

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5127043号
(P5127043)

(45) 発行日 平成25年1月23日 (2013. 1. 23)

(24) 登録日 平成24年11月9日 (2012. 11. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

C O 7 K 16/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

請求項の数 17 (全 228 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-552418 (P2007-552418)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月24日 (2006. 1. 24)
 (65) 公表番号 特表2008-528521 (P2008-528521A)
 (43) 公表日 平成20年7月31日 (2008. 7. 31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/002964
 (87) 国際公開番号 W02006/079120
 (87) 国際公開日 平成18年7月27日 (2006. 7. 27)
 審査請求日 平成21年1月26日 (2009. 1. 26)
 (31) 優先権主張番号 60/646, 333
 (32) 優先日 平成17年1月24日 (2005. 1. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500039463
 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
 ーシテイ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国、テキサス・78701、
 オースティン、ウエスト・セブンス・スト
 リート・201
 (73) 特許権者 507247221
 ペレグリン ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 927
 80-7017, タスチン, フランク
 リン アベニュー 14282
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスファチジルセリンに結合する F C 融合構築物およびそれらの治療用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 個の β 2-糖タンパク質 I (β 2 G P I) ポリペプチドに、共有結合を介して、組換え
 発現により融合タンパク質として、または、ペプチドリンカーもしくは化学的リンカーを
 介して作動可能に結合した抗体 F c 領域を含む構築物であって、

該 β 2 G P I ポリペプチドの各々は、 β 2 G P I のインタクトなドメイン V を少なくと
 も含み、該 β 2 G P I ポリペプチドは、該 F c 領域に結合された場合に、ホスファチジル
 セリンに結合し、そして、該 F c 領域は、抗原結合領域、抗原結合ドメインまたは抗原結
 合断片を含まない、構築物。

【請求項 2】

前記 β 2 G P I ポリペプチドが、それぞれ、少なくとも、 β 2 G P I のインタクトなドメ
 イン V と、 β 2 G P I の他の 4 つのドメインのうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の
 構築物。

【請求項 3】

前記 β 2 G P I ポリペプチドが、それぞれ、少なくとも、 β 2 G P I のインタクトなドメ
 イン V と、 β 2 G P I のドメイン I を含む、請求項 2 に記載の構築物。

【請求項 4】

前記 β 2 G P I ポリペプチドが、それぞれ、 β 2 G P I のドメイン I、ドメイン I I、ド
 メイン I I I、ドメイン I V、およびインタクトなドメイン V を含む、請求項 2 に記載の
 構築物。

【請求項 5】

前記 β 2 G P I ポリペプチドが、それぞれ、ヒトの β 2 G P I ポリペプチドである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 6】

前記抗体 F c 領域が、ヒトの I g G 1 (γ 1) 抗体由来の F c 領域またはヒトの I g G 3 (γ 3) 抗体由来の F c 領域である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の構築物。

【請求項 7】

前記構築物が、少なくとも 1 つ の診断剤、画像化剤または治療剤に作動可能にさらに結合されている、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の構築物。

【請求項 8】

前記構築物が、少なくとも 1 つ の抗脈管形成剤、抗癌剤、または抗ウイルス剤に作動可能にさらに結合されている、請求項 7 に記載の構築物。

【請求項 9】

治療に用いるための、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の構築物を含む、組成物。

【請求項 10】

癌を治療するための、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の構築物を含む、組成物。

【請求項 11】

前記組成物が、第 2 の治療剤または抗癌剤と組み合わせて、あるいは、放射線療法と組み合わせて使用するためのものである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

ウイルス感染またはウイルス疾患を治療するための、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の構築物を含む、組成物。

【請求項 13】

前記組成物が、第 2 の治療剤または抗ウイルス剤と組み合わせて使用するためのものである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

癌を治療するための医薬の製造における、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の構築物の使用。

【請求項 15】

前記医薬が、第 2 の治療剤または抗癌剤と組み合わせて、あるいは、放射線療法と組み合わせて使用するためのものである、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

ウイルス感染またはウイルス疾患を治療するための医薬の製造における、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の構築物の使用。

【請求項 17】

前記医薬が、第 2 の治療剤または抗ウイルス剤と組み合わせて使用するためのものである、請求項 16 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、共有に係る米国仮特許出願第 60 / 646, 333 号 (2005 年 1 月 24 日出願) に対する優先権を主張する。その出願 (明細書、特許請求の範囲、図面および配列表を含む) の開示は、但し書きなしに本明細書中に参考として明確に援用される。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、ホスファチジルセリン生物学の分野、および腫瘍およびウイルス感染の治療に関する。本発明は、腫瘍血管標的輸送および癌治療、および、ウイルス感染およびその他の疾患治療用の、驚くべき新規構築物、組成物、方法および組み合わせを提供する。本発明は特に、複数の性質の驚くべき組み合わせを有する、新規ホスファチジルセリン結合構築物、およびその診断性および治療性接合体を提供する。この新規構築物は、ホスファ

10

20

30

40

50

チジルセリン疾患標的に効果的に結合し、その破壊を促進し、さらに、治療剤を特定部位に送達することが可能なので、癌、ウイルス感染、およびその他の疾患治療のための、ある範囲の方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の記述

化学療法剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学において重要な問題となっている。腫瘍治療において対処しなければならないもう一つの大問題は、「細胞殲滅」、すなわち、無統制増殖能力を持つ、所謂「クローン性」悪性細胞の全てを殺し、治療によって除去することが可能な全ての腫瘍塊を置換したいという希求である。この分野では若干の進歩が見られるけれども、ヒト癌の主要形態の多くが、有効な化学療法介入に依然として抵抗するのは大きく二つの理由がある。

10

【0004】

細胞殲滅を実現する治療法を開発するという目標から見ると、治療に対してよく反応する腫瘍タイプもあれば、それほどでもない腫瘍タイプもある。例えば、軟組織腫瘍、例えば、リンパ腫および、血液および血液形成器官の腫瘍、例えば、白血病は、硬組織腫瘍、例えば、上皮癌よりも、化学療法に対し反応性がより高い。

【0005】

化学療法に対し軟組織および血液系腫瘍の感受性が高い一つの理由は、リンパ腫および白血病細胞では、化学療法介入に対する接触度がより大きいためである。簡単に言うと、多くの化学療法剤にとって、硬組織腫瘍塊では、軟組織腫瘍および血管系腫瘍に比べその細胞の全てに到達するのがはるかに困難であり、従ってまた、細胞殲滅を実現するのがはるかに困難となる。

20

【0006】

もう一つの腫瘍治療戦略は、抗腫瘍細胞抗体を用いてトキシンを腫瘍細胞に送達する「イムノトキシン」の使用である。しかしながら、化学療法一般に見られるように、イムノトキシン療法も、硬組織腫瘍に適用すると重大な欠点を露呈する。例えば、抗原陰性または抗原欠損細胞は生き残り、腫瘍集団を再生し、さらに転移をもたらす可能性がある。抗体療法に対する硬組織腫瘍の耐性の、もう一つの理由としては、腫瘍塊は一般に、巨大分子製剤、例えば、抗体およびイムノトキシンに対して不透過であることが挙げられる。腫瘍内における物理的分散距離および間隙圧の両方が、この種の療法に対する重大な制限因子となる。

30

【0007】

改良治療戦略は、硬組織腫瘍の血管を標的とすることである。腫瘍細胞そのものではなく、腫瘍血管を標的とすることはいくつかの利点を有する。すなわち、耐性腫瘍細胞の発達をもたらすことは恐らくないこと、標的細胞への到達が簡単であるなどである。さらに、血管の破壊は、抗腫瘍作用の増幅をもたらす。これは、多くの腫瘍細胞が、その酸素と栄養素を単一血管に依存するからである。例示の血管標的剤（VTA）が、特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、および特許文献5に記載される。これらの特許文書は、抗細胞剤およびトキシンの、腫瘍血管マーカーに対する標的輸送を記載する。

40

【0008】

血管標的法のもう一つの効果的変法は、腫瘍血管または支質内に発現される、または吸着されるマーカーに対して凝固因子を標的輸送することである（Huang et al., 1997; 特許文献6、特許文献7、特許文献8、および特許文献9）。腫瘍血管に対しトキシンではなく凝固剤を送達することは、免疫原性の低下、および毒性副作用の危険度の低下という新たな利点をもたらす。特許文献8に開示されるように、このような腫瘍特異的「凝固剤」に使用するのに好ましい凝固因子は、ヒト凝固誘発タンパク質、組織因子（TF）、血液凝固主要起動因子の短縮形である。

【0009】

比較的最近、ホスファチジルセリン（PS）が、腫瘍血管の特異的マーカーとして特定

50

された (Ran et al., 1998)。これによって、抗細胞因子、トキシン、および凝固因子を腫瘍血管に送達するための、新規抗PS免疫接合体の開発がもたらされた (特許文献10、特許文献11、および特許文献12)。さらに、非接合の、PSに対する抗体が、治療薬剤に結合することなくして抗癌作用を示すことが発見され、この方法は、腫瘍血管標的および治療のためのホスファチジルセリン「裸抗体」法という名前で知られるようになった (特許文献13)。

【0010】

前述の方法は腫瘍治療技術を前進させたけれども、治療選択肢の数と有効性を拡大するには、さらに新たな治療および血管標的剤の開発が必要とされる。他のシステム、例えば、ウイルス感染治療において抗癌性および治療作用を持つ1群の治療剤が特定されたならば、それは重要な進歩となろう。二つのヒトの成分、特に、標的輸送するのに抗体の使用に依存しない成分から調製される、新規標的輸送構築物が生成されたならば、それは、安全性が向上されるという点で著明な進展となろう。病気に対する患者自身の反応を強化する、すなわち、宿主のエフェクター機能を増進する新規薬剤を設計、開発することができたならば、それは、治療効果を最大限に発揮する点で、特に、同じ機構が、癌、および他の疾患、例えば、ウイルス感染および疾患に対しても応用が可能である場合にはきわめて貴重なものとなろう。

【特許文献1】米国特許第5,855,866号明細書

【特許文献2】米国特許第5,965,132号明細書

【特許文献3】米国特許第6,261,535号明細書

【特許文献4】米国特許第6,051,230号明細書

【特許文献5】米国特許第6,451,312号明細書

【特許文献6】米国特許第6,093,399号明細書

【特許文献7】米国特許第6,004,555号明細書

【特許文献8】米国特許第5,877,289号明細書

【特許文献9】米国特許第6,036,955号明細書

【特許文献10】米国特許第6,312,694号明細書

【特許文献11】米国特許第6,783,760号明細書

【特許文献12】米国特許第6,818,213号明細書

【特許文献13】米国特許第6,406,693号明細書

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

本発明は、腫瘍血管に標的輸送し、癌治療するため、かつ、ウイルス感染およびその他の疾患を治療するための、新規構築物、組成物、方法および組み合わせを提供することによって、従来技術における前述およびその他の要求に応える。本発明は、特に、疾患においてホスファチジルセリン標的に効果的に結合し、それら標的の破壊を、例えば、宿主エフェクター機能を増進することによって促進する、驚くべき特性の組み合わせを持つ、新規ホスファチジルセリン結合構築物を提供する。新規構築物が、さらに生物学的因子、診断剤、および治療剤に結合され、それらの薬剤の疾患部位に対する特異的送達が可能とされる、ある範囲の接合体組成物も提供される。本発明はさらに、腫瘍血管標的輸送、癌治療、および、ウイルス感染およびその他の疾患の治療における、新規構築物および接合体、およびそれらの組み合わせの効果的な使用法も提供する。

【0012】

本出願全体を通じて、「ある」成分または工程という用語は、その言及された成分または工程について、その後で上限が特異的に明言される場合を除いて、「少なくとも一つの」、「少なくとも最初の」、「1個以上の」、または「複数の」成分または工程を意味するものとして使用される。従って、本出願で用いる「ある構築物」とは、「少なくとも最初の構築物」を意味する。組み合わせの動作可能な限界およびパラメータは、任意の単一

10

20

30

40

50

因子の量と同様、本開示に照らせば当業者には明らかであろう。

【0013】

レセプター本体およびベータ体：本発明は先ず、ある範囲のホスファチジルセリン結合性構築物組成物を提供する。この組成物では、構築物は、少なくとも第1の抗体Fc領域に作動可能に結合する、少なくとも第1のホスファチジルセリン結合性タンパク質、ポリペプチド、またはレセプターを含む。「抗体」Fc領域に対するフォスファチジルセリン結合タンパク質、ポリペプチド、または「レセプター」の連結から、本明細書では、本発明のホスファチジルセリン結合性Fc構築物を指すために用いる「レセプター本体（単数または複数）」という用語が生まれる。

【0014】

本発明の構築物またはレセプター本体は、通常、少なくとも第1のホスファチジルセリン結合性タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンドまたはペプチドに動作的に結合される少なくとも第1の抗体Fc領域を含む。「ホスファチジルセリン結合性タンパク質」という用語は、本明細書では、全てのホスファチジルセリン結合性タンパク質、ポリペプチド、レセプター、リガンドおよびペプチド指すために使用されることが明言される。

【0015】

多くの実施態様では、「ホスファチジルセリン結合性タンパク質」は、本発明の構築物を形成するために抗体Fc領域に結合した場合もフォスファチジル結合性を保持する。もちろん、ホスファチジルセリン結合機能の保持は、疾患部位に暴露されるフォスファチジルセリンを標的とする使用を意図される構築物においては重要である。しかしながら、本発明の実施態様の必ずしも全てが、本発明の構築物を形成するために抗体Fc領域に結合した場合もフォスファチジル結合性を保持するホスファチジルセリン結合性タンパク質に限定されるわけではない。

【0016】

注目すべきことは、本発明は、「ニック入り (nicked) β 2-糖タンパク質I」に結合する抗体Fc領域を含むことで、その際、ニック入り β 2-糖タンパク質Iはホスファチジルセリンにもはや結合しない（下記参照）。ニック入り β 2-糖タンパク質Iは、脈管形成のインヒビターであることが知られるので（米国特許出願公開US 2003/0219406、なお本特許文書を引用することにより特に指定して本明細書に含める）、本発明の「Fc-ニック入り β 2」は、脈管形成インヒビターとして有用であり、かつ、比較的長い半減期を持ち、要すればさらに別のエフェクター機能を有するという利点を持つ。

【0017】

従って、「ホスファチジルセリン結合性タンパク質」という用語は、本発明の構築物において使用されるタンパク質、ポリペプチド、レセプター、リガンドまたはペプチドの基本体を指す。ただし、本発明の構築物のあるものは、後述するように、重要な生物学および治療的用途を持つが、ホスファチジルセリンには結合しない。すなわち、 β 2-糖タンパク質Iはホスファチジルセリン結合性タンパク質として知られるが、ニック入り β 2はもはやホスファチジルセリンに結合しない。

【0018】

ホスファチジルセリンに対する結合という観点からは、基本のホスファチジルセリン結合性タンパク質および、それから得られる構築物のフォスファチジル結合性タンパク質は、生物学的に好適な条件下で、好ましくは生理的条件下でホスファチジルセリンに結合する。このホスファチジルセリン結合性タンパク質は、要すれば任意に、生物学的に好適な条件下で、好ましくは生理的条件下で他の陰イオン性リン脂質に結合してもよい。

【0019】

ある好ましい実施態様では、構築物のホスファチジルセリン結合性タンパク質は、アミノリン脂質、フォスファチジルエタノールアミン (PE) にほとんど結合しない。別の好ましい実施態様では、構築物のフォスファチジル結合性タンパク質は、フォスファチジル

10

20

30

40

50

エタノールアミンに対して検出可能な結合を示さない。

【0020】

本発明の構築物では、ある範囲のホスファチジルセリン結合性タンパク質の使用が可能である。使用が可能な、例示のホスファチジルセリン結合タンパク質をいくつか挙げると、プロテインC、プロテインS、I I 因子（プロトロンビン）、V 因子、V I I 因子、I X 因子、またはX 因子がある。

【0021】

使用が可能な、他の例示のホスファチジルセリン結合性タンパク質としては、Mer、PS-結合性スカベンジャーレセプター、 $\alpha_5\beta_3$ インテグリン、CR3 補体レセプター、CR4 補体レセプターおよびホスファチジルセリンレセプター、PSr (Balasubramanian and Schroit, 2003、引用することにより特に指定して本明細書に含める、特に表2を参照) が挙げられる。

10

【0022】

本発明の構築物に使用してもよい、その他の例示のホスファチジルセリン結合タンパク質としては、アネキシン、好ましくはアネキシンVがある。アネキシンVは、ある実施態様、例えば、さらに別の接合体、リポソーム等への使用が特に考慮される。しかしながら、ある実施態様では、本発明は、少なくとも第1のホスファチジルセリン結合性タンパク質に対し作動可能に結合する抗体Fc領域を含む構築物を提供する。その際、前記ホスファチジルセリン結合性タンパク質はアネキシンではなく、または、その、ホスファチジルセリン結合性断片でもない、すなわち、アネキシンVでもなく、または、そのホスファチ

20

【0023】

本発明の構築物に使用される、ホスファチジルセリン結合性タンパク質およびポリペプチドは、ベータ2-糖タンパク質I (β 2-糖タンパク質I または β 2GP1) タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドである。「抗体」Fc領域に対する「ベータ」2-糖タンパク質I 結合性タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの連結から、本明細書では、本発明の、好ましいFc- β 2GP1 構築物を指すために用いる「ベータ体（単数または複数）」という用語が生まれる。

【0024】

従来アポリポタンパク質Hという名前で知られる β 2GP1は、ホスファチジルセリンに結合する、50kDaの血漿糖タンパク質である。各種哺乳動物種、例えば、マウス、ラット、イヌ、ウシ、チンプ、およびヒトを含む哺乳動物種由来の β 2GP1のDNAおよびアミノ酸配列は既知である。 β 2GP1は、5個のドメインI、II、III、IV、およびVを持つが、そのドメイン構造は、それぞれ、図18Aおよび図18Bに掲げられるマウスおよびヒトの β 2GP1のドメインI-Vによって示されるように、哺乳動物間で保存される。

30

【0025】

β 2GP1は、そのC末端ドメイン、ドメインVを介してホスファチジルセリンに結合する。 β 2GP1ドメインVの脂質およびホスファチジルセリン結合領域（単複）は既知であるので、本発明の構築物のホスファチジルセリン結合性部分は、ただ、「 β 2GP1ドメインVの脂質結合領域」を含んでいさえすればよい。

40

【0026】

例として、本明細書の図18Bにおいて、配列番号22（アクセス番号1C1ZA）として提示される、ヒトの β 2GP1アミノ酸配列、および、図18Aに示されるマウスの、同様の β 2GP1配列を参照すると、 β 2GP1のドメインVの脂質結合領域は、 β 2GP1の陰イオン性リン脂質に対する結合を可能とする、1群の正に荷電したアミノ酸（282-287）、および疎水性の保存領域（311-317）（図18Bおよび18Aにおいて下線イタリック体、および二重下線イタリック体部分）を含む。

【0027】

従って、ある実施態様では、本発明の構築物のホスファチジル結合部分は、配列番号

50

22のアミノ酸282-287によって記載されるアミノ酸配列を持つペプチド、または、配列番号22のアミノ酸311-317によって記載されるアミノ酸配列を持つペプチドを含む。別の実施態様では、本発明の構築物のホスファチジル結合部分は、上述の領域を含むペプチド、すなわち、配列番号24のアミノ酸配列を持つペプチド（ヒト）、または、配列番号20のアミノ酸配列を持つペプチド（マウス）を含む。

【0028】

上述の比較的小さいペプチドおよびポリペプチドは最適ではない可能性があるので、本発明の別の好ましい構築物は、ホスファチジルセリン結合部分が、 β 2GPIの、完全なまたは無傷なドメインVを含む β 2GPIポリペプチド、例えば、少なくともドメインV、またはドメインVのみを含む β 2GPIポリペプチドである。

10

【0029】

本発明の方法の安全性に関する不安は無いが、抗リン脂質症候群（単複）またはAPSの患者から得られた抗体は、一般に、 β 2GPIのドメインIを認識する（de Laat et al., 2005a）。 β 2GPIドメインIIを認識する抗体は病原性を持たない。従って、ある実施態様では、本発明の構築物のホスファチジルセリン結合部分は、 β 2GPIドメインVの、少なくとも脂質結合部位を含むが、 β 2GPIのドメインIを実質的に欠く β 2GPIポリペプチドを含んでもよい。好ましい実施態様では、これらの構築物は、 β 2GPIの少なくともドメインVを含み、 β 2GPIのドメインIを実質的に欠く β 2GPIポリペプチドを含む。

【0030】

20

本明細書には、図18Bに示すヒトの β 2GPIアミノ酸配列、および、図18Aに示す、マウスの同様の β 2GPIのアミノ酸配列を含む、例示の β 2GPI DNAおよびアミノ酸配列が提示される（本発明の例示のFc- β 2GPI構築物をコードする発現プラスミドの配列も、配列番号25として提示される）。これらの図面、配列、およびアクセス番号を、要すれば任意に本明細書の実施例に照らして参照するならば、当業者であれば、 β 2GPIの、少なくともドメインVを含む、ある範囲のポリペプチドを製造し、使用することが可能であろう。

【0031】

前述したように、ある好ましい β 2GPIポリペプチドは、少なくとも β 2GPIドメインVを含み、 β 2GPIドメインIを実質的に欠く。この記述に一致する β 2GPIポリペプチドは、 β 2GPIの、少なくともドメインIVおよびVを含んでもよく； β 2GPIの、少なくともドメインIII、ドメインIV、およびドメインVを含んでもよく；または、 β 2GPIのドメインII、ドメインIII、ドメインIV、およびドメインVを含んでもよい。

30

【0032】

そうは言うものの、 β 2GPIドメインIの存在は、本発明の使用において著明な欠点とはならないので、 β 2GPIポリペプチドがドメインIを含む構築物を調製する方が、例えば、調製および使用が簡単であるため好都合な場合があるかもしれない。従って、本発明はさらに、ホスファチジルセリン結合部分が、完全長 β 2GPIポリペプチドである構築物、すなわち、 β 2GPIポリペプチドが、ドメインI、ドメインII、ドメインIII、ドメインIV、およびドメインVを含む構築物も含む。完全長 β 2GPIポリペプチドは、配列番号22のアミノ酸配列を含む、ヒトの β 2GPIポリペプチドであってもよい。

40

【0033】

本発明のある実施態様では、少なくとも第1のホスファチジルセリン結合タンパク質がFc領域に結合される場合、特に、構築物が、疾患部位に暴露されるホスファチジルセリンに対する標的輸送用としての使用が意図される場合には、構築物がホスファチジルセリン結合機能を保持することは重要である。ホスファチジルセリン結合性が不要でない例は、脈管形成インヒビターとして使用される、少なくとも第1のニック入り β 2GPIポリペプチドが抗体Fc領域に結合される場合である。

50

【0034】

「ニック入り」β2GPIポリペプチドとは、β2GPI配列が、例えば、酵素プラスミンによってLys317/Thr318の切断部位において切断される場合のように切れ込みを入れられたポリペプチドである。本明細書で用いる「ニック入りβ2GPIポリペプチド」を含む構築物は、ニックドメインVのみを含んでもよい。別態様として、ニック入りβ2GPIポリペプチドは、「少なくともニックドメインV」を含んでもよい。この場合、ポリペプチドは、ドメインIV、III、II、およびIの内の任意の一つ以上と共にニックドメインVを含むことが可能である。

【0035】

本発明の構築物には、ホスファチジルセリン結合性の保持が必要とされるが、本発明は、Fc領域に結合されるβ2GPIポリペプチドの使用と関連してさらに驚くべき、有利な特徴を提供する。抗体Fc領域が、2個のβ2GPIポリペプチドに作動可能に結合された場合、驚くべきことに、これらのβ2GPIポリペプチドは、得られたFc-β2GPI構築物において二量体を形成し、かつ、この二量体構築物は、ホスファチジルセリンに効果的に結合することが見出された。

【0036】

従って、本発明の新たな実施態様は、抗体Fc領域が2個のβ2GPIポリペプチドに作動可能に結合され、好ましくは各β2GPIポリペプチドが、β2GPIの、少なくともドメインVを含む構築物である。より好ましくは、抗体Fc領域が2個のβ2GPIポリペプチドに作動可能に結合され、各β2GPIポリペプチドが、β2GPIの少なくともドメインVを含み、かつ、それらのβ2GPIポリペプチドが、Fc領域に結合された場合二量体を形成する構築物である。好ましくは、抗体Fc領域が、2個のβ2GPIポリペプチドに作動可能に結合した場合、各ポリペプチドは、β2GPIの少なくともドメインVを含み、β2GPIポリペプチドは、Fc領域に結合した場合二量体を形成し、かつ、得られた構築物はホスファチジルセリンに結合する、すなわち、β2GPIポリペプチドは、Fc領域に結合すると二量体を形成し、かつ、ホスファチジルセリンに結合する。

【0037】

さらに、抗体のFc領域が2個のβ2GPIポリペプチドに作動可能に結合した場合；β2GPIポリペプチドそれぞれが、β2GPIの少なくともドメインVを含み、β2GPIのドメインIを実質的に欠く場合；および、β2GPIポリペプチドが二量体を形成し、Fc領域に結合した時でもホスファチジルセリンに結合する場合が好ましい。さらに、それぞれが、β2GPIの少なくともドメインVを含む、第1のおよび第2のβ2GPIポリペプチドが、抗体Fc領域に作動可能に結合し、それによってFc-β2GPI二量体を形成する場合が好ましい。

【0038】

しかしながら、ホスファチジルセリン結合性が本発明のβ2GPI含有構築物に要求されるとは言うものの、構築物が2個のβ2GPIポリペプチドを含む必要はないし、また、2個以上のβ2GPIポリペプチドがFc領域に結合した際に二量体を形成する必要もない。例えば、Fc領域は、β2GPI単一ポリペプチドに結合してもよいし、あるいは、結合しても二量体を形成することがない2個以上のβ2GPIポリペプチドに結合してもよく、それでもなお、得られた構築物は、必要な結合価を与える枠組みとして処方されることによって、ホスファチジルセリン結合に使用が可能である。このような処方または枠組みの例としては、上記構築物を含むナノ粒子、リポソーム等がある。

【0039】

ヒトに使用するためには、任意のホスファチジルセリン結合性タンパク質、例えば、1個以上のβ2GPIポリペプチドは、ヒトのホスファチジルセリン結合性タンパク質、例えば、ヒトのβ2GPIポリペプチド（単複）でなければならない。ヒトのFc領域も使用されるので、このタンパク質は、副作用、例えば、免疫原性に関連する副作用が緩和された、完全にヒト的な治療剤を提供するという利点を有する。

【0040】

本発明に使用されるFc領域は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む抗体、すなわち「免疫グロブリン」から得られる。このFc領域は、疾患治療を強調するよう、宿主のエフェクター機能を刺激する能力を持つ構築物を提供する。

【0041】

ヒトでは、ヒトのFc領域の使用が好まれるとは言うものの、他の供給源、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル等から得られたFc領域を使用してもよい。臨床前試験では、Fc領域およびホスファチジルセリン結合性タンパク質の両方とも、その臨床前試験が実施される同じ動物種、例えば、マウスFc領域およびマウス β 2 GPIポリペプチドから選択することが可能である。

10

【0042】

従来技術では、抗体は、通常、4個のポリペプチドー2個の重鎖と2個の軽鎖から形成される“Y”型分子として描かれる。抗体に、その抗原結合特異性を付与する抗原結合または「可変」領域は、軽鎖および重鎖の末端に存在する。抗体をプロテアーゼで処理することによってこの領域を切断することが可能で、それによって別々のFab（「抗原結合性断片」）とFc（「結晶性断片」）領域、ドメイン、または断片が生成される。従って、“Fc”という用語は、従来技術では、「抗原結合領域、ドメイン、または断片を持たない」抗体領域、ドメイン、または断片を意味するのに用いられる。これは、本出願で意図される意味でもあり、従って、構築物の「Fc領域」は、「抗原結合領域、ドメイン、または断片を含まない」、すなわち、抗原に特異的に結合しない抗体領域、ドメイン、または断片である。従って、本発明は、標的問題によって複雑化されないエフェクター機能を持つ構築物を提供する。

20

【0043】

定常域は、抗原を破壊するために使用される機構を決定する、すなわち、エフェクター機能の決定因子を含む。抗体は、その定常域の構造と免疫機能に基づいて大きく五つのクラス、IgM、IgG、IgA、IgD、およびIgEに分割される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 μ 、 γ 、 α 、 δ 、および ϵ と呼ばれる。これらの内のいくつかはさらにサブクラスまたはアイソタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に分割される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造はよく知られる。重鎖 γ 、 α 、および δ の定常域は3個のドメインを持ち、一方、重鎖 μ および ϵ の定常域は4個のドメインを持つ。

30

【0044】

本発明の構築物では、抗体ヒンジ、および、抗体重鎖定常ドメイン C_H2 および C_H3 を有する抗体Fc領域を用いるのが好ましい。抗体ヒンジは、構造的な配慮、例えば、屈曲性にとって重要である。屈曲性は、2個以上のホスファチジルセリン結合タンパク質、例えば、2個以上の β 2 GPIポリペプチドが結合される場合、二量体の形成を促進する可能性がある。ヒンジ領域およびヒンジ結合、または下方ヒンジ領域もエフェクター機能を与える可能性がある。これは必要とされるものではないが、構築物のFc領域はまた、抗体重鎖の定常ドメイン C_H1 または C_H4 の内の少なくとも一つを含んでもよい。

【0045】

40

供給されるエフェクター機能、例えば、補体活性化（C1q結合）、Fcレセプター結合、および、ADCCおよび細胞分解のような過程を効果的に刺激する能力（Bruggemann et al., 1987; Riechmann et al., 1988; Clark, 1997; Padlan, 1994、各特許文書を引用することにより特に指定して本明細書に含める）に鑑みれば、抗体Fc領域は、ヒトのIgG1（ $\gamma 1$ ）、またはヒトのIgG3（ $\gamma 3$ ）抗体のFc領域であることが本発明では好ましい。マウス抗体の場合、Fc領域は、マウスのIgG2a（ $\gamma 2a$ ）、またはマウスIgG2b（ $\gamma 2b$ ）抗体のFc領域であることが好ましい。

【0046】

抗体Fc領域は、少なくとも第1のホスファチジルセリン結合タンパク質、例えば、 β

50

2 G P I ポリペプチドに、任意の動作可能的手段によって結合、結合、または接合される。例えば、直接的共有結合、例えば、化学的架橋リンカーによって、または、抗体 F c 領域およびホスファチジルセリン結合タンパク質が組み換え発現によって調製される場合は、融合タンパク質として結合される。アビジン：ビオチンのような間接的結合、および、同様の他の結合も使用することが可能である。

【0047】

F c 領域およびホスファチジルセリン結合タンパク質は、作動可能に結合または接合される。すなわち、結合または接合後も、F c 領域とホスファチジルセリン結合タンパク質それぞれが、意図される通りに十分に機能できるように結合または接合される。例えば、「作動可能に」結合されるとは、F c 領域が所望のエフェクター機能を実質的に保持し、かつ、ホスファチジルセリン結合タンパク質が、所望の性質、特に、所望の場所においてホスファチジルセリン結合性、または抗脈管形成活性を実質的に保持することを意味する。

10

【0048】

ある実施態様では、「動作可能的結合」とは、F c 領域にホスファチジルセリン結合タンパク質を結合するに際し、結合された時に、特に、ホスファチジルセリン結合タンパク質が2個以上の β 2 G P I ポリペプチドである場合、ホスファチジルセリン結合タンパク質が二量体を形成することを可能とするやり方で行われる結合を含む。

【0049】

選ばれたホスファチジルセリン結合タンパク質が β 2 G P I ポリペプチドであり、および／または、F c 領域上での二量体化が特に望まれる場合、F c 領域を構築物のN-末端部分として使用し、かつ、ホスファチジルセリン結合タンパク質または β 2 G P I ポリペプチドを結合し、これが構築物のC-末端部分となるようにする（図16）ことが本発明では好ましい。

20

【0050】

一方、作動可能に結合するための他のスキームも考えられる。例えば、ホスファチジルセリン結合タンパク質または β 2 G P I ポリペプチドが、構築物のN-末端部分となる、すなわち、抗原結合域の代わりに、または、C_H1ドメインと抗原結合域の代わりに挿入されるスキームであってもよい。この実施態様では、得られた構築物に新たな屈曲性を付与するペプチドまたは化学的リンカー、例えば、4個のグルタミン残基と1個のセリン残基を有するペプチドリinker（G4S屈曲性リンカー）を用いるのが好ましいと思われる。

30

【0051】

2個以上の成分を作動可能に結合させると、得られた構築物は所望の性質を示す。構築物全体における例示の、望ましい生物学的性質としては、ホスファチジルセリンに対する結合能力、宿主のエフェクター機能に対する刺激能力、活性化細胞、例えば、活性化、分裂、損傷、またはアポトーシス内皮細胞、腫瘍細胞、またはウイルス感染細胞等の細胞におけるホスファチジルセリン標的輸送能力、標的部位、例えば、腫瘍血管および腫瘍細胞に対する局在能力、および、抗癌および／または抗ウイルス作用を発揮する能力が挙げられる。

40

【0052】

得られた構築物の生物学的性質はまた、所望の安全性特徴を含む。例えば、構築物は、静止細胞を著明に傷害せず、インビトロで凝固反応を著明に抑制せず、インビボで著明な血栓症を起こさず、または、著明な狼瘡抗凝固活性を持たないことが好ましい。

【0053】

上記から、本発明は、癌、ウイルス感染、およびその他の疾患の治療に有効な、新規レセプター本体およびベータ体構築物を提供する。これらの構築物は、疾患においてホスファチジルセリン標的に効果的に結合し、宿主エフェクター機能を増強することによって該標的の破壊を強化する成分を含む。

【0054】

50

付加的接合体、組成物、およびキット：単独でもきわめて効果的であるが、にも拘わらず本発明はまた、本発明の構築物、レセプター本体、およびベータ体がさらに新たな生物学的因子、診断剤、および治療剤に結合される接合体、組成物、および関連法も提供する。本発明のこの「付加的接合体」は、ホスファチジルセリンに結合する能力、宿主のエフェクター機能を刺激する能力、および、結合した生物学的因子、診断剤、または治療剤を所望標的に送達する能力という三つの能力を持つので、「三重機能剤」である。

【0055】

本発明による、接合体、組成物、製剤、組み合わせ、混合物、キット、第1のおよび第2の医学的使用、および全ての方法に関する下記の説明において、「構築物」は、前述の一次的発明の全ての構築物、レセプター本体、およびベータ体を含む。

10

【0056】

付加的接合体実施態様では、本発明はさらに、元の構築物、レセプター本体、またはベータ体が、「付加的な」、新たな、または外来の生物学的因子、診断剤、または治療剤に作動可能に結合される、新しい範疇の接合体、組成物、キット、および方法を提供する。「外来の」生物学的因子、診断剤、または治療剤は、「元の構築物に既に存在するFcドメインとは別の介在因子」である。

【0057】

付加的、または外来性「生物学的因子」は、直接治療剤または診断剤である必要はない。例えば、本発明は、ADEPT実施態様を含む薬剤前駆体と組み合わせて使用が可能であるように、生物学的因子は、介在因子であってもよく、実質的には不活性な薬剤前駆体を切断して、実質的に活性な薬剤を放出する酵素であることが好ましい。このような介在因子および酵素は、薬剤前駆体およびADEPT法実施態様と関連して後述する。

20

【0058】

「診断剤」に関して言えば、結合させるのに好ましい診断剤は、インビボにおける診断、画像、または検出可能剤である。このような診断的接合体は、ある範囲の疾患におけるアポトーシス前およびアポトーシス細胞の画像化、腫瘍画像化および治療の組み合わせ、および、化学療法監視のための代用マーカーとして本発明を用いる方法において使用されてもよい。好ましい診断剤としては、X線検出可能な化合物、放射性イオン、核磁気スピン共鳴同位元素、およびCESTまたはパラCEST剤が挙げられる。

【0059】

好適な検出可能ラベルとしては、X線検出可能な化合物、例えば、ビスマス（III）、金（III）、ランタン（III）、または鉛（II）；放射性イオン、例えば、銅⁶⁷、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、インジウム¹¹¹、インジウム¹¹³、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、水銀¹⁹⁷、水銀²⁰³、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、ルビジウム⁹⁷、ルビジウム¹⁰³、テクネチウム^{99m}、またはイットリウム⁹⁰；核磁気スピン共鳴同位元素、例えば、コバルト（II）、銅（II）、クロム（III）、ジスプロシウム（III）、エルビウム（III）、ガドリニウム（III）、ホルミウム（III）、鉄（II）、鉄（III）、マンガン（II）、ネオジム（III）、ニッケル（II）、サマリウム（III）、テルビウム（III）、バナジウム（II）、またはイッテルビウム（III）；またはローダミン、またはフルオレセンが挙げられる。

30

40

【0060】

「治療剤」に関しては、ある好ましい治療剤は、細胞毒性、細胞増殖抑制性、抗細胞性、および抗癌製剤である。従って、本発明のレセプター本体またはベータ体は、少なくとも第1の化学療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、抗生物質、放射性同位元素、または凝固剤に結合されてもよい。

【0061】

細胞傷害剤において、本発明で好まれるものは、リシン、ゲロニン、アブリン、ジフテリア、シュードモナス、および百日咳菌毒素である。サイトカインおよびケモカインに関して、本発明で好まれる介在因子は、IL-2、IL-12、TNF- α 、インターフェ

50

ロン- α (IFN- α)、IFN- β 、IFN- γ 、およびLEC (肝臓発現ケモカイン) である。V型ATPアーゼインヒビター、例えば、サリチリハラミド、コンカナマイシン、またはバフィロマイシンも、タンパク質合成インヒビター、例えば、シンベリン、ペデリン、イルシニアスタチンAと同様、本発明では好まれる。

【0062】

タキソール、ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、ゲムシタビン、コンブレタスタチン、ドキソルビシン、およびアドリアマイシンは、本発明において好まれる抗癌剤である。付加的または外来製剤として、砒素の放射性同位元素も本発明では好まれる。凝固剤に関しては、が本発明では好まれる。

【0063】

本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体はまた、抗ウイルス因子または薬剤、例えば、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、またはプロテアーゼインヒビターに作動可能に結合されてもよい。外来性抗ウイルス剤としては、AZT、シドフォビル、およびリバビリンが本発明では好まれる。

【0064】

再び、付加的接合体実施態様において、「接合体」という用語は、元の構築物、レセプター本体、またはベータ体と、付加的介在因子との動作的連結を定義するために用いられるものであって、単に、任意のタイプの動作的連結を指すことを意図するものではなく、特に化学的「共役」に限定されるものではない。ここでも組み換え融合タンパク質の使用が可能である。ホスファチジルセリン結合タンパク質、Fc領域、および新たに結合される介在因子(単複)が、意図通りに十分機能する限り、特に、インビボで標的部位に送達される限り、どのような結合方式であっても好適とされる。

【0065】

β 2GPIポリペプチドが、構築物のホスファチジルセリン結合タンパク質として用いられる場合、一般に、 β 2GPIドメインVに、あるいは、少なくとも、ドメインVの脂質結合領域(単複)の中に、どのようなものであれ付加的介在因子を結合させないことが好ましい。ある実施態様、例えば、図16に示す実施態様では、付加的介在因子は、構築物のN-末端部分に、すなわち、ヒンジまたは C_H 2領域の方に動作的に結合させることが好ましい。

