、種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号; 第4496689号; 第4301144号; 第4670417号; 第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。

【0155】

また、本発明は、化学療法薬、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片) などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体 (即ち、放射性コンジュゲート) とコンジュゲートしている本明細書中に記載の抗体を含むイムノコンジュゲートに関する。種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の生成に利用できる。例には、限定するものではないが、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。

【0156】

このようなイムノコンジュゲートの生成に有用な化学療法剤は上記した。例えば、BCNU、ストレプトゾシン、ビンクリスチン、5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラミシン (米国特許第5877296号) など (本明細書中の「化学療法薬」の定義も参照のこと) が本発明の抗体ないしその断片にコンジュゲートされうる。

【0157】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性

10

20

30

40

50

コンジュゲートした抗体ないしその断片を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、限定するものではないが、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 、 ^{111}In 及び ^{177}Lu の放射性同位体などが含まれる。コンジュゲートが診断用に使われる場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 又は ^{123}I 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、MRIとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素- ^{123}I 、ヨウ素- ^{131}I 、インジウム- ^{111}In 、フッ素- ^{19}F 、炭素- ^{13}C 、窒素- ^{15}N 、酸素- ^{17}O 、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

【0158】

放射性又は他の標識は、既知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素 ^{19}F を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 又は ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 及び ^{111}In は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム- ^{90}Y はリジン残基を介して結合可能である。IODOGÉN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素- ^{123}I の導入に使用することができる。他の方法を詳細に記載している例えば「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)も参照のこと。

【0159】

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*Saponaire*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

【0160】

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

【0161】

別法として、抗IL-17抗体及び/又は抗VEGF抗体及び/又は抗G-CSF抗体及び細胞傷害性薬剤は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの

10

20

30

40

50

長さは、コンジュゲートの所望する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り離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

【0162】

ある実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」（例えばストレプトアビジン）に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤（例えばラジオヌクレオチド）にコンジュゲートする「リガンド」（例えばアビジン）を投与する。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗体と核酸溶解活性を有する化合物（例えば例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNAアーゼ）との間で形成される。

10

【0163】

本発明は、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体を提供する。メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ*Maytenus serrata*から単離されたものである（米国特許第3896111号）。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された（米国特許第4151042号）。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されている。

20

【0164】

本発明の抗体は、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子にコンジュゲートすることができる。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。一実施態様において、メイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

30

【0165】

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari等, *Cancer Research*, 52:127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

40

【0166】

抗体とメイタンシノイドのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(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、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミデートHCL）、活性エステル類（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス(p

50

- アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製されうる。典型的なカップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するための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)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオアート(SPDP)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

【0167】

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。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たC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0168】

関心のある別のイムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N-アセチル- 1^I 、PSAG及び 1^I (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0169】

(x) 合成抗体ファージライブラリからの抗体の産生

一実施態様では、本明細書に記載の抗体は固有のファージディスプレイアプローチ法を使用して産生され選択される。該アプローチ法は、単一フレームワーク鋳型に基づく合成抗体ファージライブラリの産生、可変ドメイン内の十分な多様性の設計、多様化した可変ドメインを有するポリペプチドのディスプレイ、抗原を標的とする高親和性を持つ候補抗体の選択、及び選択された抗体の単離を含む。

【0170】

ファージディスプレイ法の詳細は例えば2003年12月11日公開の国際公開第03/102157号に見出すことができ、この開示内容の全体は出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

【0171】

一態様では、本発明において使用される抗体ライブラリは抗体可変ドメインの少なくとも一のCDRにおいて溶媒接近可能な及び/又は高度に多様性の位置を変異させることによってつくることができる。CDRの幾らか又は全てをここに提供した方法を使用して変異させることができる。幾つかの実施態様では、CDRH1、CDRH2及びCDRH3中の位置に変異を施して単一のライブラリを形成するか、又はCDRL3及びCDRH3中の位置に変異を施して単一のライブラリを形成するか、又はCDRL3及びCDRH1、CDRH2及びCDRH3中の位置に変異を施して単一のライブラリを形成することにより、多様な抗体ライブラリをつくるのが好ましい。

【0172】

例えばCDRH1、CDRH2及びCDRH3の溶媒接近可能な及び／又は高度に多様性の位置に変異を有する抗体可変ドメインのライブラリをつくることができる。CDRL1、CDRL2及びCDRL3に変異を有する他のライブラリをつくることができる。これらのライブラリは所望の親和性の結合体をつくるために互いに関連させて使用することもできる。例えば、標的抗原への結合についての重鎖ライブラリの一又は複数回の選択後に、軽鎖ライブラリを結合体の親和性を増加させるために更なる選択回数に対して重鎖結合体の集団中に置き換えることができる。

【0173】

好ましくは、ライブラリは重鎖配列の可変領域のCDRH3領域における変異アミノ酸での元のアミノ酸の置換によりつくられる。得られたライブラリは複数の抗体配列を含み得、ここで配列多様性は主として重鎖配列のCDRH3領域にある。

10

【0174】

一態様では、ライブラリはDVKコドンセットによってコードされるアミノ酸で重鎖の少なくとも残基95 - 100aを置換することによりつくられ、ここでDVKコドンセットはこれらの位置の各一に対して変異アミノ酸セットをコードするために使用される。これらの置換をつくるのに有用なオリゴヌクレオチドセットの一例は配列(DVK)₇を含む。幾つかの実施態様では、ライブラリはDVKとNNKの双方のコドンセットによってコードされるアミノ酸で残基95 - 100aを置換することによりつくられる。これらの置換をつくるのに有用なオリゴヌクレオチドセットの例は配列(DVK)₆(NNK)を含む。別の実施態様では、ライブラリはDVKとNNKの双方のコドンセットによってコードされるアミノ酸で少なくとも残基95 - 100aを置換することによりつくられる。これらの置換をつくるのに有用なオリゴヌクレオチドセットの例は配列(DVK)₅(NNK)を含む。これらの置換をつくるのに有用なオリゴヌクレオチドセットの別の例は配列(DVK)₆を含む。好適なオリゴヌクレオチド配列の他の例はここに記載された基準に従って当業者によって決定することができる。

20

【0175】

他の実施態様では、異なったCDRH3設計を使用して高親和性結合体を単離し様々なエピトープに対して結合体を単離する。このライブラリにおいて産生されたCDRH3の長さの範囲は11から13アミノ酸であるが、これとは異なった長さも産生することができる。H3多様性はNNK、DVK及びNVKコドンセットを使用し、並びにN及び／又はC末端での多様性をより制限して、拡張することができる。

30

【0176】

多様性をCDRH1及びCDRH2においてまた生じさせることができる。CDRH1及びH2多様性の設計は、過去の設計よりも天然の多様性により密に適合する多様性に焦点を当てる変更をした上で、上述の天然抗体レパートリーを模倣するターゲティング戦略に従う。

【0177】

CDRH3での多様性に対しては、複数のライブラリを、異なった長さのH3と別個に構築し、ついで、標的抗原に対する結合体を選択するために組み合わせる。複数のライブラリをプールし、過去に記載され以下に記載されたような固体支持体選別及び溶液選別方法を使用して選別することができる。複数の選別方策を用いることができる。例えば、一つの変異は固体に結合した標的での選別を含み、融合ポリペプチド上に存在しうるタグ(例えば抗gDタグ)の選別が続く。別法として、ライブラリは固体表面に結合した標的で先ず選別することができ、溶出した結合体がついで標的抗原の濃度を減少させた溶液相結合を使用して選別される。異なった選別法を併用することにより高度に発現した配列のみの選択の最小化がもたらされ、多くの異なった高親和性クローンの選択をもたらす。

40

【0178】

標的抗原に対する高親和性結合体はライブラリから単離することができる。H1／H2領域における多様性の制限は約10⁴から10⁵倍縮重を減少させ、より多くのH3多様性を許容することによりより多くの高親和性結合体をもたらす。CDRH3において異な

50

ったタイプの多様性を持つライブラリを利用することにより（例えばD V K又はN V Tを利用して）標的抗原の異なったエピトープに結合しうる結合体の単離をもたらす。

【0179】

上述のプールされたライブラリから単離された結合体において、軽鎖において制限された多様性を提供することによって親和性を更に改善することができることが発見された。軽鎖多様性はこの実施態様では以下のように生成される。CDRL1においては：アミノ酸位置28がR D Tによってコードされる；アミノ酸位置29がR K Tによってコードされる；アミノ酸位置30がR V Wによってコードされる；アミノ酸位置31がA N Wによってコードされる；アミノ酸位置32がT H Tによってコードされる；場合によっては、アミノ酸位置33がC T Gによってコードされる；CDRL2においては：アミノ酸位置50がK B Gによってコードされる；アミノ酸位置53がA V Cによってコードされる；場合によっては、アミノ酸位置55がG M Aによってコードされる；CDRL3においては：アミノ酸位置91がT M T又はS R T又はその両方によってコードされる；アミノ酸位置92がD M Cによってコードされる；アミノ酸位置93がR V Tによってコードされる；アミノ酸位置94がN H Tによってコードされる；アミノ酸位置96がT W T又はY K G又は両方によってコードされる。

10

【0180】

他の実施態様では、CDRH1、CDRH2及びCDRH3領域に多様性を持つライブラリ又はライブラリ群が作製される。この実施態様では、CDRH3における多様性は様々な長さのH3領域を用い、主にコドンセットX Y Z及びN N K又はN N Sを用いて作り出される。ライブラリは個々のオリゴヌクレオチドを使用して形成しプールすることができる。この実施態様のライブラリは固体に結合した標的に対して選別することができる。多重選別から単離されたクローンをE L I S Aアッセイを使用して特異性及び親和性についてスクリーニングすることができる。特異性については、クローンを所望の標的抗原並びに他の非標的抗原に対してスクリーニングすることができる。標的抗原に対するこれらの結合体をついで溶液結合競合E L I S Aアッセイ又はスポット競合アッセイでの親和性についてスクリーニングすることができる。高親和性結合体は上に記載したようにして調製されたX Y Zコドンセットを使用してライブラリから単離することができる。これらの結合体は抗体又は抗原結合断片として細胞培養物中に高収量で容易に産生されうる。

20

30

【0181】

幾つかの実施態様では、CDRH3領域の長さに大なる多様性を持つライブラリを作成することが望まれる場合がある。例えば、約7から19アミノ酸の範囲のCDRH3領域を持つライブラリを作成することが望ましい場合がある。

【0182】

これらの実施態様のライブラリから単離された高親和性結合体は細菌及び真核生物細胞培養で高収量で直ぐに産生される。ベクターはg D タグ、ウイルスコートタンパク質成分配列のような配列を直ちに除去し、及び/又は定常領域配列に加えて完全長抗体又は抗原結合断片を高収量で生産するように設計することができる。

【0183】

CDRH3での変異を持つライブラリを、例えばCDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及び/又はCDRH2のような他のCDRの変異型を含むライブラリと組み合わせることができる。よって、例えば、一実施態様では、CDRH3ライブラリは予め定まったコドンセットを使用して位置28、29、30、31、及び/又は32に変異アミノ酸を持つヒト化4 D 5抗体配列の形態において作りだしたCDRL3ライブラリと組み合わせられる。他の実施態様では、CDRH3に対する変異のライブラリは変異CDRH1及び/又はCDRH2重鎖可変ドメインを含むライブラリと組み合わせることができる。一実施態様では、CDRH1ライブラリは位置28、30、31、32及び33に変異アミノ酸を持つヒト化抗体4 D 5配列を用いて作り出される。CDRH2ライブラリは予め定まったコドンセットを使用して位置50、52、53、54、56及び58に変

40

50

異アミノ酸を持つヒト化抗体4D5の配列を用いてつくり出すことができる。

【0184】

(xi) 抗体変異体

ファージライブラリから生成される新規の抗体は、さらに修飾して、親抗体よりも改善した物理学的、化学的及び/又は生物学的特性を有する抗体変異体を生成することができる。使用するアッセイが生物学的活性アッセイである場合、抗体変異体は、選択したアッセイにおいて、該アッセイにおける親抗体の生物学的活性よりも少なくともおよそ10倍良好な、好ましくは少なくともおよそ20倍良好な、より好ましくは少なくともおよそ50倍良好な、時には少なくともおよそ100倍又は200倍良好な生物学的活性を有する。例えば、抗IL-17抗体変異体は、親抗体の結合親和性より、少なくともおよそ10倍強力な、好ましくは少なくともおよそ20倍強力な、より好ましくは少なくともおよそ50倍強力な、時には少なくともおよそ100倍又は200倍強力な、IL-17に対する結合親和性を有することが好ましい。

10

【0185】

抗体変異体を産生するためには、親抗体の高頻度可変領域の一又は複数中に一又は複数のアミノ酸修飾(例えば置換)が導入される。別法として、又は加えて、フレームワーク領域残基の一又は複数の修飾(例えば置換)を親抗体に導入することができ、これらにより第二の哺乳動物種由来の抗原に対する抗体変異体の結合親和性が改善される。修飾するためのフレームワーク領域残基の例には、抗原に非共有的に結合するもの(Amit等, Science 233:747-753 (1986)); CDRと相互作用し/そのコンホメーションに影響を及ぼすもの(Chothia等 J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); 及び/又はV_L-V_H界面に関与するもの(欧州特許第239400号B1)が含まれる。ある実施態様では、そのようなフレームワーク領域残基の一又は複数の修飾により第二の哺乳動物種由来の抗原に対する抗原の結合親和性が向上する。例えば、約1から約5のフレームワーク残基を本発明のこの実施態様において修飾することができる。時には、これは、高頻度可変領域が何ら改変されていない場合でさえ、前臨床試験に使用するのに適した抗体変異体を生じるのに十分でありうる。しかしながら、通常は、抗体は更なる高頻度可変領域の改変を含む。