【0066】

本発明はまた、少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体の生物学的有効量を含む組成物を提供する。好ましい組成物は、本発明の、少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の生物学的または治療的有效量を、製薬学的に受容可能な担体の中に含む「薬学的組成物」である。これらの組成物は、製薬学的、薬理学的、治療的、医用的、および獣医学的使用、好ましくは、癌およびウイルス感染治療における使用が意図される。

【0067】

本薬学的組成物は、非経口的投与、例えば、静脈内投与、またはリポソームまたはエロゾルとしての投与用に処方される組成物を含む。エロゾル処方は、ウイルス感染の治療に特に好適である。薬学的組成物における「生物学的または治療的有效量」とは、疾患または障害を治療するのに有効な量、特に、癌またはウイルス感染を治療するのに有効な量である。

【0068】

それぞれ固有の効果を持つとは言うものの、本発明の、各種構築物、レセプター本体、およびベータ体、およびそれらの接合体、および本発明の関連法はまた、他の薬剤および療法と組み合わせられてさらに有利なものとして、本発明の、併用組成物、製剤、およびキット、および関連併用治療法を提供するために使用することも可能である。従って、さらに別の実施態様では、本発明は、例えば、癌および抗ウイルス治療のために用意され、下記にさらに詳述するように、驚くべき共同作用を表すように選ばれた、特定の併用組成物、方法、およびキットを提供する。

【0069】

本発明の局面はさらに、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を、生物学的または治療の有効量の、少なくとも第2の生物学的因子と組み合わせる含む、組成物、薬学的組成物、組み合わせ、混合物、薬剤、および／または、介在因子の薬用混合物を含む。このような組み合わせは全て、「生物学的または治療的に有効な組み合わせ量の」、例えば、疾患、例えば、癌またはウイルス感染を治療するのに有効な組み合わせ量を含む。

【0070】

組成物では、「少なくとも第2の生物学的因子」は、多くの場合、診断剤または治療剤であるが、そうである必要はない。例えば、第2の生物学的因子は、薬学的組成物の成分、例えば、分散剤、または吸収遅延剤であってもよい。他の生物学的因子、例えば、薬剤前駆体およびADEPT法で使用される接合体および薬剤前駆体製造用薬剤、および診断剤は、本発明の第1の組成物とは組み合わせられるが、別々に維持されるのが好ましく、従って、本発明のキットを参照しながら後述される。「組み合わせられるが、別々に」とは、共に緊密に同梱されるが、同じ組成物の部分としてではなく、例えば、同じ溶液または薬学的組成物の部分としてではなくということの意味する。

【0071】

「少なくとも第2の治療剤」について言えば、「第2の」という用語は、「第1の」治療剤である、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を参照した用語である。

【0072】

本発明が癌治療用に意図される場合、少なくとも第2の治療剤は、「少なくとも第2の、別の抗癌剤」であることが好ましい。併合使用のための第2の抗癌剤は、放射線治療剤、化学療法剤、抗脈管形成剤、またはアポトーシス誘発剤、サイトカインまたは抗体、または、腫瘍細胞に結合する抗体-治療薬剤構築物、壊死腫瘍細胞から放出される細胞内抗原、または、腫瘍血管成分（すなわち、抗癌免疫トキシンまたは凝固リガンド）であってもよい。本明細書で用いる「化学療法剤」とは、遺伝子、ベクター、アンチセンス構築物、およびリボザイムを含む。

【0073】

併合使用のための、ある好ましい第2の抗癌剤は、本発明の第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体、および／または、特定の腫瘍タイプまたは患者のために選択された第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の治療作用を補充または強化するものである。「治療作用を補充または強化する治療剤」は、放射線治療剤、血管透過性強化剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、ある種のサイトカイン、抗癌性細胞免疫トキシンの外、選ばれた化学療法剤を含む。本発明において好まれる「選ばれた化学療法剤」は、表Eに見られるような抗脈管形成作用を持つ化学療法剤、表Fに見られるようなアポトーシスを誘発する化学療法剤、カルシウムフラックス誘発剤、炎症性サイトカイン、 H_2O_2 、トロンビン、および、コンブレタスタチンファミリーの抗チューブリン薬剤である。さらに、ドキシソルビシン、エトポシド、およびアクチノマイシンDも好まれるが、ドセタキシルがもっとも好まれる。

【0074】

本発明がウイルス治療の使用が意図される場合、少なくとも第2の治療剤は、「少なくとも第2の、別の抗ウイルス剤」であることが好ましい。併合使用のための、この第2の抗ウイルス剤は、任意の抗ウイルス剤、または本発明の実施時に利用可能な薬剤、例えば、本発明の構築物への結合に関して本明細書に記載した範囲の抗ウイルス剤および薬剤を含む薬剤から選ばれてもよい。例示として述べれば、抗レトロウイルス剤、例えば、NTR I、非ヌクレオシドRTインヒビター、およびプロテアーゼインヒビター、表Gに示される抗ウイルス剤、および好ましくはAZT、またはシドフォビルが選ばれる。

【0075】

本発明はさらに、リポソーム、脂質担体、複合体、混合物、超分子構造多分子凝集体、

10

20

30

40

50

または本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を含む、脂質系薬剤送達システムを提供する。リポソームまたはリポソーム様組成物は、単層、二重層、多分子凝集体、小胞、螺旋、ディスク、チューブ、ファイバー、円環体、六角相、ゲル相、液体－結晶相、液体－結晶性多分子凝集体、ミセル、逆転ミセル、微小乳液、乳液、微小貯留槽、油小滴、脂肪小滴、ワックス小滴、および／またはコロイド状粒子の形を取ってもよい。

【0076】

リポソーム、またはリポソーム様組成物は、一般に、「外膜」すなわち粗大な水性相と、「中心コア」すなわち内部の水性相を含む。好ましい実施態様では、リポソームまたはリポソーム様組成物は、ステルス処理されたリポソーム、脂質担体、複合体、混合物、超分子構造多分子凝集体、または脂質系薬剤送達システムである。「ステルス処理された」リポソームおよびリポソーム様組成物は、該膜と作動可能に連結した、生物学的有効量の、少なくとも第1のステルス剤を含む。「ステルス剤」とは、リポソームまたはリポソーム様組成物の外膜と動作的に連結されると、そのリポソームまたはリポソーム様組成物の生物学的半減期を延長する組成物である。「動作可能的連結」では、リポソームまたはリポソーム様組成物の外膜は、1種以上のステルス剤によってコートされることが好ましい。

10

【0077】

効果的ステルス剤としては、ある範囲の生体適合性疎水性ポリマー、例えば、ポリアミン、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリ酢酸－ポリグリコール酸（PLGA）、ポリペプチド、および関連物質が挙げられる。好ましいステルス剤は、ポリエチレングリコール（PEG）成分であり、この場合、得られるステルス処理リポソームは「PEG処理リポソーム」と呼ばれる。

20

【0078】

本発明の好ましいリポソームは、ステルス処理またはPEG処理リポソームであり、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体が、リポソームの外膜と作動可能に連結されるリポソームであり、その際、リポソームはステルス剤でコートされていることが好ましい。

【0079】

特に好ましいリポソームは、このような「コートされ」、ステルス処理されるか、またはPEG処理されたリポソームであって、第1の治療剤、例えば、抗ウイルス剤または、好ましくは抗癌剤が、リポソームと作動可能に連結するか、または、リポソーム処方内部に分散するリポソームである。治療剤、抗ウイルス剤、または抗癌剤は、リポソームの中心コアと作動可能に連結するか、または中心コア内部に維持されることが好ましい。例示の抗癌剤は、核種（単複）、および化学療法剤、例えば、抗チューブリン剤、ドセタキセルおよびパクリタキセルであるが、ドセタキセルが好ましい。

30

【0080】

本発明のさらに別の実施態様は、少なくとも第1の組成物または容器の中に、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体を、生物学的または治療的有效量の、少なくとも第2の生物学的因子、成分、またはシステムと組み合わせて含むキットに関する。

40

【0081】

この「第2の生物学的因子、成分、またはシステム」は、治療剤または診断剤に限定されない。例えば、第2の生物学的因子、成分、またはシステムは、構築物を修飾する、および／または、他の薬剤を結合させるための成分を含んでもよい。ある好ましい第2の生物学的因子、成分、またはシステムは、薬剤前駆体、または、薬剤前駆体を製造・使用するための成分、例えば、薬剤前駆体そのものを製造するための成分、および、本発明の構築物を、そのような薬剤前駆体またはADEPT実施態様において機能するように適応させるための成分を含む。

【0082】

50

この少なくとも「第2の診断剤、成分、またはシステム」は、インビトロ診断試験によって直接または間接に検出可能な診断剤、成分、またはシステムであってもよい。「直接検出が可能なインビトロリポーター因子」としては、放射標識、免疫蛍光およびルシフェラーゼによって検出が可能なリポーター因子が挙げられる。「間接的に検出が可能なインビトロリポーター因子」は、別の外来因子（単複）、例えば、発色源物質と接触すると着色産物を生成する検出可能酵素と協調して機能する。これらは、直接的または間接的に検出可能な因子、例えば、放射標識または酵素に結合される「二次抗体」を含み、かつ、三次抗体が検出可能因子に結合される、「二次および三次抗体検出システム」を含む。

【0083】

本発明の好ましい診断キットは、インビボ診断または画像法によって検出が可能な診断剤、成分、またはシステムを含むキットである。本発明の画像法実施態様の利点は、同じ構築物が、画像法にも治療にも使用が可能であることである。従って、本発明は、下記を含むキットおよび薬剤を提供する、すなわち、

(a) 検出可能標識または診断剤に対して作動可能に結合される、診断有効量の、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体を含む第1の薬学的組成物；および、

(b) 治療有効量の、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、好ましくは、治療有効量の、第1の薬学的組成物において使用されたものと同じ構築物、レセプター本体、またはベータ体を含む第2の薬学的組成物。

【0084】

治療実施態様で使用するためには、キットは、「少なくとも第2の治療剤」を含む。そのようなキットは、生物学的または治療的に有効な組み合わせ量、例えば、増殖またはウイルス複製を抑制する、または、癌またはウイルス感染のような疾患を治療するのに有効な組み合わせ量の、少なくとも二つの指定の薬剤を含む。

【0085】

癌治療に関して言えば、本発明のキットは、薬剤前駆物質およびADPPTと組み合わせて使用される抗体を含む。この組成物では、構築物、レセプター本体、またはベータ体は、「転換または酵素能力を発揮するように修飾される」。構築物、レセプター本体、またはベータ体は、少なくとも一つの薬剤前駆体を薬剤の活性形に転換することが可能な、少なくとも第1の転換剤または酵素に対し、作動可能に連結する、好ましくは共有的に結合するまたは接合することが好ましい。

【0086】

酵素的構築物または酵素接合構築物、レセプター本体、またはベータ体は、「薬剤前駆体」から成る、初期には別物の処方と組み合わせられる。薬剤前駆体とは、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体と連結する酵素能力、転換機能、または酵素と接触すると、該薬剤の活性形に転換される、薬剤の不活性形または弱活性形である。

【0087】

従って、好ましくは別々の組成物および／または容器において、下記、すなわち、

(a) 生物学的有効量の、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、その際、該構築物、レセプター本体、またはベータ体は、少なくとも第1の酵素に、作動可能に連結、または共有的に結合または接合する；および、

(b) 生物学的有効量の、少なくとも第1の、実質的に不活性な薬剤前駆体、該薬剤前駆体は、前記構築物、レセプター本体、またはベータ体に連結、結合、または接合される酵素によって、実質的に活性な薬剤に転換される、

を含むキットが提供される。

【0088】

実質的に不活性な薬剤前駆体を切断して、実質的に活性な薬剤を放出するのに好適な酵素としては、アリアルスルファターゼ、セラチアプロテアーゼ、テルモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、カテプシン、D-アラニルカルボキシペプチダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ノイラミニダーゼ、β-ラクタマーゼ、ペニシリンアミダーゼ、およびシトシンデアミナーゼが挙げられる。

【0089】

薬剤前駆体とは別に、少なくとも第2の抗癌剤は、本発明の組み合わせられた抗癌組成物に関連して前述した、第2の抗癌剤の内の任意のものであってよい。ウイルス感染を治療するために、少なくとも第2の抗ウイルス剤も、本発明の組み合わせられた抗ウイルス組成物に関連して前述した、第2の抗ウイルス剤の内の任意のものであってよい。一方、「キット」は、前述の薬剤の内の少なくとも二つを「組み合わせ、ただし別々に」含んでもよい。このようにすると、薬剤の選択にさらに大きな柔軟性が得られる。

【0090】

従って、本発明のキットは、単一の容器または容器手段、または別々の容器または容器手段の中に、生物学的または治療的に有効な組み合わせ量の、少なくとも二つの指定薬剤を含んでもよい。キットはまた、その中に含まれる生物学的因子および治療剤を使用するための案内を含んでもよい。画像成分もまた、治療キットと組み合わせ、しかし別々に含まれてもよい。

10

【0091】

腫瘍治療および関連法：本発明は、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体のための、いくつかの方法および使用を提供する。全ての方法について、「ある」という用語は、特異的に言明される場合を除き、言及される方法の工程の内、「少なくとも一つの」、「少なくとも第1の」、「一つ以上の」、または「複数の」工程を意味するのに用いられる。これは特に、治療法の投与工程に関係する。従って、本発明においては様々な用量の採用が可能であるばかりでなく、様々な回数 of 投与、例えば、注入または吸引、ある多数回を含む、該多数回までの注入または吸引の使用が可能である。

20

【0092】

重要な生物学的内容を持つ、種々の有用なインビトロ法および使用が提供される。従って、ホスファチジルセリンに対する結合法および使用であって、一般に、本発明の第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体に、フォスファチジルセリンを含む組成物を効果的に接触させることを含む方法および使用が提供される。「接触」は、結合複合体の形成を可能とし、かつ、そのように形成された複合体の、それがどのようなものであれ、検出を可能とするのに効果的な条件下で行われる。

【0093】

この検出法および使用は、生物サンプルと組み合わせ、例えば、アポトーシス、腫瘍、およびウイルス感染細胞の診断学において使用されてもよく、この方法および使用に基づく診断キットも提供される。これらの方法およびキットは、本発明の構築物、レセプター本体、ベータ体、および接合体に関する特異的で、信用性の高い使用を提供する。例えば、本発明では、アポトーシス細胞を検出するための方法およびキットにおいてアネキシンVが使用される。一方、アネキシンVは、ホスファチジルセリンと同様、フォスファチジルエタノールアミンにも結合するが、他方、本発明の構築物、レセプター本体、ベータ体および接合体はホスファチジルセリンには結合するが、フォスファチジルエタノールアミンに対して目立つ程には、または好ましくは検出可能な程度には結合しない。従って、本発明の構築物は、検出法および診断アッセイにおいて、ホスファチジルセリンをより特異的に検出することが可能である。

30

40

【0094】

本発明はさらに、沢山の有用なインビボ法および使用を提供する。例えば、腫瘍血管に到達するための、安定的標的マーカーである、ホスファチジルセリンに対する局在化に基づく、腫瘍血管標的法、腫瘍画像法および治療法が提供される。本発明の構築物、レセプター本体、およびベータ体、およびその接合体は、腫瘍を持つ動物に投与されると、硬組織腫瘍の血管に対して特異的に局在する。従って、完全アポトーシスおよび細胞死とは独立に、少なくとも相当部分において、腫瘍血管内皮細胞の表面に対するフォスファチジルセリンの転位が起こり、そのため、ホスファチジルセリンは、形態学的に無傷な血管内皮細胞でも露出される。

50

【0095】

この方法および使用は、インビトロおよびインビボで実行が可能である。後者の場合、組織または細胞は動物の体内に局在し、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体はその動物に投与される。組織または細胞が体外で維持される場合、本発明は、薬剤発見プログラムにおいて好適に利用される。信頼性の高い陽性および陰性コントロールを用いたインビトロ・スクリーニングアッセイは、薬剤開発の第1の工程として有用である。組織または細胞が、動物または患者の体内に局在する場合、組成物は、治療の形式としてその動物に投与される。

【0096】

抗脈管形成剤および抗血管療法は、望ましくない、不適切な、異常な、過剰な、および／または、病的な脈管形成または血管形成によって特徴づけられる任意の疾患または障害を持つ、または発症する恐れのある動物および患者に関連して提供される。本発明の方法および使用は、任意の形の血管増殖腫瘍、加齢性黄斑変性を含む黄斑変性、関節リウマチを含む関節炎、アテローム硬化症およびアテローム硬化プラーク、糖尿病網膜症およびその他の網膜症、グレイズ病を含む甲状腺過形成、血管腫、血管新生緑内障、および乾癬を有する、または発症の危険性のある動物および患者に対する使用が特に意図される。ある実施態様では、脈管形成の抑制に使用するために、ニックドメインVを含む $\beta 2 G P I$ ポリペプチドに対し作動可能に結合されるFc領域の使用が好まれる。

【0097】

米国特許第5,712,291および6,524,583号に開示されるように、なおこれら特許文書を引用することにより特に指定して本明細書に含める、前述の治療グループは、それぞれ、本発明によって治療される病態タイプに関して決して網羅的なものではない。米国特許第5,712,291および6,524,583号は、あるいくつかの特定の目的、例えば、ある定められた範疇の化合物が開示され特許請求された後、効果的に治療される可能性のある、いくつかの他の病態を特定する目的、および、他の疾患の治療も、単一モデルシステムのみからのデータによって可能であることを示す目的のため、参照することによって本明細書に含める。

【0098】

血管病の治療の外に、本発明の重要かつ一体的局面は、癌治療のための組成物および方法である。このような方法は、癌を抱える、または癌を発症する危険性のある動物または患者に対し、生物学的または治療的に有効な量の、本発明の、少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を投与することを含む。

【0099】

本発明の癌治療法および使用は、血管増殖硬組織腫瘍、転移腫瘍、または一次腫瘍からの複数転移を有する、または発症する危険性のある動物および患者を含む、あらゆる形態の癌の治療に好適である。本発明の癌治療法は、抗血管作用、例えば、腫瘍血管内皮細胞の腔表面に露出されるホスファチジルセリンを標的輸送することによる抗血管作用のみに依存するものではない。なぜなら、本発明の構築物は、同時に腫瘍細胞の表面に露出されるホスファチジルセリンをも標的とするものであるから。本発明の方法は、目立った血栓合併症をもたらすことなく抗癌作用を発揮することが好ましい。

【0100】

元の発明の未接合構築物、レセプター本体、またはベータ体、または、新たな、その接合体を、本発明の癌治療局面に使用してもよい。免疫接合体の使用について言うと、本発明は、腫瘍に診断剤または治療剤を送達する方法を提供する。このような実施態様は、腫瘍を持つ動物または患者に、生物学的有効量の、少なくとも第1の接合体を投与することを含む。その際、該接合体では、診断剤または治療剤が、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体に作動可能に結合される。

【0101】

本発明はまた、前アポトーシスおよびアポトーシス細胞を検出するために本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体を用いる、腫瘍診断、予後決定、画像記録、および

10

20

30

40

50

関連法を提供する。このような方法は、他の治療、特に化学療法の進行を監視するための代行マーカーとして、あるいは、治療前の腫瘍の画像を形成するために使用することが可能である。

【0102】

癌治療、特に化学療法の進行を監視するための代行マーカーとして本発明を導入させる使用は、

(a) 腫瘍を抱える動物または患者に対し、抗腫瘍作用を及ぼすように設計された少なくとも第1の治療を施すこと；

(b) 次いで、同じ動物または患者に対し、検出可能な標識または診断剤に作動可能に結合される、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体の診断的有効量を投与し、腫瘍の検出可能な画像、好ましくは、腫瘍内の、前アポトーシスまたはアポトーシス腫瘍細胞または腫瘍血管内皮細胞の画像を形成すること；

(c) 腫瘍の検出可能な画像、好ましくは、腫瘍内の、前アポトーシスまたはアポトーシス腫瘍細胞または腫瘍血管内皮細胞の画像を分析し、抗腫瘍作用を及ぼすように設計された少なくとも第1の治療の進行または効果を評価すること、

を含む。

【0103】

画像記録および癌治療組み合わせ法は、

(a) 腫瘍を持つ動物または患者に対し、検出可能な標識または診断剤に作動可能に結合される、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体の診断的最小量または有効量を投与することによって腫瘍の画像を形成し、該腫瘍の検出可能画像を形成すること；および、

(b) 次いで、同じ動物または患者に対し、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の治療的最適量または有効量を投与することによって抗腫瘍作用をもたらすこと、

を含む。

【0104】

本発明の癌治療法において、本発明はさらに、薬剤前駆体治療法であって、一般に、

(a) 腫瘍を抱える動物または患者に対し、少なくとも第1の酵素に対し作動可能に連結、共有的に結合または接合される、本発明の第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体を含む、第1の薬学的組成物を投与すること；

(b) 次いで、該動物または患者に対し、効果的な時間間隔の後、生物学的有効量の、少なくとも一つの実質的に不活性な薬剤前駆体を投与することを含み、その際、薬剤前駆体は、腫瘍内に局在化される、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体に連結、結合、または接合される酵素によって実質的に活性な薬剤に転換される、

方法を提供する。

【0105】

本発明は、ある範囲の組み合わせ癌治療法であって、癌を抱える動物または患者に対し、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体、および、少なくとも第2の、別の治療剤または抗癌剤を投与することを含む方法を提供する。

【0106】

一般的に、少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に対し、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の投与前、投与中、または投与後に投与されてもよい。少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に対し、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体と「実質的に同時に」、例えば、単一の薬学的組成物、または、きわめて接近して投与される二つの薬学的組成物から放出されるように投与される。

【0107】

それとは別に、少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に対し、本発明の構築物、

10

20

30

40

50

レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の投与後のある時点で投与されてもよい。本明細書で用いる「後のある時点」とは、少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に対し、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の投与時とは別の時点で投与されるように「間を置くこと」を意味する。

【0108】

継続投与の場合、二つの薬剤は、該二つの薬剤がそれぞれの治療効果を発揮できるよう効果的に隔てられた別時点で投与される、すなわち、二つの薬剤は、「生物学的に有効な間隔を置いて」投与される。少なくとも第2の抗癌剤は、動物または患者に対し、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の投与前の、生物学的に有効な時点において、または該治療剤投与後の生物学的に有効な時点において投与されてもよい。

10

【0109】

本発明の組み合わせ癌治療法に使用される第2の治療または抗癌剤としては、任意の治療または抗癌剤、例えば、本発明の抗癌組成物およびキットと関連して上述した治療または抗癌剤の内の任意のものをを用いてよい。好ましい薬剤は、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体の治療作用を補充または強化する薬剤、例えば、血管透過性強化剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、カルシウムフラックス誘発剤、炎症性サイトカイン、抗体、腫瘍細胞および壊死腫瘍細胞に対する免疫トキシン、表Eまたは表Fに見られる化学療法剤、コンブレタスタチン、ドキソルビシン、エトポシド、およびアクチノマイシン-Dである。

20

【0110】

ドセタキセルは、組み合わせ療法の使用には特に好まれる薬剤である。ドセタキセルは、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体とは別に、その前か後のいずれかに投与されてよい。同時投与について言えば、ドセタキセルは、別の、または同じ処方において、要すれば任意にリポソーム、またはステルス処理リポソームにおいて、好ましくは、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体によって被覆されたステルス処理リポソームのコア内に納められて投与される。

【0111】

ウイルス感染を治療する：別の全体的実施態様では、本発明はさらに、ウイルス感染および疾患の治療に使用される、ウイルス複製、感染、および伝播を抑制するための、重要な新規クラスの組成物および方法を提供する。これらの方法は、それが抗ウイルス剤に接合されるかどうかには無関係に、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体の使用に基づく。重要なことは、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体は、何か別の薬剤に結合されることがなくとも抗ウイルス作用を発揮することである。別の薬剤に対する結合が望まれるのであれば、古典的抗ウイルス剤ばかりでなく、細胞傷害剤およびその他の薬剤も抗ウイルス治療には効果的である。従って、ある範囲のウイルス感染および関連疾患の治療には、このような構築物および接合体も広く適用が可能である。

30

【0112】

第1の例では、本発明の抗ウイルス法は、生物学的有効量の、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体に対し、ウイルス感染細胞を含む、または含むことが疑われる細胞または細胞集団を接触させることに関する。ウイルス感染細胞は、真核細胞、例えば、動物細胞であることが好ましく、哺乳動物またはヒトの細胞であることが好ましい。

40

【0113】

抗ウイルス法および使用は、インビトロおよびインビボで実行することが可能である。インビトロ実施態様では、方法は重要な利便性を持つ。例えば、本発明は、抗ウイルス剤またはその組み合わせの開発のための薬剤発見プログラムの外に、ウイルス感染、複製、および伝播に関する新たな情報の定義においても有用である。インビトロ抗ウイルス法はまた、生物サンプル、例えば、実験室用の細胞集団および細胞培養体、サンプル、組織、種、植物部分、および、農業用植物、治療用血液および組織サンプルからウイルスを駆逐

50

するためにも使用される。

【0114】

細胞、集団、または組織が動物の体内に局在するインビボ法では、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体は、抗ウイルス治療として動物に投与される。本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体は、ウイルス感染細胞の表面に露出されるホスファチジルセリンに結合する可能性があり、あるいは、ウイルス粒子の表面に露出されるホスファチジルセリンに結合する可能性がある。

【0115】

いずれの場合でも、組成物、方法、および使用は、ウイルス侵入を抑制することを含め、生産的または進行的ウイルス感染にとって必要な工程または段階を抑制する。組成物、方法、および使用は、ウイルス複製および／または伝播を抑制する、例えば、ウイルスの転写、翻訳、アセンブリ、パッケージング、および／または、感染宿主細胞内への、または該細胞からの溢出等、の内の1個以上の工程を抑制する。従って、本発明は、ウイルス感染を、初期に感染した細胞および細胞集団に限定し、実質的に封鎖し、このようにして、さらに別の宿主細胞または組織の、その後の、または進行中の感染を抑制または阻止することが好ましい。

【0116】

本発明の抗ウイルス治療法は、ウイルス感染または関連疾患を持つ、持つことが疑われる、または、発症の危険性がある動物または患者に対して、生物学的有効量の、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を投与することに関することが好ましい。接合体は、V型ATPアーゼ、例えば、サリチリハラミド、コンカナマイシン、またはバフィロマイシン；タンパク質合成インヒビター、例えば、シンベリン、ペデリン、イルシニアスタチンA；リシン、ゲロニン、アブリン、ジフテリア、シュードモナス、または百日咳菌毒素；または、少なくとも第2の、別の抗ウイルス剤に作動可能に結合されてもよい。結合のための好適な抗ウイルス剤としては、表Gに記載されるもの、例えば、AZTまたはシドフォビルが挙げられる。

【0117】

本発明は、全てのウイルスに共通な生産的または進行的感染に必要な1種以上の工程または段階を抑制するので、本発明の抗ウイルス法および使用は、エンベロープ被覆、非エンベロープ被覆を問わず、全てのウイルス、例えば、植物、動物、脊椎動物、哺乳類、およびヒト患者に感染するものを含む全てのウイルスを治療するのに好適である。本発明は、本明細書の表Hに列挙されるように、脊椎動物に感染する全てのウイルス、特にヒトに感染するウイルス、特に、動物およびヒトにおいて病原となるウイルスの治療に好適である。本発明によって治療が可能な、ウイルス感染および、関連および由来疾患としては、表Jに記載されるウイルスおよび疾患が挙げられる。例示として、CMV、RSV、アレナウイルスおよびHIV感染、および疾患として肝炎、インフルエンザ、肺炎、ラッサ熱、およびAIDSの治療が挙げられる。

【0118】

本発明の抗ウイルス治療法も、その他の治療法および診断法と組み合わせて使用することが可能である。組み合わせ治療法は、ウイルス感染を抱える動物または患者に対し、治療的に有効な組み合わせ量の、本発明の少なくとも第1の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体、および少なくとも第2の、別の治療または抗ウイルス剤を投与することを含む。

【0119】

この少なくとも「第2の、別の」抗ウイルス剤は、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体が、「第1の」抗ウイルス剤であることに基づく。この少なくとも第2の抗ウイルス剤は、動物または患者に対し、本発明の第1の抗ウイルス剤の投与中に、または実質的に同時に、すなわち、その前に、またはその後に、すなわち、本発明の第1の抗ウイルス剤の投与に続いて投与されてもよい。

【0120】

本発明の組み合わせ抗ウイルス治療法では、第2の治療剤または抗ウイルス剤として任意の治療剤または抗ウイルス剤の使用が可能であり、例えば、本発明の抗ウイルス接合体、組成物、およびキットと関連して上述した抗ウイルス剤の内の任意のものを含む抗ウイルス剤の使用が可能である。

【0121】

前述の癌および抗ウイルス治療法および使用は、多くの場合、動物または患者に対し、製薬学的に有効な組成物の全身的投与、例えば、経皮、筋肉内、静脈内注入等による投与を含む。ウイルス感染、特に、呼吸器のウイルス感染の治療では、エロゾルを用いて実現される肺への送達は、もう一つの好ましい実施態様である。しかしながら、腫瘍またはウイルス感染部位に対する治療剤の局在を可能とするものであれば、どのような投与ルートも受容が可能である。従って、その他の好適な送達ルートとしては、経口、直腸、鼻腔内、局所、および経腔ルートが挙げられる。関節炎治療用の使用および方法では、例えば、米国特許第5,753,230号において他の免疫剤に関して記載されるように、滑膜内投与を用いることも可能である。眼に関連した病態では、眼科用処方および投与が考慮される。

10

【0122】

本明細書で用いる「投与」とは、治療作用を及ぼすのに有効な量（単複）および期間（単複）において行われる、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体の供給または送達を意味する。タンパク質様治療剤の受動的投与は、一部は簡便と再現性のために、一般に好まれる。

20

【0123】

一方、「投与」という用語は、本明細書では、治療剤の送達に用いられる任意の、また全ての手段を指すために用いられる。従って、「投与」は、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を効果的に生産する細胞の調製を含む。この実施態様では、選択的透過膜、構造体、または埋設可能デバイス、一般に治療を停止するために取り出すことが可能なデバイスに含まれるものとして、細胞を処方する、または包装することが望ましい。それでも、一般に、外部投与は、用量の緊密な監視、および調節を可能とする非侵襲的方法を代表するものなので、好まれる。

【0124】

本発明の治療法および使用はまた、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を、インビボの発現をもたらすほど効果的なやり方でコードする核酸の調製にまで発展する。任意の遺伝子治療技術、例えば、裸のDNA送達、組み換え遺伝子およびベクター、患者細胞の体外操作を含む細胞性送達等の使用が可能である。ウイルスベクター、例えば、組み換えレトロウイルス、単純疱疹ウイルス（HSV）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）、サイトメガロウイルス（CMV）等の内部に含まれるものも使用が可能である。ある実施態様では、リポソーム、およびステルス処理リポソームの使用も好ましい。

30

【0125】

本発明の薬学的組成物および治療法は、「治療的有效量の」本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体を用いる。「治療効果」、およびそれから導かれる「治療有効量」は、癌治療対抗ウイルス治療における種々のパラメータによって測定される。

40

【0126】

癌治療では、薬剤の量は、腫瘍細胞、腫瘍、または腫瘍内血管内皮細胞を殺す、または少なくともその一部を特異的に殺すのに有効であり；腫瘍細胞、腫瘍、または腫瘍内血管内皮細胞においてアポトーシスを誘発する、または少なくともその一部において特異的にアポトーシスを誘発するのに有効であり；腫瘍または腫瘍内血管において凝固を促進する、または少なくともその一部において特異的に凝固を促進するのに有効であり；腫瘍の血液輸送血管を閉塞または破壊する、または少なくともその一部を特異的に閉塞または破壊するのに有効であり；腫瘍の壊死を誘発する、または少なくともその一部において特異的

50

に壊死を誘発するのに有効であり；および／または、動物または患者に投与することによって腫瘍の萎縮または寛解を誘発するのに有効である。

【0127】

ウイルス感染および関連疾患の治療では、薬剤の量は、進行するウイルス感染のための一つ以上の要件、例えば、ウイルスの侵入、および、好ましくは、ウイルスの複製、感染宿主細胞からの溢出および拡散を抑制するのに有効である。その量はまた、ウイルス感染細胞の少なくとも一部を、ウイルスの複製、拡散、および進行感染に対抗するやり方で殺す、または排除することが可能である。まとめると、薬剤の量は、動物または患者に投与されると、ウイルス感染を低減、著明に低減または根絶するのに有効である。

【0128】

本明細書に用いる「好んで」および「特異的に」という用語は、本発明の構築物、レセプター本体、またはベータ体、またはその接合体は、疾患部位に実質的に限局した抗癌または抗ウイルス作用を実現するが、動物または患者の正常で健康的な組織に対しては凝固、破壊、および／または組織壊死を実質的にもたらすことがないことを意味する。従って、健康細胞および組織の構造および機能は、本発明を実施することによって実質的に妨げられることなく維持される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0129】

(例示的な実施形態の詳細)

固形腫瘍およびガン腫は、ヒトにおける全てのガンの90%より多くに相当する。モノクローナル抗体および免疫毒素の使用は、リンパ腫および白血病の治療において検討されている(Vitettaら, 1991)が、これらの因子は、ガン腫および他の固形腫瘍に対する臨床試験においては失望すべきことに有効ではなかった(AbramsおよびOldham, 1985)。抗体に基づく処置が有効でないことについての主な理由は、高分子は固形腫瘍に容易に輸送されないということである。一旦、腫瘍塊内になっても、これらの分子は、腫瘍細胞、線維性間質、間質性圧力勾配および結合部位障壁の間の緊密な結合の存在に様に起因して分布することができない(Denekamp, 1990; Dvorakら, 1991)。

【0130】

固形腫瘍を処置するための新規な戦略を開発することにおいて、腫瘍細胞ではなく腫瘍の脈管を標的する工程を包含する方法によって別個の利点を得られる。腫瘍血管の有効な破壊または遮断は、腫瘍を通じた血流を停止させ、腫瘍細胞死亡の崩壊を生じる。抗体毒素および抗体凝固構築物、腫瘍血管を選択的に破壊および／または閉塞するVTAの例は既に、腫瘍脈管構造の特定の標的および破壊において大きな効果を発揮しており、腫瘍壊死を生じる(Burrowsら, 1992; BurrowsおよびThorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; Huangら, 1997; 各々が参考として本明細書に援用される)。

【0131】

VTAは、固形腫瘍の既存の血管に対してその一次的な作用を発揮し、新しい血管形成を妨げる血管新生阻害因子とは異なる。他のガン治療を上回るVTAの多くの利点がある。第一に、単一の血管によって、栄養が供給されて、数百または数千の腫瘍細胞からの代謝物の廃棄物の除去が促進されており、血流の上流および下流をブロックするためには1つのポイントを損傷させるだけでよい。従ってVTAは樹立された腫瘍には特に有効である。第二に、内皮細胞殺傷は有用な機構の1つであるが必要ではない。血液凝固の形状または開始位置の変化は十分であり得る。第三に内皮細胞は血流に隣接し、十分な薬物送達を保障する。第四に、標的は、薬物耐性を付与する遺伝的変異を獲得する可能性の低い正常な二倍体細胞である。第五に生物学的活性の代理のマーカー(すなわち血流)は測定可能である。

【0132】

第六に、血管機能に対する一時的な効果は有意な抗腫瘍効果について十分であり得る。

10

20

30

40

50

研究によって、インビボにおいて99%を上回る腫瘍細胞が、虚血の2時間の間に殺傷され得ることが示される。最終的に、脈管形成インヒビターとは異なり、VTAは、数ヶ月または数年を超える慢性的な投与ではなく、従来の処置と協同作用するためには間欠的な投与しか必要としない。

【0133】

細胞傷害性VTAは、以下の特許に記載されている：各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第5,660,827号、同第5,776,427号、同第5,855,866号、同第5,863,538号、同第5,965,132号、同第6,004,554号、同第6,051,230号、同第6,261,535号、および同第6,451,312号。腫瘍脈管構造に対して凝固因子を特異的に送達するために抗体、成長因子または他の結合リガンドが用いられる場合、このような因子は「コアグリガンド (coaguligands)」と名付けられる。コアグリガンドVTAは、以下の特許に記載される：各々が参考として援用される、米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号および同第6,036,955号。

【0134】

コアグリガンドにおける使用のための現在好ましい凝固因子は、短縮型組織因子 (truncated Tissue Factor) (tTF) (Huangら、1997; WO96/01653; 米国特許第5,877,289号) である。TFは、血液凝固の主な開始因子である (Rufら、1991; Edgingtonら、1991)。損傷の部位で、血液中の第VII/VIIa因子は、血管周囲の組織における細胞上のTFに接触して結合する。TF:VIIa複合体は、リン脂質表面の存在において、因子IXおよびXを活性化する。これが次に、トロンビンおよびフィブリンの形成を導き、最終的に血液凝固をもたらす (RufおよびEdgington, 1994)。

【0135】

細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠く、組換えの短縮型の組織因子 (tTF) は、ネイティブなTFよりも凝固を誘導する能力の大きさが約5分の1である可溶性のタンパク質である (Stoneら、1995; Huangら、1997)。この理由は、TFが、効率的にIXaまたはXaを活性化する、VIIaとの複合体についてリン脂質と関連する必要があるということである。しかし、抗体または因子を標的化する手段によって腫瘍血管内皮に対してtTFが送達される場合、これは脂質表面に近位に戻されて血栓形成性の活性を回復する (Huangら、1997; 米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号および同第6,036,955号)。従って、腫瘍脈管構造を選択的に血栓症にさせるコアグリガンドが作製される。

【0136】

短縮されたTFは、脈管標的化コアグリガンドにおける使用が推奨されるいくつかの利点を有する：ヒトtTFは容易に利用可能であり、ヒトタンパク質は、ヒトにおいては免疫原性が無視できるかまたは低い；ヒトtTFは、マウスを含む実験動物において完全に機能的である；標的されたtTFは非常に強力である。なぜなら、凝固タンパク質のカスケードの活性化を誘引して、大きく増幅された効果を生じるからである (米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号、および同第6,036,955号)。

【0137】

腫瘍内皮から入手できるが、正常な内皮細胞からはかなり損なわれている、一連の適切な標的分子が記載されている。例えば、発現された標的、例えば、エンドグリン、Eセ렉チン、Pセ렉チン、VCAM-1、ICAM-1、PSMA、TIE、LAM-1と反応性のリガンド、VEGF/VPRレセプター、FGFレセプター、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、プレイオトロピンまたはエンドシアリンが利用されてもよい (各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第5,855,866号、同第5,877,289号; Burrowsら, 1992; BurrowsおよびThorpe, 1993; Huangら, 1997; Liuら, 1997; Ohizumiら, 1997)。

【0138】

吸着された標的は、別の適切な群、例えば、VEGF、FGF、TGF β 、HGF、PF4、PDGF、TIMP、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム（米国特許第5,877,289号、同第5,965,132号、同第6,051,230号および同第6,004,555号）。フィブロネクチンアイソフォームは、インテグリンファミリーのレセプターに結合するリガンドである。腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームは、腫瘍脈管および腫瘍間質の両方の標的可能成分である。モノクローナル抗体BC-1（Carnemollaら、1989）は腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームに特異的に結合する。

【0139】

天然の腫瘍環境によって、またはその後のヒトによる介入によって誘導可能な他の標的はまた、米国特許第5,776,427号、同第5,863,538号および同第6,036,955号に記載のとおり、標的可能な実体である。正常な組織および腫瘍血管誘導における以前の抑制と組み合わせて用いる場合、MHCクラスII抗原も、標的として用いることができる（米国特許第5,776,427号、同第5,863,538号、同第6,004,554号および同第6,036,955号）。

【0140】

臨床的適用のために現在好ましい1つの標的は、脈管内皮接着分子-1（VCAM-1）である（米国特許第5,855,866号、同第5,877,289号、同第6,051,230号、同第6,004,555号および同第6,093,399号）。VCAM-1は細胞接着分子であって、炎症性サイトカインIL-1 α 、IL-4（Thornhillら、1990）およびTNF α （Munro, 1993）によって誘導され、そしてそのインビボでの役割は、急性炎症の部位に対して白血球を補充することである（Bevilacqua, 1993）。

【0141】

VCAM-1は、神経芽細胞腫（Pateyら、1996）、腎臓ガン腫（Drozら、1994）、非小細胞性肺ガン（Staal-van den Brekelら、1996）、ホジキン病（Pateyら、1996）および肉管肉腫（Kuzuら、1993）を含む多数のヒト悪性腫瘍において、そして良性腫瘍、例えば、血管腫（angioma）（Pateyら、1996）および血管腫（hemangioma）（Kuzuら、1993）において、脈管内皮細胞に存在する。ヒトのVCAM-1の構成的発現は、甲状腺、胸腺および腎臓においてわずかな血管に（Kuzuら、1993；BruijnおよびDinklo, 1993）、そしてマウスにおいては、心臓および肺における血管に対して限定される（Friesら、1993）。

【0142】

本明細書において提示される特定のデータは、米国特許第5,855,866号、同第5,877,289号、同第6,051,230号、同第6,004,555号および同第6,093,399号に提供されるデータをさらに補足し、抗VCAM-1・tTFコアグリガンドの投与から生じる血栓および腫瘍梗塞の選択的誘導を示す。提示される結果は、L540ヒトホジキンリンパ腫を保有するマウスを用いて生成した。SCIDマウスにおいて異種移植片として成長させた場合、この腫瘍は、炎症性サイトカインの発現（Diehlら、1985）ならびにその脈管構造におけるVCAM-1および他の内皮細胞活性化分子の存在に関してヒト疾患に対して密接な類似性を示す。

【0143】

tTFが抗VCAM-1抗体に直接結合した、共有結合した抗VCAM-1・tTFコアグリガンドを用いて、固体L540ホジキン腫瘍を有するマウスにおいて、コアグリガンドが腫瘍血管に対して選択的に局在し、これらの血管の血栓を誘導し、腫瘍全体を通じた壊死の発生を生じ、そして腫瘍増殖を遅延させることが、本明細書中で示される。腫瘍は一般に、コアグリガンドに対して応答するには少なくとも約0.3cmの直径である必要があった。なぜなら、VCAM-1はさらに小さい腫瘍からは欠失していたからである

10

20

30

40

50

。推定上、小さい腫瘍では、腫瘍に浸潤する腫瘍細胞または宿主細胞によって分泌されるサイトカインのレベルは、V C A M－1誘導には低すぎる。これは、米国特許第5, 8 5 5, 8 6 6号、同第5, 8 7 7, 2 8 9号、同第6, 0 5 1, 2 3 0号、同第6, 0 0 4, 5 5 5号および同第6, 0 9 3, 3 9 9号における研究によるが、ここでは、本発明はさらに大きい固形腫瘍において最も有用であることが示された。

【0144】

V C A M－1染色は、腫瘍の末梢において最初にさらに観察されたが、コアグリガンドは明白に血液輸送血管に対して結合して閉塞した。そのとき、それによって全ての腫瘍領域において血流を短縮することができた。さらに、本発明者らの1人は、コアグリガンドの最初の投与によって生じたトロンビン生成が、中央の血管でのV C A M－1のさらなる誘導を導く可能性が高く（S l u i t e rら、1993）、これによって腫瘍内領域の増幅されたシグナルおよび明白な破壊が生じると考える。さらなる標的可能マーカーのこのタイプの凝固剤誘導性発現、およびこれによるシグナル増幅はまた、米国特許第6, 0 3 6, 9 5 5号に開示される。

【0145】

本明細書に示されるとおり、マウスの心臓および肺におけるV C A M－1発現血管に対する局在化は、抗V C A M－1コアグリガンドの投与の際に観察されたが、この構築物は、このような非腫瘍部位において血栓を誘導しなかった。さらに、抗V C A M－1コアグリガンドは、特異性の無関係なコントロールのコアグリガンドほどマウスに対して毒性ではなかった。そしてこれによってもやはり、心臓および肺の血管におけるV C A M－1の構成的発現は毒性を導かなかったことが示された。このデータは、V C A M－1がヒトにおける腫瘍血管内皮の天然に存在するマーカーであることを考えれば、コアグリガンド治療の直接的な臨床的進歩に重要である。しかし、この現象によって、また本発明者らは、腫瘍脈管構造破壊に対する異なるアプローチにつながる固有の洞察を得た。

【0146】

（A. 腫瘍処置のための裸の抗ホスファチジルセリン抗体の発見）

本発明者らは、抗V C A M－1コアグリガンドが、心臓および肺における血管上で構成的に発現されるV C A M－1に対して結合するが、その血管において血栓は生じない能力の背景の機構を理解しようと努めた。心臓および肺における腫瘍環境のプロトロンビン性質および任意の線維素溶解性素因と一般的に結び付いた、この実験的な観察については多くの科学的な可能性がある。

【0147】

概して、凝固系（フィブリン沈着）と線維素溶解系（酵素によるフィブリンの分解）との間に生物学的平衡がある。しかし、悪性疾患において、特にガン腫において、この平衡は崩壊されて、凝固の異常な活性化（凝固性亢進または「プロトロンビン状態（p r o t h r o m b o t i c s t a t e）」が生じる。広範な研究にもかかわらず、腫瘍環境のプロトロンビン性質について明白な分子説明は、最近まで認識できなかった。

【0148】

多くの可能性のある選択肢の詳細な解析後、本発明者らは、抗V C A M－1コアグリガンドが正常な組織の血管において血栓を生じ得ないことはホスファチジルセリンがこのような血管の内面から欠失したことに起因したと判断した。従って、この理論を完成させるために、ホスファチジルセリンがこれらの正常な血管から欠失することを示さなければならないだけでなく、腫瘍関連血管の内面上のその存在が実証されなければならない。

【0149】

従って、本発明者らは、免疫組織化学染色を用いて、腫瘍保有マウスへ静脈内注射したモノクローナル抗ホスファチジルセリン（抗P S）抗体の分布を評価した。これらの研究によって、心臓および肺におけるV C A M－1発現血管がP Sを欠くことが明らかになったが、V C A M－1発現血管は腫瘍においてP Sを発現した。P Sに結合するアネキシンVがインビトロおよびインビボの両方で抗V C A M－1・t T Fコアグリガンド作用をブロックするという本発明者らの知見によって、コアグリガンド作用における表面P S発現

の必要性がさらに示される。

【0150】

従って、正常な心臓および肺の血管において抗VCAM-1コアグリガン드의血栓性の影響がないことが少なくとも部分的に説明された：ホスファチジルセリンの非存在は、凝固複合体が集合し得る凝固促進性の表面が正常な血管に欠けるということを意味する。表面PSの非存在下で、抗VCAM-1・tTFがVCAM-1を発現する心臓および肺血管に結合するが、血栓を誘導できない。対照的に、腫瘍におけるVCAM-1発現血管は、表面PSの同時発生的な発現を示す。従って、コアグリガン드는、腫瘍血管に結合して、凝固因子を活性化し、局所的に閉塞性血栓を形成する。

【0151】

抗VCAM-1コアグリガンズの腫瘍特異性血栓効果を描写することに加えて、腫瘍血管の管腔表面におけるホスファチジルセリンの特異的発現によってまた、本発明者らは、観察はされたが、初期の研究では理解できなかったプロトロンビン表現型を説明することができた。PS発現は、腫瘍脈管構造のプロトロンビン状態における有意な役割を示す。

【0152】

代表的なアミノリン脂質、ホスファチジルセリンが腫瘍血管の管腔表面上に特異的に発現されたが正常な血管では発現されなかったという発見後に、本発明者らは、他のアミノリン脂質が、治療介入についての標的として能力を有したことを判断した。従って、本発明者らは、アミノリン脂質、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミン(PE)を標的することに基づいて、腫瘍脈管構造標的化および処置方法を開発した。

【0153】

腫瘍脈管構造の特定のマーカーとしてのホスファチジルセリンの発見が証明されるとすぐに、本発明者らは、腫瘍処置における使用のための、ある範囲のホスファチジルセリン標的免疫毒素およびコアグリガンズの開発を開始した。米国特許第6,406,693号において例示されるように、腫瘍脈管構造に対して毒素または凝固因子を送達する状況では、ホスファチジルセリン標的化の能力を検討することにおいて、裸の抗PS抗体が任意のさらなるエフェクター部分の非存在においてインビボで腫瘍脈管構造に対する破壊的效果を有したことを、本発明者らは、思いがけなくも見出した。腫瘍壊死をもたらす、抗アミノリン脂質抗体が腫瘍脈管構造に特異的に局在する能力および付随する破壊的效果を発揮する能力の両方ともほとんど予期されなかった。

【0154】

これらの発見は、米国特許第6,406,693号(参考として本発明に援用される)に記載されるように、ホスファチジルセリンに結合する非抱合型または「裸の」抗体を用いる腫瘍処置を生み出した。当該分野で許容される動物モデルでの抗腫瘍効果は米国特許第6,406,693号に示されており本発明に及ぶが、アミノリン脂質が腫瘍脈管構造の安全かつ効果的な標的可能マーカーとして作用する能力は、米国特許第6,406,693号より以前には研究から予測し得なかった。

【0155】

B. 抗ホスファチジルセリン抗体による広範な腫瘍治療

ホスファチジルセリンは、通常、様々な細胞の原形質膜二重層の内面に分離されるが(Gaffet et al., 1995; Julien et al., 1995)、この脂質分離によって二重層間非対称が形成される(Williamson and Schlegel, 1994)。本発明人達は以前に、PSは、腫瘍血管内皮細胞の表面に転位すること、かつ、この転位の少なくとも相当部分は、アポトーシスまたは他の細胞死機構とは無関係に起こることを明らかにした(米国特許第6,406,693号)。従って、腫瘍環境におけるPSの表面発現は、細胞死の結果ではなく、また、それが、直後に細胞破壊を誘発することでもない。各種硬組織腫瘍の未処置の血管内皮細胞にPS露出が一貫して検出されるけれども、腫瘍血管内皮は全くアポトーシスを呈することはなく、形態的には健全で(ただし、正常組織の形態とは異なるが)、代謝的には活発である。このことは、腫瘍血管内皮細胞におけるPSの外部膜への転位は十分に安定で、従って、PSは

10

20

30

40

50

、治療（裸の抗体または治療接合体を用いる）の成功に必要な、標的輸送可能な実体となり得ることを意味するのであるから、PS標的輸送に基づく治療法にとって重要である。

【0156】

様々なリン脂質に対する精妙な特異性を持つ生物学的ツールの開発を通じて、本発明人達は、腫瘍血管内皮細胞では陰イオン性リン脂質も上方調整されることを特定した。従って、陰イオン性リン脂質も、腫瘍血管の特異的で、安定なマーカーとなるので、陰イオン性リン脂質に結合する、裸の抗体および免疫接合体による治療介入を可能とする。

【0157】

陰イオン性リン脂質は、正常な条件下の安静哺乳類細胞の表面にはほとんど存在しない。原形質膜においてもっとも大量に見られる陰イオン性リン脂質であるホスファチジルセリンは、正常条件では多くの細胞タイプにおいて原形質膜の内部小葉に堅く分離されている（Williamson and Schlegel, 1994; Zwaal and Schroit, 1997）。もう一つの主要陰イオン性リン脂質であるフォスファチジルイノシトール（PI）も、主に原形質膜の内部小葉に局在する（Calderon and DeVries, 1997）。比較的目立たない陰イオン性リン脂質である、フォスファチジン酸（PA）およびフォスファチジルグリセロール（PG）は、少数の細胞タイプでしか調べられていないが、これらも、主に原形質膜の内部小葉中に存在するようである（Hinkovska-Galcheva et al., 1989）。もう一つの陰イオン性リン脂質であるカルジオリピンは、ミトコンドリア膜に存在し、原形質膜には見られない（Daum, 1985）。

【0158】

中性リン脂質も、原形質膜において非対称に分布する。中性アミノリン脂質であるフォスファチジルエタノールアミン（PE）は主に内部小葉上に存在する。コリン含有中性リン脂質である、フォスファチジルコリン（PC）およびスフィンゴミエリン（SM）は主に外部小葉上に存在する。

【0159】

PSの非対称は、アミノリン脂質の、原形質膜の外部小葉から内部小葉への輸送を触媒する、ATP依存性トランスポーターであるアミノリン脂質トランスロカーゼ（ Mg^{2+} ATPアーゼ）によって維持される（Seigneuret and Devaux, 1984）。PS非対称の消失または崩壊は、原形質膜におけるこれらのリン脂質の外向移動によって生じるが、トランスロカーゼの抑制（Bitbol et al., 1987; Comfurius et al., 1990）、PSトランスポーターの活性化、および／または、スクランブラーゼ酵素（Zhao et al., 1998）またはABC-1フロPPERゼ（Hamon et al., 2000）の活性化、全ての脂質を双方向に輸送する Ca^{2+} 依存性酵素の活性化によってもたらされる。スフィンゴミエリナーゼも活性化されて、二重層貫通脂質転位を促進するセラミドを生成することも考えられる（Contreras et al., 2003）。

【0160】

PS非対称の消失は、様々な病理的および生理的条件下、例えば、細胞傷害、設計された細胞死およびアポトーシス（Blankenberg et al., 1998; Bombelli et al., 1997）、細胞老化（Herrmann and Devaux, 1990）、血小板の活性化（Rote et al., 1993; Zwaal et al., 1989）、損傷（Boyle et al., 1996）、および悪性変形（Sugimura et al., 1994）を含む条件下で観察される。PSの露出は、筋芽細胞（Sessions and Horwitz, 1981）および栄養膜（Adler et al., 1995）の細胞間融合、細胞移動（Vogt et al., 1996）、および細胞脱顆粒（Demo et al., 1999）にも関わっている。内皮細胞は、トロンビン（Qu et al., 1996）、カルシウムイオノフォアまたはフォルボルエステル（Julien et al., 1997）、高脂血症（Lupu et al., 1993）、および、非分解濃度の補体プロテインC5

b-9 (Christiansen et al., 1997) によって誘発される Ca^{2+} フラックスの増加に反応して PS を外面化する。外来の活性化因子または細胞傷害が無い場合でも、悪性細胞には自発性 PS 露出が観察されている (Utsugi et al., 1991)。

【0161】

PS の膜露出に続いていくつかの重大な結果が生じる。食作用に従事するマクロファージは、PS-陽性の老化およびアポトーシス細胞を認識し、結合し、排除する (McEvoy et al., 1986; Tait and Smith, 1999)。PS はまた、トロンビン活性化内皮細胞に対する T リンパ球の結合を仲介する (Qu et al., 1996)。補体系は PS によって活性化され、PS-陽性細胞の分解に寄与する (Test and Mitsuyoshi, 1997)。最後に PS は、凝固複合体の集合と活性化のために陰性荷電脂質表面を提供することによって、内皮細胞に対する凝固前駆物質の移動に寄与する (Beveris et al., 1985; Dachary-Prigent et al., 1996)。腫瘍内皮の血液凝固促進性は以前から認められている (Donati and Falanga, 2001)。

【0162】

本発明人達は、腫瘍内皮の損傷および活性化は、下記によってもたらされることを認めた。すなわち、1) 腫瘍由来サイトカイン、例えば、インターロイキン-1 および腫瘍壊死因子で、これらは、内皮を活性化し、細胞接着分子の発現を誘発する (Shaughnessy et al., 1989; Orr et al., 2000); 2) 内皮に接着する白血球によって生成される酸素活性分子 (ROS) (Orr et al., 2000)、および 3) 代謝の副産物として、または、低酸素暴露に続く再度の酸素供給の結果、腫瘍細胞自身によって生成される ROS (Shaughnessy et al., 1989; Soares et al., 1994) である。これらの所見から、腫瘍内皮におけるこれらのストレスによって Ca^{2+} フラックスが生成され、これが次に、スクランブラーゼの活性化またはアミノリン脂質トランスロカーゼの抑制を通じて PS の露出をもたらすことが考えられる。

【0163】

細胞表面の陰イオン性リン脂質を検出するために、本発明人達は、新規のモノクローナル抗体 9D2 を作製した。これは、陰イオン性リン脂質とは反応するが、中性リン脂質とは反応しない。従って、9D2 は、陰イオン性アミノリン脂質、ホスファチジルセリンには結合するが、中性アミノリン脂質、フォスファチジリエタノールアミン (PE) には結合しないので、一般的なアミノリン脂質結合剤とは区別される。9D2 はまた、陰イオン性リン脂質に対し、天然のリガンドアネキシン V よりも特異的である。アネキシン V は、陰イオン性リン脂質の外、PE にも強く結合するからである (Blankenberg et al., 1998)。

【0164】

本出願において詳述するように、本発明人達は、9D2 およびアネキシン V は、様々なタイプの硬組織腫瘍を抱えるマウスに静注後の観察の結果、腫瘍内皮に特異的に局在することを見出した。この所見は、本発明人達の仮設、すなわち、ホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質は、腫瘍血管内皮の表面に通例的に暴露されるので、腫瘍治療（および画像記録）のための標的分子として使用することが可能であるとする仮設を裏付ける。

【0165】

本発明人達の得た大きな所見の一つは、腫瘍内皮の表面にホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質が露出することである (実施例 VI; Ran and Thorpe, 2002; Ran et al., 2002b)。この現象は、陰イオン性リン脂質に選択的に結合する、二つの独立試薬、すなわち、この点を裏付けるために本発明人達によって特に開発されたモノクローナル抗体、およびアネキシン V を用いることによって明らかにされた。

【0166】

9D2抗体およびアネキシンVは、リポソームのようなプラスチックに吸着される、または、インビトロにおいて活性化内皮細胞またはアポトーシス内皮細胞の膜表面に提示されるホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質に対し高い親和性および特異性をもって結合する。9D2は、PS、PA、およびCLには強く結合するが、PIおよびPGに対する結合は比較的弱い。アネキシンVは、既に見たように、PS、CL、PA、PI、およびPGの外に、PEにも結合する (Andree et al., 1990; Schlaepfer et al., 1987; Boustead et al., 1993; Blackwood and Ernst, 1990)。9D2による、ホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質の認識は、血清の存在如何に拘わらず同じである。これは、結合は、血清の補因子を必要としないことを示す。9D2の、陰イオン性リン脂質に対する結合は Ca^{2+} イオンを必要としないが、一方、アネキシンVの結合は、 Ca^{2+} を要する。

10

【0167】

PS塗布プレートにおいて交差ブロック実験を行ったところ、9D2およびアネキシンVは、PSに対する互いの結合をブロックしないことが示された。これは、この二つの試薬が、PS分子において異なるエピトープを認識すること、もっと考えられることは、別のパック形のPSを認識することを示す。アネキシンVは、平坦なPS表面に結合すると考えられ、一方、抗PS抗体の方は六角形にパックされたPSに結合すると考えられる (Rauch and Janoff, 1990)。両方の形態とも、PS塗布プレートの上に存在すると考えられる。この実際的な交差ブロック実験からはまた、陰イオン性リン脂質に対する結合で効果的に競合する、すなわち、同じエピトープに結合する複数の抗体がある時、それらは、基準抗体 (例えば、9D2) が与えられたならば、簡単に特定が可能であることも示される。

20

【0168】

本出願はまた、9D2抗体およびアネキシンVは、腫瘍血管に、インビボで調べた全ての腫瘍の壊死領域の中および周囲の腫瘍細胞に特異的に局在することを示す (実施例VI)。腫瘍中の血管の15から40%は、ホスファチジルセリン陽性の内皮を有する。一方、正常組織の血管はいずれも、検出可能な、外在化した陰イオン性リン脂質を持たない。PS発現腫瘍内皮細胞は生きている。これらの細胞は、アポトーシスマーカーを欠き (カスパーゼ-3活性、TUNEL)、形態的に無傷であり、代謝的に活性を持ち、かつ、血管は、血液および溶質輸送において機能的である。

30

【0169】

9D2による腫瘍血管染色の特異性は、下記によって確かめられる。すなわち、1) コントロールのラットのIgMでは腫瘍血管は染色されない; 2) インビトロで H_2O_2 処理内皮細胞に対する9D2またはアネキシンVの結合は、陰イオン性リン脂質から調製したリポソームによってブロックされるが、中性リン脂質から調製されたリポソームではブロックされない; 3) 界面活性剤または有機溶媒によって腫瘍セクションからリン脂質を抽出すると染色が阻止されるとする所見; および、4) 正常器官における安静内皮には9D2またはアネキシンVいずれの局在も認められないこと、である。

40

【0170】

9D2またはアネキシンVによって腫瘍血管上にその局在が確かめられる、主要な陰イオン性リン脂質はホスファチジルセリンである。なぜならホスファチジルセリンが、もっとも大量に存在する陰イオン性リン脂質であり、細胞表面におけるその露出は、環境の影響または傷害によって調整されているからである。腫瘍内皮細胞上において陰イオン性リン脂質が露出される機構を調べるために、一連の実験を行い、この中で、腫瘍の微小環境に存在することが知られる様々な因子および条件の下で内皮細胞をインビトロで処理した (実施例VII)。低酸素状態に続く酸素補給、酸性、およびトロンビンによって、全ての細胞がアポトーシスを示す場合に見られるレベルの10から22%において生きている内皮細胞上のPS暴露が増加した。炎症性サイトカイン (TNF α およびIL-1) も、

50

弱い、はっきりとPS露出を誘発した。

【0171】

これらの所見は、腫瘍の血管内皮におけるホスファチジルセリンの露出は、低酸素／再度の酸素補給が炎症性サイトカイン、トロンビン、および酸性度と組み合わせられたときに誘発されるとする予想と一致する。本発明を実行するには、正確な機構を理解する必要があるけれども、代謝の副産物として、または、低酸素症に対する反応として腫瘍細胞によってROSが生成されるのであろう (Zulietta et al., 1995)。腫瘍細胞によって放出されるサイトカインは、内皮細胞の上に白血球接着分子を誘起し、これが、活性化マクロファージ、多形核細胞、および血小板の、腫瘍内皮に対する接着、および、新たなROSの分泌を仲介すると考えられる。次に、ROSが、恐らくは、 Ca^{2+} のインフラックス、または、細胞内貯蔵からの Ca^{2+} 放出をもたらすことによって cholesterol 含有輸送分子の酸化、または脂質の過酸化 (Hermann and Devaux, 1990) を通じてPS転位を誘発するものと考えられる。実際、過酸化物が、アポトーシスではなく、グルタチオン酸化および／または脂質過酸化に関連する機構によって、インビトロで、生きている内皮細胞においてPS露出を誘発することが明らかにされている (van Gorp et al., 1999)。

10

【0172】

PSおよび他の陰イオン性リン脂質の露出は、従来から認められていた腫瘍内皮の凝固促進状態を説明する (Donati and Falanga, 2001)。陰イオン性リン脂質は、凝固因子が集中し集合する表面を提供する (Bever et al., 1985; Dachary-Prigent et al., 1996)。該表面はまた、循環するマクロファージ (McEvoy et al., 1986)、Tリンパ球 (Qu et al., 1996)、および多形核細胞に対し結合部位を提供し、これが、白血球細胞の腫瘍への浸潤を助ける。

20

【0173】

本明細書に詳述するさらに別の実験で、本発明人達は、ホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質に向けられた、3G4と呼ばれるモノクローナル抗体を作製し、その特徴を明らかにした。この抗体はまた、腫瘍の血管内皮細胞に特異的に局在し、腫瘍の血管密度および血漿容量を下げ、腫瘍増殖を遅らせることが判明した。

【0174】

3G4抗体は、プラスチックに吸収された陰イオン性リン脂質、および、活性化またはアポトーシス細胞表面の陰イオン性リン脂質に対し、血清または $\beta 2$ -糖タンパク質Iの存在下において高い親和性をもって結合する。3G4の細胞に対する結合パターンは、陰イオン性リン脂質に対するアネキシンA5または9D2抗体の結合パターンと区別されない。この三つの試薬は全て、膜ブレブに近似する原形質膜集塊に結合した。これは、 H_2O_2 で処理した内皮細胞に関する他の所見 (van Gorp et al., 1999) とも一致する。9D2同様、3G4も、酸化されにくい飽和脂肪酸を持つ合成リン脂質、およびリゾリン脂質を含む、試験した全ての陰イオン性リン脂質を認識した。

30

【0175】

9D2と違って、陰イオン性リン脂質に対する3G4の結合は、血清の完全に無添加の状態でも部分的に抑制され、 $\beta 2$ -糖タンパク質Iを加えると回復した。従って、3G4は、脂質- $\beta 2$ 糖タンパク質I複合体上のエピトープを認識する。にも拘わらず、3G4は、動物に投与した場合安全であり、抗リン脂質症候群 (単複) (APS) と関連する抗体について文献で報告される病理作用とは無縁であることが示された。

40

【0176】

3G4は、同所的ヒト乳癌MDA-MB-435を抱えるマウスに注入後、腫瘍の壊死域の中、およびその周辺の腫瘍血管および腫瘍細胞に特異的に局在した。血管の平均 $40 \pm 10\%$ が3G4による結合を見た。染色パターンは、本明細書に報告される、9D2およびアネキシンA5を用いた場合のものと同様であった。正常組織の血管内皮は染まらなかった。この点で、3G4は、腫瘍血管マーカーを認識するための抗体と異なる。大抵の

50

腫瘍血管マーカーは、生理的脈管形成部位である卵巣の血管、または、血管が高い透過性を持つ腎臓および脾臓のランゲルハンス島には存在する (Thorpe, 2004)。

【0177】

ホスファチジルセリンが、3G4によって主に検出される陰イオン性リン脂質である。PSは、もっとも大量に存在する陰イオン性リン脂質であり、その露出が、環境条件または傷害によって調整されることがもっともよく知られる陰イオン性リン脂質である (Zwaal and Schroit, 1997; Balasubramanian and Schroit, 2003)。インビボでは、腫瘍血管の上に露出したPSは、恐らく、血清成分、例えば、 β 2-糖タンパク質Iと複合体を形成し、3G4は恐らくこの複合体に結合すると考えられる。本実験を通じて注意しているように、未処理マウスにおけるPS陽性腫瘍血管は、無傷で機能的であるようである。それらの血管は血液を輸送し、還流が可能である。PS陽性血管の内皮は、高度のアポトーシスのマーカーを提示せず (カスパーゼ-3活性、TUNEL)、形態的に無傷で、急速な代謝回転タンパク質VCAM-1の共同発現から判断すると代謝的にも活性である。

10

【0178】

3G4による処理は、下記を含む各種マウスモデルにおいて腫瘍増殖を遅らせた。すなわち、同所的ヒト乳癌MDA-MB-231およびMDA-MB-435確立モデル (直径0.6-0.7cm)、大型 (直径1cm) の、L540ヒトホジキン腫瘍皮下モデル、および、小型の、同系Meth A線維肉腫モデルである。3G4処理は、これらの腫瘍の、それぞれ、75%、65%、50%、および90%の増殖遅延をもたらした。本出願における他の実験から、これらの腫瘍は、陰イオン性リン脂質を露出させた血管によって栄養補給を受けていることが示された。

20

【0179】

3G4の抗腫瘍作用は、少なくとも部分的には、腫瘍血管に対する傷害を介して起こる。3G4によって処理された、マウスの同所性MDA-MB-231腫瘍の組織学的検査から、腫瘍の血管密度および血漿含量の著明な低下が明らかにされた。腫瘍血管に対するマクロファージの結合、血管機能の破壊、および壊死の進行に先立って腫瘍血管に対する3G4の局在が起こっていた。血管閉塞および壊死パターンは、一次作用が腫瘍血管に対して為されたとする所見と一致していた。腫瘍の中心部が壊死し、一方腫瘍細胞の末梢辺縁の生存が観察された。腫瘍細胞殺作用に関するこのパターンは、VTAに特徴的である (米国特許第5,855,866号; Thorpe, 2004)。VTAは、腫瘍内部の血管に対してもっとも有効である、というのは、この領域では細胞間圧が高くなると、血管が押し潰されるからである。一方、多くの、腫瘍に対して直接作用する治療は、十分に酸素供給を受ける腫瘍の辺縁部の腫瘍細胞に対してもっとも有効である。従って、本発明人達は、3G4と、抗増殖性抗腫瘍療法との組み合わせは、実験的硬組織腫瘍において他のVTAで観察されたように、加重的、または相乗的とも言えるほどの抗腫瘍活性をもたらすであろうことを期待した (米国特許第5,855,866号; Burrows and Thorpe, 1993; Siemann et al., 2002; Siim et al., 2004)。

30

【0180】

本発明において使用される他の抗体と同様、3G4治療は、同じ治療用量 (マウスにおいて4mg/kg、週3回) によって繰り返し治療される腫瘍担持動物によってよく受忍された。マウスは、正常な生命徴候、凝固パラメータ、骨髓細胞プロファイル、白血球カウント、および組織所見を保持した。抗カルジオリピン抗体で治療された動物とは違って、APSの徴候は観察されなかった (Matzinger, 1998; Fadok et al., 1998; Fadok et al., 2001a; b)。高濃度の3G4は、リン脂質依存性凝固経路を部分的に抑制するが、それにも拘わらず、治療用量と、インビボで凝固時間を延長する用量との間には相当の安全性マージンが存在する。

40

【0181】

本発明人達は、サイトカイン、低酸素、およびROSがPS転位を誘発した場合 (Mo

50

ldovan et al., 1994)、非悪性病変部（例えば、アテローム硬化病変部、炎症部）においてもPSは血管内皮上に露出されるのかという疑問を考えた。もしもこのようなことが起こるとすれば、抗PS抗体を使用した場合若干の毒性がもたらされることが考えられるから、上記条件を持つ患者は治療から排除することが好ましい。しかしながら、本発明人達の別の実験から、アテローム硬化症のウサギを3G4のキメラ版で治療しても、大動脈のアテローム硬化病変部は悪化しないことが示された。

【0182】

薬剤または凝固剤を用いる血管標的剤は、大型の硬組織腫瘍を抱えるマウスにおいて極めて有効であり、場合によって治癒的であることが示された（Huang et al., 1997; Nilsson et al., 2001; 米国特許第5,660,827、5,776,427、5,855,866、5,863,538、5,965,132、6,004,554、6,051,230、6,261,535、6,093,399、6,004,555、5,877,289、および6,036,955号）。本発明人達は、ヒトにおける癌の診断と治療において腫瘍血管を標的とするために、ホスファチジルセリンに向けた裸の抗体と血管標的剤を提供する。

10

【0183】

治療を行うために、ホスファチジルセリンに向けた裸の抗体が腫瘍治療にどのように機能するかに関する正確な分子的理解は必要ではないが、本発明人達は、観察された内皮細胞殺作用を説明することが可能な機構をいくつか考えた。もっとも適正と思われる機構（特に、本明細書に記載される3G4抗体にとっては）は、Fcドメイン仲介による免疫エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）、補体依存性細胞傷害性（CDC）、抗体仲介性食作用である。細胞仲介性細胞傷害性、補体仲介性細胞分解および／またはアポトーシス、細胞骨格に対する抗体誘発性細胞シグナル伝達および／または干渉も関与している可能性がある。

20

【0184】

ホスファチジルセリンに対する生の抗体、特に3G4を、血管内皮細胞表面に結合させることは、抗体のFc部分が血管腔の中に突出することを意味する。抗体のFc断片は補体経路を活性化するので、観察される細胞破壊は、補体の指令による分解の結果かもしれない。従って、抗体結合は、補体依存性の凝固反応カスケードを活性化し、多成分複合体の集合をもたらし、最終的に、標的細胞の透過性を高める分解性複合体の生成を招く。「補体活性化ADCC」もこの破壊に働いている可能性がある。すなわち、補体が抗体で被われた標的細胞に結合し、補体に対するレセプターを持つ細胞、例えば、好中球がこの標的細胞を分解する可能性である。

30

【0185】

その抗原結合性断片を含む、裸の、すなわち未接合の抗体は、腫瘍血管内皮細胞表面のホスファチジルセリンに結合するので、腔表面に対する抗体コーティングを形成する。これは、免疫エフェクター細胞、例えば、細胞傷害性T細胞および／またはナチュラルキラー（NK）細胞を惹きつける働きをし、次に、これらエフェクター細胞が、血管内皮細胞に対して細胞介在性細胞傷害作用を及ぼす。

【0186】

ホスファチジルセリンに対する抗体の結合はまた、腫瘍血管内皮細胞においてアポトーシスを誘発する。（PSは、アポトーシスの結果得られるマーカーであるというのではなくて）PSに対する抗体の結合がアポトーシスを誘発するとする知見を述べる報告は知られていないが、本発明人達は、この知見は、観察された抗腫瘍作用を説明するもう一つの可能な機構と考えている。

40

【0187】

さらにまた、腫瘍血管内皮細胞表面におけるホスファチジルセリンに対する抗体の結合は、該細胞の細胞骨格組織を攪乱するという可能性もある。細胞骨格は表面膜の組織に関わっており、かつ、抗体結合は、膜を攪乱する（または、さらに新たに攪乱する）可能性がある。ホスファチジルセリンに対する抗体の結合は、二重層と相互作用を持つ細胞

50

骨格タンパク質に変化を伝える可能性がある。細胞骨格タンパク質の空間的組織は、膜の安定性および細胞の形状を調節することが既に知られるので、何かの細胞骨格平衡の攪乱は、細胞の統合性に対して深刻な結果を招く可能性がある。

【0188】

本発明の作用に関するさらに別の機構は、内皮細胞表面におけるホスファチジルセリンに対する抗体の結合は、現在不明の経路によるシグナル変換を起動する可能性である。抗体結合はまた、既知のシグナル変換経路を、例えば、膜レセプター、シグナル変換タンパク質、膜チャンネル同士の立体配座および／または相互作用を変えることによって攪乱する可能性がある。細胞破壊（アポトーシス）のためのシグナルが起動または模倣されるのかもしれないし、および／または、維持／ホメオスタシスシグナルが抑制されるのかもしれない。

10

【0189】

科学的には興味あることではあるが、ホスファチジルセリンに対する裸の抗体の結合によって実現される血管破壊について、その正確な性質を決めることは、治療の実施には必要ではない。これらの抗体の投与がインビボにおいて好都合にも特異的な抗腫瘍作用をもたらすことが示される限り、この現象の背後に横たわる分子機構とは無関係にその治療を利用することは可能である。従って、ホスファチジルセリンに結合する裸の抗体の使用は、腫瘍治療における重要な進歩を表し、調製およびコストにおける利点となる。

【0190】

C. 3G4抗体の詳細な分析

20

本明細書で示すように、3G4は、有効で、よく受忍される抗腫瘍剤であり、最終的に腫瘍血管上のホスファチジルセリンに結合することによって作用し、宿主細胞介在性抗腫瘍作用をもたらす。PSは、ヒトおよびマウスにおいて同じ分子であり、同じ細胞分布を持ち、両動物種においてROSによって調整および誘発される（Balasubramanian and Schroit, 2003; Whitworth et al., 1990）のであるから、上記実験はさらに、ヒトの癌治療にもホスファチジルセリンに結合する抗体および他の構築物を使用することを支持する。実際、3G4の、キメラ版およびヒト化版が、すでにこの目的のため、および他の目的のために調製されている。

【0191】

従って、腫瘍血管の標的輸送、画像記録、および／または治療のために、ホスファチジルセリンに結合する抗体および他のリンガンドを使用することが可能である。ホスファチジルセリンは、いくつかの理由で、腫瘍標的血管として魅力的である。すなわち、ホスファチジルセリンは大量に存在する（PSは、細胞当たり 3×10^6 分子存在する）；PSは腫瘍内皮の腔表面に存在するので、血液中の血管標的剤が結合のために直接接触することが可能である；PSは、各種硬組織腫瘍の腫瘍内皮細胞の大多数に存在する；および、PSは、全ての正常組織の内皮には事実上存在しない。

30

【0192】

3G4抗体については従来から、腫瘍の血管内皮細胞に特異的に局在すること、腫瘍の血管密度および血漿容量を低下させること、および、腫瘍増殖を遅らせることが明らかにされていた（本実施例、Ran et al., 1998; Ran and Thorpe, 2002; Ran et al., 2002b; Ran et al., 2005; Huang et al., 2005）。

40

【0193】

現在進行中の実験から、3G4処理は、マウスの腫瘍の同種移植片、およびヒトの腫瘍の異種移植片の増殖を抑制すること（本実施例；Ran et al., 2005）が示された。後者は、同所性ヒト乳癌（実施例XX；Huang et al., 2005）および同所性ヒト膵臓癌（実施例XX；Beck et al., 2005）を含む。3G4はまた、転移拡散、およびこれらの転移腫瘍の増殖を抑制する（実施例XX；Huang et al., 2005; Beck et al., 2005）。組み合わせると、3G4は、それぞれ乳癌と膵臓ガンの治療において、化学療法剤ドセタキセル

50

およびゲムシタビンの治療効力を強調する（実施例XX；Huang et al., 2005；Beck et al., 2005）。

【0194】

本発明において使用される他の抗体と同様、3G4治療は、同じ治療用量（マウスにおいて4mg/kg、週3回）によって繰り返し治療される腫瘍担持動物によってよく受忍される。マウスは、正常な生命徴候、凝固パラメータ、骨髄細胞プロファイル、白血球カウント、および組織所見を保持した。極高濃度の3G4は、リン脂質依存性凝固経路を部分的に抑制する作用を持つが、それにも拘わらず、治療用量と、インビボで凝固時間を延長する用量との間には相当の安全性マージンが存在する。従って、3G4は、有効で、よく受忍される抗腫瘍剤であり、最終的に腫瘍血管上のホスファチジルセリンに結合することによって作用し、宿主細胞介在性抗腫瘍作用をもたらす。3G4は、抗リン脂質症候群（単複）と関連する抗体について文献で報告されている病理作用とは無関係である。

10

【0195】

抗リン脂質症候群（単複）（APS）は、「抗カルジオリピン」抗体および「狼瘡抗凝固抗体」と名づけられる自己抗体と関連する。これらの症候群は、静脈および動脈血栓塞栓症、血小板減少症、およびいくつかの神経学的症候群に罹りやすい素因と関連する。従って、これらの患者における抗リン脂質抗体は、「病理的抗体」である。ヒト集団では、このような抗リン脂質抗体は、全身性エリテマトーデスに見られ（Branch et al., 1987；Staub et al., 1989；Drouvalakis and Buchanan, 1998；Smirnov et al., 1995；Rauch et al., 1986；Rauch and Janoff, 1990）、反復性流産と関連する（Rote et al., 1995；Rote, 1996；Vogt et al., 1996；1997；Katsuragawa et al., 1997）。