20

【0186】

改変される高頻度可変領域残基は、特に親抗体の出発結合親和性が、無作為に生産された抗体変異体を直ぐにスクリーニングすることができるものである場合には、無作為に変化させることができる。

30

【0187】

そのような抗体変異体を産生するための一つの有用な方法は、「アラニンスキャンニング突然変異誘発法」(Cunningham及びWells Science 244:1081-1085 (1989))と呼ばれる。ここで、高頻度可変領域残基の一又は複数が、第二の哺乳動物種由来の抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を及ぼすためにアラニン又はポリアラニンによって置換される。ついで置換に対する機能的感受性を示す高頻度可変領域残基は、置換部位において又はそれに対して更なる又は他の置換を導入することにより洗練される。従って、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異の種類自体は予め決める必要はない。このようにして産生されるa1a変異体をここに記載したその生物活性についてスクリーニングされる。

40

【0188】

通常は、「好ましい置換」の項目名で以下に示されているもののような保存的置換で始める。そのような置換が生物活性(例えば結合親和性)の変化を生じるならば、次の表において「例示的置換」と命名され、又はアミノ酸クラスを参照して以下に更に記載されるより実質的な変化が導入され、産物がスクリーニングされる。

表2.好ましいアミノ酸置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

30

40

50

抗体の生物学的性質の更により実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋コンホメーション、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持して、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性の親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：his、lys、arg；
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly、pro；及び
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

10

【0190】

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

【0191】

他の実施態様では、修飾のために選択された部位がファージディスプレイを使用して亜親和性成熟される(上を参照)。

【0192】

アミノ酸配列変異体をコードしている核酸分子は当該分野で知られている様々な方法により調製される。これらの方法は、限定されるものではないが、親抗体の先に調製された変異体又は非変異体型のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発を含む。変異体を作製するための好ましい方法は部位特異的突然変異誘発(例えばKunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)を参照)である。

20

【0193】

ある実施態様では、抗体変異体は単一の高頻度可変領域残基を置換させている。他の実施態様では、親抗体の高頻度可変領域残基の2又はそれ以上が置換され、例えば約2から約10の高頻度可変領域置換である。

【0194】

通常、改善された生物学的性質を有する抗体変異体は親抗体の重鎖又は軽鎖の何れかの可変ドメインのアミノ酸配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に対する同一性又は類似性は、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入し最大の配列同一性パーセントを達成した後に親抗体残基と同一(つまり同じ残基)又は類似(つまり共通の側鎖特性に基づく同じグループのアミノ酸残基、上を参照)である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセントとしてここで定義される。可変ドメインの外側の抗体配列中へのN末端、C末端、又は内部の伸展、欠失、又は挿入は何れも配列同一性又は類似性に影響を及ぼすものとはみなされない。

30

【0195】

抗体変異体の産生後に、親抗体に対するその分子の生物活性が決定される。上に述べたように、これは抗体の結合親和性及び/又は他の生物活性を決定することを含みうる。本発明の好適な実施態様では、抗体変異体のパネルを調製し、抗原ないしその断片に対する結合親和性についてスクリーニングする。この最初のスクリーニングから選択される抗体変異体の一又は複数場合は場合によっては一又は複数の更なる生物活性アッセイにかけて、結合親和性が向上した抗体変異体が例えば前臨床研究に確かに有用であることが確認される。

40

【0196】

このように選択された抗体変異体は、しばしば抗体の意図される用途に応じて更なる修飾を受けることができる。そのような修飾は以下に詳細を記載したもののようなアミノ酸

50

配列の更なる改変、異種ポリペプチドに対する融合及び／又は共有修飾を含む。アミノ酸配列改変については例示的な修飾を上記に詳細に説明した。例えば、抗体変異体の正しいコンホメーションを維持することに関与しない任意のシステイン残基はまた一般にはセリンで置換して、分子の酸化安定性を改善し異常な架橋を防止することができる。逆に、システイン結合を抗体に加えてその安定性を向上することができる（特に抗体がFv断片のような抗体断片である場合）。他のタイプのアミノ酸変異体は改変されたグリコシル化パターンを有する。これは抗体に見出される一又は複数の糖鎖部分を欠失させ、及び／又は抗体中に存在していない一又は複数のグリコシル化部位を加えることによって達成することができる。抗体のグリコシル化は典型的にはN結合又はO結合の何れかである。N結合とはアスパラギン残基の側鎖への糖鎖部分の付着を意味する。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-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）がアスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的付着に対する認識配列である。よって、ポリペプチドにおいてこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると潜在的なグリコシル化部位をつくる。O結合グリコシル化はヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニン（但し5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた使用できる）への糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つの付着を意味する。抗体へのグリコシル化部位の付加は、それが上述のトリペプチド配列（N結合グリコシル化部位に対する）の一又は複数を含むようにアミノ酸配列を改変することにより簡便に達成される。改変はまた元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加又は置換によって行うこともできる（O結合グリコシル化部位の場合）。

【0197】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。例えば、抗体のFc領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国公開特許第2003/0157108号（Presta, L.）に記載される。米国公開特許第2004/0093621号（協和発酵工業株式会社）も参照のこと。抗体のFc領域に接着した炭水化物内のN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を二分する抗体は、国際公報第03/011878号、Jean-Mairet等、及び米国特許第6602684号、Umana等に参照されている。抗体のFc領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報第97/30087号、Patel等に報告される。また、抗体のFc領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報第98/58964号（Raju, S.）及び国際公報第99/22764号（Raju, S.）も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国公開特許第2005/0123546号（Umana等）を参照。

【0198】

本明細書中の好適なグリコシル化変異体はFc領域を含有し、Fc領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善されたADCC機能を有する。場合によって、Fc領域は、更にADCCを改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えばFc領域の位置298、333及び／又は334の置換（Eu残基番号付け）を更に含む。「脱フコース化」又は「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開番号2003/0157108；国際公報2000/61739；国際公報2001/29246；米国公開番号2003/0115614；米国公開番号2002/0164328；米国公開番号2004/0093621；米国公開番号2004/0132140；米国公開番号2004/0110704；米国公開番号2004/0110282；米国公開番号2004/0109865；国際公報2003/085119；国際公報2003/084570；国際公報2005/035586；国際公報2005/035778；；国際公報2005/053742；Okazaki等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；及びYamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失 Lec13 CHO細胞（Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国公開番号2003/015

7108, Presta, L; 及び国際公報 2004/056312, Adams 等、特に実施例 11)、及びノックアウト細胞株、例として - 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 (Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)) などがある。

【0199】

(xii) 抗体の組換え製造

抗体の組換え製造のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング (DNAの増幅) 又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。モノクローナル抗体をコードするDNAは直ぐに単離され、従来の手法を用いて (例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用することによって) 配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる: シグナル配列、複製開始点、一又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、及び転写終結配列である (例えば米国特許第 5534615号に記載されており、出典明記によって特別に本明細書中に援用される)。

【0200】

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンサス及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチエフォルミス(licheniformis) (例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開示されたバシリ・リチエニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)及び大腸菌W3110(ATCC27325)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

【0201】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用できる、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ; クルイペロマイセス宿主、例えばK.ラクティス、K.フラギリス(ATCC12424)、K.ブルガリカス(ATCC16045)、K.ウィッケラミイ(ATCC24178)、K.ワルチイ(ATCC56500)、K.ドロソフィラム(ATCC36906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアナス; ヤローウィア(EP402226); ピチアバストリス(EP183070); カンジダ; トリコデルマ・リーシア(EP244234); アカパンカビ; シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス; 及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリボクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽巢性コウジ菌及びクロカビが使用できる。

【0202】

グリコシル化抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウィルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドブレタ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンビクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウィルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカNPVのL-1変異体とボンビクス・モリNPVのBm-5株が公に利用でき、そのよ

10

20

30

40

50

うなウィルスは本発明においてここに記載したウィルスとして使用でき、特にスポドプテラ・フルギベルダ細胞の形質転換に使用できる。綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することができる。

【0203】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養（組織培養）中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、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（293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977))；ハムスター乳児腎細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR（CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；マウスのセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))；サルの腎細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザルの腎細胞（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）；マウス乳房腫瘍細胞（MMT060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982))；MRC5細胞；FS4細胞；及びヒト肝癌株（Hep G2）である。

10

【0204】

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

20

【0205】

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム（Ham）のF10（シグマ）、最小必須培地（MEM）、（シグマ）、RPMI-1640（シグマ）及びダルベッコの改良イーグル培地（DMEM）、シグマ）が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4767704号；同4657866号；同4927762号；同4560655号；又は同5122469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子（例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子）、塩類（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩）、バッファ（例えばHEPES）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMYCINTM）、微量元素（最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される）及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

30

40

【0206】

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔に生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成される場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された細胞の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

50

【0207】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss等, EMBO J. 5: 16571575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ (スチレンジビニル) ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び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、Bakerbond ABXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSETMクロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

10

【0208】

B. IL-17アンタゴニストの使用

本発明のIL-17アンタゴニストは、腫瘍血管新生を阻害するために単独で又は他の治療薬 (一又は複数) と組み合わせて、使われてもよい。

20

【0209】

本発明の治療方法のための一次標的は、VEGFアンタゴニスト、特に抗VEGF抗体による治療に抵抗力があることを示すか又はそのことが既知である腫瘍である。

【0210】

本発明の方法によって治療されるための疾患及び疾病の例は、腫瘍性疾患、例えば、「癌」及び「癌性」なる用語の下に本明細書中で記載されるものを含む。本発明のアンタゴニストによる治療に敏感に反応する非腫瘍性状態は、限定するものではないが、例として、望ましくない又は異常な肥大、関節炎、関節リウマチ (RA)、乾癬、乾癬のブランク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化、アテローム硬化性ブランク、心筋梗塞からの浮腫、未熟児の網膜症を含む他の増殖性及び糖尿病性の網膜症、後水晶体繊維増殖症、血管形成緑内障、加齢性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管形成、角膜移植片血管形成、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡叢血管形成、アングルの血管形成 (ルベオーシス)、眼性血管形成疾患、血管性再狭窄、動静脈奇形 (AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺の過形成 (グレーブス病を含む)、角膜及び他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性の肺損傷 / ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺滲出、大脳浮腫 (例えば、急性の脳卒中 / 非開放性頭部損傷 / 外傷と関係するもの)、滑液炎症、RAのパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大性骨形成、骨関節炎 (OA)、抵抗性腹水、多嚢胞性卵巣疾患、子宮内膜症、第3区画の体液疾患 (脾炎、区画症候群、熱傷、腸疾患)、子宮頸線維腫、早産、IBD (クローン病および潰瘍性大腸炎) のような慢性炎症、腎臓同種異系移植片拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくない又は異常な組織塊成長 (非癌)、肥満、脂肪組織質量成長、血友病関節、肥大性瘢痕、体毛成長の阻害、オスラー・ウェーバー症候群、化膿肉芽腫後水晶体線維増殖症、強皮症、トラコーマ、血管性接着、関節滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心嚢貯留液 (心外膜炎と関係しているものなど) および胸水を含む。

30

40

【0211】

本発明は、本発明のIL-17アンタゴニストが他の療法と組み合わせて投与される併用療法を提供する。組合せ治療は具体的に、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストと組み合わせた、本明細書中のIL-17アンタゴニストの投与を含む。あるいは、併用治療は、抗G-CSF抗体など、G-CSFアンタゴニストと併用した本明細書のIL

50

- 17アンタゴニストの投与を特に含む。さらに、または、あるいは、本明細書中のIL-17アンタゴニストは、様々な腫瘍性又は非腫瘍性の状態、例えば炎症細胞依存性血管形成又は腫瘍形成を治療するために、一又は複数の更なる薬剤、例えば骨髓系細胞減少薬剤、抗癌剤又は治療薬、化学療法及び/又は放射線療法、抗血管新生剤、又は抗血管新生治療薬と組み合わせて投与されてもよい。

【0212】

一実施態様では、腫瘍性又は非腫瘍性の状態は、VEGFアンタゴニスト治療に抵抗力がある、異常であるか望ましくない血管形成と関係している病理学的疾患に特徴を有する。本発明のアンタゴニストは、同じ組成物で又は異なる組成物として、目的のために有効である他の薬剤と連続して、又は組み合わせて投与されうる。あるいは、又は、さらに、本発明の複数のアンタゴニスト、薬剤および/またはアゴニストが投与されてもよい。

10

【0213】

アンタゴニストおよび/または薬剤の投与は、例えば単一の組成物として、または、同じか異なる投与ルートを使用した2以上の異なる組成物として、同時に行われてもよい。あるいは、又は、さらに、投与はいずれの順序で連続して行われてもよい。ある実施態様では、2以上の組成物の投与の間に分の日、週、月の間隔が存在してもよい。例えば、IL-17アンタゴニストが第一に投与され、その後、異なるアンタゴニスト又は薬剤、例えばVEGF及び/又はG-CSFアンタゴニストが投与されてよい。しかしながら、本発明の異なるアンタゴニスト又は薬剤の同時投与又は投与が第一に考慮される。

20

【0214】

投与される治療薬の有効量は医師又は獣医の裁量である。治療される症状を最大限管理するために用量投与及び調整がなされる。用量は、さらに、使用される治療薬の種類及び治療される特定の患者などの因子に依存するであろう。IL-17アンタゴニストの好適な用量は現在用いられているものであり、IL-17アンタゴニスト及びVEGF及び/又はG-CSFアンタゴニストなどの本発明の異なるアンタゴニストの組合せ作用(相乗作用)のために低くてもよい。ある実施態様では、阻害薬の組合せは単一の阻害薬の有効性を増強する。「増強」なる用語は、その一般的又は認可された用量での治療薬の有効性の改善を指す。本明細書中の「薬学的組成物」と題した項目も参照のこと。

【0215】

癌との関連の抗血管新生療法は、腫瘍増殖を支える栄養分の供給に必要な腫瘍血管の発達を阻害することを目的とした癌治療方略である。血管新生が原発性腫瘍増殖と転移の療法に伴うので、本発明によって提供される抗血管新生療法は、原発部位での腫瘍の新生物性増殖の阻害と二次部位での腫瘍の転移の予防が可能であり、ゆえに他の療法によって腫瘍の攻撃がなされる。本発明の一実施態様では、抗癌剤又は膠癌療法は抗血管新生剤である。他の実施態様では、抗癌剤は化学療法剤である。

30

【0216】

多くの抗血管新生剤が同定されており、当分野で公知であり、本明細書中に挙げるもの、例えば定義の項目に挙げるもの、例えばCarmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara等, Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004); 及びSato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)に挙げるものなどがある。また、米国特許公開第20030055006号を参照。一実施態様では、本発明のIL-17アンタゴニストは、抗VEGF中和抗体(又は断片)及び/又は他のVEGFアンタゴニストないしはVEGFレセプターアンタゴニスト、例として、限定するものではないが、例えば、可溶性VEGFレセプター(例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ニューロピリン(例えば、NRP1、NRP2))断片、VEGFないしはVEGFRを遮断することができるアプタマー、中和抗VEGFR抗体、VEGFRチロシンキナーゼ(RTK)の低分子量インヒビター、VEGFのアンチセンス方略、VEGFないしはVEGFレセプターに対するリボザイム、VEGFのアンタゴニスト変異体、及びこれらのいずれかの組み合わせと組み合わせて用いられる。あるいは又はさらに、2つ以上の血管新生インヒビターは、場合によってVEGFアンタゴニストと本発明の他の薬剤に加えて患者に

40

50

同時に投与されてもよい。ある実施態様では、一又は複数の更なる治療薬、例えば抗癌剤は、本発明の薬剤、VEGFアンタゴニスト及び／又は抗血管新生剤と組み合わせて投与されてもよい。

【0217】

本発明のある態様では、本発明のIL-17アンタゴニストによる併用腫瘍療法に有用な他の治療剤には、他の癌療法（例えば、外科的治療、放射線処置（例えば、放射活性物質の照射又は投与を伴う）、化学療法、本明細書中に挙げる抗癌剤及び当分野で公知の抗癌剤、又はこれらの組み合わせ）が含まれる。あるいは又はさらに、本明細書中に開示した同じ又は2以上の異なる抗原を結合する2以上の抗体が患者に同時に投与されてもよい。また、患者に一又は複数のサイトカイン、例えばG-CSF抗体などを投与することが有益であることもある。

10

【0218】

ある態様では、本発明は、有効量のIL-17のアンタゴニストと一又は複数の化学療法剤を、癌に罹りやすい患者又は癌と診断された患者に投与することによって、耐性腫瘍増殖又は癌細胞の増殖を遮断する又は低減する方法を提供する。様々な化学療法剤が本発明の併用治療方法で用いられてもよい。考慮する化学療法剤の例示的及び非限定的リストを本明細書中の「定義」の項目に示す。

【0219】

当業者によって理解されるように、化学療法剤の適切な用量は、一般的に、化学療法剤が単独ないしは他の化学療法剤と組み合わせて投与される臨床治療に既に用いられる用量の程度であろう。用量の変更はおそらく治療する症状に応じて行うであろう。治療を行う医師は、個々の被検体ごとに適当な用量を決定することが可能であろう。

20

【0220】

また、本発明は、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を阻害するか又は予防するための方法及び組成物を提供する。再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖は、一又は複数の現在利用可能な治療法（例えば、癌治療、例として化学療法、放射線療法、外科治療、ホルモン療法及び／又は生物学的療法／免疫療法、抗VEGF抗体療法、特に特定の癌のための標準的な治療投薬計画）を施されている患者ないしはこれらによって治療された患者が臨床的に治療に不十分であるか、又は患者がこのような治療からもはやいかなる有用な効果を得ておらず更なる有効な治療を求める場合の症状を表すために用いられる。本明細書中で用いるように、この表現も「非応答性／難治性」患者の症状を指すものであり、例えば、副作用に苦しむ治療に応答する患者、耐性を生じる患者、治療に応答しない患者、治療に満足に応答しない患者などを表す。様々な実施態様では、癌は、癌細胞の数が有意に低減しなかった、又は増加した、又は腫瘍の大きさが有意に減少しなかった、又は大きくなった、又は癌細胞のサイズないしは数に何らかの減少が生じなかった、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖である。癌細胞が再発性腫瘍増殖であるか再発性癌細胞増殖であるかの決定は、文脈上で「再発」又は「難治性」又は「非応答性」の当分野で容認される意味を用いて、癌細胞に対する治療の有効性をアッセイするための当分野で公知の任意の方法によってインビトロないしはインビボでなされうる。再発性腫瘍増殖のある例は抗VEGF治療に耐性のある腫瘍である。

30

40

【0221】

本発明は、一又は複数の本発明のアンタゴニストを投与して、被検体の再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を遮断又は低減することによって、被検体の再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を遮断又は低減する方法を提供する。ある実施態様では、IL-17アンタゴニストは癌治療剤に続いて投与されてもよい。ある実施態様では、本発明のIL-17アンタゴニストは癌療法、例えば化学療法と同時に投与される。あるいは又はさらに、IL-17アンタゴニスト療法は他の癌療法と交互に行い、いずれの順序でも実施可能である。また、本発明は、癌を有する傾向にある患者の癌の発症や再発を予防するために一又は複数の阻害性抗体を投与するための方法も包含する。通常、被検体は、癌療法を施されたか同時に施されている。一実施態様では、癌療法は、抗血管新生剤、例えばVEGF

50

アンタゴニストによる治療である。抗血管新生剤は当分野で公知のものや本明細書中の定義の項目に見られるものなどがある。一実施態様では、抗血管新生剤は、抗 V E G F 中和抗体ないしは断片（例えば、ヒト化 A 4 . 6 . 1、アバスチン（登録商標）（ジェネンテック、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州）、Y 0 3 1 7、M 4、G 6、B 2 0、2 C 3 など）である。例として、米国特許第 6 5 8 2 9 5 9 号、同第 6 8 8 4 8 7 9 号、同第 6 7 0 3 0 2 0 号、国際公開第 9 8 / 4 5 3 3 2 号、同第 9 6 / 3 0 0 4 6 号、同第 9 4 / 1 0 2 0 2 号、欧州特許第 0 6 6 6 8 6 8 号 B 1、米国公開特許第 2 0 0 3 0 2 0 6 8 9 9 号、同第 2 0 0 3 0 1 9 0 3 1 7 号、同第 2 0 0 3 0 2 0 3 4 0 9 号、同第 2 0 0 5 0 1 1 2 1 2 6 号、Popkov等、Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)、及び国際公開第 2 0 0 5 0 1 2 3 5 9 号を参照。更なる薬剤は、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を遮断又は低減するために、I L - 1 7 アンタゴニスト及び本発明のアンタゴニストと組み合わせて投与することができる。例として本明細書中の「併用療法」と題する項目を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0222】

一実施態様では、本発明の I L - 1 7 アンタゴニストは、一又は複数の骨髄系細胞減少薬剤、例えば限定するものではないが、G r 1、好中球エラスターゼ、M C P - 1、M I P - 1、U R C G P 又は U R R T P の発現を低減する治療法と組み合わせて投与される。本発明の I L - 1 7 アンタゴニストと組み合わせて使用する骨髄系細胞減少薬剤は、具体的に、G r 1 アンタゴニスト、C d 1 1 B アンタゴニスト、C D 1 8 アンタゴニスト、エラスターゼインヒビター、M C P - 1 アンタゴニスト、M I P - 1 アンタゴニスト、クロドロネートを単独又はいずれかの組合せで含む。

【0223】

さらに、本発明の I L - 1 7 アンタゴニストは、ホルモン剤、放射線剤及び化学療法剤と組み合わせて投与され、これによって癌細胞を一又は複数の薬剤に対して再感作してもよい。この一又は複数の薬剤は転移の阻害を含め、癌の治療又は管理をするために次いで投与される（又は投与され続ける）。

【0224】

I L - 1 7 アンタゴニストによる治療に対する腫瘍感度は、U R C G P、D R C G P、U R R T P 又は D R R T P をコードする核酸に相同な一又は複数の核酸配列を発現することが可能な細胞を含む被検体から一又は複数の試験細胞集団を提供することによって評価されてもよい。配列の発現は参照細胞集団と比較される。参照細胞集団中の細胞の I L - 1 7 アンタゴニスト感受性状態が知られている限り、いずれの参照細胞集団が使われてもよい。比較は、同時又は時間的に異なる時に測定される試験及び参照試料について行われてよい。後者の例は収集された発現情報、例えば配列データベースの使用であり、この配列データベースは感受性の状態が既知である細胞における既知の配列の発現レベルについての情報を集めたものである。本発明の特定の実施態様では、参照細胞集団は、C D 1 1 b + G r 1 + 骨髄系細胞について濃縮されている。本発明の特定の実施態様では、参照細胞集団は、腫瘍細胞について濃縮されている。

【0225】

また、V E G F アンタゴニストによる治療に抵抗力がある腫瘍は、2 0 0 7 年 3 月 2 8 日に出願の同時係属出願番号 1 1 / 6 9 2 6 8 2 号において提供される診断用マーカー群を使用して同定されてもよい。例えば、一マーカー群は、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、1 0 以上、1 2 以上、1 3 以上、1 4 以上、1 5 以上、2 0 以上、又はすべての群の分子を含んでもよい。分子は、タンパク質又は発現および/または活性の変化を有するタンパク質をコードする核酸であって、N o t c h 2、D M D 8、M C P - 1、I T G B 7、G - C S F、I L - 8 R、M I P 2、M S C A、G M - C S F、I L - 1 R、M e g - S F、H S P 1 A、I L - 1 R、G - C S F R、I L 1 0 - R 1、E r b - 2 . 1、カベオリン 3、S e m c a p 3、I N T G 4、T H B S P - 4、E r b B 3、J A M、E n g、J A M、E n g、J A M - 2、P e c a m 1、T l r 3、好中球エラスターゼ、C D 1 4、e x p i、I l - 1 3 R、L D L R、T L R - 1

、R L F、E n d o - L i p、S O C S 1 3、F G F 1 3、I L - 4 R、T H B S 1、C r e a 7、アクアポリン - 1、S C F 3 8、A P O E、F A B P、I L - 1 1 R、I L - 1 R I I、I F N T M 1、T N F R S F 1 8、W N T 5 A、分泌型キャリア膜 1、H S P 8 6、E G F R、E p h R B 2、G P C R 2 5、H G F、アンジオポイエチン様 - 6、E p h - R A 7、セマフォリン V 1 b、ニューロトロフィン 5、C l a u d i n - 1 8、M D C 1 5、E C M、A D A M T S 7 B、N C A M - 1 4 0、フィブロネクチンタイプ I I I、W I P、C D 7 4、I C A M - 2、J a g g e d 1、I t g a 4、I T G B 7、T G F - B I I - R、T G F b I E P、S m a d 4、B M P R 1 A、C D 8 3、D e c t i n - 1、C D 4 8、E - セレクチン、I L - 1 5、サイトカインシグナル伝達 4 のサブレッサー、C y t o r 4、C X 3 C R 1、I G F 2、H S P 9 A、F G F 1 8、E L M 1、L e d g f a、スカベンジャーレセプタータイプ A、マクロファージ C - タイプレクチン、P i g r 3、マクロファージ S R T - 1、G プロテイン - 結合レセプター、S c y A 7、I L - 1 R 2、I L - 1 誘導タンパク質、I L - 1、I L I X P r e c u r o r、T G F - B、F I Z Z 1、W f s 1、T P 1 4 A、E M A P、S U L F - 2、細胞外マトリックス s 2、C T F G、T F P I、X C P 2、R a m p 2、R O R -、エフリン B 1、S P A R C - 様 1 及びセマフォリン A から選択される。本発明の一実施態様では、タンパク質を検出する抗体が提供される。一実施態様では、分子は、C D 1 1 b + G r 1 + 細胞から得られ、例えば、I L - 1 3 R、T L R - 1、E n d o - L i p、F G F 1 3、I L - 4 R、T H B S 1 および C r e a 7 を含む。他の実施態様では、分子は、耐性腫瘍から得られ、例えば、M S C A、M I P 2、I L - 8 R、G - C S F、I L 1 0 - R 2、T H B S P - 4 および J A M - 2 を含む。

10

20

【0226】

C . 薬学的組成物及び投与

単独又は他の治療薬と組み合わせた本発明の I L - 1 7 アンタゴニスト、例えば抗 I L - 1 7 抗体は、ヒト患者に、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路、及び / 又は皮下投与などにより投与される。