20

【0196】

数年間「抗リン脂質抗体」および「抗PS抗体」と記述されてきたけれども、この病原性抗体は、実際は、リン脂質それ自体ではなく、カルジオリピン、PS、またはその両方に結合するタンパク質の補因子を認識する（Galli et al., 1990；1993；McNeil et al., 1990；Rote, 1996）。病原性抗体にはかなりの相違点が存在する。ある抗カルジオリピン抗体は、 β 2-糖タンパク質Iの特定領域を認識することが報告されているが、一方、狼瘡抗凝固抗体はプロトロンビンを認識する。同様に、病的状態で出現する抗PE抗体は、タンパク質と組んだPE、例えば、低および高分子量キニノゲン（HK）、プレカリクライン、およびXI因子に結合する（Sugi and McIntyre, 1995；1996a；1996b）。

30

【0197】

治療薬として投与するために抗体を選ぶ場合、タンパク質補因子と組み合わさったホスファチジルセリンには結合しないという根拠で抗体を選ぶべきではなく、むしろ、「真の」抗ホスファチジルセリン抗体を求めるべきであると思われる（WO2004/006847）。

【0198】

一方、その後3G4抗体のインビトロ実験において、9D2と違って、3G4のホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質に対する結合は、血清の完全な無添加状態において部分的に抑制されることが示された。さらに、結合は、 β 2-糖タンパク質I（ β 2 GPI）を加えると回復することが認められた。この所見から、本発明人達は、3G4は、脂質- β 2糖タンパク質I複合体上のエピトープを認識し、そのために、3G4とPSとの間の相互作用は β 2 GPIに依存すると考えるに至った（2005年1月24日出願、米国特許仮出願第60/646,333号；Ran et al., 2005）。本発明人達は、インビボで腫瘍血管の上に露出したPSは、血清成分、恐らく β 2 GPIと複合体を形成し、かつ、3G4は恐らくこの複合体に結合するのであろうと推論した。

40

【0199】

50

3 G 4 の P S - β 2 G P I 複合体に結合する能力は極めて驚くべきものであった。その理由の少なからざる部分は、3 G 4 が、数多くの実験で動物に投与しても安全であることが示されたことであり、抗体が、P S - β 2 G P I 複合体を含む、脂質-血清タンパク質複合体に結合することが知られているにも拘わらず、A P S 関連抗体について文献で報告されている病原作用とは無縁であることであった。 β 2 G P I に対する抗カルジオリピン抗体において観察されたものとは違って、3 G 4 治療では、いずれのものにも A P S の徴候は観察されなかった (Matzinger, 1998; Fadok et al., 1998; Fadok et al., 2001a; b)。高用量の 3 G 4 で長期間治療されたマウスでは凝固能力に変化は見られなかったが、抗カルジオリピンまたは狼瘡抗凝固抗体を注入されたマウスは A P S 反応を示した。

10

【0200】

本発明は、この食い違いを解明し、P S 露出内皮細胞に対する結合に必要な 3 G 4 および β 2 G P I の相互作用を明らかにし、かつ、3 G 4 が、どのようにして、従来の病原性抗体に関連する毒性に陥ることなく、P S - β 2 G P I 複合体に結合することができるのかを説明する。

【0201】

実施例 X X X に示すように、3 G 4 と P S との相互作用は β 2 G P I に依存する。 β 2 G P I は、生理的条件下では陰イオン性リン脂質に弱く結合するが、本発明は、3 G 4 が、P S 陽性内皮細胞に対する β 2 G P I の結合を大きく強化することを示す。データから、結合の強化には、3 G 4 / β 2 G P I の 2 価の複合体が必要であることが示される。なぜなら、3 G 4 の F a b ' 断片は、P S 露出内皮細胞には結合しないからである。さらにまた、 β 2 G P I の人工的二量体構築物が、3 G 4 を必要とすることなく、P S 露出内皮細胞に結合することも明らかにされた。以上まとめると、これらのデータから、3 G 4 は、3 G 4 / β 2 G P I の 2 価複合体の形成を通じて P S に対する β 2 G P I の親和度を高めることによって、腫瘍内皮細胞を含む P S - 陽性細胞を標的とすることが示唆される。

20

【0202】

実施例 X X X はまた、3 G 4 が、 β 2 G P I のドメイン I I に結合することを示す。これは、 β 2 G P I ドメイン I I を認識する、A P S 患者由来の抗体は病原性ではないことを示す意味で重要である。一方、最近の一つの重要な研究によって、A P S 患者から単離された病原性の抗 β 2 G P I 抗体は、共通して β 2 G P I のドメイン I を認識することが証明された (de Laat et al., 2005a)。3 G 4 抗体が、 β 2 G P I のドメイン I に結合することなく P S - β 2 G P I 複合体に結合できる、その能力は、その抗体が毒性を示さないという点で重要である。 β 2 G P I はまた、アポリポタンパク質 E レセプター 2 ' (a p o E R 2 ') とも相互作用を持つ (Lutters et al., 2003)。もう一つの最近の研究から、 β 2 G P I のドメイン V が、a p o E R 2 ' と相互作用を持ち、血小板の活性化に与り、この活性化が、コラーゲンに対する血小板の堆積をもたらすことが示された。

30

【0203】

従って、3 G 4 抗体は、ドメイン I にもドメイン V にも結合することがないために、P S - β 2 G P I 複合体に結合することが可能であるにも拘わらず、各種の動物モデルを用いて行った広範な毒物学的実験において毒性を示さない。これらの所見に徴して見れば、これからは、P S - β 2 G P I 複合体に結合する他の抗体を作製し、癌およびウイルス感染を含む各種病態の治療において安全に使用することが可能である。本発明によれば、 β 2 G P I のドメイン I に対して目立って結合することのない抗体の選択がまず求められる要件であり、 β 2 G P I のドメイン I、または β 2 G P I のドメイン V に目立って結合することのない抗体の選択が、さらにそれに次ぐ利点を提供するものと見なされる。

40

【0204】

振り返ってまとめると、新しい研究は、3 G 4 抗体と、その主要な陰イオン性リン脂質標的、ホスファチジルセリンとの相互作用の特徴を明らかにした。データから、3 G 4 と P S の間の相互作用は血清依存性であることが示された。この 3 G 4 - P S 相互作用を伸

50

介するのに必要な血清因子として $\beta 2 \text{ GPI}$ が特定された。

【0205】

3G4は、元々、PS露出を誘発するために、 H_2O_2 で処理したマウス内皮細胞でマウスを免疫化することによって生成したものである（実施例IV；Ran et al., 2005）。細胞は、FBS含有で、少量のウシ $\beta 2 \text{ GPI}$ を注入したと思われる培養液中で育成し、抗PS/ $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗体を生産させた。PSとの反応性に基づく最初の抗体スクリーニングをウシ血清の存在下に実施した。その後のスクリーニングは血清無添加で行ったが、本明細書に示すように、SCMから精製された抗体は、 $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗原と共に精製された。従って、この「精製」抗体は、血清無しでも、汚染性のウシの $\beta 2 \text{ GPI}$ の存在のためにPSに結合が可能である。3G4が増殖され、血清無添加培養液から精製された時だけ、血清依存性が特定される。他のグループも、抗 $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗体の、 $\beta 2 \text{ GPI}$ 無添加調製品の入手に関して同様の不安を報告している（Roubey et al., 1995）。従って、リン脂質に直接結合すると報告されている、所謂「抗リン脂質抗体」の多くが、実際は、リン脂質に対する親和性をもって血清タンパク質を認識する可能性が大いにある。

10

【0206】

$\beta 2 \text{ GPI}$ は、血漿において $\sim 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($4 \mu\text{M}$)の濃度で存在する50-kDaの糖タンパク質である（Cleave et al., 1969）。このタンパク質は、補体調節タンパク質（CCP）ファミリーの一員である（Steinkasserer et al., 1991）。 $\beta 2 \text{ GPI}$ は、5個のCCP反復体を持ち、この内最初の4ドメインは、 ~ 60 アミノ酸から成る規則的な反復体である。5番目のドメインは、陽性荷電アミノ酸（282-287）と、陰イオン性リン脂質に対する $\beta 2 \text{ GPI}$ の結合を実行する、保存された疎水性領域（311-317）から成るクラスターを含むという点で、他の4個のドメインとは異なる（Steinkasserer et al., 1992；Hunt and Krilis, 1994；Sheng et al., 1996；Mehdi et al., 2000、なお、これらの文献のそれぞれを引用することにより特に指定して本明細書に含める）。

20

【0207】

$\beta 2 \text{ GPI}$ の正常な生物学的機能についてはほとんど知られていない。仮定された機能としては、アポトーシス細胞排除の促進（Balasubramanian et al., 1997b；Balasubramanian et al., 2005）、血小板機能の変調（Nimpf et al., 1985；Nimpf et al., 1987）、および、凝固の抑制（Nimpf et al., 1986；Schousboe, 1985）が挙げられるが、 $\beta 2 \text{ GPI}$ 欠損マウスまたは患者には、これといった表現型は観察されていない（Miyakis et al., 2004；Yasuda et al., 2000）。

30

【0208】

一方、 $\beta 2 \text{ GPI}$ は、自己免疫疾患APSにおけるその関与はよく知られている。すなわち、所謂抗リン脂質（aPL）抗体の、陰イオン性リン脂質表面に対する結合に必要な血漿補因子であると特定されている（de Laat et al., 2004a；Bever et al., 2004）。抗リン脂質抗体は、種々の血清タンパク質と相互作用を持つことが知られるが、 $\beta 2 \text{ GPI}$ を認識するaPL抗体は、APSの臨床症状ともしっかりと強く相関する（de Laat et al., 2004b）。従って、 $\beta 2 \text{ GPI}$ 、抗 $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗体、および陰イオン性リン脂質膜面の間の相互作用は従来から広範に研究されている（Bever et al., 2004）。

40

【0209】

本研究はまた、PS塗布マイクロタイタープレート、およびPS露出内皮細胞に対する3G4結合の特徴を調べた。生細胞結合アッセイを用い、3G4も $\beta 2 \text{ GPI}$ も、この二つの分子が同時に存在するのでない限りPS露出内皮細胞には結合しないと結論された（実施例XXX）。この所見は、3G4は、陰イオン性脂質表面に結合するために $\beta 2 \text{ GPI}$

50

Iに依存するとするELISAによる所見と一致する。さらに、この所見は、 $\beta 2 \text{ GPI}$ は、生理的条件下で陰イオン性リン脂質膜に対し弱いが親和性を持つとする報告を支持し(Willems et al., 1996; Bevers et al., 2004; Bevers et al., 2005)、かつ、その親和性は3G4の存在によって大きく強調されることを示唆する。

【0210】

データはまた、3G4は、 $\beta 2 \text{ GPI}$ の2価複合体の形成を通じて、陰イオン性リン脂質表面に対する $\beta 2 \text{ GPI}$ の親和性を強化することを示す。 $\beta 2 \text{ GPI}$ の濃度を一定に維持し、3G4の濃度を増していくと、PS露出内皮細胞に対する3G4/ $\beta 2 \text{ GPI}$ の結合は、3G4対 $\beta 2 \text{ GPI}$ 比が2:1の時にピークを持つ。3G4がそれより高濃度になると、結合は減少する。このベル型の曲線は、1価の複合体と2価の複合体の間に競合があり、これが、全体の3G4/ $\beta 2 \text{ GPI}$ 複合体の結合に減少をもたらすことを示唆する。血栓症モデルにおける抗 $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗体についてもベル型関係式が報告されている(Jankowski et al., 2003)。別の実験では、3G4 Fab断片は、 $\beta 2 \text{ GPI}$ の存在下にPS露出内皮細胞に結合しなかった。これは、3G4/ $\beta 2 \text{ GPI}$ の1価の複合体は陰イオン性リン脂質表面に結合できないことを示す。

【0211】

さらに、 $\beta 2 \text{ GPI}$ の人工的二量体構築物は、3G4を必要とすることなくPS露出内皮細胞に結合が可能であることが証明されている。従って、抗 $\beta 2 \text{ GPI}$ 抗体は、二つの $\beta 2 \text{ GPI}$ 分子を架橋して $\beta 2 \text{ GPI}$ の2価の複合体を形成することによって、陰イオン性リン脂質表面に対する $\beta 2 \text{ GPI}$ の親和性を高める。

【0212】

3G4/ $\beta 2 \text{ GPI}$ 複合体は、APS患者から得られたaPL抗体と全く同じようにPSと相互作用を持つが、3G4は、調べたどの動物モデルにおいてもAPSの臨床的徴候を招くことはなかった。これは重要なことである。aPLがAPSを引き起こす機構(単複)は大分が未だ不明のままである。ある研究の示唆するところによれば、aPL/ $\beta 2 \text{ GPI}$ は、安静内皮細胞(PSを発現しない)に結合、および該細胞を活性化し、より血栓発現性の表現型に変えるという(Simantov et al., 1995; Pierangeli et al., 1999)。比較的最近の研究によって、 $\beta 2 \text{ GPI}$ とaPL/ $\beta 2 \text{ GPI}$ 複合体は、既に「準備活性化」されていない限り、内皮細胞に結合し、該細胞を十分に活性化できないことが明らかにされた(Chen et al., 2004)。準備活性化は、内皮細胞にPSの発現を促し、aPL/ $\beta 2 \text{ GPI}$ 複合体の結合に好適な陰イオン性リン脂質表面を準備させる。

【0213】

3G4は、生細胞アッセイにおいて、安静なABAE細胞またはHUVECには結合しない。さらに、3G4は、安静なHUVEC、または、低濃度のLPSによってあらかじめ活性化されたHUVECを活性化しない。最近の研究によって、患者の血清における、 $\beta 2 \text{ GPI}$ のドメインIを認識するaPL抗体の存在と、APSの臨床症状との間には高い相関のあること(de Laat et al., 2005)、かつ、抗体結合には立体配座の変化が必要かもしれないことが報告されている。 $\beta 2 \text{ GPI}$ の他のドメインを認識する抗体も患者の血清中に検出されているが、病原性との相関は得られていない。重要な所見として、本発明は、3G4は、 $\beta 2 \text{ GPI}$ のドメインIIを認識することを明らかにしたが、これが、インビトロにおける内皮細胞の活性化の欠如、およびインビボにおける無毒を説明するようである。

【0214】

マウスの $\beta 2 \text{ GPI}$ のドメインIIは、ラット、イヌ、ウシ、チンプ、およびヒトの $\beta 2 \text{ GPI}$ のドメインIIとは、60個のアミノ酸の内僅かに7個において異なる。従って、3G4が、マウス血清の存在下にPSに結合できないこと、免疫ブロット法によってマウスの $\beta 2 \text{ GPI}$ を検出できないことは意外であり、特に、文献に記録されるマウスにおける3G4の抗腫瘍活性に徴して見れば予想外である(本実施例; Ran et al.,

、2005; Huang et al., 2005; Beck et al., 2005) 。これは重要なことだが、これらの実験は、SCMから精製した3G4を用いて行われたものである。本明細書で示したように、3G4-SCMは、ウシ β 2GPIとの共同精製によってPSに結合することが可能となる。3G4-SCMをSDS-PAGEゲルの上に走らせ、膜支持体に移し、ウシ β 2GPIの有無について調べると、50kDaのバンドをはっきりと見ることができた。さらに、3G4-SCM注入後のマウスから採取した血清に存在する3G4はPSに結合する。従って、ウシ β 2GPIは、マウス血漿中でPSに対する3G4の結合を仲介することが可能であり、3G4の抗腫瘍作用に与っている可能性がある。3G4を用いてマウスで行う腫瘍実験は全て、PS露出腫瘍内皮細胞に対する標的輸送を確実にするために、ウシまたはヒトの β 2GPIを補充しなければならない。

10

【0215】

3G4とPSの間の相互作用に欠かせない重要な補因子として β 2GPIを特定することは、この独特な腫瘍血管標的輸送剤の理解を深める。3G4は、 β 2GPIの2価複合体の形成を通じて、陰イオン性リン脂質表面に対する β 2GPIの親和度を高めることによってPS露出腫瘍内皮細胞を標的とする。本実験は、これらの諸性質を明らかにするばかりでなく、今や、病原性抗体の性質を重ねることなく、血清タンパク質との複合体におけるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する第3世代抗体の開発を可能とする。

【0216】

20

要約すると、 β 2GPIドメインI以外の位置で、あるいは、 β 2GPIドメインIまたはドメインV以外の位置で、PSおよび β 2GPIに結合する、好ましい「第3世代」または「非病原性PS- β 2GPI抗体」を選択することが今や可能である。本明細書のデータに徴すれば、本発明によるもっとも好ましい抗体は、ドメインIIにおいて β 2GPIに結合するものである。本明細書に記載される方法およびスクリーニング技術、例えば、図18Aおよび18Bの配列情報および実施例XXXの結合アッセイに従えば、ある範囲の非病原性PS- β 2GPI抗体を調製することが可能である。このような抗体および、その免疫接合体は、ウイルス感染の安全で効果的な治療、および、癌その他の疾患の治療に好適に使用することが可能である。

【0217】

30

D. レセプター本体およびベータ体

WO2004/006847に記載される内容と好対照をなす、3G4抗体、特に、3G4と β 2GPIとの相互作用に関する前述の詳細な分析もまた、本発明人達が行った、本発明のレセプター本体の開発に貢献した。本発明はまた、重要局面として、ホスファチジルセリンに結合し、宿主のエフェクター機能を惹起する「レセプター本体」と呼ばれる、ある範囲の構築物を提供する。レセプター本体の開発局面を後述する。

【0218】

ホスファチジルセリンに対する抗体によって腫瘍血管を標的として狙い撃ちすることは腫瘍治療に有効であることを示すためにデータを本明細書に提示する。ホスファチジルセリンに対する抗体はまた、ウイルス感染症を治療するのににも有効である。腫瘍実験を一実施例と見なすと、本明細書には、腫瘍の微小環境におけるストレス条件が、腫瘍血管内皮上にホスファチジルセリン露出を誘発することが示される（実施例VII、実施例II、実施例V、および実施例VI）。露出ホスファチジルセリンは、腫瘍血管の、画像記録用および治療用の選択的マーカーとなる（実施例IX、実施例X、実施例XI、および実施例XX）。

40

【0219】

腫瘍治療と組み合わせると、ホスファチジルセリンに対する抗体は、腫瘍内の血管を損傷し、白血球浸潤を招く（例えば、図1）。さらにこのような抗体の投与は、腫瘍内にマクロファージを招集する。例えば、3G4抗体による腫瘍治療実験において、腫瘍血管内皮に対する血液単球の広範な結合、および、腫瘍間隙部に対するマクロファージの豊富な

50

浸潤が見られた（例えば、実施例XXVII；図6A、図6B、図6C、および図6D）。

【0220】

治療腫瘍に対するマクロファージの浸潤を、3G4は、インビトロにおいて、骨髓由来マウスマクロファージによるPS発現細胞の食作用速度を、Fc依存性に5倍高めると言う所見と合わせて考えると、抗体、例えば、3G4は、腫瘍血管または腫瘍細胞に向けてマクロファージの細胞毒性を喚起するという所見と一致する。さらにまた、3G4は、PS発現内皮細胞または腫瘍細胞の増殖を直接抑制することはせず、インビトロにおいて細胞の補体分解を仲介しない。これは、抗体は直接細胞毒性を及ぼさないことを示唆する。

【0221】

そこで、本発明人達は、腫瘍血管または腫瘍細胞に対するマクロファージ介在性傷害に関し、二つの実行可能な機構を提案する。まず、3G4のような抗体が、腫瘍血管および腫瘍細胞上において、陰イオン性リン脂質、主にホスファチジルセリンと、血清タンパク質との複合体に結合する。次に、この抗体は、Fcγレセプターを介して単球とマクロファージの結合を刺激し、それによって抗体依存性細胞性細胞毒性(ADCC)および抗体依存性マクロファージ食作用を強化する。活性化されたマクロファージが、直接的抗腫瘍活性を持つことは長い間認められている(Whitworth et al., 1990)。これを裏付けるものとして、Manfredi et al., (1998)は、抗リン脂質抗体は、大量のTNF-α分泌の誘発を通してスカベンジャーマクロファージによるPS発現細胞のオプソニン化を促進することを報告している。マクロファージはPSレセプターを持ち、PS発現細胞に結合し、該細胞を包み込むことが可能であるが(Balasubramanian and Shroit, 2003; Utsugi et al., 1991; Fadok et al., 2001a), PS露出だけでは、包み込みを誘発するのには不十分である(Devitt et al., 2003)。

第2のに、3G4のような抗体は、PS発現腫瘍内皮細胞からの、PS-仲介「安静」シグナル、通常は、腫瘍血管および腫瘍細胞に結合するマクロファージによる炎症反応を抑える筈であるシグナルをブロックする可能性がある(図7)。同様の機構が、アポトーシス細胞に対する、マクロファージ系統細胞の炎症反応の欠如を説明するものと考えられる(Henson et al., 2001; Matzinger, 1998; Gallucci and Matzinger, 2001; Fadok et al., 2001b)。従って、3G4のような抗体は、マクロファージを刺激してTNF-α、IL-1、および、腫瘍上皮を直接傷害する他の炎症性サイトカインを分泌させることによって腫瘍血管傷害を誘発し、さらに宿主細胞を腫瘍の内部に招集する(Fadok et al., 1998)。

【0222】

理想的には、上記予想可能な機構のそれぞれについて、腫瘍関連マクロファージは、腫瘍脈管形成を誘発し、これが腫瘍増殖を促進するとする仮設(例えば、Sunderkotter et al., 1994)と調整させなければならない。従って、本発明人達は、マクロファージの脈管形成促進作用と、腫瘍血管および腫瘍細胞に及ぼすマクロファージの直接的細胞毒性作用との間には平衡があり、この平衡は、腫瘍微小環境(Breitner et al., 2002)における局所の条件(例えば、低酸素、TGF-β)によって決められると考える。本発明では、3G4のような抗体は、マクロファージの直接的細胞傷害反応に有利となるように腫瘍環境を改変すると考えられる。

【0223】

ホスファチジルセリン生物学を、任意に、腫瘍治療中のマクロファージの振る舞いに関して本明細書に提示されるデータと比較しながら考察し、本発明人達は、ホスファチジルセリン、および任意に他の陰イオン性リン脂質に結合する、ある範囲の有利な構築物すなわち「レセプター本体」、および関連接合体および使用法を提供する。

【0224】

本発明のこのような構築物またはレセプター本体は、通常、ホスファチジルセリン、お

10

20

30

40

50

よび要すれば任意に他の陰イオン性リン脂質を認識し結合する、結合性タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンド、またはペプチドを含み、該構築物またはレセプター本体では、結合性タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンドまたはペプチドは、抗体、または免疫グロブリンFc領域またはドメインに結合する。Fc領域は、結合性タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンドまたはペプチドを、その生物学的半減期が延長するように修飾するが、さらに重要なことは、Fc領域によって、病氣治療を改善するよう宿主のエフェクター機能を刺激する能力を持つ構築物が得られることである。

【0225】

本発明のレセプター本体は、ホスファチジルセリンに対する抗体が使用される任意の実施態様において使用が可能である。従って、このようなレセプター本体は、多数の用途、例えば、腫瘍血管および腫瘍細胞に対しホスファチジルセリンを結合させ、腫瘍に対して宿主細胞介在性抗血管および抗細胞作用をもたらす使い方、および、ウイルスまたはウイルス感染細胞に対しホスファチジルセリンを結合させ、動物において抗ウイルス作用をもたらす使い方を含む用途を持つ。

【0226】

本発明の上記局面の持つ利点の一つは、レセプター本体は、特異的結合を実現するために、天然の、ホスファチジルセリン結合性タンパク質、ポリペプチド、またはレセプターを用いることである。ホスファチジルセリンに対する抗体の使用は、本明細書で、多くの治療実施態様において有効であることが示されているが、レセプター本体は、抗PS抗体よりもさらに高い親和度または特異性を持つことが可能と考えられる。ホスファチジルセリン結合性タンパク質またはポリペプチド、特にβ2GPIを、Fc免疫グロブリン領域において2価の分子とすることによって、構築物は、より優れた親和性、安定性、より長いインビボ半減期、および、ホスファチジルセリン発現組織に対し恐らくより優れた局在を実現するのを始め、インビボにおいて宿主のエフェクター機能を刺激する。抗PS抗体は、サルを含む動物に投与した場合、有効で安全であることが本明細書において示された。同様に、天然のリガンドを含むレセプター本体も有効で安全であり、抗リン脂質症候群を惹起することもない。従って、本発明のレセプター本体は、ある範囲の腫瘍およびウイルス感染を治療するのに使用が可能な、単純で、ヒト的で、特異的で、安全な治療法である。

【0227】

D1. ホスファチジルセリン結合性タンパク質

レセプター本体における結合性タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンド、またはペプチドは、いくつかのホスファチジルセリン結合性タンパク質、例えば、細胞由来レセプター、因子V、プロトロンビン（因子II）等を含む結合性タンパク質の内の任意の一つであってもよい。β2-糖タンパク質Iの使用は非常に好ましい。

【0228】

凝固カスケード反応の内のいくつかの因子もホスファチジルセリンに結合することが可能であり、従って、本発明のレセプター本体において使用することが可能である。例えば、因子Vおよびプロトロンビン（因子II）はホスファチジルセリンに結合する。プロトロンビナーゼ複合体では、因子Vaの陰イオン性脂質表面に対する結合は、因子XaのCa²⁺-依存性結合を増進し、これによってプロトロンビンはトロンビンに転換される。いずれの複合体においても、ホスファチジルセリンがもっとも有効な陰イオン性リン脂質である。従って、ホスファチジルセリン結合性タンパク質、プロテインC、プロテインS、因子II/IIa、因子V/Va、因子VII/VIIa、因子IX/IXa、および因子X/Xaの使用が可能である。

【0229】

Fadok等（2000、引用することにより特異的に本明細書に含める）は、アポトーシス細胞に直接結合する、PSレセプターのクローニングを報告する。このレセプターは、多くの細胞タイプ、例えば、マクロファージ、線維芽細胞、および上皮細胞を含む細

10

20

30

40

50

胞タイプにおいて発現される。抗体およびPS小胞による実験から、レセプターは確かに細胞表面のホスファチジルセリンを認識することが示された。従って、このレセプターは、PS特異的レセプター、「PSレセプター」、または“PSr”である（アクセス番号AF304118）。このレセプターは、マクロファージのような食細胞の上、さらに他の細胞タイプにも存在する。従って、Fadok等のPSレセプター（2000、引用することにより特異的に本明細書に含める）も本発明のレセプター本体に使用してもよい。

【0230】

本発明のレセプター本体において使用してもよい、他のホスファチジルセリン結合タンパク質が、Balasubramanian and Schroit, 2003（引用することにより特異的に本明細書に含める）に記載される。特に、Balasubramanian and Schroit, 2003、表2、および、その中に引用される文献を参照されたい。なお、これらの文献全てを引用することにより特異的に本明細書に含める。このようなホスファチジルセリン結合タンパク質としては、例えば、CD14；インテグリン、例えば、 $\alpha 5 \beta 3$ （ピトロネクチン、CD51/CD61）、および $\alpha 5 \beta 3$ /CD36；いくつかのスカベンジャーレセプター、例えば、SRB（CD36）、SRC（LOX-1, SRC）、SRD（CD68, マクロシアリン）、およびPSOX；補体レセプター、例えば、CR3（CD11b/CD18）（アクセス番号NM000632）、CR4（CD11c/CD18）（アクセス番号NM000887）、およびCD93（cC1qr, カルレチクリン）/CD91（ $\alpha 2$ -マクログロブリンレセプター）；およびその他のレセプター、例えば、PS発現アポトーシス細胞に対する、Mer/Gasの6食細胞認識パートナー（アクセス番号AH010001）が挙げられる。

【0231】

アネキシンVのようなアネキシンも、レセプター本体においてホスファチジルセリン結合性タンパク質として用いてもよいが、アネキシンの使用は、本発明の普遍的部分とはならない。従って、ある実施態様では、本発明は、ホスファチジルセリン結合性タンパク質がアネキシンではない構築物を提供する。ではあるが、アネキシンを含む実施態様の使用に関する下記の情報も提供する。さらに、引用することにより特異的に本明細書に含まれるアネキシン特許文書における技術情報、例えば、発現および接合に関する情報を用いて、本発明の他のFc-ホスファチジルセリン結合タンパク質構築物を実現してもよい。

【0232】

哺乳類組織では、アネキシンファミリーの内少なくとも9個のメンバーが特定されている（アネキシンIからアネキシンIXまで）。これらの内、本発明で好まれるのはアネキシンV（別名PAP-1）である。アネキシンのタンパク質およびDNA配列は従来技術で既知であるので、本発明のこの局面で使用される組み換え融合タンパク質の生産は容易である。

【0233】

引用によって本明細書に含まれる米国特許第5,658,877号は、アネキシンI、有効量のアネキシンI、およびその薬学的組成物を記載する。さらにまた、肺における内毒素の有害作用を予防または緩和するために動物を治療する方法であって、安全量の、33kDaアネキシンI断片を動物の気道に投与することを含む方法も記載される。

【0234】

アネキシンVは、一つの遊離スルフヒドリル基を含むが、結合炭化水素鎖を全く持たない。cDNA配列から導かれるアネキシンVの一次構造は、4個の内部反復単位を含む（米国特許第4,937,324号、引用により本明細書に含める）。米国特許第5,296,467およびWO91/07187は、「アネキシン」を含む薬学的組成物を提供するが、これらも、それぞれ、引用により本明細書に含める。

【0235】

WO91/07187は、「アネキシン」の、天然の、合成の、または遺伝学的に調製された誘導体および類縁体を提供する。変異アミノ酸を含む320個のアミノ酸から成り、要すれば任意に316-Cysと2-Alaの間にジスルフィド架橋を持つ特定のアネ

10

20

30

40

50

キシシが提供される。

【0236】

米国特許第5, 296, 467号は、さらに別のアネキシシおよびその薬学的組成物を記載した点について、全ての図および配列を含め、その全体を引用により本明細書に含める。米国特許第5, 296, 467号は、アネキシシのクローニング、組み換え発現、および調製を記載する。複数のアネキシシにおいて、例えば、それぞれのアネキシシの1個以上のシステイン基の間のジスルフィド結合によって結合される2個以上のアネキシシの凝集体も開示される。好適なアネキシシ開始材料のさらに別の例が、アポトーシス細胞を検出するのに用いられるアネキシシを提供するWO 95/27903（引用により本明細書に含める）によって与えられる。

10

【0237】

米国特許第6, 197, 278号は、一般的な意味でのアネキシシ、インビボにおけるアネキシシの安全で効果的な投与、および画像記録実施態様を可能とし、かつその記述的裏づけを行った点について、引用により本明細書に特異的に含める。本発明の構築物調製に好適なアネキシシ開始材料を明瞭に記載するという点で、米国特許第5, 627, 036号；WO 95/19791；WO 95/27903；WO 95/34315；WO 96/17618；およびWO 98/04294も引用により本明細書に特異的に含める。これらの特許文書の様々のものはまた、有用な組み換え発現ベクターにも関わる。

【0238】

米国特許第5, 632, 986号も、組織抽出物からのアネキシシの単離（米国特許第4, 937, 324号；これも引用により本明細書に含める）、および組み換え法によるアネキシシ生産についてさらに記載した点で引用される。従って、米国特許第5, 632, 986号のcDNAクローンおよび発現ベクターは、それぞれ、引用により本明細書に含められる。

20

【0239】

米国特許第5, 632, 986号はまた、リン脂質結合能力において実質的に低下しない限りにおいて、さらに細かく分割された、または1個以上のアミノ酸残基において改変された、アネキシシ分子突然変異および変異分子をさらに記載した点で、引用により本明細書に特異的に含める。従って、使用に好適なアネキシシは、例えば、1個以上のドメインを含むように、天然の同タンパク質よりも少数のアミノ酸残基を含むように短縮することも可能であるし、あるいは、アミノ酸置換体を含むことも可能である。ムテイン、すなわち第2の世代アネキシシ分子がアミノリン脂質に対して実質的により低い親和度を持たない限り、どのような変化も受け容れることが可能である。同じ考え方が、アネキシシ以外のタンパク質にも適用される。

30

【0240】

アネキシシ同士および他の薬剤同士の化学的架橋についても米国特許第5, 632, 986号に記載される。この文書を引用により本明細書に含める。このような技術は全て、単純に、血栓溶解剤を、本明細書に記載されるFcと置換することによって、本発明において使用されるように適応させることができる。従って、脂肪族ジアミン；スクシニミドエステル；ヘテロ二重機能結合反応試薬、例えば、SPDP；マレイミド化合物；スパーサー付きリンカー等も使用が可能である。これらの介在因子はまた、アネキシシ以外のタンパク質に使用することも可能である。

40

【0241】

米国特許第5, 632, 986号はまた、アネキシシ含有接合体の組み換え生産を記載している点でも引用により本明細書に特異的に含まれる。従って、適切な核酸配列が繋ぎ合わされてキメラコード配列を形成し、これが次にキメラタンパク質を生産する。例示の発現ベクターは、pKK233-2（大腸菌）、DPOT（酵母）、およびpDSP1.1BGH（哺乳動物）と言われる。この教示は、本明細書に提示される新たな情報によって補足される。

【0242】

50

米国特許第 6, 312, 694、6, 783, 760、および 6, 818, 213 号は、それぞれ、一般的な意味でのホスファチジルセリン結合タンパク質、および、インビボにおけるそれらのタンパク質の安全で効果的な投与を可能とし、かつその記述的裏づけを行った点について、引用により本明細書に特異的に含める。これらの特許は、治療剤が、ホスファチジルセリン、好ましくは、血管増殖腫瘍の血管腔表面に露出されるホスファチジルセリンに結合する標的輸送剤に作動可能に結合される、結合リガンド組成物、および、そのような結合リガンドおよび、その組み合わせを用いる癌治療法を開示する。これらの特許は、Fc 領域に結合したホスファチジルセリン結合リガンドを教示も示唆もしないけれども、ホスファチジルセリン結合タンパク質、結合される治療剤、および安全で効果的なインビボ治療法に関する、それら特許の開示は、引用により本明細書に特異的に含まれる。

10

【0243】

米国特許第 6, 312, 694、6, 783, 760、および 6, 818, 213 号は、治療剤が、少なくとも第 1 のホスファチジルセリン結合タンパク質に作動可能に結合する、結合リガンドに特に関わる。これらの特許におけるタンパク質は治療剤に結合し、Fc 領域無しで治療剤を腫瘍血管に送達するために使用されるので、宿主細胞のエフェクター機能を惹起することはない。けれども、タンパク質接合体、およびそれらの接合体の、癌治療を含むインビボにおける安全で効果的な投与を可能とし、かつその記述的裏づけを行った点について、引用により本明細書に特異的に含める。これらの特許の情報、および本開示の教示を用いるならば、ホスファチジルセリン結合タンパク質、または、その、ホスファチジルセリン結合断片が、今度は Fc 領域またはドメインに結合される、ある範囲のレセプター本体を調製することは可能である。

20

【0244】

β 2-糖タンパク質 I (β 2 GPI) は、本発明のレセプター本体に使用される、本発明において好まれるホスファチジルセリン結合タンパク質である。アポリポタンパク質 H とも呼ばれる β 2 GPI は、その C 末端を介して陰性荷電リン脂質に結合する、50 kDa の血漿糖タンパク質である。ヒト B2 GPI (NP000033、AAP72014、および 1C1ZA)、およびマウス B2 GPI (AAH53338、NP038503、CAA69401、BAB2721) について上記アクセス番号が挙げられる。インビトロおよびインビボでの証拠から、 β 2 GPI は、PS 発現アポトーシス細胞の排除に与ることが示されている (Chonn et al., 1995; Balasubramanian et al., 1997; Balasubramanian and Schroit, 1998)。 β 2 GPI の食細胞との相互作用は静電的性質のもので、タンパク質の糖化は、食細胞の認識にとって決定的に重要ではない。従って、レセプター本体に使用される β 2 GPI の組み換え生産には大きな障害はない。

30

【0245】

本発明において β 2 GPI タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを用いる場合、得られる Fc- β 2 GPI 構築物は「ベータ体」と呼ばれる。ベータ体は、本明細書の図 18A および図 18B に示されるように、 β 2 GPI のドメイン V 由来の脂質結合領域を含むことが好ましい。ドメイン V の全てを含む構築物は、脂質結合が確保されるので好ましい。ドメイン V は、それだけ、または、他の 4 個のドメインの内の 1 個以上と共に使用されてもよい。完全長 β 2 GPI を使用することは好都合ではあるが、ある局面では、 β 2 GPI のドメイン I を含まないベータ体の方が好ましい。なぜなら、APS 患者の抗体は、一般に、 β 2 GPI のドメイン I を認識するからである (de Laat et al., 2005a)。

40

【0246】

他の好ましいベータ体は、2 個の β 2 GPI ポリペプチドが、Fc 領域に対し 2 価の分子として結合するものである。このようなベータ体は、プレートにおける、および細胞表面に露出されるホスファチジルセリンに対する結合において効果的であることが本明細書で示される。一方、2 価および多価のベータ体、例えば、ナノ粒子、リポソーム、および

50

他の分子枠組みを調製する他の手段も提供される。

【0247】

D2. Fc領域

Fc領域は、ホスファチジルセリン結合タンパク質またはポリペプチド、レセプター、リガンド、またはペプチドに結合、結合、または接合されるが、結合、結合、または接合は、Fc領域を結合することによって、得られるレセプター本体の所望の活性は実質的に破壊されるように行われる。従来技術で既知の接合またはリンカー技術の任意のもの、例えば、本明細書の関連セクションに記載されるものの採用が可能である。要すれば、当業者にとっては今や標準実技となっている、例えば、これも本明細書に例示される分子生物学技術を用いて融合タンパク質を創成することも可能である。従って、レセプター本体は、化学的接合体または融合タンパク質として作製することが可能である。

10

【0248】

免疫グロブリンの重鎖の中では、アミノ末端ドメインは可変ドメイン (V_H) である。重鎖および軽鎖の可変ドメインは、共に抗原結合において機能する。重鎖では、可変ドメインの次には三つの定常ドメインが来る。すなわち、 C_H1 、 C_H2 、および、カルボキシ末端の C_H3 である。ある種の抗体では、第4定常ドメイン C_H4 が存在する。短い幅、スイッチが、重鎖の可変域と定常域とを接続する。ヒンジは、 C_H2 および C_H3 (Fc断片) を、抗体の残余部分 (Fa断片) に接続する。

【0249】

定常域の性質が、抗原結合以外の各種の作用機構を決定する。抗体は、その定常域の構造と免疫機能に基づいて大きく五つのクラス、IgM、IgG、IgA、IgD、およびIgEに分類される。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 μ 、 γ 、 α 、 δ 、および ϵ と呼ばれる。

20

【0250】

Fc領域によって実現されるエフェクター機能に徴すると (Bruggemann et al., 1987; Riechmann et al., 1988; Clark, 1997; Padlan, 1994; これらの各文献を引用により本明細書に特異的に含める)、本発明において好ましいFc領域は、臨床的使用の場合、ヒトのIgG1 ($\gamma1$) およびヒトのIgG3 ($\gamma3$) であり、マウスで臨床前試験を行う場合は、マウスのIgG2a ($\gamma2a$) およびマウスのIgG2b ($\gamma2b$) である。 $\gamma2$ は無微候性であり、エフェクター機能を実現するために選ばれることはないが、それでも二量体形成ドメインとして使用される有用なヒトタンパク質である。免疫グロブリンのFc断片は、エフェクター機能のために選ばれるものではあるが、この断片はまた半減期の延長にも貢献する。これは、腎臓における抗体の活発な再吸収による可能性がある。

30

【0251】

Fc領域および結合構築物の組み換え発現は便利ではあるが、このような断片はまた、免疫グロブリン全体のタンパク質分解、好ましくは、非特異的チオールプロテアーゼ、パパイニンによるタンパク質分解によって入手することが可能である。パパイニン消化によって、「Fab断片」と呼ばれる、それぞれ、単一の抗原結合部位を持つ、二つの同一の抗原結合性断片、および、残余の「Fc断片」が得られる。

40

【0252】

パパインは先ず、活性部位におけるスルフヒドリル基を、システイン、2-メルカプトエタノール、またはジチオスレイトールで還元して活性化しなければならない。最大の酵素活性を確保するために、保存酵素中の重金属をEDTA (2mM) でキレート化して取り去らなければならない。酵素と基質は、通常、1:100の重量比で混合する。インキュベーション後、チオール基をヨードアセタミドによって非可逆的にアルキル化することによって、または、単に透析によって反応を停止させる。消化の完全度はSDS-PAGEによって監視し、各種分画を、タンパク質A-セファローズ、またはイオン交換クロマトグラフィーで分離する。

【0253】

50

ある実施態様では、2個のFc断片、好ましくは2個のヒトFc断片を用いてもよい。このような局面では、2個の結合タンパク質、レセプター、またはリガンドは、2個のFc断片と組み合わせて別のタイプの2価のレセプター本体を調製することが可能である。ヒトへの投与用のレセプター本体を作製するにはヒトのFc断片が好ましい。実際、これは、完全にヒト的治療構築物が得られるので、本発明の利点となる。従って、Fc-β2 GPI 構築物は、完全にヒト的ベータ体治療剤を含む。

【0254】

D3. その他の構築物および担体

Fc領域をホスファチジルセリン結合タンパク質またはポリペプチドに結合することは、本発明のレセプター本体の好ましい実施態様ではあるが、ホスファチジルセリン結合タンパク質はまた、生物学的に活性な分子に長い寿命を与えるために不活性な担体に結合されてもよい。従って、本発明はまた、少なくとも第1の不活性担体に作動可能に結合した、β2 GPIを含む少なくとも第1のアミノリン脂質結合タンパク質を含む構築物を提供する。

10

【0255】

従来技術で知られるように、担体タンパク質は、生物学的半減期を延長するのに使用することが可能であり、例示のタンパク質は、アルブミン類およびグロブリン類、例えば、ニュートラビジンおよびストレプタビジンである。非タンパク質担体、例えば、ポリサッカリドおよびPEGを含む天然または合成ポリマーも、生物学的半減期を延長するのに使用することが可能である。本明細書に記載される任意のホスファチジルセリン結合タンパク質に対し、上記の内の任意の不活性担体を結合させてもよい。

20

【0256】

本発明の別局面は、Fc領域以外の手段によって調製されたβ2 GPI二量体組成物と、各種使用法に関する。本発明は特に、癌の治療法、およびウイルス感染の治療法であって、治療を必要とする動物に、治療有効量のβ2 GPI 2価分子を投与することを含む方法を提供する。

【0257】

本発明のさらに別の局面は、二量体形態を取る取らないとは無関係に、β2 GPIポリペプチドを含むリポソーム、および、Fc領域に結合するものとは別のβ2 GPIポリペプチドを含むリポソームである。従って、本発明は、少なくとも第1のβ2 GPIポリペプチドを含む、ナノ粒子、リポソーム、脂質担体、複合体、混合物、超分子構造多数分子凝集体、または脂質系薬剤送達システムに関する。β2 GPIポリペプチドは二量体であってもよいが、そうである必要はない。このようなリポソームはステルス処理されたリポソームであることが好ましく、リポソームコアに治療剤を含んでいてもよい。

30

【0258】

本発明のさらに別の局面は、β2 GPIポリペプチド（Fc領域に結合したβ2 GPIポリペプチドとは別のもの）の組成物であって、該β2 GPIポリペプチドが少なくとも第1の治療剤に作動可能に結合する組成物、および各種の使用法に関する。特に好ましいのは、β2 GPIポリペプチドが、少なくとも第1のサイトカイン、例えば、TNFα、IL-2、またはIFNαに作動可能に結合する組成物である。ある実施態様では、β2 GPIポリペプチドは二量体であり、2価のβ2 GPIポリペプチドは、少なくとも第1の治療剤、例えば、サイトカインに作動可能に結合してもよい。上記のようなものであれば、いずれのβ2 GPI-サイトカイン構築物または接合体であっても、ウイルス感染を含む病気治療への使用について特に考慮される。

40

【0259】

従って、本発明は、癌の治療法およびウイルス感染の治療法であって、治療を要する動物に対し、少なくとも第1のサイトカイン、好ましくはTNFα、IL-2、またはIFNαに作動可能に結合されるβ2 GPIポリペプチドを含む構築物の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。β2 GPIポリペプチドは、2価のβ2 GPIポリペプチドであってもよい。

50

【0260】

E. さらに別の薬剤の接合体

本発明の構築物およびレセプター本体はまた、結合した治療剤を、特異的標的、例えば、腫瘍および腫瘍内血管、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、およびウイルス粒子に送達するために使用されてもよい。Fc領域を持つ構築物に関するものではないが、米国特許第6,312,694、6,783,760、および6,818,213号も、治療剤に結合するアミノリン脂質結合タンパク質に関する一般的教示に関する参照により本明細書に特異的に含められる。本発明の構築物およびレセプター本体はまた、安全で効果的な抗ウイルス治療に使用されるので、これらの構築物は、ある範囲の既知の抗ウイルス剤に結合されると好都合である。

10

【0261】

本発明の上記局面では、接合を調製するのに、本発明の任意の構築物、レセプター本体、またはベータ体の使用が可能である。このような接合体に使用される薬剤は、抗細胞または細胞傷害性薬剤、サイトカイン、ケモカイン、V型ATPアーゼインヒビター、タンパク質合成インヒビター、化学療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、放射性同位元素、凝固剤または抗ウイルス剤を含む。抗ウイルス接合剤では、結合剤として第2の抗ウイルス剤を使用する必要はない。

【0262】

(E1. 抗細胞性薬剤および細胞傷害性薬剤)

特定の適用のために、治療剤は、細胞（特に、腫瘍内皮細胞、腫瘍細胞またはウイルスに感染した細胞）の増殖または細胞分裂を消失または抑制する能力を有する、細胞傷害性薬剤または薬理学的薬剤、特に細胞傷害性薬剤、細胞分裂抑制剤か、そうでなければ抗細胞性薬剤である。

20

【0263】

例示的な抗細胞性薬剤には、化学療法剤および細胞毒が挙げられる。使用され得る化学療法剤には以下が挙げられる：ホルモン（例えば、ステロイド）；代謝拮抗薬（例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノプテリン）；アントラサイクリン；マイトマイシンC；ビンカルカロイド類；デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；抗腫瘍アルキル化剤（例えば、クロラムブシルまたはメルファラン）。他の実施形態は、サイトカインのような薬剤を含み得る。基本的には、標的化された細胞（例えば、内皮細胞）の部位での血液成分への標的化、インターナリゼーション、放出および／または提示を可能にする様式で、構築物に首尾良く結合され得る限り、任意の抗細胞性薬剤が使用され得る。

30

【0264】

例えば、標的抗原が、毒性化合物による効率的な中毒と一致する経路によってインターナライズしない場合、化学療法剤（例えば、抗腫瘍薬物、サイトカイン、代謝拮抗薬、アルキル化剤、ホルモンなど）を標的化することが望まれる場合のような状況が存在し得る。種々の化学療法剤および他の薬理学的薬剤（ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモン（trenimon）および α -アマニチンを含む）は、現在では、首尾良く結合され、そして薬理学的に機能することが示されている。

40

【0265】

他の状況において、細胞毒に基づく治療由来の任意の潜在的な副作用が、DNA合成インヒビター（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、アドリアマイシンなど）の使用によって除去され得る。従って、これらの薬剤は、本発明における使用のための抗細胞性薬剤の好ましい例である。細胞分裂抑制剤に関して、そのような化合物は、一般に、標的細胞の天然の細胞周期を、好ましくはその細胞が細胞周期からはずされるように妨害する。例示的な細胞分裂抑制剤は含む。

【0266】

広範な種々の細胞傷害剤が、結合体化され得ることが公知である。例には、多くの有用

50

な植物由来毒素、真菌由来毒素または細菌由来毒素が挙げられ、これらは、例として数例を挙げると、以下：種々のA鎖毒素、特にリシンA鎖；リボソーム不活化タンパク質（例えば、サボリンまたはゲロニン）； α -サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン（*restrictocin*）；リボヌクレアーゼ（例えば、胎盤リボヌクレアーゼ）；ジフテリア毒素；および *pseudomonas* 外毒素、が挙げられる。

【0267】

周知の1992年の毒素の文献である「*Genetically Engineered Toxins*」（Arthur E. Frankel 編）（多数の毒素の一次アミノ酸配列を含む付録を含む）は、標的された構築物中の毒素を記載し、その使用を可能にする目的で、参考として本明細書に具体的に援用される。

10

【0268】

毒素のうちゲロニン（*gelonin*）およびリシンA鎖の使用が好ましい。脈管形成された腫瘍の腫瘍内血管において発現するマーカーに結合するか、結合へと利用可能であるか、吸着されるかまたは局在化される免疫結合体のエフェクターまたは毒素部分としてのゲロニンの使用は、米国特許第6,051,230号（これは、本明細書中において具体的に援用される）および米国特許第6,451,312号（特に、標的化剤としてVEGFに結合したゲロニンに関する）に記載される。

【0269】

リシンA鎖に関して、さらに好ましい毒素部分は、炭水化物残基を改変または除去するように処理された毒素A鎖、いわゆる脱グリコシル化A鎖（*d g A*）である。脱グリコシル化リシンA鎖は、その極度の有効性、より長い寿命のため、そして臨床等級および規模での製造に経済的に適切であるために好ましい。

20

【0270】

最も小さな分子であるが、にもかかわらず適切な生物学的応答を提供することが可能な分子を使用することは、薬理的見地から望ましくあり得る。例えば、十分な抗細胞応答を提供するより小さなA鎖ペプチドを使用することが望まれ得る。この目的のために、リシンA鎖は、*Nagarse*（*Sigma*）による30のN末端アミノ酸の除去によって「切り詰め」され得、そしてなお十分な毒素活性を保持し得ることが発見されている。所望される場合、この短縮されたA鎖は、本発明に従って結合体において使用され得ることが提案される。

30

【0271】

あるいは、毒素A鎖部分への組換えDNA技術の適用は、本発明によるさらなる利益を提供することが理解され得る。生物学的に活性なリシンA鎖のクローニングおよび発現が達成されているという点で、現在では、より小さいまたは他の様式の改変体ペプチドであるが、にもかかわらず適切な毒素活性を示す改変体ペプチドを同定および調製することが可能である。さらに、現在では、リシンA鎖がクローニングされているという事実によって、部位特異的変異誘発の適用が可能であり、それを通じて、A鎖由来ペプチドが容易に調製およびスクリーニングされ得、そして本発明と組み合わせる使用のためのさらなる有用な部分が得られる。

【0272】

40

（E2. サイトカイン）

サイトカインおよびケモカインは、本発明の構築物、レセプターボディ（*receptor body*）またはベータボディ（*betabody*）に連結するための因子の特定の例である。ある範囲のサイトカインが使用され得、これには、IL-3、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-13、TGF- β 、M-CSF、G-CSF、TNF β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MIP、LIF、OSM、TMF、IFN- α 、IFN- β が挙げられる。より好ましいサイトカインとしては、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-10、GM-CSF、IFN γ 、単球化学誘引物質タンパク質-1（MCP-1）、血小板由来増殖因子-BB（PDGF-BB）、およびC-反応性タンパク質（CRP）などが挙げられる

50

。特に好ましい例は、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 誘導因子 $\text{IL}-2$ 、 $\text{IL}-12$ 、 $\text{IFN}-\alpha$ 、 $\text{IFN}-\beta$ 、 $\text{IFN}-\gamma$ および LEC である。

【0273】

$\text{TNF}\alpha$ は、脈管浸透性を増加する。この因子は、本発明の構築物、レセプターボディ(receptor body)またはベータボディ(beta body)への結合を企図し、特に、得られる免疫結合体は、癌の処置のための併用療法において使用される。この構築物は、結合した $\text{TNF}\alpha$ を腫瘍環境に送達し、そして腫瘍における向上した脈管浸透性により、第2の抗癌剤の腫瘍内への侵入を容易にし、従って、全体的な抗腫瘍効果を増幅する。

【0274】

例えば、 $\text{IL}-12$ は、抗体に結合され得、そして腫瘍血管を攻撃するように、宿主の防御を変えるために使用され得る。ケモカイン LEC (肝臓で発現されるケモカインであり、 $\text{NCC}-4$ 、 $\text{HCC}-4$ 、または LMC としても公知)は、別の好ましい成分である(*Giovarelli*ら、2000)。 LEC は、樹状細胞、単球、T細胞、NK細胞および好中球に対する走化性であり、従って、宿主媒介抗腫瘍応答を改善し得る。

【0275】

(E3. 凝固因子)

本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、コアグリガンドを形成するために、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分に連結され得る。米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号、および同第6,036,955号が、コアグリガンドを形成するために、抗体と凝固剤の作動可能な会合をさらに記載する目的で、本明細書中において具体的に援用される。

【0276】

本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、凝血素または凝固因子に直接的に連結され得るか、または凝血素もしくは凝固因子を結合し、次いでそれらを放出する第2の結合領域に連結され得る。本明細書中で使用される用語「凝血素」および「凝固因子」は各々、適切な条件下、好ましくは特定のインビボ環境(例えば、腫瘍血管構造)に提供される場合に、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分をいうために使用される。

【0277】

好ましい凝固因子は、組織因子組成物(例えば、短縮された TF (tTF)、ダイマー TF 分子、マルチマー TF 分子および変異体 TF 分子)である。「短縮された TF (truncated TF)」(tTF)は、膜結合欠損に、この特性における変化をもたらすために十分なアミノ酸配列を除去することによってされている TF 構造をいう。この状況において「十分な量」とは、 TF 分子を膜中に進入させるか、または TF タンパク質の機能的な膜結合を他の様式で媒介するに元々十分な、膜貫通アミノ酸配列の量である。従って、このような「十分な量の膜貫通配列」の除去は、リン脂質膜結合能を欠損した短縮された組織因子タンパク質またはポリペプチドを生じ、その結果、このタンパク質は、実質的に、リン脂質膜に有意に結合しない可溶性タンパク質である。従って、短縮された TF は、実質的に、標準的な TF アッセイにおいて第 VII 因子を第 VIIa 因子に変換し得ず、そしてなお第 VIIa 因子の存在下で第 X 因子を活性化することを含む、いわゆる触媒活性を保持する。

【0278】

米国特許第5,504,067号、同第6,156,321号、同第6,132,729号および同第6,132,730号は、そのような短縮された組織因子タンパク質をさらに記載する目的のために、特に本明細書中において参考として援用される。好ましくは、本発明のこれらの局面における使用のための組織因子は、一般に、タンパク質の膜貫通領域および細胞質領域(アミノ酸220~263)を欠く。しかし、短縮された TF 分子が、219アミノ酸という正確な長さの分子に限定される必要はない。

【0279】

組織因子組成物はまた、ダイマーとして有用であり得る。任意の短縮された組織因子構築物、変異された組織因子構築物、または他の組織因子構築物は、本発明における使用のためにダイマー形態で調製され得る。当業者に公知のように、このようなTFダイマーは、分子生物学および組換え発現の標準的な技術を使用することによって調製され得る。ここで2つのコード領域は、インフレイムに調製され、そして発現ベクターから発現される。同様に、種々の化学結合技術が、TFダイマーの調製と組み合わせて使用され得る。個々のTFモノマーは、結合の前に誘導体化され得る。すべてのこのような技術は、当業者に容易に公知である。

【0280】

所望される場合、組織因子ダイマーまたはマルチマーは、生物学的に放出可能な(b i o l o g i c a l l y - r e l e a s a b l e)結合(例えば、選択的に切断可能なリンカーまたはアミノ酸配列)を介して結合され得る。例えば、腫瘍環境内で優先的に配置されるか、または活性である酵素についての切断部位を含むペプチドリンカーが意図される。そのようなペプチドリンカーの例示的な形態は、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ(例えば、コラーゲナーゼ、ゲラチナーゼまたはストロメライシン)によって切断されるペプチドリンカーである。

【0281】

特定の実施形態において、組織因子ダイマーはさらに、後にリン脂質膜と組織因子の機能的会合を(特定の所定の条件下のみであるが)強化するために、妨げられた疎水性膜挿入部分を含み得る。短縮された組織因子の状況において記載される場合、疎水性膜会合配列は、一般に、それらの疎水性の性質に起因して、リン脂質環境との会合を促進するアミノ酸のストレッチである。同様に、脂肪酸は、潜在的な膜挿入部分を提供するために使用され得る。

【0282】

このような膜挿入配列は、それらの結合がTF構築物の機能的特性を妨げない限り、TF分子のN末端もしくはC末端のいずれかに位置され得るか、または一般に膜の任意の他の点に付加され得る。妨げられた挿入部分の意義は、TF構築物が腫瘍環境に位置するまで、それは非機能性を保持し、そして疎水性付加が、接近可能になり、そしてなおさらに膜との物理的会合を促進するのを可能にすることである。再度、生物学的に放出可能な結合および選択的に切断可能な配列が、この点において特に有用であり、結合または配列のみが、腫瘍環境内の局在化および特定の酵素または他の生物活性分子への曝露の際に切断または他の様式で改変されることが意図される。

【0283】

他の実施形態において、tTF構築物は、マルチマーまたはポリマーであり得る。この状況において、「ポリマー構築物」は、3以上の組織因子構築物を含む。「マルチマーTF構築物またはポリマーTF構築物」は、少なくとも第2のおよび第3のTF分子または誘導体に作動可能に結合された第1のTF分子または誘導体を含む構築物である。マルチマーは、約3〜約20のこのようなTF分子を含み得る。マルチマーまたはポリマー内の個々のTF単位はまた、所望される場合、選択的に切断可能なペプチドリンカーまたは他の生物学的に放出可能な結合によって連結され得る。再度、上記に議論されたTFダイマーに関して、構築物は、組換え操作および発現を用いるか、または標準的な合成化学を用いるかのいずれかで容易に作製され得る。

【0284】

本発明の状況において有用ななおさらなるTF構築物は、第VII因子を活性化する能力が欠損している変異体である。そのような「第VII因子活性化変異体」は、一般に、機能的な第VII/VIIa因子を結合し、第X因子をタンパク質分解性に活性化するが、第VII因子をタンパク質分解性に活性化する能力が実質的に存在しないTF変異体として本明細書中において定義されている。従って、そのような構築物は、第VII因子活性化活性を欠くTF変異体である。

【0285】

そのような第V I I因子活性化変異体が、腫瘍特異的凝固を促進する際に機能する能力は、腫瘍血管構造へのそれらの特異的送達、および血漿中における低いレベルでの第V I I a因子の存在に基づく。そのような第V I I因子活性化変異体標的化剤結合体の投与の際に、変異体は、血管新生化腫瘍の血管構造内に局在化される。局在化の前に、T F変異体は、一般に、第V I I因子を第V I I a因子に変換し得ないことに基づいて、任意の他の身体部位における凝固を促進し得ない。しかし、次いで、腫瘍領域内の局在化および蓄積の際に、変異体は、外因性の凝固経路を開始するために血漿から十分な第V I I a因子と出会い、腫瘍特異的血栓症を導く。外因性の第V I I a因子もまた患者に投与され得る。

【0286】

10

種々の第V I I因子活性化変異体のうちの任意の1つ以上が調製され、本発明と組み合わせて使用され得る。第V I I / V I I a因子についてのT F分子上の認識部位に関して、有意な量の科学知識が存在する。従って、第V I I 活性化領域が、一般にT F分子のおよそアミノ酸157～およそアミノ酸167の間に位置することが理解される。しかし、この領域の外側の残基もまた、第V I I 活性化活性に関連することが判明し得、従ってT F配列のおよそアミノ酸106～およそアミノ酸209に一般に位置する残基の任意の1つ以上に変異を導入することが考慮され得る（WO94/07515；WO94/28017；各々、本明細書中において参考として援用される）。

【0287】

米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号および同第6,036,955号に詳細に記載されるように、種々の他の凝固因子は、以下に示される薬剤によって詳述されるように、本発明と組み合わせて使用され得る。トロンビン、第V / V a因子および誘導体、第V I I I / V I I I a因子および誘導体、第I X / I X a因子および誘導体、第X / X a因子および誘導体、第X I / X I a因子および誘導体、第X I I / X I I a因子および誘導体、第X I I I / X I I I a因子および誘導体、第X因子アクチベーターおよび第V因子アクチベーターが、本発明において使用され得る。

【0288】

ラッセルクサリヘビ蛇毒第X因子アクチベーターは、本発明における使用について意図される。ラッセルクサリヘビ蛇毒中に存在する第X因子アクチベーターについて特異的なモノクローナル抗体もまた産生されており、そして二重特異性結合リガンドの部分として因子を特異的に送達するために使用され得る。

【0289】

トロンボキサンA₂は、血小板ミクロソーム中の酵素シクロオキシゲナーゼおよび酵素トロンボキサンシンターゼの連続的作用によって、エンドペルオキシドから形成される。トロンボキサンA₂は血小板によって容易に産生され、そして血小板凝集を生成するその能力が理由で強力な血管収縮薬である。トロンボキサンA₂およびその活性なアナログは、本発明の用途のために意図される。

【0290】

トロンボキサンシンターゼ、および血小板活性化プロスタグランジン合成する他の酵素もまた、本発明の状況において「凝固薬」として使用され得る。トロンボキサンシンターゼに対するモノクローナル抗体、およびトロンボキサンシンターゼのイムノアフィニティ精製は公知であり；ヒトトロンボキサンシンターゼについてのcDNAも同様である。

【0291】

α2-抗プラスミン、すなわち、α2-プラスミンインヒビターは、プラスミノゲンアクチベーターによって誘導されるフィブリン血餅の溶解を効率的に阻害するように機能する、ヒト血漿において天然に存在するプロテイナーゼインヒビターである。α2-抗プラスミンは、特に強力なインヒビターであり、そして本発明の用途のために意図される。

【0292】

α2-抗プラスミンについてのcDNA配列が利用可能である場合、組換え発現および

40

50

／または融合タンパク質が好ましい。α 2-抗プラスミンに対するモノクローナル抗体もまた利用可能であり、これは本発明の二重特異性結合リガンドの実施形態において使用され得る。これらの抗体は、標的部位に外因性α 2-抗プラスミンを送達するために使用されるか、または内因性α 2-抗プラスミンを収集し、そして標的領域内でそれを濃縮するために使用され得る。

【0293】

(E 4. 抗チューブリン薬)

一連の薬物は、チューブリン活性との干渉を介してその効果を行使する。チューブリンの機能は、有糸分裂および細胞の生存能力に不可欠であるので、特定の「抗チューブリン薬」は、強力な化学療法剤である。「抗チューブリン薬」は、本明細書で使用される場合、好ましくは、細胞有糸分裂に必要なチューブリン活性（好ましくは、チューブリン重合もしくは脱重合）を直接的もしくは間接的に阻害することによって細胞有糸分裂を阻害する任意の因子、薬物、プロドラッグまたはそれらの組み合わせを意味する。

10

【0294】

いくつかの周知であってかつ本発明とともに使用するための現在好ましい抗チューブリン薬は、コルヒチン；タキサン（例えば、タキソール）；ビンカアルカロイド類（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビンデスチン）；およびコンブレタスタチン（*combretastatin*）である。他の適切な抗チューブリン薬は、サイトカラシン類（B、J、Eを含む）、ドラスタチン（*dolastatin*）、オーリスタチン（*auristatin*）PE、パクリタキセル、ウスチロキシシン（*ustiloxin*）D、リゾキシシン（*rhizoxin*）、1069C85、コルセミド（*colcemid*）、アルベンダゾール、アザトキシシン（*azatoxin*）およびノコダゾールである。

20

【0295】

米国特許第5, 892, 069号、同第5, 504, 074号、および同第5, 661, 143号（各々本明細書中に詳細に参考として援用される）に記載されるように、コンブレタスタチン類は、一般に細胞有糸分裂を阻害するエストラジオール誘導体である。本発明と組合せて使用され得る例示的なコンブレタスタチンとしては、コンブレタスタチンA、Bおよび／またはDを基本とするコンブレタスタチンならびに米国特許第5, 892, 069号、同第5, 504, 074号、および同第5, 661, 143号に記載されるコンブレタスタチンが挙げられる。コンブレタスタチンA-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、B-1、B-2、B-3およびB-4は、上記の型の例である。

30

【0296】

米国特許第5, 569, 786号および同第5, 409, 953号は、コンブレタスタチンA-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3およびB-4の各々の単離、構造的特徴付けおよび合成、ならびにこのようなコンブレタスタチンを使用して新生物性増殖を処置するための処方物および方法を記載する目的のために、本明細書中に参考として援用される。任意の1つ以上のこのようなコンブレタスタチンは、本発明と組合せて使用され得る。

【0297】

米国特許第5, 892, 069号、同第5, 504, 074号、同第5, 661, 143号および同第4, 996, 237号（各々詳細に本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、コンブレタスタチンA-4はまた、本発明と共に使用され得る。米国特許第5, 561, 112号は、適切なコンブレタスタチンA-4プロドラッグ（これらは、本発明とともに組合せて使用することが意図される）を適切に記載するために、本明細書中に参考として援用される。

40

【0298】

米国特許第4, 940, 726号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、コンブレタスタチンD-1および「コンブレタスタチンD-2」と称される大環状ラクトンを詳細に記載し、これらは、本発明の組成物および方法と組み合わせて使用され得る。米国特許第5, 430, 062号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、抗癌活

50

性を有するスチルベン誘導体およびコンプレタスタチンアナログに関し、これらは本発明と組合せて使用され得る。

【0299】

(E5. 抗脈管形成剤)

抗脈管形成剤は、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディへの結合に有用である。多くの抗癌剤が、それらの作用の機構の一部として、抗脈管形成効果を有する。併用療法で使用するために記載されるこのような任意の1つ以上の薬剤（表Eに含まれる）がまた、本明細書中に記載されるように、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディに結合体化され得る。特定の他の薬剤が、作用の一次的な機構として、抗脈管形成効果を有することが発見されるか、設計されるか、または選択された。このような薬剤の例は、以下に記載され、これらのうちの任意がまた、免疫結合体を調製するために使用され得るか、または本発明の併用療法において別々に使用され得る。

10

【0300】

種々の疾患状態で顕著であるように、新脈管形成の処置に有用である多数のチロシンキナーゼインヒビターが、現在公知である。これらとしては、例えば、米国特許第5,639,757号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）の4-アミノピロール[2,3-d]ピリミジンが挙げられる。これはまた、本発明と組み合わせて使用され得る。VEGDR2レセプターを介するチロシンキナーゼシグナル伝達を媒介し得る有機分子のさらなる例は、キナゾリン化合物および米国特許第5,792,771号（具体的に、脈管形成疾患の処置における本発明と共に使用するためのさらなる組み合わせを記載する目的で、参考として本明細書中で援用される）の組成物である。

20

【0301】

他の化学クラスの化合物はまた、新脈管形成を阻害することが示されており、そして本発明と組み合わせて使用され得る。例えば、米国特許第5,972,922号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）に記載されるステロイド（例えば、新脈管形成の4,9(11)-ステロイドおよびC21-酸化ステロイド）は、併用治療において使用され得る。米国特許第5,712,291号および同第5,593,990号（各々、参考として本明細書中で援用される）は、サリドマイドならびに関連する化合物、前駆体、アナログ、代謝物および加水分解産物を記載する。これらもまた、新脈管形成を阻害するために本発明と組み合わせて使用され得る。米国特許第5,712,291号および同第5,593,990号における化合物は、経口的に投与され得る。組合せ治療に関して有用である、さらなる例示的な抗新脈管形成剤は、表Bに列举される。ここで列举される各薬剤は、例示であって、限定することを意味しない。

30

【0302】

【表 16-1】

表B

血管形成のインヒビターおよびネガティブ調節剤

物質	参考文献
アンギオスタチン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1994
エンドスタチン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1997
16kDaプロテグリンフラグメント	Ferrara <i>et al.</i> , 1991; Clapp <i>et al.</i> , 1993; D'Angelo <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1998
ラミニンペプチド	Kleinman <i>et al.</i> , 1993; Yamamura <i>et al.</i> , 1993; Iwamoto <i>et al.</i> , 1996; Tryggvason, 1993
71kDプロテグリンペプチド	Grant <i>et al.</i> , 1998; Sheu <i>et al.</i> , 1997
組織メタプロテイナーゼインヒビター (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1, -2)	Soff <i>et al.</i> , 1995
腸癌壊死因子α (高用量, インヒビター)	Frater-Schroder <i>et al.</i> , 1987
TGF-β1	RayChadhury and D'Amore, 1991; Tada <i>et al.</i> , 1994
インターフェロン(IFN-α, -β, γ)	Moore <i>et al.</i> , 1998; Lingen <i>et al.</i> , 1998
ELR-CXCケモカイン : IL-12; SDF-1; MIG; 血小板因子 4 (PF-4); IP-10	Moore <i>et al.</i> , 1998; Hiscox and Jiang, 1997; Coughlin <i>et al.</i> , 1998; Tanaka <i>et al.</i> , 1997
トロンボスポンジン(TSP)	Good <i>et al.</i> , 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma <i>et al.</i> , 1993; Sheibani and Frazier, 1995; Volpert <i>et al.</i> , 1998
SPARC	Hasselaar and Sage, 1992; Lane <i>et al.</i> , 1992; Jendraschak and Sage, 1996
2-メトキシエストラジオール	Fotsis <i>et al.</i> , 1994
プロリフェリン(proliferin)関連タンパク質	Jackson <i>et al.</i> , 1994
スラミン	Gagliardi <i>et al.</i> , 1992; Takano <i>et al.</i> , 1994; Waltenberger <i>et al.</i> , 1996; Gagliardi <i>et al.</i> , 1998; Manetti <i>et al.</i> , 1998
サリドマイド	D'Amato <i>et al.</i> , 1994; Kenyon <i>et al.</i> , 1997 Wells, 1998

【0303】

【表 16-2】

コルチゾン	Thorpe <i>et al.</i> , 1993 Folkman <i>et al.</i> , 1983 Sakamoto <i>et al.</i> , 1986
リノミド	Vukanovic <i>et al.</i> , 1993; Ziche <i>et al.</i> , 1998; Nagler <i>et al.</i> , 1998
アスギリン (AGM-1470; TNP-470)	Sipos <i>et al.</i> , 1994; Yoshida <i>et al.</i> , 1998
タモキシフェン	Gagliardi and Collins, 1993; Linder and Borden, 1997; Haran <i>et al.</i> , 1994
朝鮮ヤドリギ抽出物 (<i>Viscum album coloratum</i>)	Yoon <i>et al.</i> , 1995
レタリド	Oikawa <i>et al.</i> , 1989; Lingen <i>et al.</i> , 1996; Majewski <i>et al.</i> 1996
CM101	Hellerqvist <i>et al.</i> , 1993; Quinn <i>et al.</i> , 1995; Wamil <i>et al.</i> , 1997; DeVore <i>et al.</i> , 1997
デキサメタゾン	Hori <i>et al.</i> , 1996; Wolff <i>et al.</i> , 1997
白血病阻害因子 (LIF)	Pepper <i>et al.</i> , 1995

新脈管形成を阻害するのに使用するための特定の好ましい成分は、アンギオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスピンである。「アンギオスタチン」と呼ばれるタンパク質は、米国特許第5, 776, 704号；同第5, 639, 725号および同第5, 733, 876号において開示されている。これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。アンギオスタチンは、還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定されるように、約38 kDa～約45 kDaの分子量を有するタンパク質であり、これは、プラスミノゲン分子のほぼクリングル領域1～4を含む。アンギオスタチンは、一般に、インタクトなマウスプラスミノゲン分子のアミノ酸番号98から開始するマウスプラスミノゲンのフラグメントと実質的に類似のアミノ酸配列を有する。

【0304】

アンギオスタチンのアミノ酸配列は、種の間でわずかに変化する。例えば、ヒトアンギオスタチンにおいて、このアミノ酸配列は、上記のマウスプラスミノゲンフラグメントの配列と実質的に類似であるが、活性なヒトアンギオスタチン配列は、インタクトなヒトプラスミノゲンアミノ酸配列のアミノ酸番号97または99のいずれかで開始し得る。さらに、ヒトプラスミノゲンは、類似の抗脈管形成活性を有するので、マウス腫瘍モデルにおいて示されるように使用され得る。

【0305】

特定の抗脈管形成治療剤は、腫瘍後退を引き起こすことが既に示されており、アンギオスタチンがこのような薬剤の1つである。エンドスタチン (endostatin)、コラーゲンXVIIの20 kDaのCOOH末端フラグメント、細菌性多糖類CM101、および抗体LM609もまた、血管静止 (angiostatic) 活性を有する。しかし、それらの他の特性を考慮して、これらは、脈管形成を阻害するだけではなく、大部分規定されていない機構によって腫瘍脈管の破壊を開始するので、抗脈管治療剤または腫瘍脈管毒素と呼ばれる。

【0306】

アンギオスタチンおよびエンドスタチンは、マウスにおいて、腫瘍増殖を阻害するだけでなく腫瘍後退もまたもたらす能力が実証された最初の新脈管形成インヒビターであるので、これらは熱心な研究の焦点となる。エラスターゼ、マクロファージメタロエラスター

ゼ (MME)、マトリリシン (matrilysin) (MMP-7)、および 92 kDaゼラチナーゼ B/I V型コラゲナーゼ (MMP-9) を含む、プラスミノゲンからアンギオスタチンを生成することが示される複数のプロテアーゼが存在する。

【0307】

MMEは、腫瘍においてプラスミノゲンからアンギオスタチンを生成し得、そして顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、アンギオスタチンの生成を誘導するマクロファージによってMMEの発現をアップレギュレートする。アンギオスタチン生成におけるMMEの役割は、MMEが患者由来の肝細胞癌の臨床サンプルにおいて実際に発現されるという知見によって支持される。アンギオスタチンを生成し得ると考えられる別のプロテアーゼは、ストロメライシン-1 (MMP-3) である。MMP-3は、インビトロにおいてプラスミノゲンからアンギオスタチン様フラグメントを生成することが示されている。アンギオスタチンについての作用機構は現在のところ明らかではなく、これが、プログラム化された細胞死または有糸分裂の阻止を受けるように内皮細胞を誘導する内皮細胞上の同定されていない細胞表面レセプターに結合すると推定されている。

10

【0308】

エンドスタチンは、その生物学はあまり明白ではないものの、さらにより強力な抗新脈管形成および抗腫瘍剤であるようである。エンドスタチンは、マウスにおける多くの腫瘍モデルにおいて後退を生じることにおいて有効である。腫瘍は、エンドスタチンに対する耐性を発生させず、そして複数のサイクルの処置後に、腫瘍は、休眠状態に進入し、この間、これらは容量において増加しない。この休眠状態において、アポトーシスを受ける腫瘍細胞の割合は増加し、そして本質的に同じサイズをとどめる集団を生じた。エンドスタチンは、その効果を媒介する未同定の内皮細胞表面レセプターに結合すると考えられる。

20

【0309】

FolkmanおよびO'Reillyらへの米国特許第5,854,205号 (本明細書中で参考として詳細に援用される) は、内皮細胞増殖および脈管形成のインヒビターとしてのエンドスタチンおよびその使用に関する。エンドスタチンタンパク質は、コラーゲンXVII型 (XVII型) のC末端フラグメントに対応し、そしてこのタンパク質は、種々の供給源から単離され得る。米国特許第5,854,205号はまた、エンドスタチンが、コラーゲンXVII型、コラーゲンXV型、またはBOVMP-1プロガストリン (pregastrin) エステラーゼのフラグメントのアミノ酸配列を有し得るということを教示する。エンドスタチンの他の抗脈管形成タンパク質、特にアンギオスタチンとの組み合わせはまた、米国特許第5,854,205号に記載され、その結果、組合された組成物は、脈管形成依存性腫瘍塊を効果的に後退させ得る。

30

【0310】

CM101は、細菌性ポリサッカリドであり、これは、腫瘍において新血管炎症を誘導する能力において十分に特徴付けられている。CM101は、補体系の活性化を刺激する脱分化した内皮上で発現されるレセプターに結合し、そして架橋する。それはまた、腫瘍を選択的に標的するサイトカイン駆動化炎症応答を開始する。これは、発現VEGFおよびそのレセプターをダウンレギュレートする固有の抗病理新脈管形成剤である。CM101は、現在、抗癌剤として臨床試験中であり、そしてこれと組み合わせて使用され得る。

40

【0311】

トロンボスポンジン (thrombospondin) (TSP-1) および血小板因子4 (PF4) もまた、本発明において使用され得る。これらはともに、ヘパリンと会合する新脈管形成インヒビターであり、そしてまた血小板 α -顆粒において見出される。TSP-1は、細胞外マトリクスの構成成分である、大きな450 kDaのマルチドメイン糖タンパク質である。TSP-1は、HSPG、フィブロネクチン、ラミニン、および種々の型のコラーゲンを含む、細胞外マトリクスにおいて見出される多くのプロテオグリカン分子に結合する。TSP-1は、インビトロにおいて内皮細胞遊走および増殖、ならびにインビボにおいて新脈管形成を阻害する。TSP-1はまた、形質転換された内皮細胞の悪性表現型および腫瘍形成を抑制し得る。腫瘍抑制遺伝子p53は、TSP-1の発現

50

を直接的に調節することが示されており、その結果、p 5 3 活性の損失は、T S P-1 生成における劇的な減少、および腫瘍が開始する新脈管形成を付随する増大を生じる。

【0312】

P F 4 は、ケモカインの C X C E L R ファミリーのメンバーである 7 0 a a タンパク質あり、これは、インビトロにおける内皮細胞の増殖およびインビボにおける新脈管形成を強力に阻害し得る。腫瘍内に投与された、またはアデノウイルスベクターによって送達された P F 4 は、腫瘍増殖の阻害を生じ得る。

【0313】

インターフェロンおよびメタロプロテイナーゼインヒビターは、本発明に従って送達され得る、2つの他のクラスの天然に存在する脈管形成インヒビターである。インターフェロンの抗内皮活性は、1980年代初期から公知であるが、阻害の機構は、未だ明確でない。これらが内皮細胞の移動を阻害し得ること、およびこれらが、腫瘍細胞による新脈管形成プロモーターの産生を阻害する能力によっておそれく媒介される、インビボでのいくつかの抗新脈管形成活性を有することは公知である。血管腫瘍は具体的に、インターフェロンに感受性であり、例えば、増殖中の血管腫は I F N α で首尾よく処置され得る。

【0314】

メタロプロテイナーゼの組織インヒビター (T I M P) は、天然に存在するマトリックスメタロプロテナーゼ (M M P) のインヒビターのファミリーであり、これもまた、新脈管形成を阻害し得、そして本発明の処置プロトコルにおいて使用され得る。M M P は、新脈管形成プロセスにおいて重要な役割を果たす。なぜなら、これらは、血管網を拡大または再構築する場合、内皮細胞および線維芽細胞が移動するマトリックスを分解するからである。実際、M M P の1つのメンバーである M M P-2 は、おそらくこの目的のためにインテグリン $\alpha v \beta 3$ を介して活性化された内皮と会合することが示されている。この相互作用が M M P-2 のフラグメントによって崩壊されられる場合、次いで新脈管形成はダウンレギュレートされ、そして腫瘍増殖において阻害される。