【0227】

ある実施態様では、本発明の治療は I L - 1 7 アンタゴニストと V E G F アンタゴニスト及び / 又は一又は複数の骨髄系細胞減少剤ないし化学療法剤との併用投与を伴う。一実施態様では、付加的な抗癌剤、例えば、一又は複数の異なる抗血管新生剤、一又は複数の化学療法剤などが存在する。また、本発明は、複数のインヒビター、例えば同じ抗原に対する複数の抗体又は本発明の異なるタンパク質に対する複数の抗体の投与を考慮する。一実施態様では、異なる化学療法剤の混合物が、本明細書中の I L - 1 7 アンタゴニストと投与される。併用投与は、別々の製剤又は単一の製薬的製剤による同時投与、及び / 又はいずれかの順序での連続投与が含まれる。例えば、V E G F 又は G - C S F アンタゴニストは、I L - 1 7 アンタゴニストの投与の前、後、交互に行われるか、又はこれらと同時になされうる。一実施態様では、両方（又はすべて）の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間がある。

30

【0228】

疾患の予防又は治療のために、本発明の薬剤の好適な用量は、上記に定義した治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及びインヒビターへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。インヒビターは一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。併用療法投与計画では、本発明の組成物は治療的有效量又は治療的相乗作用量で投与される。本明細書中で用いられるように、治療的有效量は、本発明の組成物の投与及び / 又は I L - 1 7 アンタゴニスト及び一又は複数の他の治療剤の同時投与により標的とする疾患又は症状が減少又は阻害される量である。薬剤の組み合わせの投与効果は付加的であってもよい。一実施態様では、投与の結果は相乗効果である。治療的相乗作用量は、特定の疾患に関係する状態又は症状を相乗作用的に又は有意に減少ないし除去するために必要な

40

50

、IL-17アンタゴニストと一又は複数の他の治療剤、例えばIL-17アンタゴニスト及び場合によって骨髓系細胞減少剤、化学療法剤及び/又は抗癌剤の量である。

【0229】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、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IL-17アンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、G-CSFアンタゴニスト、骨髓系細胞減少剤、化学療法剤、又は抗癌剤が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。しかしながら他の用量処方があるかもしれない。典型的には、臨床医は、必要とされる生物学的な効果が生じる用量（一又は複数）が達成されるまで本発明の分子（一又は複数）を投与するであろう。本発明の治療の経過は従来の技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

10

【0230】

例えば、血管新生インヒビター、例えばアバスチン（登録商標）（ジェネンテック）などの抗VEGF抗体の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。他の例では、このような化学療法剤の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。化学療法の調製及び投与計画はChemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載される。

20

【0231】

本発明の治療の有効性は、新生物ないし非新生物疾患を治療する際に共通に用いられる様々なエンドポイントによって決定することができる。例えば、癌治療は、限定するものではないが、腫瘍再発、腫瘍重量ないしサイズの収縮、進行時間、生存期間、進行がない生存、全体の応答速度、応答の継続期間、生活の質、タンパク質の発現及び/又は活性などで評価されてもよい。本明細書に記載の抗血管新生剤は腫瘍の血管をターゲットとするのであって、新生物細胞自体をターゲットとする必要はないので、抗癌剤の特定のクラスを示し、それゆえに薬剤に対する臨床応答の特定の測定と定義を必要としうる。例えば、二次元分析において50%より大きい腫瘍の収縮は応答を示す標準のカットオフである。しかし、本発明のインヒビターは原発性腫瘍を収縮することなく転移の拡がりを阻害するか、又は単に腫瘍抑制(tumouristatic)効果を及ぼしうる。したがって、例えば血管新生の血漿又は尿路マーカーの測定及び放射線画像法による応答の測定などの、治療の有効性を決定する手法が用いられうる。

30

【0232】

本発明の他の実施態様では、上記の疾病の治療又は診断に有用な材料を具備する製造品が提供される。該製造品は容器、ラベル及びパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。一実施態様では、容器は、症状を治療するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる（例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる）。組成物中の少なくとも一つの活性剤はVEGFモジュレーターであり、少なくとも2つ目の活性剤は骨髓系細胞減少剤及び/又は化学療法剤である。容器に添付又は付属するラベルは、組成物が選択した症状の治療に使用されることを示す。さらに製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の容器を更に具備してもよい。

40

【0233】

本発明の更なる詳細は以下の非限定的な実施例によって例示される。以下の実施例において、スチューデントのt検定が、すべての実験において有意差を決定するために使用された。P値が < 0.05 は有意と考えられた。

【実施例】

50

【0234】

実施例1 - 抗VEGF耐性及び抗VEGF感受性腫瘍細胞の分泌タンパク質のプロファイル

その微小環境を確立し指示することを担う腫瘍由来の因子を同定するために、以前に樹立された抗VEGF耐性及び感受性腫瘍細胞株間の分泌タンパク質のプロファイルを比較した。マウス腫瘍細胞株(EL4、Tib-6)は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から入手した。EL4は、抗VEGF耐性であるT細胞リンパ腫細胞株であり、一方Tib-6は抗VEGF-感受性であるB細胞リンパ腫細胞株である。これらは両方ともL-グルタミン、10%ウシ胎児血清(FBS)(Sigma, St. Louis, MO)を補充したDMEM(インビトロジェン、カールスバッド、CA)中で培養し、5% CO₂、湿度80%のインキュベーター中で37℃に維持された。

10

【0235】

腫瘍細胞株を72時間還元血清DMEM(1%FBS)中で 1×10^6 /mlの密度で6ウェルプレート中で増殖させた後に、EL4及びTib-6細胞株条件培地を収集した。細胞生存率及び総細胞数は、調整期間中の細胞数の変化を説明するためにVi-Cell XR(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を用いて測定した。全てのデータは、調整期間の終了時に、細胞数によって正規化した。

【0236】

32のマウスサイトカイン及び増殖因子に特異的な抗体のパネルを用いて馴化培地内に含まれる腫瘍細胞分泌因子を調べた(実施例2に記載のBioRad社サイトカインビーズアッセイ)。腫瘍細胞が浸潤する間質細胞と接触する状態になるインビボでの条件をモデル化するための試みにおいて、我々は、腫瘍と主要な間質細胞型、線維芽細胞との間の相互作用を研究するために共存培養アッセイを用いた。これは、細胞-細胞相互作用を研究する最も単純なシステムである。マウスから単離した正常皮膚繊維芽細胞は、最も密接にインビボでの設定を模倣する共培養実験に用いた。共培養アッセイにおいて、何れの細胞型の遺伝子発現において検出される変化は容易に検出され、それは異なる細胞型が接触または近接している場合に現れる。

20

【0237】

図1Aに示すように、IL-17は、インビトロで抗VEGF感受性(Tib-6)腫瘍細胞に対して抗VEGF耐性(EL4)腫瘍細胞で見いだされた最も豊富な分泌因子であることを実証している。図1Bは、抗VEGF難治性EL4細胞および正常皮膚繊維芽細胞(NSF)の共培養物中でIL-6およびG-CSFレベルが上昇していることを示している。これらの知見は、抗VEGF耐性及び感受性細胞株は、それらの分泌タンパク質のプロファイルが異なることを示唆しており、最も顕著なのは、耐性EL4細胞株の中で最も豊富に発現するサイトカインとしてのIL-17である。更に、炎症促進性サイトカイン、IL-6およびG-CSFは、NSFと耐性腫瘍細胞株を共培養すると強力にアップレギュレートされ、腫瘍および間質線維芽細胞間の細胞-細胞相互作用は、炎症促進性サイトカインの発現を誘導することができることを示唆している。

30

【0238】

実施例2 - 腫瘍細胞はパラクリン機構を介して線維芽細胞において炎症促進性遺伝子の発現を誘導する

40

RNAサンプルの調製および定量的逆転写酵素-PCR(qRT-PCR)分析:

DNAを含まない総RNAを、製造業者のプロトコルに従ってRNeasyキット(キアゲン社、ドイツ)を用いて単離した。一段階定量的逆転写-PCRは、スーパースクリプトIIブラチナワンステップ定量RT-PCRキット(インビトロジェン、カールスバッド、CA)又はTaqManワンステップRT-PCRマスターミックス(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて50μLの総容量で行った。下記のTaqMan遺伝子発現アッセイプライマー及びプローブミックスを以下のマウスの遺伝子のために使用した: IL-17(アッセイID: Mm00439619__m1), IL-6(アッセイID: Mm01210733__m1), Bv8(アッセイID: Mm00450080

50

__m1), G-CSF (アッセイID: Mm00438334 __m1), MMP-9 (アッセイID: Mm00442991 __m1), S100a8 (アッセイID: Mm00496696 __g1), S100a9 (アッセイID: Mm00656925 __m1), GAPDH (アッセイID: Mm99999915 __g1). 分析は、製造業者の推奨プロトコールに従って標準ABI7500機(インビトロジェン)で行った。

【0239】

サイトカインビーズアッセイ及びELISA:

EL4細胞(1×10^6 細胞/ml)及び正常皮膚繊維芽細胞(NSF)(3.3×10^5 細胞)を単独又は1:3(NSF/EL4)比で一緒にのどちらかで、6ウェルプレートに72時間3通りに培養し;上清を収集し、Bio-Plex Pro磁性サイトカイン、ケモカイン、及び増殖因子アッセイシステム(BioRad, Hercules, CA)を用いて分析した。細胞は還元血清培地(1%FBS)中で培養した。マウスIL-17A、G-CSF、IL-6のレベルをQuantikine ELISAキットにより測定した(R&D Systems, Minneapolis, MN)。

【0240】

FP標識化EL4腫瘍細胞は、72時間正常な皮膚繊維芽細胞(NSF)と共培養され、その後繊維芽細胞から腫瘍細胞がFACS単離され、qRT-PCRにより遺伝子発現の解析がなされた。図2Aに示されるG-CSF(Csf3)及び図2BのIL-6の発現は、単一培養細胞に対して抗VEGF耐性細胞株EL4と共培養したときに誘導され、正常繊維芽細胞において観察された。プリソート分析を、FACSソーティングにより導入された潜在的アーティファクトの調製のために実施した。G-CSF及びIL-6発現の細胞供給源を決定するために、GFP標識腫瘍細胞は、非標識繊維芽細胞との共培養及びqRT-PCRによってこれらの細胞型における遺伝子発現の変化をプロファイリングの後にFACS選別した。このデータは、細胞-細胞相互作用は、共培養の際に腫瘍細胞に対する繊維芽細胞コンパートメント内に、IL-6及びG-CSFの両方の誘導を生じることを明らかにした。同様に、NSFがEL4馴化培地で刺激されるときに、繊維芽細胞においてG-CSF及びIL-6の発現の誘導も観察され(データ非表示)、細胞間相互作用は厳密に必要ではなく、そして腫瘍細胞分泌因子がNSFにおけるG-CSFとIL-6の上方制御を誘発するのに十分であることを示唆している。まとめるとこのデータは、腫瘍細胞は、隣接する繊維芽細胞に、パラクリン機構を介して、G-CSFとIL-6を含む炎症促進性サイトカインの発現及び分泌へと指示しているかもしれないことを示唆している。

【0241】

実施例3-IL-17中和は繊維芽細胞におけるEL4誘導型G-CSF発現を阻害する

NSFにおいて観察されたG-CSF no誘導がIL-17依存性であり得るかどうかに対処するために、実施例1に記載したようにEL4条件培地を回収し、次いで、IL-17に対する中和抗体と共にプレインキュベートし、96ウェルのクラスターに播種したNSFに添加する前に標的の可溶性因子の中和を可能とした。IL-17及び様々な濃度のG-CSF(TNF-及びIL-1)の他の2つの既知の誘導物質に対する中和抗体を、全量200µl中、37で24時間の共培養において、EL4/繊維芽細胞とインキュベートした。このインキュベーションの後、上清の50µlを各ウェルから採取し、ELISA希釈液50µlで希釈し、ELISAによりMG-CSFのレベルを試験した。図3に示すように、IL-17に対する中和抗体は、EL4/繊維芽細胞共培養物の条件培地中の分泌されたG-CSFのレベルの最も有意な減少を与え、IL-17は、関連する正常な繊維芽細胞において炎症性サイトカインの分泌を誘導することの原因となるドミナントな腫瘍由来因子であり得ることを示唆している。

【0242】

実施例4-腫瘍微小環境におけるIL-17の機能

メスのマウス(6~12週齢)が指示されるように用いられた: C57BL/6, IL-17RC-/-, C57BL/6WT同腹仔はジェネンテック社で特定の病原体を含まない

10

20

30

40

50

条件下で飼育され、維持された。メスのWT C57BL/6マウスはチャールズリバー研究所(Hollister, CA)から購入した。動物が関与する手順は、ジェネンテック社の施設内動物管理使用委員会によってレビューされ、承認され、関連する規制基準に準拠する。実施例1に記載したようにEL4腫瘍細胞を培養した。

【0243】

この実験で用いた腫瘍のマウスモデルは次のように記述される：成長因子低減マトリゲル(BDバイオサイエンス)の100 μ l中のEL4腫瘍細胞(2.0×10^6)を野生型(C57/BL6 WT)またはIL-17受容体ノックアウト型(IL-17rc KO)の何れかの異なる遺伝子型のマウスの背部側腹部に皮下接種した。抗体は、対応する図の説明文に示された用量で1週間に2回腹腔内注射した。対照抗体、抗ブタクサ、抗VEGFモノクローナル抗体B20-4.1.1(Liangら、2006)又は抗IL-17Aでの処置は、腫瘍細胞接種後2日目に開始した。全ての腫瘍増殖実験を少なくとも3回実施し、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。腫瘍体積を楕円体の体積の式($0.5 \times L \times W^2$ 、ここでLは長さでありWは幅である)を用いて一日おきに計算した。

【0244】

図4Aは、対照抗体(抗ブタクサ、10 mg/kgを腹腔内(IP)、週二回)又は抗VEGF(10 mg/kg、IP、週二回)で処置されたC57/BL6 WT及びIL-17rc-/-マウスにおけるEL4腫瘍の増殖を示す。処置は腫瘍細胞接種の48時間後に開始した。データは平均値 \pm SEMとして示される。対照処置群では、WTマウスと比較して末期EL4腫瘍体積はIL-17rc-/-マウスで~50%減少し、宿主間質へのIL-17シグナル伝達が腫瘍増殖において重要な役割を果たすことを示唆している。そして抗VEGFによる単独療法は、WTマウスでEL4腫瘍の縮小にわずかな影響を持つのに対し、IL-17rc-/-マウスでは~80%の腫瘍増殖阻害をもたらした。データは平均値 \pm SEMとして示される。*は、抗VEGF抗体で処置されたWT及びIL-17rc-/-動物におけるEL4腫瘍間の有意な相違($P < 0.0001$)を示している。

【0245】

図4Bは、対照抗体(抗ブタクサ)、抗VEGF、抗mIL-17、及び抗mIL-17/抗VEGFの組み合わせで処置されたC57/BL6 WTマウスにおけるEL4腫瘍の増殖を示す。全ての抗体を週2回、腹腔内(IP)に、10 mg/kg投与した。処置は腫瘍細胞接種の48時間後に開始した。データは平均値 \pm SEMとして示される。VEGFが単独で投与されると、末期腫瘍体積は僅かに減少したが、抗IL-17が抗VEGFと組み合わせると、腫瘍体積は~50%だけ減少し、IL-17の阻害は抗VEGF処置に対する感受性を与えることを示唆している。データは平均値 \pm SEMとして示される(Shojaei et al 2009)。(*)は抗VEGFで処置されたEL4腫瘍と抗mIL-17との組み合わせで処置されたEL4腫瘍の間における有意差($P < 0.05$)を示す。まとめると、図4と4Bは、腫瘍微小環境におけるIL-17の機能は腫瘍増殖を促進することができ、抗VEGF治療に対する耐性に必要とされ得ることを実証している。

【0246】

更に、処置に感受性のある腫瘍細胞株であるTib-6が、マウスIL-17A(Tib6-IL17と表記)で形質導入され、免疫不全(nu/nu)レシピエントマウスにおける抗VEGF処置に対するその応答について試験されると、VEGF阻害に対する腫瘍耐性を媒介するIL-17の役割が確認された。対照である、(Tib6-neoと表記)ネオマイシン形質導入Tib6(Tib6-neoと表記)担腫瘍マウスと比較して、循環性及び腫瘍IL-17Aの両方で有意に高いレベルであった。相応して、G-CSFの高いレベルはまた、Tib6-IL17腫瘍においても検出され、これらの腫瘍は、Tib6-neo腫瘍よりもインビボでより多くのCD11b+Gr1+細胞をリクルートした。移植されたTib6-IL17腫瘍はTib6-neo腫瘍と比較して腫瘍増

10

20

30

40

50

殖速度に有意な増加を示しなかったものの、これらの腫瘍は、4つの独立した安定な T i b - 6 / I L - 17 クローン間で、試験された 2 - T i b 6 / n e o の対照クローンと比較して、抗 V E G F 処置に対して有意により耐性であった (図 11)。更に n u / n u マウスの機能獲得型データは、I L - 17 のエフェクター機能は、T 細胞から付加的インプットとは無関係に発生することができることを示しており、唯一 I L - 17 の機能だけが、抗 V E G F 処置に対する耐性を駆動する炎症促進性ネットワークの媒介に必要な十分であることを示唆している。

【0247】

実施例 5 - E L 4 担腫瘍マウスにおける I L - 17 のシグナル伝達実験

実施例 2 に記載したように、ナイーブ及び担腫瘍マウスの血清中の循環サイトカインレベルを測定した。前述のように B V 8 濃度を E L I S A により測定した (Shojaei et al 2009)。この実験で用いた腫瘍のマウスモデルは実施例 4 記述される通りである。図 5 A - C は、対照抗 プタクサ抗体 (R a g , 10 m g / k g) 又は抗 V E G F 抗体 (B 20 , 10 m g / k g) のどちらかで処置された E L 4 担持 W T 及び I l - 17 r c - / - マウスにおける m G - C S F , m B v 8 及び m I L - 17 A の血清レベルを示す。データは平均値 ± S D として示される。このデータは I L - 17 及び G - C S F のレベルはナイーブマウスに対して担癌マウスでサイトカインレベルを比較した場合、腫瘍の存在に関連していることを示している。第二に、G - C S F および血管新生促進因子 B V 8 両方のレベルは、I L - 17 R C - / - 宿主において両方の因子がナイーブレベルに戻るため、宿主細胞への I L - 17 シグナル伝達に依存すると思われる。更に、W T マウスを I L - 17 R C - / - マウスと比較して、循環で見いだされた I L - 17 のレベルの低下は無く、I L - 17 の発現は腫瘍固有であることを示唆している。まとめると、この実験データは、宿主間質細胞への I L - 17 シグナル伝達は、担腫瘍マウスでは炎症促進性 / 血管新生促進サイトカインのレベルを制御することを示している。

【0248】

上記のように E L 4 腫瘍担持マウスを用いて、白血球を担腫瘍マウスから単離し、次のように C D 11 b + G r 1 + 細胞をマウスの脾臓から単離した：単一細胞懸濁液をナイーブマウス及び担腫瘍マウスから単離した脾臓から調製し、C D 11 b + G r 1 + の集団を、製造業者によって提供されるプロトコルに従って、抗 G r - 1 - P E コンジュゲート続いて抗 P E マイクロビーズ (Miltenyi Biotech) により第一標識細胞別に選別した。品質管理のために、選別された細胞のアリコートをし、抗 C D 11 b および抗 G r 1 で染色し、そして C D 11 b + G r 1 + 細胞の純度 (90% 以上) を確保するために F A C S 分析により分析した。

【0249】

骨髄単核細胞 (B M N C)、末梢血単核細胞 (P B M N C)、及び腫瘍細胞のフローサイトメトリーは腫瘍を移植したマウスから採取した。対照により処置され及び抗 V E G F により処置されたマウスからの腫瘍を単離し、かみそりの刃で腫瘍を切り刻み、機械的に破碎し、コラゲナーゼ / ディスパーゼ及び D N A s e (Roche, Basel, Switzerland) で消化して、37 °C で 1 時間、1 m g / m l の増殖培地中で均質化することにより単一細胞懸濁液を得た。赤血球を、A C K (Lonza, Basel, Switzerland) 溶解緩衝液を用いて溶解し、ラット抗マウス C D 11 b 及び G r - 1 抗体で染色した (B D バイオサイエンス、サンノゼ、カリフォルニア州)。死滅細胞を除去するため、L S R I I B F A C S 装置 (B D バイオサイエンス) 上でのデータ取得及び F l o w J o ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を用いた解析の前に、ヨウ化プロピジウム (Sigma, St. Louis, MO) を全てのサンプルに添加した。

【0250】

免疫抑制未熟骨髄細胞は C D 11 b + / G r 1 + 二重陽性細胞として定義され、腫瘍増殖と関連しており、(Gabrilovich & Nagaraj 2009) に総説される。G - C S F 及び B V 8 は C D 11 b + G r 1 + 細胞を補充、動員し、抗 V E G F 抗体に対する腫瘍抵抗性を付与することが報告されているので (Shojaei et al 2009)、E L 4 担腫瘍マウスにおける G -

10

20

30

40

50

C S F 及び B V 8 レベルの上昇が、抗 V E G F に対する耐性を媒介する際に C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の補充に同様に關与しているかどうかを調べた。免疫抑制性未熟骨髓細胞は G r 1 + / C D 1 1 b + 二重陽性細胞として定義され (図 6)、図 7 A - C に示すように定量化され、ナイーブマウスと比較して担腫瘍マウスにおいてフローサイトメトリー分析によって決定されるように、循環への C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の動員を実証している。更に、担癌 I L - 1 7 R C - / - マウスの循環中に見いだされた C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の有意な低下によって示されるように、C D 1 1 b + G r 1 + の動員は、腫瘍微小環境への I L - 1 7 のシグナル伝達に依存している。これまでの研究では、脾臓の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞は腫瘍の増殖に寄与すると示唆している (Kusmartsev & Gabrilovich 2002)、(Bronte et al 2000)、担腫瘍マウスの脾臓を調べ、W T 宿主に比較して I L - 1 7 R C - / - で脾臓の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の減少が観察された。図 7 A - C でのフローサイトメトリー結果の定量化は、W T 宿主と比べて I L - 1 7 R C - / - では腫瘍へ補充される C D 1 1 b + G r 1 + 細胞は少ないことを実証している。まとめると、この実験データは、E L 4 担腫瘍マウスにおいて、宿主間質への I L - 1 7 のシグナル伝達が、C D 1 1 b + G r 1 + 免疫抑制性未熟骨髓細胞の動員及び腫瘍浸潤に必要となり得ることを実証している。

10

【 0 2 5 1 】

実施例 6 - I L - 1 7 は、腫瘍促進機能のために必要であり得る

抵抗性の腫瘍を有するマウス由来の脾臓の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞に起因した腫瘍促進表現型を更に探索し、I L - 1 7 シグナル伝達は、宿主の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の表現型をプライミングする役割を果たしているかどうかを更に理解を得るために、G r 1 + 細胞を E L 4 担癌マウスの脾臓から単離し、実施例 5 に記載したように行った。脾臓の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の純度を検証した後、これらの細胞を L P S の存在下または非存在下で一晩培養し、続いて B v 8 (図 8 A) などの血管新生促進遺伝子、及び S 1 0 0 A 8 (図 8 B)、S 1 0 0 A 9 (図 8 D) 及び M M P 9 (図 8 C) などの腫瘍促進遺伝子の発現について q R T - P C R により q R T - P C R 分析を行った。W T 担腫瘍マウスの C D 1 1 b + G r 1 + 細胞は、I L - 1 7 R C - / - 宿主の脾臓に見られる C D 1 1 b + G r 1 + と比較して、より高レベルの腫瘍促進遺伝子のサブセットを発現し、I L - 1 7 は、宿主の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の腫瘍促進表現型に決定に關与するプライミングシグナルとして作用している可能性があり、I L - 1 7 のシグナル伝達は、宿主の C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の抗 V E G F 耐性の表現型に寄与することを示唆している。

20

30

【 0 2 5 2 】

抗 V E G F 不応性を媒介する G - C S F の必要性を試験するために、抗 V E G F 耐性細胞株 E L 4 を、全ての間質宿主細胞が G - C S F シグナル伝達を欠損している、同系の G - C S F 受容体ノックアウト C 5 7 B L / 6 レシピエント (C s f 3 r - / -、以後 G C S F R K O とする) へ移植した。G - C S F シグナル伝達は E L 4 腫瘍の増殖を変化させるようには見えなかったが、このシグナル伝達軸が、抗 V E G F 治療に対する腫瘍不応性を媒介において、並びに骨髓からの C D 1 1 b + G r 1 + 細胞の動員及び腫瘍微小環境への補充において本当に必要であったことが観察された。まとめると、このデータは、腫瘍微小環境中への C D 1 1 b + G r 1 + の動員と補充を介して抗 V E G F 耐性の媒介における I L - 1 7 - G - C S F シグナル伝達カスケードの必要性を決定的に実証している。

40

【 0 2 5 3 】

実施例 7 - 平均血管密度を測定する

対照抗体 (抗ブタクサ) または抗 V E G F 抗体 (B 2 0) で処置された、W T 及び I L - 1 7 r c K O 動物由来の E L 4 腫瘍を以下のように免疫染色した。腫瘍サンプルは、最適な切断温度 (O C T、サクラファイン) に包埋し、ドライアイス浴中で凍結させた。腫瘍切片を、クライオスタット (ライカマイクロシステム) 中で切断 (1 0 μ m) した。切片を 1 時間、2 0 ° で乾燥させ、次いで - 2 0 ° で 1 0 分間、アセトン中で固定した。空気乾燥した後、2 % B S A / P B S 中の 1 0 % 正常口バ血清 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 中において非特異的結合部位を 2 0 ° で 1 時間インキュベートすること

50

によってブロックし、続いて2% BSA / PBS中の1.5%正常血清で希釈した抗体により免疫染色を行った。腫瘍切片は、以下の一次抗体：抗マウスCD31抗体（クローンMEC13.3、BD Pharmingen）を1:100で4℃で一晩、抗ウサギデスミン（クローンGTX15200、Genetex）を1:400で、及び抗マウス平滑筋アクチン（SMA）-Cy3コンジュゲート型1:400で4℃で一晩、続いて二次抗体、抗ラット-アレクサ-488コンジュゲートおよび抗ウサギアレクサ647コンジュゲート（インビトロジェン）で20℃で2時間染色した。スライドを、DAPIで対比染色し、洗浄し、ダコ（DAKO）蛍光封入剤（DakoCytomation）内にマウントした。免疫蛍光画像はツァイスAxioImager Z2正立顕微鏡（ツァイス）とTissueGnosticsスライドスキャナ（TissueGnostics、ウィーン、オーストリア）で収集した。図9は免疫染色した組織を示す。