【0315】

新脈管形成を阻害する多くの薬理的物質が存在し、これらの任意の1以上が本発明の一部として使用され得る。これらの物質としては、A G M-1 4 7 0 / T N P-4 7 0、サリドマイド、およびカルボキシアミドトリアゾール (C A I) が挙げられる。フマギリンは、1990年に新脈管形成の強力なインヒビターであることが見出されており、そしてそれ以来、フマギリンの合成アナログである、A G M-1 4 7 0 および T N P-4 7 0 が開発されてきた。これら両方の薬物は、インビトロでの内皮細胞増殖およびインビボでの新脈管形成を阻害する。T N P-4 7 0 は、ヒトの臨床試験で広範に研究され、そのデータは長期の投与が最適であることを示唆する。

【0316】

サリドマイドは、元来鎮静薬として使用されていたが、強力な催奇形物質であることが見出され、そして中止された。1994年に、サリドマイドは新脈管形成インヒビターであることが見出された。サリドマイドは現在、抗癌剤および血管性の眼疾患の処置として臨床試験されている。

【0317】

C A I は新脈管形成の低分子量の合成インヒビターであり、これは、アクチンの再組織化、内皮細胞の移動およびコラーゲン I V 上での伸展を妨げる、カルシウムチャネルブロッカーとして作用する。C A I は生理学的に達成可能な濃度で新生血管形成を阻害し、そして癌患者によって経口的に十分許容される。C A I を用いた臨床試験によって、処置前に進行性の疾患を有する癌患者の49%において疾患の安定化を生じた。

【0318】

ヘパリンまたはヘパリンフラグメントの存在下のコルチゾンは、内皮細胞増殖をブロックすることによってマウスにおいて腫瘍増殖を阻害することが示された。ステロイドおよびヘパリンの相加的な阻害効果に関与する機構は明らかでないが、ヘパリンが内皮細胞によるステロイドの取り込みを増加させ得ると考えられる。この混合物は、新しく形成され

10

20

30

40

50

た毛細血管の下の基底膜の溶解を増加させることが示されており、そしてこれはまた、相加的な血管抑制 (ang i o s t a t i c) 効果についての可能性のある説明である。ヘパリン-コルチゾール結合体はまた、インビボでの強力な血管抑制効果活性および抗腫瘍効果活性を有する。

【0319】

さらに特定の新脈管形成インヒビターが、本発明の腫瘍標的化方法を使用して腫瘍に送達され得る。これには、抗侵襲性因子 (Ant i - I n v a s i v e F a c t o r)、レチノイン酸およびパクリタキセル (米国特許第5, 716, 981号; 参考として本明細書中に援用される); AGM-1470 (Ingberら、1990; 参考として本明細書中に援用される); サメ軟骨抽出物 (米国特許第5, 618, 925号; 参考として本明細書中に援用される); 陰イオン性ポリアミドオリゴマーまたは陰イオン性ポリ尿素オリゴマー (米国特許第5, 593, 664号; 参考として本明細書中に援用される); オキシンドール (oxindole) 誘導体 (米国特許第5, 576, 330号; 参考として本明細書中に援用される); エストラジオール誘導体 (米国特許第5, 504, 074号; 参考として本明細書中に援用される); およびチアゾールピリミジン誘導体 (米国特許第5, 599, 813号; 参考として本明細書中に援用される) が挙げられるが、これらに限定されない。これらはまた、本発明の併用使用のための、抗新脈管形成組成物としての使用が意図される。

【0320】

$\alpha_v \beta_3$ インテグリンのアンタゴニストを含む組成物はまた、本発明と組合せて新脈管形成を阻害するために使用され得る。米国特許第5, 766, 591号 (参考として本明細書中に援用される) に開示されるように、RGD含有ポリペプチドおよびその塩 (環状ポリペプチドを含む) は、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリンアンタゴニストの適切な例である。

【0321】

アンギオポイエチン (ang i o p o i e t i n) が Tie 2 に対するリガントであるので、Tie 2 レセプターを介するシグナル伝達を変えることに基づく治療的介入の他の方法がまた、本明細書と組み合わせて使用され得る。例えば、Tie 2 を活性化をブロックし得る可溶性 Tie 2 レセプター (Linら、1998a) が使用され得る。組換えアデノウイルス遺伝子治療を使用するこのような構築物の送達は、癌の処置および転移の減少において有効であることが示されている (Linら、1998a)。

【0322】

アンギオポイエチンは、VEGFファミリーのメンバーと同様に、血管内皮に特異的な増殖因子である (DavisおよびYancopoulos、1999; Holashら、1999; 本明細書中で参考として援用される)。最初に記載されたアンギオポイエチンは、天然に存在するレセプター賦活体またはアゴニストであるアンギオポエチン-1 (Ang-1; 配列番号1および配列番号2)、および天然に存在するレセプターアンタゴニストであるアンギオポエチン-2 (Ang-2; 配列番号3および配列番号4) であった。この両方は、内皮細胞チロシンキナーゼレセプター Tie 2 によって作用する。

【0323】

2つの新しいアンギオポエチンである、アンギオポエチン-3 (マウス) およびアンギオポエチン-4 (ヒト) もまた同定された (Valenzuelaら、1999)。アンギオポエチン-3は、(Ang-2のような) アンタゴニストとして作用するようであるが、アンギオポエチン-4は、(Ang-1のような) アゴニストとして機能するようである (Valenzuelaら、1999)。アンギオポエチン-3と呼ばれるタンパク質はまた、ヒト心臓からクローニングされ、そして内皮細胞に対してマイトジェン効果を有しないと報告された (Kimら、1999)。

【0324】

VEGFは、血管発達の早期の段階のために必要であるが、アンギオポエチン-1は、一般に、血管新生のより後期の段階に必要とされる。従って、VEGFは、内皮細胞分化、増殖および初期の血管形成を促進するように作用する。アンギオポエチン-1は、Tie

10

20

30

40

50

e 2 レセプターを介して、成熟管の維持および安定化を促進するように作用する。従って、アンジオポエチン-1 は、成熟因子または安定化因子であり、これは、内皮細胞と周囲の支持細胞との間の相互作用を促進することにより未成熟の血管を成熟した血管に変換する (Holash ら、1999)。

【0325】

(E6. アポトーシス誘発剤)

本発明はまた、任意の細胞 (腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞およびウイルスに感染した細胞を含む) においてアポトーシスを誘発する因子を送達するために使用され得る。多くの抗癌剤は、その作用機構の一部として、アポトーシス誘発効果を有する。併用療法において使用するために記載された任意の1つ以上のこのような薬剤 (表Fに含まれる) はまた、本明細書中に記載されるように、本発明の抗体に結合体化され得る。特定の他の薬剤が、一次的な機構として、アポトーシス効果を有することが発見されるか、設計されるか、または選択された。このような因子の例は、以下に記載され、これらのうちの任意がまた、免疫結合体を調製するために使用され得るか、または本発明の併用療法において別々に使用され得る。

【0326】

多くの形態の癌において、腫瘍抑制遺伝子 (例えば、p53) における変異が報告されている。p53 の不活性化は、アポトーシスの促進の不全を生じる。この不全によって、癌細胞は、細胞死へと運命付けられるよりむしろ、腫瘍形成を進行させる。従って、腫瘍抑制因子の送達もまた、細胞死を刺激するために本発明での使用が意図される。例示的な腫瘍抑制因子としては、p53、網膜芽細胞腫遺伝子 (Rb)、ウィルムス腫瘍 (WT1)、bax α 、インターロイキン-1 β -変換酵素およびファミリー、MEN-1 遺伝子、神経芽細胞腫 I 型 (NF1)、cdk インヒビター p16、結腸直腸癌遺伝子 (DCC)、家族性腺腫症ポリポーシス遺伝子 (FAP)、多発性腫瘍抑制遺伝子 (MTS-1)、BRCA1 ならびに BRCA2 が挙げられるがこれらに限定されない。

【0327】

使用のために好ましいのは、p53 (米国特許第5,747,469号;同第5,677,178号;および同第5,756,455号;各々は、参考として本明細書中に援用される)、網膜芽細胞腫、BRCA1 (米国特許第5,750,400号;同第5,654,155号;および同第5,710,001号;同第5,756,294号;同第5,709,999号;同第5,693,473号;同第5,753,441号;同第5,622,829号;および同第5,747,282号;各々は、参考として本明細書中に援用される)、MEN-1 (GenBank登録番号U93236号)およびアデノウイルスE1A (米国特許第5,776,743号;参考として本明細書中に援用される)の遺伝子である。

【0328】

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死を阻害する他の発癌遺伝子としては、bcl-2、bcl-1 (bcl-1とは異なる、サイクリンD1;GenBank登録番号M14745、X06487;米国特許第5,650,491号;および同第5,539,094号;各々が本明細書中において参考として援用される);およびファミリーメンバー (bcl-x1、Mcl-1、Bak、A1、A20を含む) が挙げられる。bcl-2 の過剰発現は、最初に、T細胞リンパ腫において発見された。bcl-2 は、Bax、アポトーシス経路におけるタンパク質に結合し、不活化することによって発癌遺伝子として機能する。bcl-2 機能の阻害は、Bax の不活化を妨げ、アポトーシス経路が進行し得る。このように、このクラスの発癌遺伝子の阻害 (例えば、アンチセンスヌクレオチドを使用する) は、アポトーシスの増強が所望される局面において本発明における使用に企図される (米国特許第5,650,491号;同第5,539,094号;および同第5,583,034号;各々が、本明細書中において参考として援用される)。

【0329】

本発明の抗体により送達され得る他の組成物としては、腫瘍壊死因子関連アポトーシス

10

20

30

40

50

誘導リガンド (T R A I L と称される) をコードする遺伝子、および T R A I L ポリペプチド (米国特許第 5, 7 6 3, 2 2 3 号; 参考として本明細書中に援用される); 米国特許第 5, 6 0 5, 8 2 6 号 (参考として本明細書中に援用される) 2 4 k D アポトーシス関連プロテアーゼ; F a s 関連因子 1、F A F 1 (米国特許第 5, 7 5 0, 6 5 3 号; 参考として本明細書中に援用される) が挙げられる。インターロイキン-1 β -変換酵素およびファミリーのメンバー (これらもまた、アポトーシスを刺激することが報告されている) の提供もまた、本発明のこれらの局面における使用のために意図される。

【0330】

以下のような化合物もまた使用され得る; カルボスチリル (c a r b o s t y r i l) 誘導体 (米国特許第 5, 6 7 2, 6 0 3 号; および同第 5, 4 6 4, 8 3 3 号; 各々は、参考として本明細書中に援用される); 分枝状アポトーシス原性 (a p o g e n i c) ペプチド (米国特許第 5, 5 9 1, 7 1 7 号; 参考として本明細書中に援用される); ホスホチロシンインヒビターおよび非加水分解性ホスホチロシンアナログ (米国特許第 5, 5 6 5, 4 9 1 号; および同第 5, 6 9 3, 6 2 7 号; 各々は、参考として本明細書中に援用される); R X R レチノイドレセプターのアゴニスト (米国特許第 5, 3 9 9, 5 8 6 号; 参考として本明細書中に援用される); さらに、抗酸化剤 (米国特許第 5, 5 7 1, 5 2 3 号; 参考として本明細書中に援用される)。チロシンキナーゼインヒビター (例えば、ゲニステイン) もまた、本発明の抗体に連結され得る (参考として本明細書中に援用される米国特許第 5, 5 8 7, 4 5 9 号により支持されるように)。

【0331】

(E 7. 抗ウイルス薬剤)

P S および他のアニオン性リン脂質がウイルスに感染した細胞に曝露される場合、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディもまた、任意の 1 以上の抗ウイルス薬剤に連結され得る。構築物、レセプターボディまたはベータボディに連結するための例示的な抗ウイルス薬剤としては、表 G のものが挙げられる。そのような抗ウイルス薬剤もまた、本発明の抗ウイルス併用療法において別々に使用され得る。

【0332】

いわゆる古典的な抗ウイルス薬剤に加えて、他の D N A / R N A インヒビターもまた、抗ウイルス治療を形成するために付与される。例示的な抗ウイルス薬剤は、表 G に列挙されており、そのうちの任意の 1 以上が本発明の抗ウイルス結合体を調製するために付与され得るか、または本発明の抗ウイルス併用療法で別々に使用され得る。

【0333】

10

20

30

【表 17】

表G

一般的な疾患を生じるウイルスおよび抗ウイルス薬

疾患を生じるウイルス	薬物カテゴリー	例示的な抗ウイルス薬
ヘルペスウイルス		シドフォビル、アシクロビル、ペンシクロビル(ファミシクロビル)、ガンシクロビル、デオキシグアノシン、フォスカーネット、イドクスウリジン、トリフルオロチミジン、ビダラビン、ソリブジン
レトロウイルス	ヌクレオシド逆転写酵素(RT)インヒビター	ジドブジン、ジダノシン、ザルシタビン、ラミブジン、スタブジン、アバカビル、マルチヌクレオシド抵抗性(resistance)A、マルチヌクレオシド抵抗性B
	非ヌクレオシドRTインヒビター	ネビラピン、デラビラジン、エファビレンツ、アデフォビルディピボキシル(Adefovir Dipivoxil)
	プロテアーゼインヒビター	インディナビル、リトナビル、サキナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル
	細胞周期相特異的抗悪性腫瘍薬	ヒドロキシウレア (Hydrea™、Bristol Myers-Squibb)
B型肝炎		デオキシシトシンリン酸塩(iphosphate)、ラミブジン三リン酸、エムチシタビン三リン酸、アデフォビルニリン酸、ペンシクロビル三リン酸、ロブカビル三リン酸
C型肝炎		インターフェロン α、リバビリン
インフルエンザAおよびB		アマンタジン、リマンタジン、ザナミビル、オセルタミビル

抗ウイルス薬剤および薬物のうちで、A Z Tおよびシドフォビルが現在好ましい。選択される抗ウイルス薬物に関係なく、抗ウイルス結合体は肺のマクロファージ、ウイルスに感染した細胞に結合し、またウイルス粒子にも結合し得る。使用されるリンカーおよび結合体化技術に依存して、抗ウイルス薬物は、標的細胞の表面で放出され得、次いで細胞に取り込まれ得る。好ましくは、結合体それ自体は、細胞（例えば、マクロファージまたはウイルスに感染した細胞）中に取り込まれる。取り込みは、自然にまたはウイルスが介在するかのいずれかで生じ得る。一旦細胞の中に入ると、抗体結合体と同様に、リンカーの加水分解により活性な抗ウイルス薬剤が放出される。

【0334】

生物学的に不安定な結合を含む他の連結（例えば、ジスルフィド、酸に不安定なもの、酵素的に切断可能なもの、または加水分解可能なもの）が使用され得る。したがって、治療剤に連結するのに使用するために記載される任意の生物学的に放出可能または選択的加水分解可能な結合が、本発明の抗ウイルス剤と組み合わせて使用され得る。

【0335】

(F. 生物学的機能性等価物)

抗体およびエフェクターの等価物またはさらなる改良物が、今や、一般には上記に提供される物質を出発点として使用して作製され得る。改変および変化が、このような抗体の

構造中になされ得、そしてさらに類似または他の様式の所望の特徴を有する分子を入手し得る。例えば、特定のアミノ酸が、相互作用性結合能（例えば、アミノリン脂質、P SおよびP Eへの結合）のかなり大きな損失なしに、タンパク質構造において他のアミノ酸の代わりに置換され得る。これらの考察もまた、毒素、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤および凝血薬などにあてはまる。

【0336】

タンパク質の生物学的機能活性を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換がタンパク質配列（または、当然のことながら基礎のDNA配列）中でなされ得、にもかかわらず類似（アゴニスト）の特性を有するタンパク質を入手し得る。従って、種々の変化が、それらの生物学的有用性または活性のかなり大きな損失なく、抗体または治療剤の配列（または、基礎のDNA配列）になされ得ることが意図される。基礎のDNA配列を変異することから作製される生物学的機能性等価物は、本明細書中の表Aにおいて提供されるコドン情報、および部位特異的変異誘発に関する支持する技術的詳細を用いてなされ得る。

【0337】

【表18】

表 A

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

10

20

30

40

50

分子の所定の部分内になされ得、なお受容可能なレベルの等価な生物学的活性を有する分子を生じ得る変化の数に対して限界が存在するという概念が、「生物学的機能性等価物」タンパク質またはペプチドの定義に固有であることもまた、当業者に十分に理解される。従って、生物学的機能性等価物タンパク質およびペプチドは、本明細書中において、ほとんどまたはすべてではないが特定のアミノ酸が置換され得るタンパク質およびペプチドとして規定される。当然のことながら、異なる置換を有する複数の異なるタンパク質／ペプチドは、本発明に従って容易に作製および使用され得る。

【0338】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなど）に基づく。アミノ酸側鎖置換のサイズ、形状および型の分析によって、アルギニン、リジンおよびヒスチジンはすべて正に荷電した残基であること；アラニン、グリシンおよびセリンはすべて類似のサイズであること；そして、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはすべて一般的に類似の形状であることが示される。従って、これらの考察に基づいて、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、本明細書中において、生物学的機能性等価物として規定される。

【0339】

より定量的な変化を生じさせる際に、アミノ酸の疎水親水指数が考慮され得る。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷特徴に基づいて疎水親水指数を指定されており、これらは以下である：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

【0340】

タンパク質に相互作用性生物学的機能を付与する際の疎水親水アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野において理解される（KyteおよびDoolittle、1982、本明細書中で参考として援用される）。特定のアミノ酸が、類似の疎水親水指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を保持することは公知である。疎水親水指数に基づいた変化を生じさせる際に、疎水親水指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内である置換が特に好ましく、そして±0.5以内である置換がさらにより特に好ましい。

【0341】

従って、アミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸の代わりに置換され、そしてなお生物学的に等価なタンパク質を入手し得ることが理解される。米国特許第4,554,101号（本明細書中で参考として援用される）において詳述されるように、以下の親水性値が、アミノ酸残基に指定されている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-0.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。

【0342】

親水性値に基づいた変化を生じさせる際に、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内である置換が特に好ましく、そして±0.5以内である置換がさらにより特に好ましい。

【0343】

(G. 結合体)

抗体Fc領域は、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディを提供するために少なくとも第1のホルファチジルセリン結合タンパク質に作動可能に結合されるか、そのタンパク質と関連するか、または結合体化される。そのような構築物、レセプターボディまたはベータボディは、例えば、抗細胞性薬剤および細胞傷害性薬剤、凝血薬ならびに抗ウイルス薬剤にさらに結合体化または結合され得る。

【0344】

共有結合が好ましいものの、作動可能な結合の他の手段がまた使用され得る。例えば、任意の連結される構築物は、アビジン：ビオチン架橋を使用して作製され得る。当業者に利用可能な知識に加えて、共有に係る米国特許第6,093,399号は、生物学的薬剤および治療剤に対する標的化剤の結合におけるアビジン：ビオチンの使用をさらに記載し、可能にするために、本明細書中において具体的に援用される。

10

【0345】

任意の2つまたは3つの薬剤がまた、第2の結合領域（好ましくは、抗体またはその抗原結合領域）によって結合され得る。これは、コアグリガンドによって例示され、この標的化剤は、第2の結合領域によって凝固剤に連結される（米国特許第6,093,399号、同第6,004,555号、同第5,877,289号、および同第6,036,955号、各々が、本明細書中において参考として援用される）。これは、癌の処置において作製され、首尾良く使用された。

【0346】

20

免疫結合体技術は、ここで、一般的に当該分野で公知である。しかし、特定の利点が、特定の好ましい技術（調製および引き続く臨床的投与のための精製の両方）の適用を介して達成され得る。さらに、多くのタイプのジスルフィド結合含有リンカーが、公知であり、抗体およびペプチド結合体において首尾良く利用され得、特定のリンカーが、一般的に、異なる薬理学的特性および能力に基づいて、他のリンカーよりも好ましい。例えば、立体的に「妨害される」ジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでより大きな安定性を生じること起因して好ましく、これによって作用部位での結合の前での凝固剤の放出を妨げる。

【0347】

架橋リンカーの各タイプ、ならびに架橋がどのように実行されるかは、得られる結合体の薬物動力学を変化する傾向がある。作用の意図される部位（この部位で、結合体が良好な「放出」特性を有する）を除いて、体内のいたる場所で見出される条件下でインタクトなままである結合体を有することが望ましくあり得る。従って、特定の架橋スキーム（特に、使用される特定の架橋試薬および架橋される構造を含む）は、いくつかの有用性がある。

30

【0348】

結合体化される特定の薬剤に依存して、その薬剤を作動可能に結合するペプチドスペーサーを提供することが必要であり得るかまたは所望され得る。特定のペプチドスペーサーは、ジスルフィド結合されたループ構造に折り畳まれ得る。次いで、ループ内のタンパク質分解切断は、ヘテロダイマーポリペプチドを生成し、ここでこの抗体および治療剤は、単一のジスルフィド結合のみによって連結される。このような毒素の例は、リシンA鎖毒素である。

40

【0349】

特定の他の毒素化合物が利用される場合、非切断可能ペプチドスペーサーが、融合タンパク質の毒素化合物を作動可能に結合するために提供され得る。非切断可能ペプチドスペーサーとともに使用され得る毒素は、それら自体が、タンパク質分解切断によって、細胞傷害性ジスルフィド結合形態に変換され得る毒素である。このような毒素化合物の例は、Pseudomonas外毒素化合物である。

【0350】

種々の化学治療剤および他の薬理学的薬剤が、ここで、首尾良く結合体化され、そして

50

薬理学的に機能することを示した。調査されている例示的な抗新生物剤としては、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンブラスチン、および種々の他のものが挙げられる。さらに、他の薬剤（例えば、ネオカルジノスタチン（neocarjinstatin）、マクロマイシン、トレニモン（trenimon）および α -アミニチンが記載されている。これらの結合方法が、本明細書中での使用のために適合され得る。

【0351】

抗体またはPE結合ペプチドに対する任意の共有結合が、機能的部位とは異なる部位で理想的になされるべきである。従って、組成物は、特に、得られる構築物がなお意図される抗原またはPEに結合し、そして結合される薬剤が、実質的に生物学的活性を実質的に維持し、および／または構築物から放出される場合に、生物学的活性を回復するように、有意に損なうことなく、その異図とされる機能を各領域が実行する、任意の操作様式で「連結」される。

10

【0352】

Fc領域の炭水化物部分を介する生物学的薬剤の結合も企図される。グリコシル化（O結合型およびN結合型の両方）が抗体で天然に生じる。組換え抗体は、所望の場合、さらなるグリコシル化部位を再現または作製するように改変され得、これは、適切なアミノ酸配列（例えば、Asn-X-Ser、Asn-X-Thr、Ser、またはThr）を抗体の一次配列に操作することによって単純に達成される。

【0353】

20

（G1．生化学架橋剤）

上記に提供される一般の情報に加えて、特定の好ましい生化学架橋剤が使用され得る。架橋試薬は、2つの異なる分子の官能基を共に結ぶ分子架橋を形成するために使用される。段階的な様式にて2つの異なるタンパク質を連結するために、所望されないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤が、使用され得る。例示的なヘテロ二官能性架橋剤は、表Cにおいて参照される。

【0354】

【表 19】

表C：ヘテロ二官能性架橋剤

リンカー	以下に対して 反応性	利点および適用	架橋後のスペーサー アームの長さ	
SMPT	第1級アミン スルフヒドリル	・ より大きな安定性	11.2 Å	
SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ チオール化	6.8 Å	10
LC-SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ 切断性架橋	15.6 Å	
スルホ-LC-SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ 伸長したスペーサーアーム	15.6 Å	
SMCC	第1級アミン スルフヒドリル	・ 伸長したスペーサーアーム ・ 水溶性	11.6 Å	
スルホ-SMCC	第1級アミン スルフヒドリル	・ 安定なマレイミド反応基 ・ 酵素-抗体結合体 ・ ハプテンキャリアタンパク質結合体	11.6 Å	20
MBS	第1級アミン スルフヒドリル	・ 安定なマレイミド反応基 ・ 水溶性	9.9 Å	
スルホ-MBS	第1級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体結合体 ・ ハプテンキャリアタンパク質結合体	9.9 Å	
SIAB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	10.6 Å	
スルホ-SIAB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体結合体	10.6 Å	
SMPB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	14.5 Å	30
スルホ-SMPB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 伸長したスペーサーアーム	14.5 Å	
EDC/スルホ-NHS	第1級アミン カルボキシル基	・ 伸長したスペーサーアーム ・ 酵素-抗体結合体	0	
ABH	糖質 非選択的	糖基と反応	11.9 Å	

ヘテロ二官能性架橋剤は、2つの反応基（一方は、一般に、第1の級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、そして他方は、一般にチオール基（例えば、ピリジリジルスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する）を含む。第1の級アミン反応基を通じて、この架橋剤は、あるタンパク質のリジン残基と反応し得、このチオール反応基を通じて、第1のタンパク質と既に結び付けられている架橋剤は、他のタンパク質のシステイン残基（遊離のスルフヒドリル基）と反応する。

【0355】

従って、組成物は、一般に、架橋の目的に利用可能な官能基を有するか、または有するように誘導体化される。この要件は、広汎な種々の基がこの様式において使用され得るという点で限定的であるとは考えられない。例えば、第一級アミン基または第二級アミン基、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシル基、アルコール基、ホスフェート基、

40

50

あるいはアルキル化基は、結合および架橋のために使用され得る。

【0356】

架橋剤の2つの反応基の間のスペーサーアームは、種々の長さおよび化学組成を有し得る。より長いスペーサーアームは、結合体成分のより良好な可撓性を可能にし、その一方、架橋におけるいくつかの特定の成分（例えば、ベンゼン基）は、反応基にさらに安定性を、または種々の局面の作用に化学結合の耐性の増大（例えば、還元剤への耐性のジスルフィド結合）を与え得る。ペプチドスペーサー（例えば、L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala）の使用もまた、意図される。

【0357】

血中にて合理的な安定性を有する架橋剤が用いられることが好ましい。標的化剤および毒素因子または凝固因子を結合体においてに首尾よく用いられ得る、多くの型のジスルフィド結合含有リンカーが、公知である。立体的に妨害されるジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでより大きな安定性を生じることを証明し得、このことは、作用部位での結合の前に因子の放出を妨げる。従って、これらのリンカーは、連結剤の1つの好ましい群である。

【0358】

最も好ましい架橋試薬のうちの1つは、SMP Tである。SMP Tは、隣接するベンゼン環およびメチル基により「立体的に妨害」されているジスルフィド結合を含む、二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、チオレート陰イオン（組織および血中に存在し得るグルタチオンのような）による攻撃から結合を保護し、それによって腫瘍部位への結合した薬剤の送達の前に結合体の脱カップリングを防ぐため際に役立つ機能を提供すると考えられる。SMP T剤はまた、本発明の二重特異性リガンドと組み合わせて使用され得ることが意図される。

【0359】

多くの他の公知の架橋試薬のように、SMP T架橋試薬は、官能基（例えば、システインのSHまたは第一級アミン（例えば、リジンのε-アミノ基））を架橋する能力を与える。別の可能な型の架橋剤は、切断性ジスルフィド結合（例えば、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート）を含む、ヘテロ二官能性感光性フェニルアジドを含む。N-ヒドロキシスクシンイミジル基は、第一級アミノ基と反応し、そしてフェニルアジド（光分解の際）は、任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0360】

妨害された(hindered)架橋剤に加えて、妨害されていないリンカーもまた、本明細書に従って用いられ得る。保護されたジスルフィドを含まないかまたは生成しないと考えられる、他の有用な架橋剤には、SATA、SPDPおよび2-イミノチオレンが挙げられる。このような架橋剤の使用は、当該分野において十分に理解されている。

【0361】

一旦結合体化されると、この結合体は、非結合体化因子および他の夾雑物から分離される。多数の精製技術が、結合体を臨床的に有用にするに十分な程度の純度の結合体を提供する使用に利用可能である。サイズ分離（例えば、ゲル濾過、ゲル浸透、または液体高速クロマトグラフィー）に基づく精製方法は、一般に、最も有用である。他のクロマトグラフィー技術（例えば、Blue-Sepharose分離）もまた、使用され得る。

【0362】

(G2. 生物学的に放出可能なリンカー)

任意の結合部分は、血液において合理的な安定性を有し、疾患、例えば、腫瘍部位に標的化する前に、結合した薬剤の実質的な放出を予防することが、好ましいけれども、特定の局面において、生物学的に放出可能な結合および／または選択的に切断可能なスペーサーまたはリンカーの使用が、意図される。「生物学的に放出可能な結合」および「選択的に切断可能なスペーサーまたはリンカー」は、循環において合理的な安定性をなお有する。

【0363】

従って、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、生物学的に放出可能な結合を介して1以上の治療剤に結合され得る。「生物学的に放出可能な結合」または「選択的に加水分解可能な結合」は、唯一または優先的に特定の条件下で、放出可能、切断可能、または加水分解であるすべての結合を含む。これは、米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号（各々は、本明細書中で特異的に参考文献として援用される）に記載されるように、ジスルフィド結合およびトリスルフィド結合ならびに酸標識結合が挙げられる。

【0364】

治療剤の、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディへの結合のための酸感応性スパーサーの使用は、特に意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸区画内で放出される。酸感応性放出は、細胞外で起こり得るが、特定の標識の後、好ましくは腫瘍部位に対して起こることが意図される。特定の現状で好ましい例としては、酸感応性スパーサーを介してコルヒチンまたはドキソルビシンに結合された2C3様抗体が挙げられる。抗体の糖質部分を介する結合はまた、意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸性区画内で放出される。

【0365】

構築物、レセプターボディまたはベータボディはまた、生物学的に放出可能な結合を介して治療剤の結合を可能にする官能基を導入するように誘導され得る。従って、構築物、レセプターボディまたはベータボディは、ヒドラジド基、ヒドラジン基、1級アミン基または2級アミン基において側鎖ターミネートを導入するように誘導され得る。治療剤は、Schiffの塩基結合、ヒドラゾンもしくはアシルヒドラゾン結合またはヒドラジドリンカーを介して結合体化され得る（米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号、各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）。

【0366】

米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号（各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）に記載されるように、構築物、レセプターボディまたはベータボディは、酵素感応性の1以上の生物学的に放出可能な結合（ペプチド結合、エステル、アミド、リン酸ジエステルおよびグリコシドが挙げられる）を介して治療剤に操作可能に結合され得る。

【0367】

本発明の特定の局面は、優先的に疾患部位、特に、腫瘍環境内に位置する、ペプチターゼおよび／またはプロテイナーゼに対する少なくとも第1の切断部位を含むペプチドリンカーの使用に関する。従って、結合された治療剤の抗体媒介送達、疾患部位または腫瘍環境内で特異的に切断を生じ、活性薬剤の特異的な放出を生じる。特定のペプチドリンカーは、再構築に関する1以上の酵素によって認識される切断部位を含む。

【0368】

ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、TGF β 、スタフィロキナーゼ、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、間質性コラゲナーゼ、セラチナーゼ、またはストロメライシン）に対する切断部位を含むポリペプチドリンカーは、特に好ましい。米国特許第6,004,555、米国特許第5,877,289および同第6,093,399号は、さらなる記載ならびに標的薬剤-治療剤構築（生物学的に放出可能な結合ならびに選択的に切断可能なリンカーおよびペプチドを含む）を作製かつ使用する方法を可能にする目的のために、本明細書中で参考として特異的に援用される。特に、1999年3月2日に発行された米国特許第5,877,289号は、さらなる記載ならびに標的薬剤-治療剤構築（ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、間質性コラゲナーゼ、セラチナーゼ、またはストロメライシン）によって腫瘍環境内で切断される選択的に切断可能なペプチドリンカーを含む）を作製かつ使用する方法を可能にす

10

20

30

40

50

る目的のために、本明細書中で特異的に参考として援用される。

【0369】

現状で好ましい選択的に切断可能なペプチドリナーは、プラスミンまたはメタロプロテイナーゼ（「マトリックスメタロプロテアーゼ」または「MMP」としても公知である）（例えば、間質性コラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメリシン）に対する切断部位を含むリンカーである。本発明に関して有意に使用され得るさらなるペプチドリナーとしては、例えば、プラスミン切断可能配列（例えば、プロウロキナーゼによって切断可能なもの）、TGF β 、プラスミノゲンおよびスタフィロキナーゼ；第Xa因子切断可能配列；MMP切断可能配列（例えば、ゼラチナーゼAによって切断可能なもの）；コラゲナーゼ切断可能配列（例えば、ウシ皮膚コラーゲン（ $\alpha 1$ （I）鎖）、ウシ皮膚コラーゲン（ $\alpha 2$ （I）鎖）、ウシ軟骨コラーゲン（ $\alpha 1$ （II）鎖）、ヒト肝臓コラーゲン（ α_1 （III）鎖）、ヒト α_2 M、ヒトPZP、ラット α_1 M、ラット α_2 M、ラット α_1 I $_3$ （2J）、ラット α_1 I $_3$ （27J）、およびヒト線維芽細胞コラゲナーゼ自己分解切断部位が挙げられる。当業者に利用可能な知識に加えて、同一出願人の米国特許第6,342,219号、同第6,524,583号、同第6,342,221号および同第6,416,758号における表B2からの文書および配列が、このような切断可能な配列の使用を記載しそして可能にする目的で、本明細書中において具体的に援用される。

10

【0370】

（G3. 融合タンパク質および組換え発現）

構築物、レセプターボディまたはベータボディは、分子生物学技術を使用して融合タンパク質として調製され得る。任意の融合タンパク質が、任意の構築物、レセプターボディまたはベータボディならびに第二の薬剤（本明細書中に開示されるものおよび当該分野で公知のもの）を使用して設計および作製され得る。融合タンパク質技術は、他の改変（例えば、CDR配列の最適化、選択的に切断可能なペプチド配列を介する連結など）を有する融合タンパク質を調製するために容易に適合可能である。

20

【0371】

このような目的を達成するための組換えDNA技術の使用は、現在、当業者に標準的操作である。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ組換え／遺伝的組換えが挙げられる。さらに、DNA合成およびRNA合成は、自動合成装置を使用して実施され得る（例えば、Sambrookら、1989（本明細書中に参考として援用される）に記載される技術を参照のこと）。

30

【0372】

このような融合タンパク質の調製は、一般的に、所望の融合タンパク質をコードする単一のコード領域を調製するために、第1のおよび第2のDNAコード領域の調製、およびそのような領域をインフレームで機能的に連結または結合することを伴う。一旦、所望のコード領域が生成されると、発現ベクターが作製される。発現ベクターは、挿入されたDNA領域の上流に、そのDNAの転写を促進するように作用し、そして従ってコードされる組換えタンパク質の発現を促進するように作用する1つ以上のプロモーターを含む。これが、「組換え発現」の趣意である。

【0373】

構築物、レセプターボディまたはベータボディのいわゆる「組換え」バージョンを獲得するために、ベクターが、組換え細胞内で発現される。原核生物系または真核生物系における発現のためのDNAセグメントの操作は、組換え発現における当業者に一般的公知の技術によって実施され得る。実質的に任意の発現系が、この発現において使用され得ると考えられる。

40

【0374】

本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、真核生物発現系（例えば、CHO細胞）において首尾良く発現され得る。しかし、E. coli pQE-60のような細菌発現系が、構築物の大規模調製および引き続き精製のために特に有用であると考えられる。cDNAはまた細菌系において発現され、発現されるそのコードタンパク質は

50

β-ガラクトシダーゼ、ユビキチン、*Schistosoma japonicum* グルタチオンS-トランスフェラーゼなどを伴う融合物として発現され得る。細菌発現は、使用の容易さ、およびそれによって得られる物質の品質に関して、真核生物発現を超える利点を有すると考えられる。

【0375】

微生物発現に関して、組換え宿主細胞における遺伝子の発現と関連して本発明の開示をなおさらに補充する目的のために、米国特許第5,583,013号；同第5,221,619号；同第4,785,420号；同第4,704,362号；および同第4,366,246号が、本明細書中で参考として援用される。

【0376】

組換え的に生成される構築物、レセプターボディまたはベータボディは、ヒト投与のために精製および処方され得る。あるいは、免疫結合体コードする核酸は、遺伝子治療を通して送達され得る。裸の組換えDNAまたはプラスミドが使用され得るが、リポソームまたはベクターの使用が好ましい。特定ウイルスが、レセプター媒介性エンドサイトーシスを介して細胞に進入する能力、および宿主細胞ゲノムに組み込みそして安定的および効率的にウイルス遺伝子を発現する能力は、それらを、哺乳動物細胞内に外来遺伝子を移入させるための魅力的な候補にさせている。本発明における使用のために好ましい遺伝子治療ベクターは、一般的にウイルスベクターである。

【0377】

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノム中に組み込むそれらの能力、大量の外来性遺伝物質を移入させるそれらの能力、広範なスペクトルの種および細胞型に感染するそれらの能力、および特定の細胞株にパッケージングされるそれらの能力に起因して、遺伝子送達ベクターとして見込まれている。他のウイルス（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）（例えば、米国特許第5,139,941号（本明細書中で参考として援用される）に記載されるウイルス）もまた、遺伝子移入のためのベクターとして作用されるように操作され得る。

【0378】

外来性遺伝物質を受容し得るいくつかのウイルスは、それらが適応し得るヌクレオチドの数、およびそれらが感染する細胞の範囲において限定されるが、これらのウイルスは、遺伝子発現を首尾良くもたらしことが実証されている。しかし、アデノウイルスは、それらの遺伝産物を宿主ゲノム中に組み込まず、従って遺伝子発現のために宿主の複製を必要としない。これは、迅速な遺伝子発現、効率的な遺伝子発現、異種遺伝子発現についてそれらを理想的に適合させる。複製欠損した感染性ウイルスを調製する技術は、当該分野において周知である。

【0379】

特定のさらなる実施形態において、遺伝子治療ベクターはHSVである。HSVを魅力的なベクターにする因子は、ゲノムの大きさおよび組織化である。HSVは大きいので、複数の遺伝子または発現カセットを組み込むことは、より小さな他のウイルス系よりもあまり問題ではない。さらに、変動する性能（例えば、時間的、強度）を有する種々のウイルスコントロール配列の利用能は、他の系におけるよりも高い程度で発現を制御することを可能にする。ウイルスが比較的少数でスプライシングされるメッセージを有し、遺伝子操作をさらに容易にすることもまた有用である。HSVはまた、操作が比較的容易であり、そして高い力価まで増殖され得る。

【0380】

もちろん、ウイルス送達系を使用する際には、所望されない夾雑物（例えば、不完全干渉ウイルス粒子または発熱物質）を本質的に含まないようにするために十分にピリオンを精製し、その結果、ベクター構築物を受容する細胞、動物、または個体において不都合な反応を全く引き起こさないことが所望される。ベクターを精製する好ましい手段としては、浮遊密度勾配の使用（例えば、塩化セシウム勾配遠心分離）が挙げられる。

【0381】

(H. 薬学的組成物)

本発明の治療剤は、一般に、薬学的組成物として処方される。薬学的組成物は、少なくとも本発明の第1の治療剤（薬学的に受容可能なキャリアまたは水性媒体中に、溶解または分散した）の生物学的または治療的有効量を含む。組み合わせ治療もまた意図され、そして同じ型の基礎をなす薬学的組成物を、単一医薬および組み合わせ医薬の両方について使用し得る。

【0382】

句「薬学的に受容可能、または薬理学的に受容可能」とは、必要に応じて、動物またはヒトに投与された場合、有害な、アレルギー性のまたは他の有害な反応を生じない分子全体または組成物をいう。獣医学的使用、本発明に等しく包含され、そして「薬学的に受容可能な」処方物は、臨床的および／または獣医学的使用の両方のための処方物を含む。

10

【0383】

本明細書において使用する場合、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、任意のおよび全ての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤および吸着遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質のための、そのような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性成分と不適合である場合を除いて、治療的組成物中でのその使用が意図される。ヒトへの投与のために、調製物は、FDA官庁の生物製剤の基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を充たすべきである。補助的な活性成分もまた、組成物中に組込まれ得る。

20

【0384】

「単位用量」処方物は、特定の時機に合わせられた送達に適合される投与成分の用量または副用量を含む。例えば、例示的な「単位用量」処方物は、日用量もしくは日用量単位もしくは日副用量または週用量もしくは週用量単位もしくは週副用量などを含む処方物である。

【0385】

(H1. 注射可能処方物)

本発明の治療剤は、しばしば、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮を介する注射のための処方、またはぜん動投与および腫瘍もしくは疾患部位（腔内投与）中への直接滴下を含む他の経路のための処方）のために処方される。抗体、免疫結合体またはペプチド結合体を活性成分として含有する水性組成物の調製は、本明細書の開示を参照すれば、当業者に公知である。代表的には、そのような組成物は、水溶液または懸濁液のいずれかにおいて、注射可能な薬剤として調製され得る；注射前の液体への添加において、溶液または懸濁液を調製するための使用に適切な固体形態もまた調製され得る；そしてその調製物はまた、乳化され得る。

30

【0386】

注射での使用に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または滅菌懸濁液；ゴマ油、ピーナッツオイル、または水性プロピレングリコールを含む処方物；および滅菌注射可能溶液または滅菌注射可能懸濁液の即時調製のための滅菌粉末、が挙げられる。全ての場合において、その形態は、滅菌であるべきであり、そして注射可能性が存在する程度に流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下において安定であるべきであり、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の混入作用に対して、保護されるべきである。

40

【0387】

治療剤は、中性または塩の形態において、滅菌水性組成物中に処方され得る。遊離の塩基、または薬理学的に受容可能な塩としての治療剤の溶液は、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合された水中で調製され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸添加塩（タンパク質の遊離のアミノ基を用いて形成される）、および無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）または有機酸（例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸）などを用いて形成される塩などが挙げられる。遊離のカル

50

ボキシ基を用いて形成される塩はまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化鉄（I I I））および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン）などから誘導され得る。

【0388】

適切なキャリアとしては、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、ならびに植物油を含む、溶媒および分散媒体が挙げられる。多くの場合において、等張剤（例えば、糖類または塩化ナトリウム）を含むのが好ましい。適切な流動性は、例えば、コーティング剤（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合において必要とされる粒子サイズの維持によって、および／または界面活性剤の使用によって、維持され得る。

10

【0389】

貯蔵および使用の通常の下において、全てのそのような調製物は、防腐剤を含有し、微生物の増殖を防ぐべきである。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によってもたらされ得る。注射可能な組成物の長期の吸収は、遅延型吸収剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の組成物中での使用によってもたらされ得る。

【0390】

処方の際、または処方前に、治療剤は、広範に透析され、所望されない低分子物質を除去するか、および／または、適切な場合、所望のビヒクル中へのより容易な処方のために凍結乾燥されるべきである。滅菌の注射可能溶液は、必要とされる量の活性薬剤を、適切な溶媒中に、上記に列挙した他の種々の成分とともに取り込まれ、必要に応じて、その後ろに濾過滅菌されることにより調製される。一般に、分散剤は、種々の滅菌活性成分を、塩基性分散媒体および上記に列挙される必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に取り込まれることにより、調製される。

20

【0391】

滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分、および以前に滅菌濾過されたその溶液由来の任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライ技術である。

30

【0392】

本発明に従う適切な薬学的組成物は、一般に、受容可能な薬学的希釈剤または賦形剤（例えば、滅菌水溶液）と混合された治療剤のある量を含み、意図される使用に依存して、ある範囲の最終濃度を生じる。調製の技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第1の6版、Mack Publishing Company、1980（本明細書において参考として援用される）によって例示されるように、一般に当該分野において周知である。エンドトキシンの混入は、安全なレベルに最小限に維持されるべきである（例えば、0.5 ng/mgタンパク質未満）ことを理解するべきである。さらに、ヒトへの投与について、調製物は、FDA官庁の生物製剤基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を充たすべきである。処方の際に、抗体または免疫結合体溶液は、投薬量処方と適合する様式において、およびそのような治療的有効量において、投与される。

40

【0393】

（H2．徐放性処方物）

処方物は、種々の投薬形態（例えば、上記の注射可能な溶液の型）において容易に投与されるが、他の薬学的に受容可能な形態（例えば、錠剤、ピル、カプセルまたは経口投与のための他の固体、座剤、腔坐薬、経鼻溶液またはスプレー、エアロゾル、吸入剤、リポソーム形態など）もまた意図される。投与形態の型は、処置される疾患または障害に適合される。

【0394】

50

薬学的「遅放性」カプセルまたは「徐放性」組成物または調製物が、使用され得、そして一般的に適用可能である。徐放性処方物は、一般に、長期間にわたって一定の薬物レベルを生じるように設計され、そして本発明に従う治療剤を送達するために使用され得る。遅放性処方物は、代表的に、疾患部の近位（例えば、腫瘍またはウイルス感染の部位）に移植される。

【0395】

徐放性調製物の適切な例としては、抗体または免疫結合体を含む固形疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形された物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、以下が挙げられる：ポリエステル；ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメ
10
タクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））；ポリラクチド（例えば、米国特許第3,773,919号）；L-グルタミン酸およびγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー；非分解性エチレン-酢酸ビニル；分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、Lupron Depot™（乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートからなる注射可能なミクロスフェア））；およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸。

【0396】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、分子を100日間にわたって放出し得、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短期間で放出する。カプセル化抗体が身体内に長時間残留する場合、37℃で湿気に曝露される結果としてこれら
20
は変性または凝集し得、従って生物学的活性を減少し、かつ／または免疫原性を变化する。合理的な戦略は、関与する機構に依存した安定化に利用可能である。例えば、凝集機構がチオージスルフィド相互変換を介した分子間S-S結合形成に関与する場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用、特定のポリマーマトリクス組成物の開発などによって達成される。

【0397】

（H3. リポソームおよびナノカプセル）

特定の実施形態において、リポソームおよび／またはナノカプセルもまた、治療剤とともに使用され得る。リポソームの処方および使用は、以下に要約されるように、当業者に、一般に公知である。本発明は、抗体、リポソームおよび化学療法剤の特定の組合せ（以下に記載される）を提供する。さらに、リポソーム処方物は、本発明の治療剤のいずれかの慣用的な成分として使用され得る。
30

【0398】

リポソームは、水性媒体中に分散されるリン脂質から形成され、そして自発的に多層の同心の二重層ビヒクル（多層ビヒクル（MLV）とも称する）を形成する。MLVは、一般に、25nm～4μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、中心に水溶液を含有する、直径200～500Åの範囲の小さな単層のビヒクル（SUV）を生じる。

【0399】

リン脂質は、水中に分散される場合、水に対する脂質のモル比に依存して、リポソーム以外の多様な構造を形成し得る。低い比において、リポソームは、好ましい構造である。
40
リポソームの物理学的特徴は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。リポソームは、イオンおよび極性物質に対する低い浸透性を示し得るが、高温において、その浸透性を顕著に変化させる相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として公知の密接に充填された、規則正しい構造から、流体状態として公知の疎に充填された、より規則正しくない構造への変化を含む。これは、特徴的な相転移温度において生じ、そしてイオン、糖および薬物の浸透性を増加する。

【0400】

リポソームは、4つの異なる機構を通じて、細胞と相互作用する：マクロファージおよび好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水的な力、もしくは静電的な力のいずれかによるか、または細胞表面成分との特異的な相互作用
50

用による細胞表面への吸着；リポソーム含有物の細胞質への同時放出をともなう、リポソームの脂質二重層の形質膜への挿入による形質細胞膜との融合；および、リポソームの内容物の会合をいずれもともなわない、リポソーム脂質の、細胞膜または細胞内（オルガネラ）膜への移入、あるいはその逆。1つより多い機構が同時に作動し得るが、リポソームの処方を変化させることは、作動する機構を変更し得る。

【0401】

ナノカプセルは、一般に、安定にかつ再現性のある方法において、化合物を捕獲し得る。細胞内へのポリマー性の過剰負荷に起因する副作用を避けるために、そのような超微粒子（約0.1 μmのサイズ）が、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子は、本発明における使用において意図され、そしてそのような粒子は、容易に作製され得る。

10

【0402】

（H4．眼性処方物）

眼の多くの疾患（特に、脈管形成成分を有するもの）は、本発明によって処置され得る。例えば、眼の脈管新生疾患、年齢関連黄斑変性症、糖尿病性網膜症、未成熟の網膜症、角膜移植拒絶、脈管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ならびに角膜脈管新生または網膜／脈絡膜脈管新生と関連する他の疾患（本明細書中で以下に記載される）。

【0403】

従って、本発明の治療剤は、眼性溶液として使用するために適切な薬学的組成物の調製において有利に使用され得、この薬学的組成物は、硝子体内および／または房内（intracameral）投与のための組成物を含む。前述の障害または他の障害の処置のために、治療剤は、従来の薬学的慣行（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第1の5編、1488～1501頁（Mack Publishing Co., Easton, PA）を参照のこと）に従って調製された眼性調製物の形態で処置の必要な非験体の眼に投与される。

20

【0404】

眼性調製物は、薬学的に受容可能な溶液、懸濁液または軟膏中に約0.01～1重量％、好ましくは約0.05～約0.5重量％の濃度で治療剤を含む。濃度のいくらかの変更は、使用する特定の化合物、処置される被験体の状態などに依存して必要に生じ、そして処置の担当者は、個々の被験体について最も適切な濃度を決定する。眼性調製物は、好ましくは、滅菌水溶液の形態であり、所望の場合、さらなる成分、例えば、防腐剤、緩衝液、弾力剤、酸化防止剤および安定剤、非イオン性湿潤剤または浄水剤、粘性増加剤などを含む。

30

【0405】

このような溶液において使用するための適切な防腐剤としては、塩化ベンズアルコニウム、塩化ベンズエトニウム、クロロブタノール、チメロサルなどが挙げられる。適切な緩衝液としては、約pH6とpH8との間、好ましくは、約pH7とpH7.5との間のpHを維持するために十分な量の、ホウ酸、炭酸水素ナトリウムおよびカリウム、ホウ酸ナトリウムおよびカリウム、炭酸ナトリウムおよびカリウム、酢酸ナトリウム、ピリン酸（biphosphate）ナトリウムなどが挙げられる。適切な弾力剤は、デキストラン40、デキストラン70、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコール、塩化ナトリウム、などであり、眼性溶液の塩化ナトリウム当量は、0.9±0.2％の範囲である。

40

【0406】

適切な酸化防止剤および安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸水素ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム、チオ尿素などが挙げられる。適切な湿潤剤および浄水剤としては、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー282およびチロキサポールが挙げられる。適切な粘性増加剤としては、デキストラン40、デキストラン70、ゼラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセル

50

ローズ、ラノリン、メチルセルロース、ペトロラタム、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。眼性調製物は、例えばドロップの形態で従来の方法によってか、または眼性溶液中に眼を浸すことによって処置の必要な被験体の眼に局所的に投与される。

【0407】

(H5. 局所処方物)

広範な意味で、局所投与のための処方物は、口（頬側）を介してかつ皮膚を通して送達するための処方物を含む。「局所送達システム」はまた、投与される成分を含む経皮的パッチを含む。皮膚を通す送達は、所望の場合、イオン注入または電氣的運搬によってさらに達成され得る。

【0408】

口において局所投与するための適切な処方物は、風味のある基礎原料の成分、通常は、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントを含むロゼンジ；不活性基礎原料（例えば、ゼラチンおよびグリセリン）の活性成分またはショ糖およびアカシアを含む香錠；ならびに適切な液体キャリアで投与される成分を含むうがい薬が挙げられる。

【0409】

皮膚に局所投与するための適切な処方物としては、軟膏、クリーム、ゲルおよび泥膏（薬学的に受容可能なキャリアで投与される成分を含む）が挙げられる。局所使用（例えば、クリーム、軟膏およびゲルで）のための治療剤としては、当該分野で周知のような、脂肪性基剤または水溶性軟膏剤の調製物が挙げられる。例えば、これらの組成物は、野菜オイル、動物性脂肪、が挙げられ、そしてより好ましくは、石油から得た半個体炭化水素が挙げられ得る。使用される特定の成分は、白色軟膏、黄色軟膏、セチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブオイル、パラフィン、ペトロラタム、白色ペトロラタム、鯨蝟、グリセリンデンブレン、白色ワックス、黄色ワックス、ラノリン、無水ラノリンおよびモノステアリン酸グリセリルが挙げられ得る。種々の水溶性軟膏剤が、使用され得、グリコールエーテルおよび誘導体、ポリエチレングリコール、ポリオキシシル40ステアレート、ならびにポリソルベートが挙げられる。

【0410】

直腸投与のための処方物は、適切な塩基（例えば、ココアバターまたはサリチレートを含む）とともに坐剤として与えられ得る。室投与のための適切な処方物は、さらなる活性成分（例えば、当該分野で適切であると知られるキャリア）を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、泥膏、包状物、またはスプレー処方物として与えられ得る。

【0411】

(H6. 鼻性処方物)

鼻経路および呼吸器経路を介する局所送達は、種々の状態を処置するため（特に、本発明の抗ウイルス処置方法における使用のため）に意図される。これらの送達経路はまた、薬剤を全身性循環に送達するために適切である。従って、鼻性投与のための適切なキャリアにおける活性成分の処方物は、本発明内に含まれ、例えば、鼻性溶液、スプレー、エアロゾルおよび吸入抗原が挙げられる。キャリアが個体である場合、処方物は、例えば、20～500ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗散剤が挙げられ、例えば、鼻に近接して維持される散剤のコンテナから鼻経路を通る急速な吸入によって投与される。

【0412】

キャリアが液体である適切な処方物は、鼻投与において有用である。鼻溶液は、通常は、ドロップまたはスプレーで鼻経路に投与されるように設計される水溶液であり、そしてそれらが、多くの局面において鼻分泌と類似であり、通常の線毛作用が維持されるように調製される。従って、鼻水溶液は、通常、等張性であり、そして5.5～6.5のpHを維持するようにわずかに緩衝化される。さらに、必要な場合、眼性調製物において使用される防腐剤と類似の抗菌防腐剤および適切な薬物安定剤は、処方物中に含まれ得る。種々の市販の鼻性調製物は、公知であり、そして例えば、抗生物質および抗ヒスタミン剤が挙げられ、ぜん息予防に使用される。

【0413】

吸入薬および吸入剤は、薬物または化合物の患者の呼吸樹への送達のために設計される薬学的調製物である。蒸気または霧が、投与され、そして有効領域に到達する。この経路はまた、薬剤を全身性循環に送達するために使用され得る。吸入薬は、鼻または口呼吸性経路によって投与され得る。吸入薬溶液の投与は、この液滴が十分に良質でかつサイズが均一であり、その結果、この霧が、細気管支に到達する場合にのみ、有効である。

【0414】

製品の別のグループ（吸入薬としても公知であり、そして時には、吸入剤といわれる）は、特異的送達システムの使用によって呼吸経路に運ばれる良質の散剤薬物または液体薬物（例えば、薬学的エアロゾル）を含み、液体ガス噴霧剤中に薬物の溶液または懸濁液を維持する。適切なバルブおよび口アダプターを通して放出される場合、吸入薬の測定用量は、患者の呼吸路に進められる。粒子サイズは、この型の調製物の投与において主に重要である。肺腔への穿通のための最適粒子サイズは、0.5～7 μmのオーダーであると、報告されてきた。良質の霧は、加圧エアロゾルによって産生され、それによって、それらの使用の利点が、考慮される。

【0415】

（I. 結合、機能およびスクリーニングアッセイ）

本発明が動物およびヒトの処置レジメンにおいて有意な有用性を有するものの、多くの他の特異的および信頼できる使用（多くのインビトロ実施形態における特定の使用を含む）も有する。これらの使用の特定のものは、抗体、ペプチドおよび免疫結合体の特異的結合特性に関連する。本発明の構築物の各々が、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質に結合する少なくとも1つの抗体またはペプチド成分を含む点で、これらは、種々の結合実施形態（有用な結合アッセイを含む）において使用され得る。

【0416】

Fc領域または結合される薬剤の存在（関連する場合）は、有利な特性を提供するが、任意の結合アッセイにおける第1の抗体の有用性を否定しない。従って、適切な有用な結合アッセイは、本明細書中にさらに記載されるように、当該分野で一般的に使用されるもの（イムノブロット、ウェスタンブロット、ドットブロット、RIA、ELISA、免疫組織化学、蛍光活性化細胞選別（FACS）、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーなどを含む）。

【0417】

特定の標準的な結合アッセイは、イムノブロット、ウェスタンブロット、ELISAおよび関連アッセイのような、固体支持体マトリクス（例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたはそれらの組合せ）上に固定される。他の重要なアッセイは、細胞を使用し、本発明の成分が、細胞表面において、PSまたは陰イオン性リン脂質を用いて細胞についてのアッセイに使用され得る。このようなアッセイは、前臨床試験（例えば、薬物の設計、作用の機構の試験および／または組み合わせた使用のための治療剤の選択に関する）において適用され得る。

【0418】

さらなるインビトロアッセイは、異常な細胞活性化および／またはアポトーシスに関連した疾患の診断に有用であり、細胞表面でのPSまたは陰イオン性リン脂質の存在の試験は、特に有用である。本発明の構築物は、このように、免疫組織化学において、新鮮凍結およびホルマリン固定の両方、パラフィン包埋組織ブロック；蛍光活性化細胞選別、フローサイトメトリーまたはフローマイクロフルオロメトリーと組み合わせて使用され得る。

【0419】

これらの本発明の構築物は、免疫沈降、抗原精製実施形態（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）、および本明細書中に提示される情報を与えられる当業者に公知の多くの他の結合アッセイにおいてさらなる実際的な使用を有する。

【0420】

本発明の構築物のなおさらなる実際的な使用は、機能的アッセイ（多くのインビトロお

10

20

30

40

50

よびエキソビボのアッセイおよびシステムを含む)におけるコントロールとしてである。本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディの結合特性および機能的特性が本明細書中に開示されるように特に特異的であるので、このような「コントロール」の使用は、実際に非常に価値がある。本発明のこのような実際の適用からの利点があるアッセイとしては、例えば、細胞表面でのPSまたは陰イオン性リン脂質の検出に関するアッセイが挙げられる。

【0421】

これらのアッセイシステムはまた、インビトロまたはエキソビボでの薬物スクリーニングアッセイへと開発され得、ここで、十分に規定された特性を有する生物学的材料の現在の提供 (provision) が特に重要である。例えば、類似した、等価な、または改善された結合特性を有する低分子の選択におけるポジティブコントロールとして本発明の構築物を使用すること (例えば、薬物スクリーニングおよび開発において)。

10

【0422】

本発明の結合アッセイおよびシステムはまた、インビトロまたはエキソビボでの薬物スクリーニングアッセイへと開発され得、ここで、十分に規定された特性を有する生物学的材料の現在の提供 (provision) が特に重要である。例えば、類似した、等価な、または改善された結合特性を有する低分子の選択におけるポジティブコントロールとして本発明の構築物を使用すること (例えば、薬物スクリーニングおよび開発において)。

【0423】

(J. 診断および治療キット)

20

本発明はまた、処置方法、組合せ処置方法ならびに／または画像化および処置実施形態において使用するための、本発明の少なくとも1つの第1の構築物、レセプターボディまたはベータボディを含む診断キットおよび治療キットを提供する。このようなキットは、一般的に、少なくとも第1の適切な容器 (または容器手段)、少なくとも1つの治療剤、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体、免疫結合体またはペプチド結合体の薬学的に受容可能な処方物を含む。キットは、例えば、前臨床的、臨床的および／または獣医学的実施形態での使用のための記載された指示書または電子指示書を備え得る。

【0424】

キットはまた、他の組成物、薬学的に受容可能な処方物および第2の生物学的および治療的薬剤 (併用療法ならびに／または診断および画像化のためを含む) を含む得る。例えば、このようなキットは、任意の1つ以上のある範囲の化学治療剤、放射線療法剤または抗脈管形成剤、抗腫瘍細胞、抗腫瘍脈管構造または抗腫瘍間質抗体、免疫毒素またはコアグリガンド、抗ウイルス剤および／または診断成分または診断薬剤を含む得る。併用療法において使用するためならびに／または診断および画像化のための記載された指示書または電子指示書もまた含まれ得る。

30

【0425】

キットは、任意のさらなる成分を伴うかまたは伴わないで、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディを含む単一容器を有し得るか、あるいは、これらは、各所望の薬剤のための異なる容器を有し得る。併用療法が提供される場合、単一の容器が、等しいモルの組合せで、または他方が過剰な一方の成分を有してのいずれかで予め混合され得る。あるいは、本発明の一次的な薬剤および第2の生物学的および治療的薬剤 (例えば、第2の抗癌剤または抗ウイルス剤)、キットが、患者への投与の前に、キットの異なる容器内で別々に維持され得る。

40

【0426】

診断成分は、ほとんど大部分、少なくとも第2の容器 (1つ以上の治療剤を含む他の容器または第1の容器とは異なる) で維持される。診断キットは、PSに結合する標識された抗体またはペプチド、あるいは処置される疾患を診断するために適切な任意の他の薬剤を含む得る。キットは、インビトロでの使用、インビボでの使用のため診断剤、またはこのような薬剤の両方を含む得る。キットは、例えば、前臨床的、臨床的および／または獣

50

医学的实施形態での使用のための記載された指示書または電子指示書を備え得る。

【0427】

インビトロでの免疫検出のために、構築物、レセプターボディまたはベータボディは、固体支持体（例えば、マイクロタイタプレート（の壁））に結合し得るが、再構成のために抗体溶液または粉末が、好ましい。免疫検出キットは、好ましくは、少なくとも第1の免疫検出試薬を含む。キットの免疫検出試薬は、種々の形態のいずれか1つ（例えば、インビボで使用される、抗体に結合するかまたは連結した検出可能な標識を含む）を取り得る。第2の結合リガンドに結合するかまたは連結した検出可能な標識もまた、企図される。例示的な二次リガンドは、第1の抗体に対する結合親和性を有する第2の抗体である。

【0428】

本発明のキットでの使用のためのさらに適切な免疫検出試薬は、第2の抗体に対する結合親和性を有する第3の抗体とともに、第1の抗体に対する結合親和性を有する第2の抗体を含む二成分試薬を含み、第3の抗体は、検出可能な標識に連結されている。多くの例示的な標識が当該分野において公知であり、全てのこのような標識が、本発明とともに使用され得る。これらのキットは、完全に結合体化された形態で、中間の形態で、またはキットの使用者によって結合体化されるように別々の部分として、のいずれかで抗体標識結合体を含み得る。画像化キットは、好ましくは、インビボ検出可能な標識に既に結合された標的薬剤または抗体を含む。しかし、標識および結合手段は、別々に供給され得る。

【0429】

診断キットのいずれの形態も、さらに、コントロール薬剤（例えば、適切なアリコート）の生物学的組成物（標識されているかまたは標識されていない）を含み得、これは、検出アッセイのための検量線を調製するために使用され得る。

【0430】

このキットの成分が、1つ以上の液体中で提供される場合、液体は、好ましくは、水溶液であり、特に滅菌水溶液が好ましい。しかし、このキットの成分は、乾燥粉末において提供され得る。試薬または成分が乾燥粉末として提供される場合、この粉末は、適切な溶媒の添加によって再構成され得る。この溶媒もまたキット内の別の容器中で提供され得る。

【0431】

治療用キットおよび診断用キットの容器は、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段を含み、これらの中で治療剤および任意の他の所望の薬剤が、好ましくは適切なアリコートで、配置され得る。少なくとも2つの別々の成分が好ましいので、キットは、好ましくは、少なくとも2つのこのような容器を含む。このキットは、滅菌の、薬学的に受容可能な緩衝液または他の希釈剤を含むための第3／第4の容器もまた、含み得る。

【0432】

このキットはまた、治療剤を動物または患者に投与するための手段（例えば、1つ以上の針またはシリンジ、あるいは点眼剤、ピペット、または他のそのような装置）を含み、その手段によって、この処方物が、動物に注入され得るか、または身体の疾患領域に適用され得る。本発明のキットはまた、代表的に、バイアルなど、および他の成分を、市販のために密接な拘束において含む手段（例えば、射出成形またはブロー成形したプラスチック容器）を含み、これらの手段の中で、所望のバイアルおよび他の装置が配置され、そして保持される。

【0433】

（K. 免疫検出および画像化）

本発明はさらに、インビトロおよびインビボでの診断法および画像化法を提供する。このような方法は、診断情報、予後情報および／または画像情報（例えば、脈管形成疾患およびウイルス感染、好ましくは、腫瘍処置および画像化方法に関連する）を生成する際の使用に適用可能である。本発明の方法は、インビトロでの診断試験（例えば、サンプルが非侵襲的に得られ、好ましくは、高スループットアッセイにて試験され得るか、そして／

10

20

30

40

50

または曖昧および確認における臨床診断が望まれる)を含む。インビボ診断および画像化の分野において、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、1つ以上の検出可能な薬剤に連結され、そして必要に応じて、処置の前に第1の工程として、脈管形成部位または腫瘍の画像を形成するために使用される。

【0434】

(K1. 免疫検出法およびキット)

従って、本発明は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を結合、精製、除去、定量またはさもなければ一般には検出するため(例えば、活性化細胞およびアポトーシス細胞および関連する疾患の診断において使用するため)の、免疫検出法に関する。本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディが、インビボ(下記)にて、単離された組織サンプル、生検またはスワブにおいて、そして/またはホモジナイズされた組織サンプルにおいて、PSおよび陰イオン性リン脂質を検出するために使用され得る。このような免疫検出法は、明らかな診断的有用性を有するが、また、非臨床サンプルに(例えば、抗原サンプルの力価測定などにおいて)も適用を有する。

10

【0435】

種々の有用な免疫検出法の工程は、科学文献(例えば、Nakamuraら、(1987、本明細書中に具体的に参考として援用される))に記載されている。一般には、免疫結合法は、PSおよび陰イオン性リン脂質を含むと疑われるサンプル(好ましくは、細胞表面にPSを有することが疑われる細胞)を得る工程、およびそのサンプルを本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディと、免疫複合体の形成を可能にするに有効な条件下で接触させる工程を包含する。次いで、結合プロセスの間に形成される任意の免疫複合体が検出され、好ましくは、定量される。

20

【0436】

分析されるサンプルは、細胞サンプル(例えば、実験室において特定の試験条件下に曝露された細胞)であり得る。サンプルはまた、動物または患者(1つ以上の細胞型の活性化またはアポトーシスと関連する疾患を有することが疑われるもの)由来の生物学的サンプルであり得る。このようなサンプルは、組織切片または試料、生検、スワブ、またはスメア試験サンプル、ホモジナイズされた組織抽出物または分離もしくは精製されたこれらの形態であり得る。

【0437】

免疫複合体(一次免疫複合体)の形成を可能にするに有効な条件下でかつそれを可能にするに十分な時間の間、選択した生物学的サンプルをその抗体と接触させることは、一般には、そのサンプルに構築物、レセプターボディまたはベータボディを単に添加し、そして構築物、レセプターボディまたはベータボディが存在する任意のPSおよび陰イオン性リン脂質と免疫複合体を形成する(すなわち、結合する)に十分に長い時間その混合物をインキュベートすることである。この時点の後、そのサンプル-抗体組成物(例えば、組織切片、またはELISAプレート)が、一般には洗浄されて、非特異的結合したすべての抗体種が除去されて、一次免疫複合体中の特異的に結合した抗体のみ検出することが可能になる。

30

【0438】

免疫複合体の検出は、当該分野で周知であり、そして多数のアプローチの適用を介して達成され得る。これらの方法は、一般的には、標識またはマーカー(例えば、当該分野で公知の任意の放射性、蛍光性、生物学的または酵素的な、タグもしくは標識)の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、第3,817,837号;同第3,850,752号;同第3,939,350号;3,996,345号;同第4,277,437号;同第4,275,149号および同第4,366,241号(各々が、本明細書中で参考として援用される)が挙げられる。色素形成基質との接触に際して有色生成物を生成する酵素の使用が、一般的に好ましい。二次結合リガンド(例えば、第2の抗体またはビオチン/アビジンリガンド結合配置)もまた、当該分野で公知であるように、使用され得る。

40

50

【0439】

検出において使用される構築物、レセプターボディまたはベータボディ自体は、検出可能な標識に連結され得、次いでこの標識が簡単に検出され、それにより組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能になる。

【0440】

好ましくは、この一次免疫複合体は、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディについて結合親和性を有する第2の結合リガンドによって検出される。この場合において、その第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。この第2の結合リガンド自体は、しばしば抗体であり、従って、「二次」抗体と呼ばれ得る。この一次免疫複合体は、この標識された二次結合リガンドまたは抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間の間、接触される。次いで、この二次免疫複合体は、一般的には、非特異的に結合したすべての標識二次抗体またはリガンドを除去するために洗浄され、次いでその二次免疫複合体中の残りの標識が検出される。

10

【0441】

さらなる方法は、2工程アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。第1の抗体に結合親和性を有する第2の結合リガンド（例えば、抗体）が、上記のように二次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄の後、その二次免疫複合体は、その第2の抗体に結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体と、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間、接触させられる。この第3のリガンドまたは抗体は、そのようにして形成された三次免疫複合体の検出を可能にする、検出可能な標識に連結される。この系は、所望ならば、シグナル増幅を提供し得る。

20

【0442】

臨床的診断またはモニタリングは、種々の疾患（特に、細胞表面での増加したPSまたは陰イオン性リン脂質の曝露と関連するもの）を有する患者に適用され得る。アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の検出、あるいは正常な被験体由来の対応する生物学的サンプルのレベルと比較した、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質のレベルの上昇は、このような疾患を有する患者を示す。

【0443】

しかし、当業者に公知であるように、このような臨床診断は、この方法に基礎に基づいて孤立しては行われまいだろう。当業者は、バイオマーカーの有意な発現（ポジティブな同定を示す）とバイオマーカーの低レベル発現またはバックグラウンド発現との間を識別することに非常に精通している。実際、バックグラウンド発現レベルは、しばしば、「カットオフ」を形成するために使用され、このカットオフを超える染色の増加が、有意またはポジティブと記録される。

30

【0444】

（K2. インビボ画像化）

本発明は、種々のインビボ診断および画像化の実施形態を提供する。本発明の特定の局面は、インビボ診断および画像化について、新規な驚くべき有効な組成物に関する。例えば、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディが、インビトロで検出可能な薬剤に連結されて、本発明の免疫診断結合体を形成する。抗体がこの分野において重要な発展を示しているものの、得られる免疫診断は、現在、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の検出と連結されて、任意の以前に記載された診断実施形態または画像化実施形態において使用され得る。

40

【0445】

これに関して、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディを含む免疫診断は、脈管血栓症（特に、心臓または心臓近く（例えば、深静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、心房性細動、補綴心臓血管材料に伴う問題、発作など））を画像化する際に使用され得る。本発明のこのような組成物はまた、例えば、膿瘍、再狭窄、関節の炎症および止血

50

性障害（例えば、動脈、冠状、静脈および大脳の塞栓など）のような状態において、活性化血小板を画像化する際に使用され得る。本発明の免疫診断組成物がまた、アポトーシス細胞を検出する際に使用され得、これは、増加したまたは不適切なアポトーシスが生じる種々の疾患の診断および画像化において使用され得る。

【0446】

本発明のインビボ画像化組成物および方法は、画像化それ自体で、または処置の前に信頼のある画像を形成するために身体の部位を予め画像化する際に使用され得る。好ましくは、画像化は、腫瘍の画像化である。これらの組成物および方法はまた、P Sおよび陰イオン性リン脂質と関連する他の疾患または状態（例えば、細胞活性化および／またはアポトーシスを含むもの（脈管形成疾患、アテローム性硬化症、ウイルス感染、および診断目的もしくは予後目的または処置を設計するために内部画像が望ましい他のこのような状態を含む））の画像化および診断に適用され得る。

10

【0447】

これらの実施形態において、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディが、検出可能な標識に作動可能に結合、連結または結合体化される。「検出可能な標識」は、それらの特異的な機能特性、または化学的特徴に起因して検出され得る化合物あるいはエレメントであり、その使用により、それらが結合する成分が検出可能になり、そして所望であれば、さらに定量可能になる。インビボでの診断プロトコルまたは「画像化方法」のための抗体およびペプチド結合体において、非侵襲的方法を用いて検出され得る標識が必要である。

20

【0448】

結合リガンドにそれらを結合させる方法のような多くの適切な画像化剤が、当該分野において公知である（例えば、米国特許第5, 021, 236号および同第4, 472, 509号を参照のこと。両方とも本明細書中に参考として援用される）。特定の結合方法は、例えば、抗体に結合されたDTPAのような有機キレート剤を使用する金属キレート複合体の使用を含む（米国特許第4, 472, 509号）。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のような結合剤の存在下で酵素と反応され得る。フルオレセインマーカートとの結合体は、これらの結合剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応により、調製される。

【0449】

検出可能な標識の例は、常磁性イオンである。この場合、適切なイオンとしては、以下が挙げられる：クロム（III）、マンガン（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（III）、サマリウム（II）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）、およびエルビウム（III）（ガドリニウムが特に好ましい）。

30

【0450】

他の状況（例えば、X線画像化）において有用なイオンは、以下を含むがそれらに限定されない：ランタン（III）、金（III）、鉛（II）および特にビスマス（III）。蛍光標識には、ローダミン、フルオレセイン、およびレノグラフィンが挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインは、しばしば、イソチオシアネート中間体を介して結合される。

40

【0451】

診断的適用のための放射性同位体の場合、適切な例としては、以下が挙げられる：¹⁴C炭素、⁵¹Crクロム、³⁶S塩素、⁵⁷Coコバルト、⁵⁸Coコバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³H水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁹Fe鉄、³²Pリン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵Seセレンウム、³⁵S硫黄、テクネチウム^{99m}、およびイットリウム⁹⁰。¹²⁵Iは、しばしば、特定の実施形態において使用するために好ましく、そしてテクネチウム^{99m}およびインジウム¹¹¹はまた、しばしば、それらが低エネルギーでありかつ広範囲での検出に適しているために好ましい

50

。

【0452】

本発明における使用のための放射性標識された構築物、レセプターボディまたはベータボディが、当該分野で周知の方法により生成され得る。例えば、放射性同位体金属イオンを抗体に結合するために、しばしば使用される中間体官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）およびエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）である。

【0453】

構築物、レセプターボディまたはベータボディはまた、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼのような酵素酸化剤と接触することによりヨウ素化され得る。本発明による構築物、レセプターボディまたはベータボディは、リガンド交換プロセスにより、例えば、二価のスズの溶液で過テクネチウム酸（pertechnetate）を還元し、Sephadexカラム上でその還元されたテクネチウムをキレート化し、そしてこのカラムに抗体を適用することにより、テクネチウム^{99m}で標識され得る；かまたは直接的標識技術により、例えば、過テクネチウム酸、 SnCl_2 のような還元剤、ナトリウム-カリウムフタレート溶液のような緩衝溶液、およびその抗体をインキュベートすることにより、標識され得る。

【0454】

上記の型の検出可能に標識された結合リガンドのいずれかが、画像化単独または処置の前に疾患部位または腫瘍の画像を形成するためのいずれかで、本発明の画像化の局面において使用され得る。いずれに方法においても、この方法は、一般的に、動物または患者に、非侵襲的な方法によって検出可能なマーカーに結合された抗体または結合リガンドの診断的有効量を投与する工程を包含する。抗体または結合リガンド-マーカー結合体は、疾患部位（例えば、腫瘍または腫瘍脈管構造）においてアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の曝露を発現する細胞に局在化および結合するのに十分な時間を可能にする。次いで、患者は、検出可能なマーカーを同定するために、検出デバイスに曝露され、このようにして、疾患部位または腫瘍の画像を形成する。

【0455】

核磁気スピン-共鳴同位体（例えば、ガドリニウム）は、核磁気画像化装置を使用して検出され；そして放射性物質（例えば、テクネチウム^{99m}またはインジウム¹¹¹）は、ガンマシンチレーションカメラまたは検出器を使用して検出される。米国特許第5,627,036号はまた、検出可能に標識された構築物の個々の血液内への安全かつ効果的な導入に関するさらなるガイダンス、および例えば、ガンマシンチレーションカメラを使用するかまたは磁気共鳴測定によって体外的に検出可能な標識薬剤の分布を決定するための方法を提供する目的で、本明細書中において具体的に参考として援用される。

【0456】

画像化実施形態のための投薬量は、一般的に、治療用よりも少ないが、患者の年齢および体重に依存する。患者1人当たり、0.1mg、0.5mgまたは約1mgと約9mgまたは10mgとの間、より好ましくは、約1mgと約5~10mgの間の抗体または結合体リガンド-結合体の1回の用量が有用であると企図される。

【0457】

（K3. 癌治療のための代理マーカー）

インビボ診断および画像化に関して、本発明は、さらに、癌治療のための代理マーカーとして使用するための組成物および方法を提供する。このような実施形態は、インビボ検出可能な薬剤に連結された、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディの使用に関する。

【0458】

現在の使用において多くの抗癌治療は、アポトーシスおよび壊死を誘導する。アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質（特に、PS）は、アポトーシス前およびアポトーシス細胞のマーカーである。従って、適切な構築物、レセプターボディまたはベータボディで

の画像化は、アポトーシス前細胞およびアポトーシス細胞を同定するために使用され得、従って、治療の進行に関する情報を提供し得る。これは、本明細書中において使用されるように、「癌治療のための代理マーカー」によって意味されることである。

【0459】

本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディの使用は、癌治療のための代理マーカーとしての特定の利点を提供する。例えば、アポトーシス前細胞を同定する能力は、特に有利である。特異性はまた、医師により意味のある画像化を提供する。また、安全性プロフィールは、印象的であり、例えば、アネキシンが凝固と関連する欠点を受けるので、アネキシン対して利点を提供する。

【0460】

従って、上記の任意のインビボ診断および画像化方法が、単純に、癌治療を受ける患者における使用によって、癌の治療のための代理マーカーとして診断的使用のために適合され得る。

【0461】

(L. 腫瘍処置)

本発明の重要な局面は、悪性疾患、腫瘍および脈管新生化腫瘍の処置に関する。これは、脈管新生が多かれ少なかれ重要である腫瘍、およびプロトロンビン血管を有する腫瘍を含む。良性腫瘍の処置が本発明に含まれ、例えば、聴覚神経腫、神経線維腫、トラコーマ、化膿性肉芽腫およびBPHが挙げられる。血液の腫瘍（例えば、白血病）および骨髄の種々の急性または慢性の新生物形成疾患の処置もまた包含される。