10

【0254】

免疫染色の定量化は、細胞の全面積に対するCD31陽性細胞の平均面積として表され、以下のように実施した。腫瘍の血管密度の平均（MVD）の測定は、20X対物レンズを用いて、CD31染色切片のTissueGnosticsスライドスキャナで捕獲したデジタル画像から定量化した。染色された血管に対応するピクセルは、Definiensの組織スタジオソフトウェア（Definiens、ニュージャージー州）を用いて選択した。腫瘍全体の断面及び群当たり合計5つの腫瘍を分析した。血管領域の凝集ピクセルは、画像全体の面積及び分析された全体面積に対して、陽性細胞の面積 / 全表面積の%として報告されている。図10は、MVDとして表される腫瘍血管新生測定の定量化を示す。WT宿主に比べてIL-17RC-/-において、抵抗性腫瘍のMVDは有意に減少しており（ $p < 0.05$ ）、IL-17RC KOマウスにおける腫瘍増殖の抑制を伴うMVDの減少は、対照及び抗VEGF処置群の両方についてMVDの減少を伴うことを示唆している。このデータは、宿主微小環境へのIL-17のシグナル伝達は、新しい血管の成長を促進することを示している。

20

【0255】

実施例8 - 抗VEGF応答に対するTH17細胞の媒介作用

IL-17はCD4+T細胞及びCD8+T細胞（Tc17）のTH17サブセットによって産生される。TH17細胞の浸潤は、ヒト肺癌及び結腸直腸癌における予後不良と関連しているため、同系マウスの肺及び結腸癌モデルにおける抗VEGF処置に応答した腫瘍浸潤性TH17細胞の作用を試験した。

30

【0256】

マウス腫瘍細胞株CT-26をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手し、RPMI（インビトロジェン、カールスバッド、CA）中で培養した。培地にL-グルタミン、10%ウシ胎児血清（FBS）（シグマ、セントルイス、MO）を補充した。CT26は、5%CO₂、湿度80%のインキュベーター中、37℃で培養し、維持した。成長因子低減マトリゲル（BDバイオサイエンス）100µl中のCT-26腫瘍細胞（ 2.0×10^6 ）をC57BL6.WT又はC57BL6.IL-17RC-/-（KO）のどちらかの背の脇腹に皮下接種した。抗体は、1週間に2回腹腔内注射した。対照抗体、抗ブタクサ、抗VEGFモノクローナル抗体B20-4.1.1（Liangら、2006）又は抗IL-17A又は抗IL-17Fによる処置は腫瘍細胞接種後2日に開始した。全ての腫瘍増殖実験を少なくとも3回実施し、実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。腫瘍体積を楕円体の体積の式（ $0.5 \times L \times W^2$ 、ここでLは長さでありWは幅である）を用いて一日おきに計算した。

40

【0257】

結腸直腸癌細胞株のCT-26において、抗VEGF単独と比べて、抗IL17と抗VEGFの組み合わせで処置すると腫瘍増殖の有意な減少が観察され、並びに抗VEGF処置の後に、WT同腹仔と比べて、ルイス肺癌（LLC）担持IL-17rc-/-において腫瘍量の有意な減少が観察された（図13AおよびB）。

【0258】

50

CT-26腫瘍細胞を、腫瘍を移植したマウスから採取した。対照により処置され及び抗VEGFにより処置されたマウスからの腫瘍を単離し、かみそりの刃で腫瘍を切り刻み、機械的に破砕し、コラゲナーゼ/ディスパーゼ及びDNase (ロシュ、バーゼル、スイス)で消化して、37℃で1時間、1mg/mlの増殖培地中で均質化することにより単一細胞懸濁液を得た。死滅細胞を除去するため、LSRIIB FACS装置(BDバイオサイエンス)上でのデータ取得及びFlowJoソフトウェア(Tree Star, Ashland, OR)を用いた解析の前に、ヨウ化プロピジウム(Sigma, St. Louis, MO)を全てのサンプルに添加した(図14A-B及び図15B)。マウスIL-17A及びG-CSFのレベルをQuantikine ELISAキットにより測定した(R&D Systems, Minneapolis, MN)。マウスBV8レベルはジェネンテック社で開発されたELISAアッセイを用いて測定した。(図15C及び図16AとC)。腫瘍浸潤性CD11b+Gr1+細胞の割合はフローサイトメトリーによって決定した。(図16B)。

10

20

30

40

50

【0259】

TI L分析は以前に記載したように行った。LLC腫瘍浸潤性CD3+T細胞のレベルはWT宿主とKO宿主の間で相違しなかった(それぞれ肝臓腫瘍細胞の1.24%±0.18%及び1.28%±0.22%)。しかし、抗血管新生療法は、腫瘍リンパ球浸潤30-32を増加させることができることを示す最近の報告と一致して、抗VEGF治療は、腫瘍浸潤性CD4+とCD8+の両方の数を、CD8+T細胞よりもCD4+T細胞が10倍高いものの、増加させることが観察された(図15A-C)。そしてこれらの成熟T細胞亜集団の両方ともIL-13を発現することが知られているが、IL-17の発現はLLC腫瘍においてCD4+細胞により制限された(図14A-Bおよび図15A-C)。全てのIL-17+CD4+細胞はまたIL-22(図14A-B)、成熟して末期的に分化したTh17細胞の顕著なサイトカインを発現した。LLC腫瘍におけるIL17+IL-22+CD4+集団の増加は抗VEGF処置の際に観察された。これらのTI Lの有病率は、腫瘍微小環境におけるIL-17およびG-CSFの両方のレベルの上昇、並びにCD11b+Gr1+骨髓性細胞の補充及び血管新生促進因子、BV8(図16C)の腫瘍内レベルの増加と一致していた(図16C)。しかし、TH17腫瘍浸潤の下流での作用は、WT担癌宿主における完全なIL-17のシグナル伝達の存在下で唯一の観察されただけであった(図16A-C)。

【0260】

最近の研究は、これらの研究のほとんどは組換えIL-17タンパク質又は腫瘍へのIL-17遺伝子のレトロウイルス形質導入を用いて行われたが、IL-17は、腫瘍の血管新生を促進する役割を果たしていることを示唆している(Tartour, E. et al. Interleukin 17, 「T細胞由来サイトカインは、ヌードマウスにおけるヒト子宮頸部腫瘍の腫瘍形成を促進する」 Cancer Res 59, 3698-704 (1999); Numasaki, M. et al. 「インターロイキン-17は、血管新生および腫瘍増殖を促進する」 Blood 101, 2620-7 (2003))。同系LLC腫瘍モデルにおける腫瘍血管構造の促進に関する内因性腫瘍浸潤性Th17細胞の効果が問われた。この目的のために、IL-17RCのKO宿主における抗VEGF治療による腫瘍関連内皮細胞枯渇の増強がWTと比較して観察され、TH17細胞はVEGF遮断に直面して持続的な血管新生を同様に促進することができることを示唆している(図16A-C)。まとめると、このデータは、炎症促進性サイトカインG-CSFの発現の媒介及び抗VEGF療法に対する耐性を更に媒介するために血管新生促進CD11b+Gr1+細胞の補充における、腫瘍浸潤性TH17細胞の必要性及びその宿主微小環境内のIL-17のシグナル伝達の必要性についての証拠を提供している。

【0261】

Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, et al. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. Blood 96:3838-46.

Gabrilovich DI, Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 9:162-74.

Kusmartsev S, Gabrilovich DI.2002.Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression.Cancer Immunol Immunother 51:293-8.

Shojaei F, Wu X, Qu X, Kowanetz M, Yu L, et al.2009.G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models.Proc Natl Acad Sci USA 106:6742-7.

【 0 2 6 2 】

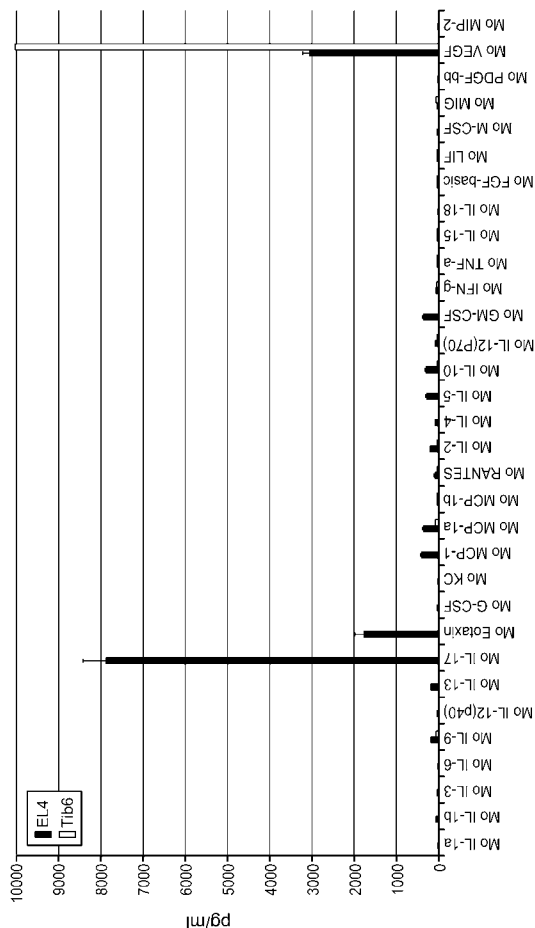
本開示を通して引用される全ての参考文献は、本明細書において参照によりその全体が明確に援用される。本発明は特定の実施態様であると考えられるものを参照して説明されるが、本発明は係る実施態様に限定されるものではないことを理解すべきである。これに対し、本発明は、添付の特許請求の範囲の精神及び範囲内に含まれる種々の改変と均等物を包含するように意図されている。

【 0 2 6 3 】

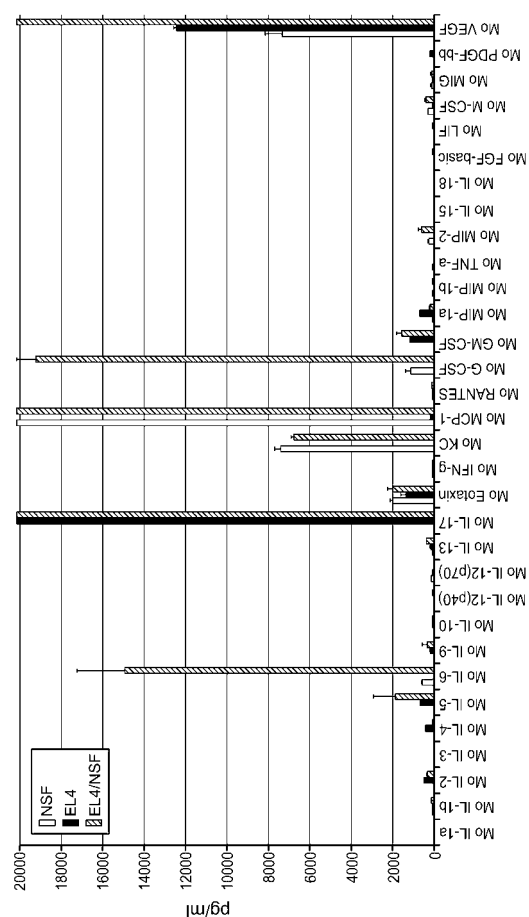
特許請求の範囲を含む本出願を通じて、「含む(comprising)」なる用語は、包含的で、変更可能な移行句として使用され、付加的な、列挙されていない要素又は方法工程を除外しない。

10

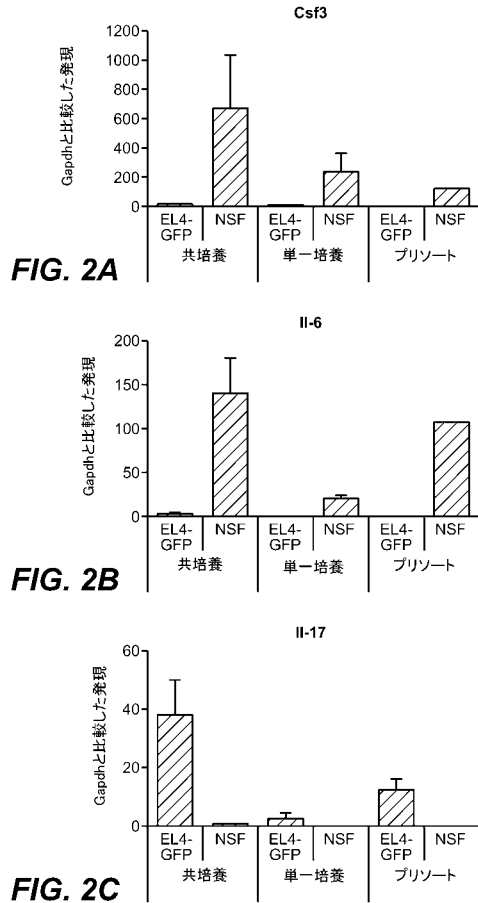
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 】