【0462】

本発明は、任意の悪性腫瘍（脈管成分を有するかまたは有さないか関わらず）の処置に幅広く適用可能である。処置される腫瘍としては、固形腫瘍、特に癌腫（酸素および栄養の提供のための脈管成分を必要とする）が挙げられる。本発明を使用して処置され得る例示的な固形腫瘍としては、限定しないが、以下が挙げられる：肺、乳房、卵巣、胃、脾臓、咽頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、結腸、直腸、頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、前立腺、甲状腺、扁平細胞の癌、腺癌、小細胞癌、メラノーマ、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫。

【0463】

本発明は、固形腫瘍を呈する任意の患者の処置における使用を企図される。一般的に、本発明は、全てのサイズの腫瘍（約0.3~0.5cm以上を含むもの、0.5cmより大きいサイズの腫瘍、および約1.0と約2.0との間のサイズの腫瘍を呈する患者）を処置するために使用され得るが、ヒトにおいて見出される最も大きな腫瘍までを含む腫瘍がまた処置され得る。

【0464】

本発明が、一般的に、予防的（preventive）または予防的（prophylactic）処置として意図されないが、本発明の使用は、中程度または大きなサイズみの腫瘍を有する患者の処置に特に制限されない。本発明のこれらの局面の元にある多くの理由が存在する。例えば、中程度以上の原発性腫瘍を呈する患者はまた、転移腫瘍の種の初期段階で小さなサイズであることが考えられる種々の他の転移性腫瘍を有し得る。本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、一般的に、患者の全身循環内に投与されることを考慮すると、これらは、自然に、二次のより小さな転移性腫瘍に対する効果を有するものの、これは、処置の最初の意図ではないかもしれない。さらに、全体としての腫瘍質量が単一の小さな腫瘍である状況においてさえ、特定の有利な抗腫瘍効果が、本書値の使用から生じる。

【0465】

本発明と関係する使用についてより適切な患者に関して本明細書中に提供されるガイドンスは、特定の患者のプロフィールが、本発明による処置についての患者の選択を補助し得るという教示として意図される。特定の患者の予備選択、または患者のカテゴリーは、癌を有する全ての患者の処置に関係する本発明の有用性を、いかなる方法でも否定しない

。さらなる考慮は、本発明の抗体治療によって提供される腫瘍に対する攻撃が、腫瘍をさらなる治療処置を受けやすくさせ、その結果、引き続く処置は全体的な相乗効果を生じるか、完全な寛解または治癒を導きさえする。

【0466】

任意の特定の型の腫瘍が本発明を使用する処置から除外されることは考えられない。しかし、腫瘍細胞の型は、他の治療剤、特に化学療法剤および抗腫瘍細胞イムノトキシンを組合せた本発明の使用に関連し得る。本発明が、腫瘍脈管構造の標的化および破壊をその作用の様式内で含み、その脈管系は実質的または全体的に全ての固形腫瘍で同じであるために、本発明の方法論は、腫瘍細胞自体の特定の表現型または遺伝子型に無関係に、全ての固形腫瘍の処置に広範に、または全体的に適用可能であることが理解される。本明細書中に提示されるデータは、幅広い範囲の異なる腫瘍モデルにおいて印象的な結果を示すように思われる。

10

【0467】

治療的有效用量は、例えば、本明細書中に詳述される研究に示されるように、動物モデルからのデータを使用して、そしてある範囲の治療剤を使用する臨床的なデータから、容易に決定可能である。固形腫瘍を保持する実験動物は、臨床環境に移行する前に適切な治療用量を最適化するために、しばしば使用される。このようなモデルは、効果的な抗癌ストラテジーを予測する際に非常に信頼性があることが公知である。例えば、固形腫瘍を保持するマウス（例えば、本実施例で使用される）は、前臨床試験において広範に使用される。本発明者らは、このような分野で受容されるマウスモデルを使用して、最小の毒性で有益な抗腫瘍効果を与える治療剤の作用範囲を決定した。

20

【0468】

本発明に関連して付随する安全性の利益を考慮して腫瘍治療の点で、他の脈管治療を使用する成功に関する化学文献および特許文献を参照し得る。例として、米国特許第5,855,866号；同第5,877,289号；同第5,965,132号；同第6,051,230号；同第6,004,555号；同第5,776,427号；同第6,004,554号；および同第6,036,955号；ならびに同第6,093,399号の各々が挙げられ、これらは、本発明に適用され得る、このような薬剤の使用をさらに記載する目的で、本明細書中に参考として援用される。米国特許第6,312,694号、同第6,783,760号、同第6,818,213号および同第6,406,693号は、PSおよびPEならびに関連する免疫結合体に対する非結合体化抗体を使用する投薬および処置についてのガイダンスについて、本明細書中に参考としてさらに具体的に援用される。

30

【0469】

当該分野で公知のように、臨床処置に進める前に、前臨床試験と関係するガイドラインとして使用され得る、現実的目的が存在する。しかし、受容されるモデルにおいてすでに実証された安全性に起因して、本発明の前臨床試験は、有効性を確認するというよりも、最適化である。従って、前臨床試験は、最も有利な薬剤、用量または組み合わせを選択するために利用され得る。

【0470】

40

任意の一定して検出可能な抗腫瘍効果（検出可能な腫瘍脈管構造後退、血栓および／または破壊、ならびに腫瘍壊死を含む）を生じる任意の用量、組合せ方法または医薬が有用な発明をなお規定する。退行、血栓、破壊および壊死効果は、好ましくは、約10%と約40~50%との間の腫瘍血管および腫瘍組織において観察され、約50%と約99%との間までのこのような効果が観察される。本発明はまた、腫瘍の下流の脈管に効果的であり得る（すなわち、特に腫瘍から放出されるサイトカインがこれらの脈管に作用し、それらの抗原性プロフィールを変化させるので、少なくとも排出脈管のサブセットを標的化する）。

【0471】

治療の抗腫瘍効果が、この範囲の下端に向かうような状況下でさえ、この治療が、特定

50

の腫瘍の状況における他の全ての公知の治療となお等価であるか、またはより効果的でさえあることがあり得ることもまた理解される。特定の腫瘍が中期間または長期間効果的に処置され得ないことは臨床医に不幸にも明らかであるが、特に一般的に提案されている他のストラテジーと少なくともほぼ同様に効果的である場合、それは、本発明の治療の有用性を否定しない。

【0472】

血管新生化腫瘍の処置のための、構築物、レセプターボディまたはベータボディの適切な用量を設計する際に、臨床投与のための適切な用量に到達するために、本明細書中に記載される動物研究および文献における技術的常識から容易に推定し得る。このコンバージョンを達成するために、当業者は、実験動物の単位質量あたり投与される薬剤の質量を計算し、そして好ましくは、実験動物とヒト患者との間の体表面積の差異を計算する。全てのこのような計算は、当業者に周知でありそして慣用的である。

10

【0473】

例えば、マウス研究において使用される治療剤の首尾良い用量を採用し、そして質量および表面積に基づいて標準計算を適用する場合、ヒト患者における使用のため薬剤の有効用量は、患者当たり約1mgと約500mgとの間の抗体、好ましくは、患者当たり約10mgと約100mgとの間の抗体である。

【0474】

従って、この情報を使用して、本発明者らは、ヒト投与のための有用な低用量は、患者当たり、約1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、15mg、20mg、25mg、または約30mgなどであり；そしてヒト投与のための有用な高用量は、患者当たり約250mg、275mg、300mg、325mg、350mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mgまたは約500mgなどである。ヒト投与のための有用な中程度の用量は、患者当たり、約35mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、または約225mgなどであることが企図される。一般的に、患者当たり、約5～100mg、約10～80mg、約20～70mg、約25～60mg、または約30～50mgの間の用量範囲が好ましい。しかし、上記に引用されたいずれかの例示的用量を用いる任意の特定の範囲または特定の記載された範囲の間の任意の中間の値が意図される。

20

30

【0475】

記載された範囲にかかわらず、本明細書中に提示されるパラメータおよび詳細なガイドンスを考慮して、活性な範囲または最適な範囲にさらなる変更が、本発明内において包含される。従って、特定の薬剤と組み合わせにおいて、低用量がより適切であり得、そして特に、本発明の構築物の増強された安全性を考慮すると、高用量がなお許容され得ることは理解されるべきである。ヒト構築物およびヒトエフェクターの使用は、健常組織における有意な毒性または副作用の機会をさらに減少して、本発明を臨床使用のためにさらに安全にする。

【0476】

本発明の治療レジメの意図は、一般的に、受け入れられない毒性に関連するレベル未満の用量をなお維持しながら、有意な抗腫瘍効果を生成することである。用量自体の変化に加えて、投与レジメはまた、処置ストラテジーを最適化するために採用され得る。現在の好ましい処置ストラテジーは、約1mg～500mg、好ましくは、約10mg～100mgの抗体、あるいはこれらを含む治療カクテル (therapeutic cocktail) を、約7日間に約3回で投与することである。例えば、用量は、およそ1日目、およそ3日目または4日目、および6日目または7日目に与えられる。

40

【0477】

特定の用量自体の投与において、好ましくは薬学的受容可能な組成物（無菌性、発熱性、純度および一般的な安定性のFDA基準に従う）を患者に全身的に提供する。静脈内注射が、一般的に好ましく、最も好ましい方法は、約1時間または2時間などの期間にわた

50

って連続注入を使用することである。本発明を使用する処置の前にこのようなパラメータを決定することは必要ではないが、本明細書中に詳述される研究が、注射の約12～24時間以内に固形腫瘍の血管において特異的に観察される少なくともいくつかの血栓を生じること、および腫瘍細胞自体が、約24～72時間以内に死滅し始めることに留意すべきである。広範な腫瘍壊死は、一般的に、次の約48～96時間で観察され、60%までおよび60%を超える壊死が、観察される。

【0478】

当然、広範な使用の前に、臨床試験が実施される。臨床試験の実行の種々のエレメント（患者の処置およびモニタリングを含む）は、本発明の開示に照らして当業者に公知である。以下の情報は、このような治験を確立する際の使用のための一般的なガイドラインとして提示されている。

10

【0479】

第1の処置研究について選択される患者は、従来の治療の少なくとも1つの過程に応答せず、そして身体検査、実験技術、および／またはX線撮影手段によって決定されるような客観的に測定可能な疾患を有する。いずれの化学療法も、本研究に入る少なくとも2週間前に停止する。マウスモノクローナル抗体または抗体部分を使用する場合、患者はマウス免疫グロブリンに対するアレルギーの病歴を有さない。

【0480】

特定の利点は、三管腔ポート（triple lumen port）を有する中心静脈カテーテルの留置を使用する際に見出される。この治療は、例えば、0.22μフィルターを使用して濾過され、そして適切に（例えば、生理食塩水で）100mlの最終用量に希釈される。使用の前に、この試験サンプルはまた、同様の様式で濾過され、そしてA₂₈₀を測定することによって濾過の前後でその濃度を評価される。予想される回収率は、87%～99%の範囲内であり、次いで、タンパク質の損失についての調整が補正される。

20

【0481】

この構築物は、約4～24時間の期間にわたって投与され、各患者は、2～7日間の間隔で2～4回の注入を受ける。投与はまた、7日間にわたって一定速度の注入によって実施され得る。任意の用量レベルで与えられる注入は、観察される任意の毒性に依存する。従って、グレードI Iの毒性が、任意の単回注入後または一定速度注入の間の特定の期間で達した場合、毒性が改善されない限り、さらなる用量を中止するか、またはその一定速度注入を停止する。漸増用量は、約60%の患者が、任意のカテゴリにおいて、受け入れられないグレードI I IまたはI Vの毒性を示すまで、患者群に投与される。この値の2/3である用量が、安全用量として定義される。

30

【0482】

身体検査、腫瘍測定、および実験室試験は、もちろん、処置前および1ヶ月後までの間隔で実施される。実験室試験としては、全血球計数、血清クレアチニン、クレアチニンキナーゼ、電解質、尿素、SGOT、窒素、ビリルビン、アルブミン、および全血清タンパク質が挙げられる。処置後60日までに採取された血清サンプルは、投与された構築物、およびそのいずれかの部分に対する抗体の存在について放射免疫アッセイによって評価される。任意の標準的アッセイ（例えば、ELISAまたはRIAのような）を使用する、血清の免疫学的分析は、治療剤の薬物動態およびクリアランスの評価を可能にする。

40

【0483】

抗腫瘍応答を評価するために、患者を、最後の注入の、48時間後～1週間後に、そして再び30日後に試験するべきである。触知可能な疾患が存在した場合、全ての塊の二つの垂直直径（perpendicular diameter）を、処置の間毎日、治療完了後1週間以内、および30日で測定すべきである。触知可能でない疾患を測定するために、連続CTスキャンが、胸部、腹部、および骨盤の全体を通して、1cm間隔で、48時間～1週間で、そして30日で再び実施され得る。組織サンプルはまた、組織学的小および／あるいはフローサイトメトリーにより、疾患部位から、または適切であれば血液

50

もしくは体液サンプルからの生検を用いて評価されるべきである。

【0484】

臨床応答は、受容可能な基準により規定され得る。例えば、完全な応答は、処置の1カ月後、全ての測定可能な腫瘍がみられないことにより規定され得る。これに対し、部分的な応答は、処置の1カ月後に、増大を示す腫瘍部位なしでの、全ての評価可能な腫瘍小節の垂直直径の積の和の50%またはそれ以上の減少により規定され得る。同様に、混合応答は、処置の1カ月後に、一つ以上の部位での進行を伴った、全ての測定可能な病巣の垂直直径の積の50%以上の減少により規定され得る。

【0485】

上記のような臨床試験の結果を鑑みて、さらにより正確な処置レジメが処方され得る。10
そうであったとしても、投与量におけるいくつかのバリエーションは、処置される被験体の状態に依存して、後で必要であり得る。投与に責任をもつ医者は、本開示に鑑みて、個々の被験体に適切な用量を決定し得る。このような最適化および調節は、当該分野において慣用的に実施され、そして過剰な実験量をけっして反映しない。

【0486】

M. 併用腫瘍療法

本発明の処置方法は、患者が示す特定の腫瘍、疾患または障害の処置において一般に使用される任意の他の方法と組み合わせられてもよい。特定の治療アプローチがそれ自体で患者の状態に対して有害であることが知られておらず、そして本発明の処置に有意に反作用しない限り、本発明とのその組み合わせが考えられる。20

【0487】

非悪性疾患の併用療法も意図される。このような特定の例は、良性の前立腺過形成（BPH）であり、これは当該分野で現在行なわれる他の処置との組み合わせで処置されてもよい。例えば、PSAのようなBPH内に局在するマーカーに対する免疫毒素の標的化。

【0488】

固形腫瘍処置に関して、本発明は、古典的なアプローチ、例えば外科手術、化学療法、放射線療法、サイトカイン療法、血管新生抑制などと組み合わせ用いられ得る。従って、構築物、レセプターボディまたはベータボディを、外科手術または放射線治療と同時に、または前後に用いる；あるいは従来の化学療法剤または放射線治療剤、サイトカイン、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、標的化免疫毒素またはコアグリガンドなど30
とともに、またはその前後に患者に投与する、併用療法を本発明は提供する。適切な治療因子の多くの例は、本発明の免疫複合体の局面と関連して上記されている。治療複合体の一部としての使用のために最初に記載された任意の因子はまた、本発明の併用療法において別々に用いられてもよい。

【0489】

外科手術に関しては、任意の外科的介入を本発明と組み合わせ実施してもよい。放射線療法と組み合わせ、DNA損傷を腫瘍細胞内に局所的に誘導するための任意の機構、例えば、 γ 放射線、X線、UV照射、マイクロ波およびさらには電子発光などが考えられる。腫瘍細胞への放射性同位体の指向性の送達もまた考えられ、これは、標的化抗体または他の標的化方法と組み合わせ用いられ得る。40

【0490】

ガン処置における物質の組み合わせの一般的使用が周知である。例えば、米国特許第5,710,134号（参考として本明細書に援用される）は、非毒性物質または「プロドラッグ（prodrugs）」と組み合わせ腫瘍における壊死を誘導する成分を開示する。壊死的プロセスによって自由になる酵素は、非毒性の「プロドラッグ（prodrug）」を毒性の「薬物（drug）」へ切断し、これが腫瘍細胞死をもたらす。また、米国特許第5,747,469号（参考として本明細書において援用される）は、p53およびDNA損傷因子をコードするウイルスベクターの併用使用を開示する。任意のこのような類似のアプローチを本発明とともに用いることができる。

【0491】

1つ以上の因子を、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディと組み合わせて用いる場合、併用結果が、各々の処置を別々に行なう場合に観察される効果の相加的なものである必要はない。少なくとも相加作用が一般に所望されるが、単一での治療の1つを上回る抗腫瘍効果の任意の増大が有益である。また、併用処置が相乗作用を示すための特定の要件はないが、これは特に見込みがあって有利である。

【0492】

M1. 第二の抗ガン剤の選択

本明細書において用いる場合、本発明の「一次治療因子 (primary therapeutic agents)」は、構築物、レセプターボディまたはベータボディである。本明細書において用いる場合、「二次治療因子 (secondary therapeutic agents)」は、第二の、別個の治療因子または抗ガン剤、すなわち、一次治療因子「以外の (other than)」治療剤または抗ガン剤である。任意の二次治療因子は、本発明の併用療法において用いられ得る。また、二次治療因子または「二次抗ガン剤」は、以下の手引きに従って、相加作用、相加作用より大きい作用および潜在的に相乗的な作用を達成するという観点で選択され得る。

【0493】

併用された抗腫瘍治療を行なうために、動物または患者に、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディを、別の、すなわち、第二の別個の抗ガン剤と組み合わせて、その動物または患者において、その併用された抗腫瘍作用を得るのに有効な様式で、単に投与する。従って、この因子は、腫瘍または腫瘍脈管構造内に組み合わされて存在し、その腫瘍環境において組み合わせた作用をするのに有効な量で、かつ有効な時間で提供される。この目的を達成するために、本発明の一次治療剤および第二の別個の抗ガン因子を動物に実質的に同時に、単一の組成物として投与してもよく、または異なる投与経路を用いて2つの別個の組成物として投与してもよい。

【0494】

あるいは、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、例えば、数分から数週間の間隔で、第二の別個の抗ガン剤と前後してもよい。本発明の一次治療剤および第二の別個の抗ガン剤が動物に別々に適用される特定の実施形態では、各々の因子は腫瘍に対して有利に組み合わされた効果をさらに発揮することができるよう、各々の送達の間長時間経過して失効しないことを確実にする。このような場合、腫瘍を両方の因子と、互いの約5分～約1週内に、より好ましくは互いの約12～72時間内に、最も好ましくはわずか約12～48時間の遅延時間で、接触させることを考慮する。

【0495】

離れたタイミングの併用療法のための二次治療因子は、以下に考察される規準を含む、特定の規準に基づいて選択され得る。しかし、1つ以上の第二の別個の抗ガン剤の事前の投与または引き続き投与の選択の優先は、所望の場合に実質的に同時投与でそれを使用することを妨げない。

【0496】

第二に、本発明の一次治療因子の「前の (先立った) (prior to)」投与のために選択され、そして増大されかつ潜在的に相乗的である作用を達成するように設計された別個の抗ガン剤は、腫瘍脈管構造内にアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質の発現を誘導する因子を含む。例えば、局所的なカルシウム産生を刺激して、原形質膜の外表面へPSおよび他のリン脂質を移動する膜輸送因子を活性化し、腫瘍内皮細胞を傷害し、前アポトーシス性変化を生じ、そして／または腫瘍内皮細胞においてアポトーシスを誘導する因子は一般に、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現を増大させる。このような因子の例は、ドセタキセルおよびパクリタキソールである。次いで、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質は、本発明の抗体を用いて標的され得、これによって全体的な治療効果を増幅して、また宿主エフェクターを介した攻撃の増大が得られる (補体、ADCC、抗体媒介性食作用、CDC)。

【0497】

血管形成、再構築または活性化内皮細胞についての選択性を有する薬物、例えば、腫瘍血管には存在するが、正常な休止期の血管には存在しない薬物がまた、腫瘍内皮細胞の表面上でPSおよび他のリン脂質の露出を選択的に生じるために用いられ得る。このような因子の例は、コンプレタスタチンおよびドセタキセルである。これもやはり、抗体結合の増大および宿主エフェクター機構の開始の増強をもたらす。

【0498】

第二に、本発明の一次治療因子に「引き続く (subsequent to)」投与のために選択された、そして増大されかつ潜在的に相乗的な作用を達成するために設計された別個の抗ガン剤としては、この一次治療因子の効果から利益がある因子が挙げられる。本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、腫瘍破壊を生じる。従って、
10
引く続く投与のための有効な第二の、別個の抗ガン剤としては、転移を阻害する血管新生阻害因子；細胞内抗原に特異的な抗体がインビボにおいて悪性細胞から接近可能になるように壊死性腫瘍細胞を標的する因子（各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第5,019,368号、同第4,861,581号および同第5,882,626号）；および末梢で生存し得る任意の腫瘍細胞を攻撃する、化学療法剤および抗腫瘍細胞免疫複合体が挙げられる。

【0499】

いくつかの状況では、処置の期間を有意に延ばすことが所望され得、各々の投与の間に、数日間（2、3、4、5、6または7）、数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）またはさらに数ヶ月間（1、2、3、4、5、6、7または8）経過する。これは、
20
本発明の一次治療因子のような1つの処置が、腫瘍を実質的に破壊し、そして血管新生阻害因子の投与のような別の処置が、微小転移または腫瘍再増殖を妨げることが、意図される状況の場合に、有利である。しかし、効率的な創傷治療を可能にするため、外科手術後、血管新生阻害因子は、注意深く投与されなければならない。次いで、血管新生阻害因子は、患者の一生投与されてもよい。

【0500】

一次治療因子または第二の別個の抗ガン因子のいずれかの2つ以上の投与が利用されることもまた想定される。一次治療因子および第二の別個の抗ガン剤は、別々の日または週に、互換可能に投与されてもよい；または1つの因子の処置の手順の後に他の処置の手順が行なわれてもよい。いずれの場合においても、併用療法を用いて腫瘍回帰を達成するために必要なことは、投与の回数にかかわらず、抗腫瘍効果を発揮するのに有効な併用量で両方の因子を送達することが全てである。

【0501】

実質的に、同時にまたは続けてのいずれで投与されようと、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディ、ならびに治療剤は、1つ以上の化学療法剤または薬物と組み合わせ投与され得る。化学療法薬物は、増殖する腫瘍細胞を殺傷し得、これによって処置全体によって生み出される壊死領域を増強する。これによって薬物は、本発明の一次治療因子の血栓性作用を増強し得る。

【0502】

ほとんどのガン化学療法薬物は、分裂している酸素化された細胞に選択性である。これらは、併用療法において有利である。なぜなら、化学療法薬物は、本発明の一次治療因子とは異なる標的に対して作用し、これがさらに完全な抗血管または抗腫瘍効果をもたらすからである。例えば、化学療法薬物は、腫瘍末梢の、急速に分裂している酸素化された腫瘍細胞に対して選択的に活性であるが、本発明の因子は、活性化反応性酸素種が豊富である、「抑制された (stressed)」腫瘍コアにおける血管または腫瘍細胞に対して主に作用する。腫瘍末梢において十分に酸素化された脈管形成性血管に選択性である血管新生阻害薬物はまた、併用で有効である。なぜなら、本発明の因子は、腫瘍コアにおける比較的低酸素で静止状態の血管に対して作用するからである。

【0503】

腫瘍血管において血栓の形成を誘導することによって、本発明の一次治療因子はまた、

10

20

30

40

50

腫瘍内に薬物を保持または捕獲することによって化学療法薬物の作用を増強し得る。従って、化学療法剤は、腫瘍内に保持されるが、残りの薬物は身体から排出される。従って腫瘍細胞は、より高濃度の薬物により長時間曝される。腫瘍内の薬物のこの捕獲によって、薬物の用量を減らすことが可能になり、処置はさらに安全かつさらに有効になる。

【0504】

本発明における併用使用のためのさらなる薬物は、一次治療因子の作用によって薬物に対して「感作 (s e n s i t i z e d)」されている細胞に作用して、その結果、その抗腫瘍効果を達成するために必要とされる第二の薬物の用量が低下される薬物である。例えば、これは、第二の薬物の作用の主な成分が腫瘍血管で発揮されて本発明の抗体または因子が薬物に対して細胞を感作する場合に生じ得る。本発明の一次治療因子が、直接または

10

【0505】

併用療法のための他の適切な二次抗ガン剤は、例えば、免疫系の免疫抑制成分の活性を選択的に阻害することによって、宿主エフェクター細胞の活性を増強するものである。このような因子は、その機構の一部としてエフェクター細胞による攻撃を刺激する本発明の一次治療因子がさらに積極的に働くことを可能にする。このような因子の例はドセタキセルである。

【0506】

一次治療因子の作用の正確な機構（単数または複数）の理解は本発明の処置を行なうために必要ではないが、このような機構に関連するデータおよび理論的な推察を用いて、本発明における組み合わせた使用のための特定の第二の抗ガン剤を選択することができる。選択された併用療法の有効性によって、次に作用のものとデータおよび提唱される機構が支持され、これによってまた、併用療法を行なうための第二の抗ガン剤の好ましいカテゴリーがもたらされる。

20

【0507】

アポトーシスを誘導する薬物は、併用療法における使用のために好ましい。例えば、ドセタキセルは、アポトーシスを誘導し、従ってPSは、微小管に対する結合および細胞有糸分裂の破壊によって露出する (H o t c h k i s s ら、2002)。臨床濃度未満のドセタキセルを用いた、腫瘍血管をライニングする内皮細胞および腫瘍細胞の処置は本明細書においてインビトロにおける3G4抗体の強力な結合によって実証されたとおり、細胞表面でPS発現を誘導することが示されている。

30

【0508】

本発明の抗腫瘍効果が、抗体媒介性食作用の増大によって示されるように免疫エフェクター機能のFcドメイン媒介性増強を誘導するということを本発明者らはまた決定した。従って、この抗体はまた、他のFcドメイン媒介性機能、例えば、ADCC、CDC、サイトカイン産生の刺激、およびこのような機構の組み合わせを発揮するはずである。これはまた、ドセタキセルに関連する。なぜなら、他の研究は、ドセタキセルを用いた乳ガン患者の処置が、血清IFN- γ 、IL-2、IL-6およびGM-CSFサイトカインレベルにおける増大をもたらし、これがナチュラルキラー(NK)細胞およびリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞の活性を増強することによって、これらの患者における抗腫瘍免疫応答を増強するということを示しているからである (T s a v a r i s ら、2002)。

40

【0509】

従って、本発明者らは、ドセタキセルがPS発現および投与された構築物、レセプターボディまたはベータボディの結合の両方を誘導し、また免疫エフェクターの活性を増強し、これが抗腫瘍効果を媒介すると判断した。前述の考慮に基づいて、本発明者らは、3G4抗体によって例示されるような本発明の抗体の、ドセタキセルとの組み合わせが、同所性MDA-MB-435ヒト乳ガン異種移植片を保有するマウスにおいて、ドセタキセルまたは3G4のいずれか単独よりも有意に優れていたことを示した (実施例XX)。

50

【0510】

従って、アポトーシスを誘導するドセタキセルおよび他の化学療法剤は、本発明の併用療法における使用のための好ましい因子である。構築物、レセプターボディまたはベータボディと、アポトーシスを誘導する化学療法薬物、例えばドセタキセルとの組み合わせは、腫瘍脈管内皮細胞および腫瘍細胞成分を相乗作用的に攻撃するはずであり、これは処置有効性の有意な増強だけでなく、毒性の低下ももたらす。これらの組み合わせは、乳ガン処置における使用、詳細には、ドセタキセルと本発明の抗体とを用いるメトロノームのような化学療法の併用が意図される。

【0511】

M2. 内毒素

内毒素および解毒された内毒素誘導体は、併用処置において、好ましくは低用量で用いられ得る（本明細書において参考として詳細に援用される、PCT公開第WO03/028840号）。動物での使用のために、詳細にはヒトにおける使用のために好ましい、種々の解毒された内毒素が利用可能である。解毒および精練された内毒素、ならびにそれらの組み合わせは、各々が参考として本明細書において詳細に援用される、米国特許第4,866,034号；同第4,435,386号；同第4,505,899号；同第4,436,727号；同第4,436,728号；同第4,505,900号に記載される。

【0512】

非毒性の誘導体モノホスホリル脂質A（MPL）は、本発明において用いられ得る解毒された内毒素の1例である。MPLは、ヒトについて安全であることが公知である；アジュバントとしてMPLを用いる臨床試験によって、外来患者でさえ、ヒトでの使用については $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ が安全であることが示されている。

【0513】

M3. サイトカイン

サイトカイン療法は、組み合わせの治療レジメンのための有効なパートナーであることが証明されている。本発明の組み合わせアプローチにおいて、種々のサイトカインが使用され得る。サイトカインの例としては、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TGF- β 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF α 、TNF β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ が挙げられる。サイトカインは、患者の状態およびサイトカインの相対的な毒性のような、臨床的指標と整合する標準的レジメンに従って投与される。ウテログロビンまたは転移を防止または阻害するために用いられ得る（米国特許第5,696,092号；参考として本明細書に援用される）。

【0514】

M4. TNF α およびTNF α の誘導因子

TNF α およびTNF α の誘導因子はまた、本発明と組み合わせで用いられ得る。TNF α は、脈管透過性を増大し、従って、腫瘍への抗ガン剤の浸透を促進することにおいて有用である。抗体局在化は、PSおよび陰イオン性リン脂質を標的化する場合には決して問題ではない。なぜなら本発明においては、TNF α の併用使用は、腫瘍への他の化学療法剤および免疫複合体の接近を容易にし得、そして遠くの腫瘍細胞への本発明の抗体の結合を増大させるからである。

【0515】

低レベルの内毒素であるRac1アンタゴニスト、例えば、弱毒化されるかまたは操作されたアデノウイルス、DMXAA（およびFAA）、CM101およびサリドマイドがまた使用されてもよい。Rac1アンタゴニストは、本発明の併用処置において用いられてもよい。なぜなら1細胞あたり約5000個のDNA粒子でCD14と独立してTNF上方制御が生じるからである（Sanliogluら、2001）。CM101、サリドマイドおよびDMXAAがまた、標準的用量または低下した用量で、これと組み合わせ

て用いられてもよい。

【0516】

M5. 化学療法剤

背景にある機構（単数または複数）にかかわらず、種々の化学療法剤が、本明細書に開示される併用処置方法において用いられ得る。併用療法について考えられる化学療法剤としては、例えば、タモキシフェン、タキソール、ビンブラスチン、エトポシド（VP-16）、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル（5FU）、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、コンブレタスタチン（類）、さらに詳細には、ドセタキセル（タキソテル）、シスプラチン（CDDP）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、メトトレキサート、パクリタキセル、およびビンクリスチン、ならびにその誘導体およびプロドラッグが挙げられる。

10

【0517】

当業者に理解されるように、適切な用量の化学療法剤は、一般に、臨床治療においてすでに利用されてきており、ここで、この化学療法剤は、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて投与される。しかし、ここで、本発明によって提供される利点に起因して、低用量が、可能である。例示のみのために、シスプラチンのような薬剤、および他のDNAアルキル化剤が使用され得る。シスプラチンは、ガンを処置するために広範に使用され得、臨床適用において使用される有効な用量は、総計3つの経路について3週間毎に5日間 20 mg/m^2 である。シスプラチンは、経口で吸収されず、従って、注射を介して、静脈内で、皮下で、腫瘍内で、または腹腔内で送達されねばならない。

20

【0518】

さらに有用な薬剤は、DNA複製、有糸分裂、染色体分離および／またはチューブリン活性に干渉する化合物を含む。このような化学療法剤化合物には、アドリアマイシン（ドキソルビシンとしてもまた公知である）、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが挙げられる。新形成の処置のための臨床設定において広範に使用されるので、これらの化合物は、静脈内では、アドリアマイシンについて21日間隔で $25 \sim 75 \text{ mg/m}^2$ からエトポシドについては $35 \sim 50 \text{ mg/m}^2$ までの範囲の用量で、静脈内にボラス注射を通じて、または経口的に静脈内用量の2倍で、投与される。

【0519】

ポリヌクレオチド前駆体の合成および忠実度を崩壊させる薬剤もまた使用され得る。特に有用なものは、広範な試験を受け、そして容易に利用可能な薬剤である。そのようなものとして、5-フルオロウラシル（5-FU）のような薬剤は、新形成組織によって優先的に使用され、新形成細胞に対する標的化のためにこの薬剤を特に有用にさせる。非常に毒性の5-FUは、広範囲のキャリア（局所を含む）において適用可能であるが、 $3 \sim 15 \text{ mg/kg/day}$ の範囲の用量を有する静脈内投与が一般に使用される。

30

【0520】

併用療法に関して有用な例示的な化学療法剤は、表Dにおいて列举される。そこで列举される各薬剤は、例示的であり、そしていかなるようにも限定することを意味しない。当業者は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第1の5版、第33章（特に624頁～652頁）に指向される。投薬量におけるいくつかの改変は、おそらく、処置されるべき被験体の状態に依存して生じる。処置を施す医師は、個々の被験体について適切な用量を決定し得る。

40

【0521】

【表 20-1】

表D

新形成疾患において有用な化学療法剤

クラス	薬剤の型	非商品名（他の名称）	疾患
アルキル化剤	ナイトロジェンマスタード	メクロレタミン (HN ₂)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		シクロホスファミド イフォスファミド (ifosfamide)	急性および慢性リンパ球性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳房、卵巣、肺、ウィルムス腫、頸、精巣、軟組織肉腫
		メルファラン (L-サルコリン)	多発性骨髄腫、乳房、卵巣
		クロラムブシル	慢性リンパ球性白血病、原発性マクログロブリン血症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
	エチレンイミンおよびメチルメラミン	ヘキサメチルメラミン	卵巣
		チオテパ	膀胱、乳房、卵巣
	アルキルスルホネート	ブスルファン	慢性顆粒球性白血病
	ニトロソ尿素類	カルムスチン (BCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫
		ロムスチン (CCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、小細胞肺
		セムスチン (メチル-CCNU)	原発性脳腫瘍、胃、結腸
		ストレプトゾシン (ストレプトゾチン (Streptozotocin))	悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド
	トリアジン	ダカルバジン (DTIC; ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド)	悪性黒色腫、ホジキン病、軟組織肉腫
代謝拮抗物質	葉酸アナログ	メトトレキサート (アメトプテリン)	急性リンパ球性白血病、絨毛癌、菌状癌肉腫、乳房、頭および頸、肺、骨原性肉腫
	ピリミジンアナログ	フルオウラシル (5-フルオロウラシル; 5-FU)	乳房、結腸、胃、膵臓、卵巣、頭頸部、膀胱、前悪性皮膚病変 (局所的)
		フロクスウリジン (フルオリド-オキシウリジン; FUDR)	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
	プリンアナログおよび関連するインヒビター	シタラビン (シトシンアラビノシド)	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
		メルカプトプリン (6-メルカプトプリン; 6-MP)	急性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病および慢性顆粒球性白血病
		チオグアニン (6-チオグアニン; TG)	急性顆粒球性白血病、急性リンパ球性白血病および慢性顆粒球性白血病
		ペントスタチン (2-デオキシコホルマイシン)	毛細胞白血病、菌状癌肉腫、慢性リンパ球性白血病

【表 20-2】

天然産物	ビンカアルカロイド類	ビンブラスチン (VLB)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、乳房、精巣
		ビンクリスチン	急性リンパ球性白血病、神経芽細胞腫、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、小細胞肺
	エビポドフィロトキシン (Epipodophyllotoxin)	エトポシド ターチポシド (Tertiposide)	精巣、小細胞肺および他の肺、乳房、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性顆粒球性白血病、カポージ肉腫
	抗生物質	ダクチノマイシン (アクチノマイシン D)	絨毛癌、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、精巣、カポージ肉腫
		ダウノルビシン (ダウノマイシン; ルビドマイシン)	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
		ドキシソルビシン	軟組織、骨原性肉腫および他の肉腫; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性白血病、乳房、尿生殖器、甲状腺、肺、胃、神経芽細胞腫
		ブレオマイシン	精巣、頭頸部、皮膚、食道、肺および尿生殖器管; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		プリカマイシン (Plicamycin) (ミトラマイシン)	精巣、悪性高カルシウム血症
		マイトマイシン (マイトマイシン C)	胃、頸、結腸、乳房、脾臓、膀胱、頭頸部
	酵素	Ｌ-アスパラギナーゼ	急性リンパ球性白血病
	生物学的応答改質剤	インターフェロン α	毛細胞白血病、カポージ肉腫、黒色腫、カルチノイド、腎細胞、卵巣、膀胱、非ホジキンリンパ腫、菌状息肉腫、多発性骨髄腫、慢性顆粒球性白血病
種々の薬剤	白金配位錯体	シスプラチン (cis-DDP) カルボプラチン	精巣、卵巣、膀胱、頭頸部、肺、甲状腺、頸、子宮内膜、神経芽細胞腫、骨原性肉腫
	アントラセンジオン	ミトザントロン	急性顆粒球性白血病、乳房
	置換型尿素	ヒドロキシ尿素	慢性顆粒球性白血病、真性赤血球増加症、本能的 (essential) 血小板増加症、悪性黒色腫
	メチルヒドラジン誘導体	プロカルバジン (N-メチルヒドラジン, M1H)	ホジキン病
	副腎皮質抑制	ミトタン (o,p'-DDD)	副腎皮質
		アミノグルテチミド	乳房

【表 20-3】

ホルモンおよびアンタゴニスト	アドレノコルチコステロイド	プレドニゾン（利用可能ないくつかの他の等価調製物）	急性および慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、乳房
	プロゲステロン	カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン 酢酸メドロキシプロゲステロン 酢酸メゲストロール	子宮内膜、乳房
	エストロゲン	ジエチルスチルベストロール エチニルエストラジオール（利用可能な他の調製物）	乳房、前立腺
	抗エストロゲン	タモキシフェン	乳房
	アンドロゲン	プロピオン酸テストステロン フルオキシメステロン（利用可能な他の調製物）	乳房
	抗アンドロゲン	フルタミド	前立腺
	性腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログ	ロイプロリド	前立腺

(M6. 抗脈管形成)

用語「脈管形成」とは、一般的に組織または器官への新規な脈管の生成をいう。通常の生理学的条件下で、ヒトまたは動物は、特定の制限された状況においてのみ脈管形成を受ける。例えば、脈管形成は、通常、組織治癒、胎児および胚の発生、および黄体、子宮内膜および胎盤の形成において観察される。しかし、新たな証拠として、脈管形成が、例えば、副腎組織、前立腺および卵巣における特定の正常な状態において重要であることが示される。本発明の治療剤（抗脈管形成が、作用の様式だけでない）は、従って、所望のまたは「生理学的」脈管形成が、本発明を使用する場合、阻害されない点で、顕著な抗脈管形成治療に対する利点を、有する（例えば、抗体 A4.6.1 (Brem, 1998; Bacara, 1997; Prestaら, 1997)）。

【0524】

非制御（持続および／または非調節）脈管形成は、種々の疾患状態に関連し、腫瘍の発生および転移の間に生じる。制御脈管形成および非制御脈管形成は、類似の様式で進行すると考えられる。内皮細胞および周皮細胞（基底膜によって囲まれる）は、毛細血管を形成する。脈管形成は、内皮細胞および白血球によって放出される