【 図 4 】

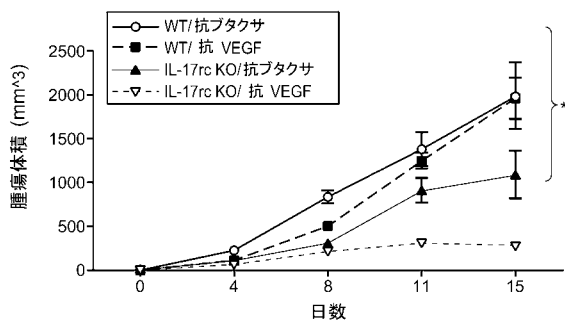


FIG. 4A

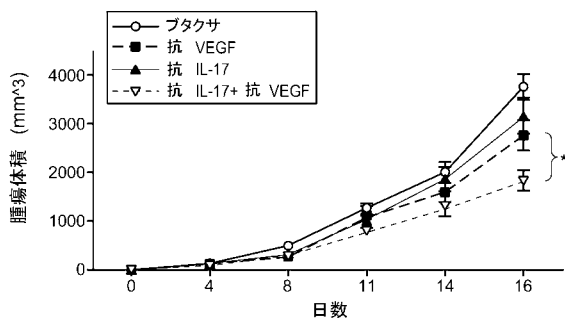


FIG. 4B

【 図 3 】

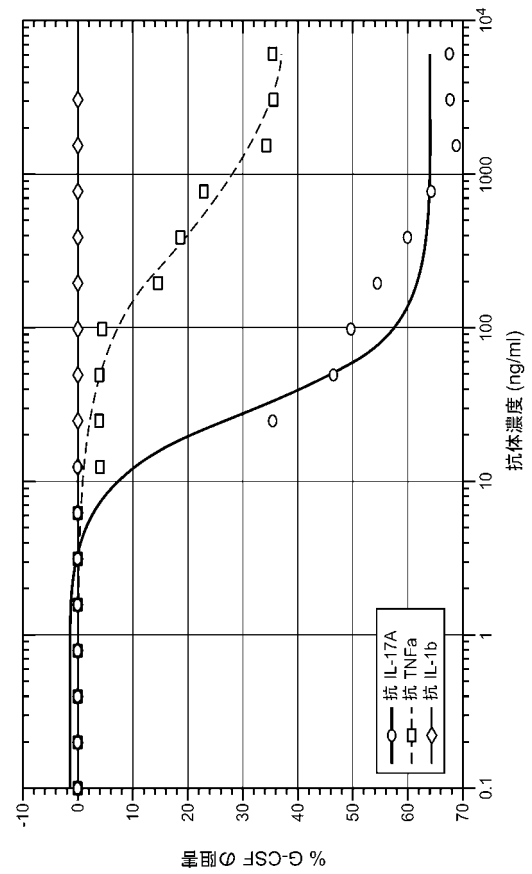


FIG. 3

【 図 5 】

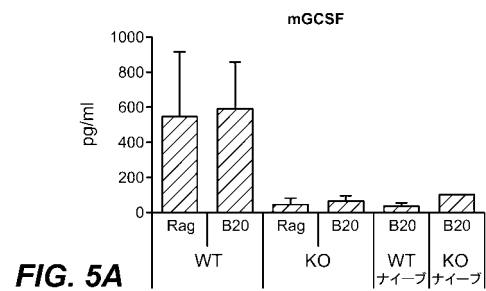


FIG. 5A

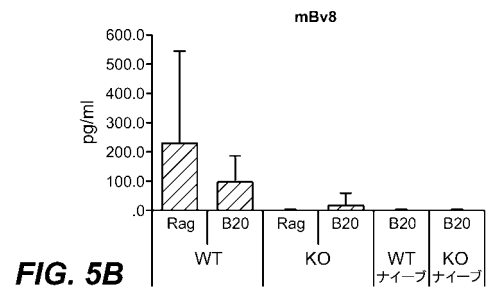


FIG. 5B

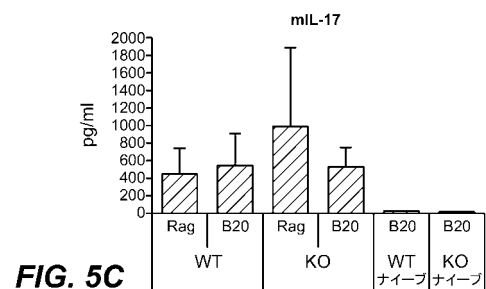
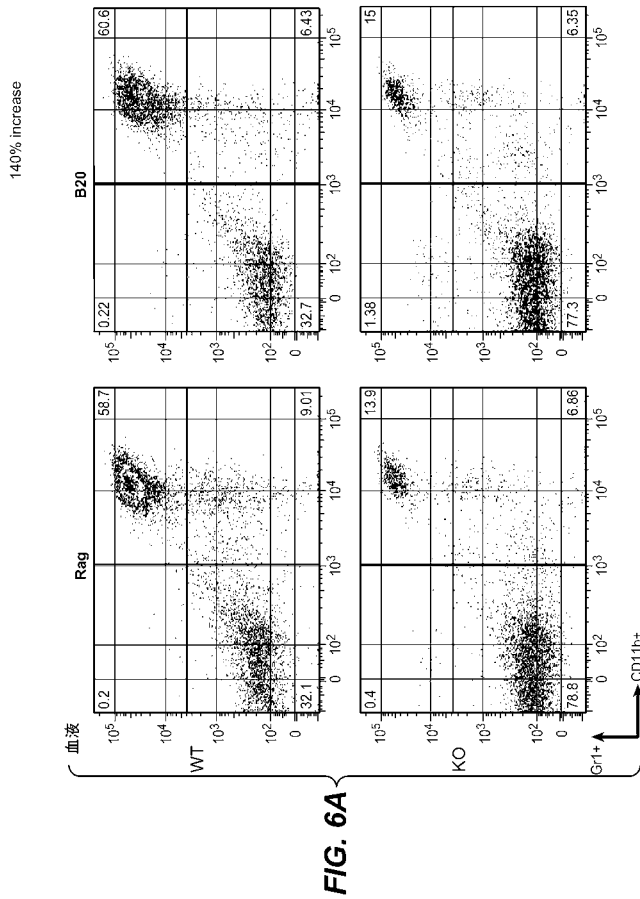
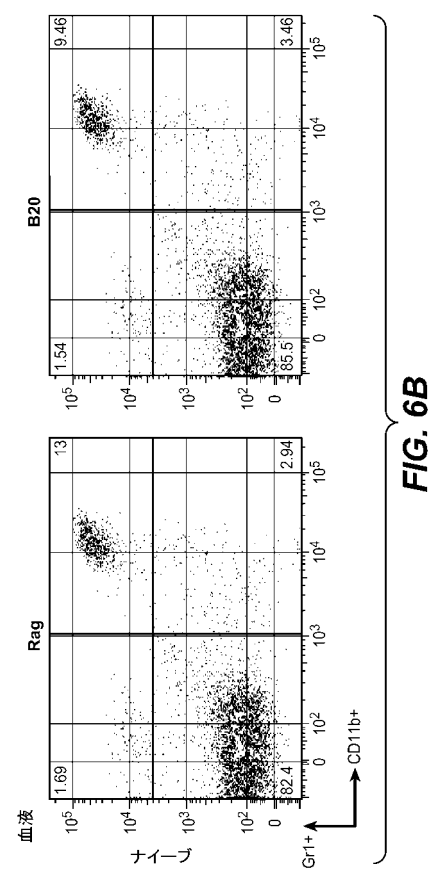


FIG. 5C

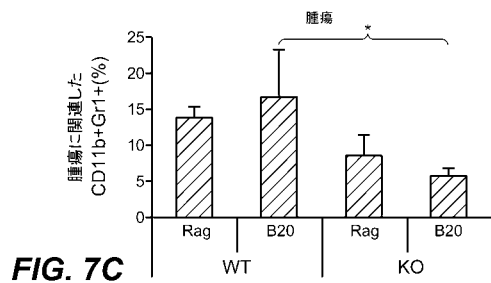
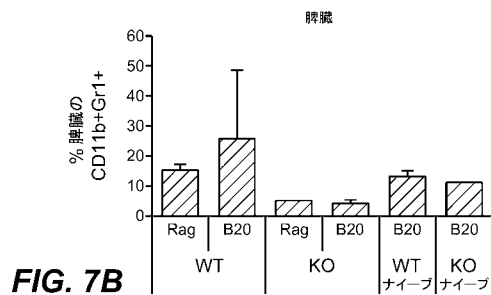
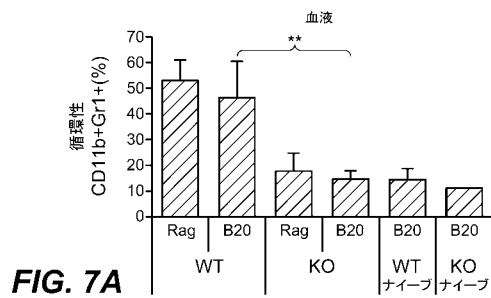
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 7】



【図 8】

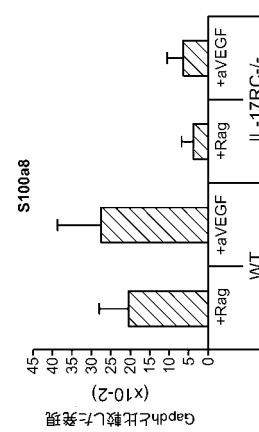


FIG. 8B

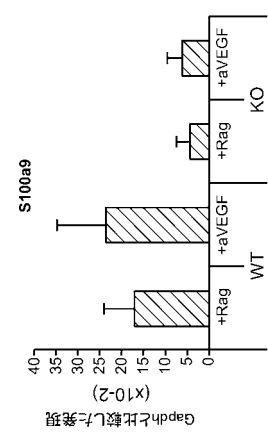


FIG. 8C

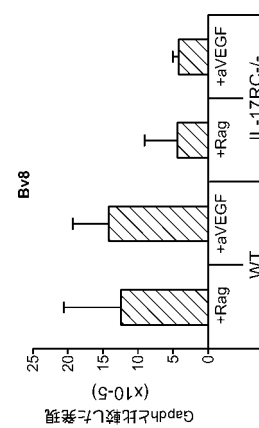


FIG. 8D

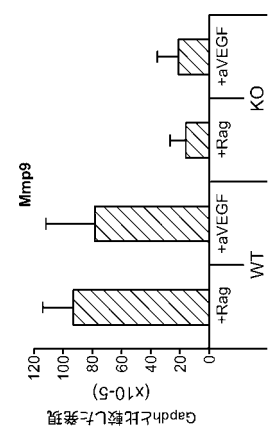


FIG. 8E

【図 10】

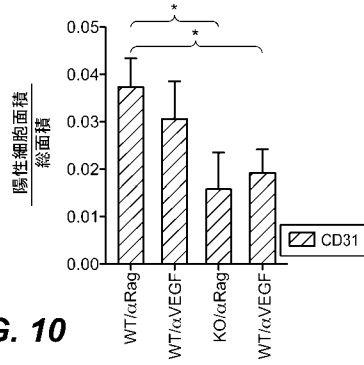


FIG. 10

【図 11】

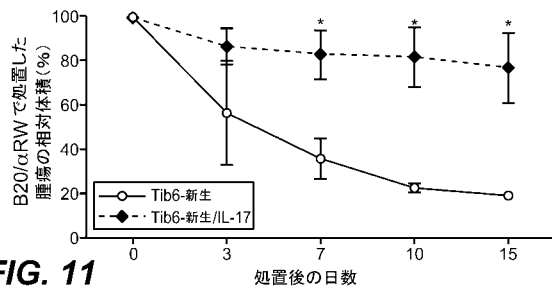


FIG. 11

【図 12 C】

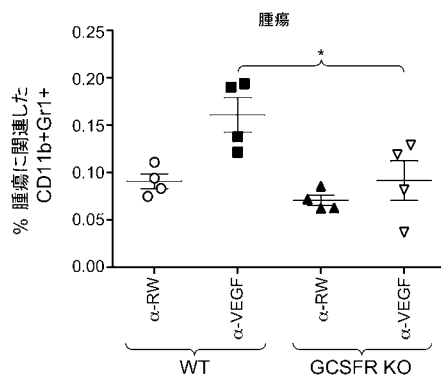


FIG. 12C

【図 12 A】

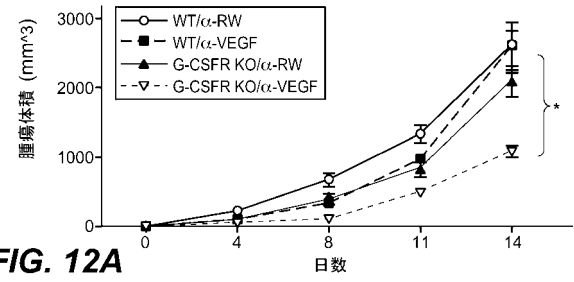


FIG. 12A

【図 12 B】

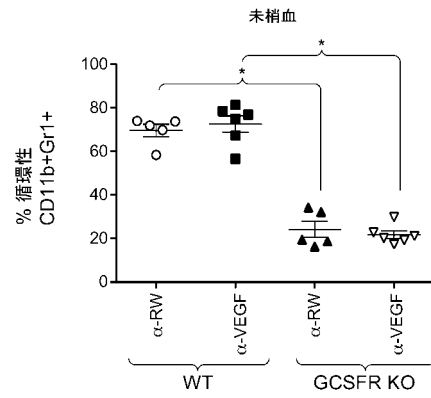


FIG. 12B

【図 13】

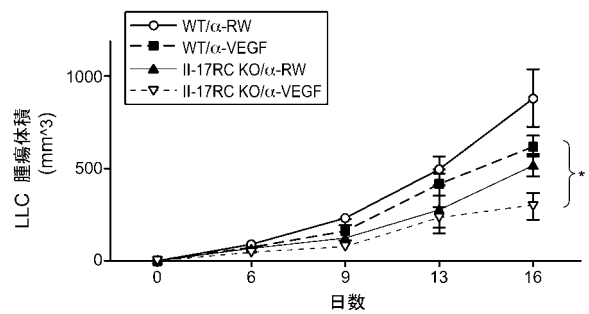


FIG. 13A

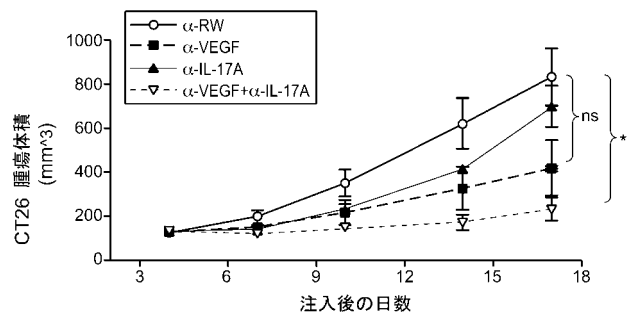


FIG. 13B

【図 14】

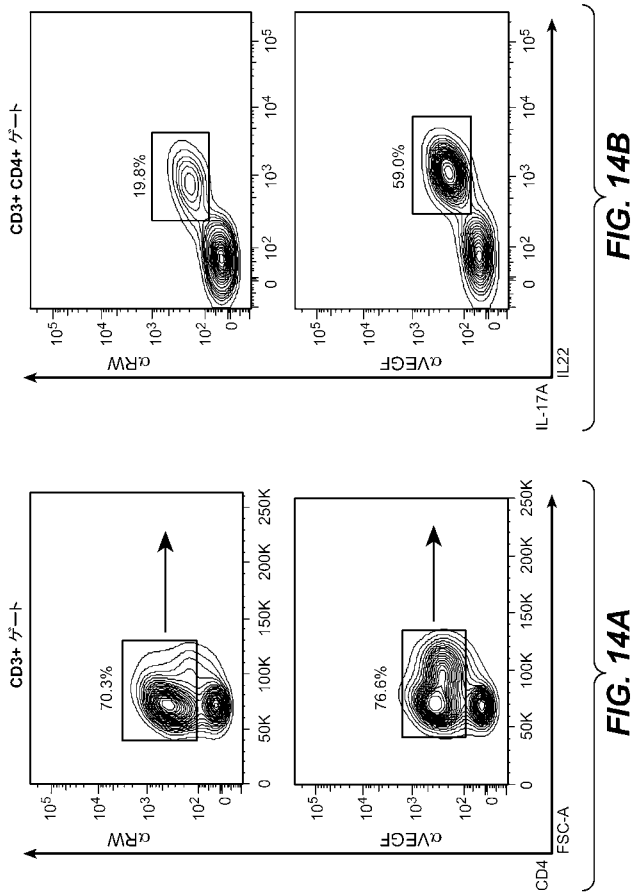


FIG. 14B

FIG. 14A

【図 15】

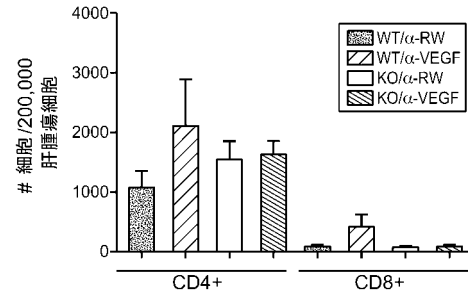


FIG. 15A

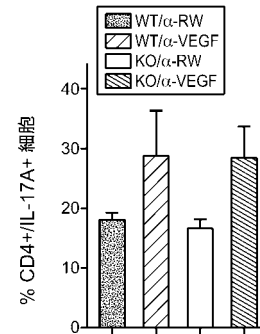


FIG. 15B

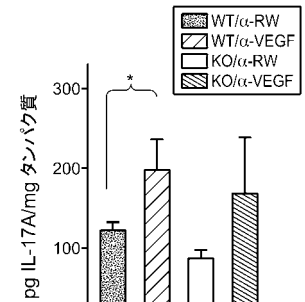


FIG. 15C

【図 16】

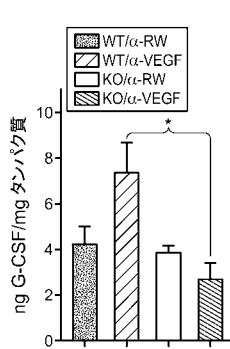


FIG. 16A

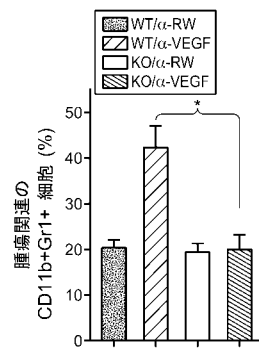


FIG. 16B

【図 17】

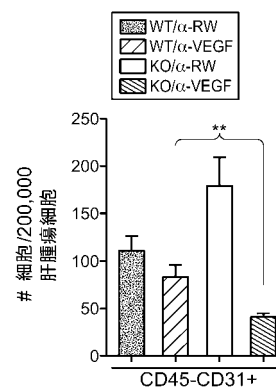


FIG. 17

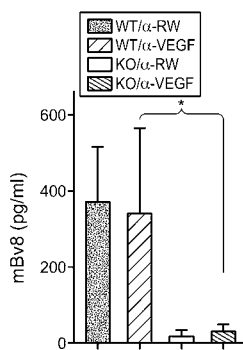
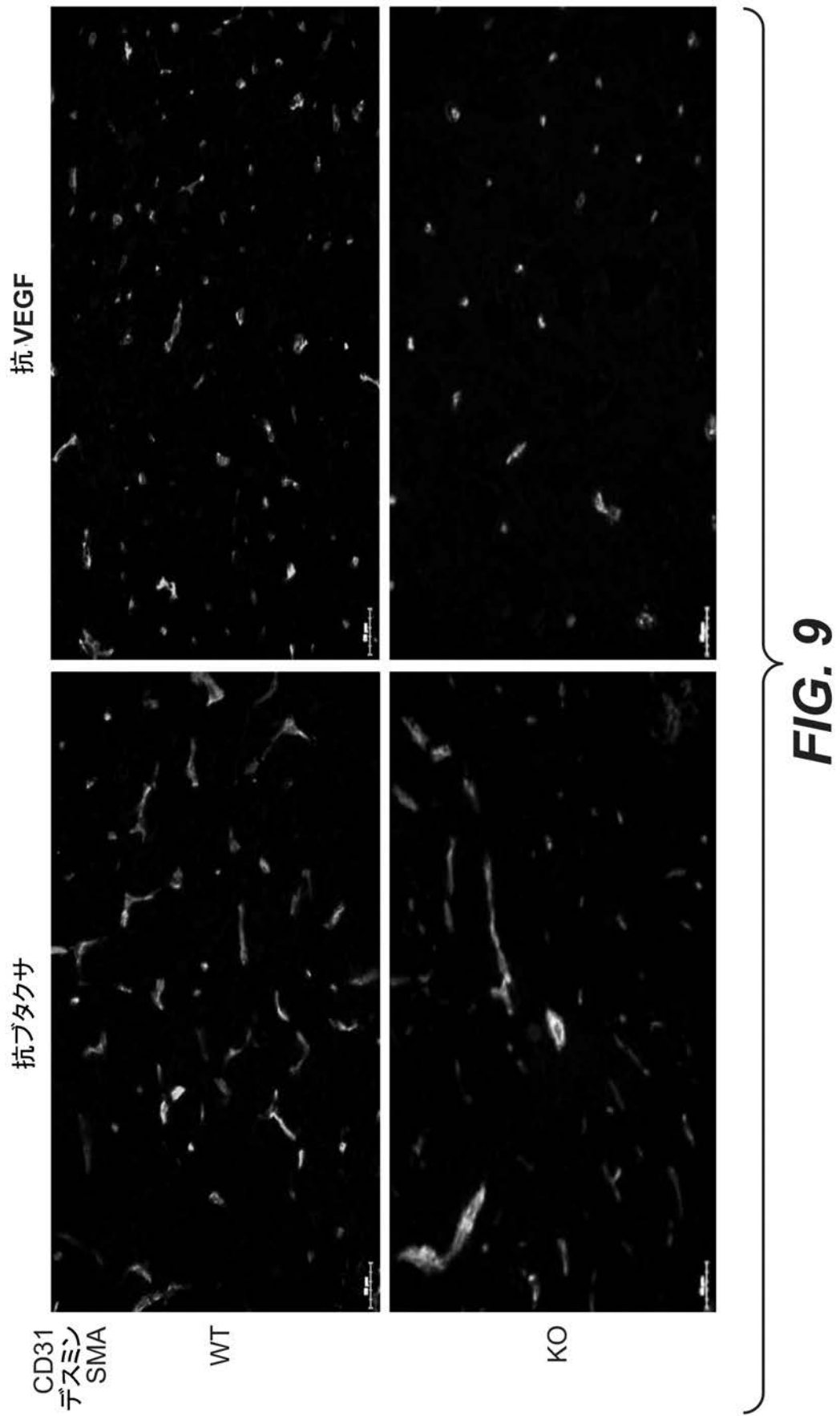


FIG. 16C

【 図 9 】



【 配 列 表 】

2014525412000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/22 C07K16/24 A61P35/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

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

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

EPO-Internal, 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.
Y	WO 2009/039337 A2 (GENENTECH INC [US]; FERRARA NAPOLEON [US]; SHOJAEI FARBOO [US]; WU XIU) 26 March 2009 (2009-03-26) the whole document -----	1-34, 41-61
Y	WO 2007/115045 A2 (GENENTECH INC [US]; BALDWIN MEGAN [US]; FERRARA NAPOLEONE [US]; GERBER) 11 October 2007 (2007-10-11) the whole document ----- -/--	1-34, 41-61

☒ 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 application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 2012

Date of mailing of the international search report

04/12/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHOJAEI FARBOD ET AL: "Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 450, no. 7171, 6 December 2007 (2007-12-06), pages 825-831, XP002507083, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE06348 the whole document	1-34, 41-61
Y	----- F. SHOJAEI ET AL: "G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 16, 21 April 2009 (2009-04-21), pages 6742-6747, XP055044243, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0902280106 the whole document	1-34, 41-61
Y	----- SHOJAEI FARBOD ET AL: "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 8, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 911-920, XP002507081, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1323 the whole document	1-34, 41-61
Y	----- SHOJAEI FARBOD ET AL: "Refractoriness to antivasculat endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 14, 15 July 2008 (2008-07-15), pages 5501-5504, XP002507176, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0925 the whole document	1-34, 41-61
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHOJAEI F ET AL: "Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth", TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, vol. 18, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 372-378, XP023520646, ISSN: 0962-8924, DOI: 10.1016/J.TCB.2008.06.003 [retrieved on 2008-07-07] the whole document	1-34, 41-61
Y	SHOJAEI F ET AL: "Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies", DRUG RESISTANCE UPDATES, CHURCHILL LIVINGSTONE, EDINBURGH, GB, vol. 11, no. 6, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 219-230, XP025668429, ISSN: 1368-7646, DOI: 10.1016/J.DRUP.2008.09.001 [retrieved on 2008-10-23] the whole document	1-34, 41-61
Y	HUANG DAN ET AL: "Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 70, no. 3, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 1063-1071, XP002583999, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3965 [retrieved on 2010-01-26] the whole document	1-34, 41-61
Y	NUMASAKI MUNEO ET AL: "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 101, no. 7, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 2620-2627, XP002474404, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2002-05-1461 the whole document	1-34, 41-61
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051220

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JIANKUN LIU ET AL: "IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 407, no. 2, 1 April 2011 (2011-04-01) , pages 348-354, XP055044236, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.03.021 the whole document</p> <p>-----</p>	1-34, 41-61
Y	<p>WO 2008/134659 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; LEWIS KATHERINE E [US]; PRESNELL SCOTT R [US];) 6 November 2008 (2008-11-06) the whole document paragraph [0261]</p> <p>-----</p>	1-34, 41-61
Y	<p>LOGES SONJA ET AL: "Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates", GENES AND CANCER, SAGE PUBLICATIONS, INC, US, vol. 1, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01) , pages 12-25, XP008148100, ISSN: 1947-6019, DOI: 10.1177/1947601909356574 the whole document</p> <p>-----</p>	1-34, 41-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/051220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009039337 A2	26-03-2009	AR 068532 A1 AU 2008302214 A1 CA 2700276 A1 CN 102037015 A CO 6270370 A2 EP 2203479 A2 JP 2010540449 A KR 20100075513 A PE 11972009 A1 RU 2010115755 A TW 200920750 A US 2010316633 A1 WO 2009039337 A2	18-11-2009 26-03-2009 26-03-2009 27-04-2011 20-04-2011 07-07-2010 24-12-2010 02-07-2010 14-08-2009 27-10-2011 16-05-2009 16-12-2010 26-03-2009
WO 2007115045 A2	11-10-2007	AR 060228 A1 AU 2007233237 A1 BR P10709425 A2 CA 2647430 A1 CL 8762007 A1 CN 101448856 A CR 10325 A EP 1999151 A2 JP 2009531463 A KR 20080106946 A MA 30348 B1 RU 2008142775 A TW 200806322 A US 2007264193 A1 US 2010239568 A1 WO 2007115045 A2 ZA 200807590 A	04-06-2008 11-10-2007 12-07-2011 11-10-2007 08-02-2008 03-06-2009 03-12-2008 10-12-2008 03-09-2009 09-12-2008 01-04-2009 10-05-2010 01-02-2008 15-11-2007 23-09-2010 11-10-2007 25-11-2009
WO 2008134659 A2	06-11-2008	CA 2683145 A1 EP 2150564 A2 EP 2392597 A2 WO 2008134659 A2	06-11-2008 10-02-2010 07-12-2011 06-11-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/24 Z N A	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/22	
	C 0 7 K 16/30	

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

(72)発明者 ファーララ, ナポレオン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA52 MA55 MA65 MA66 NA14 ZA362 ZB262 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB17 DD63 EE01 EE03

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA71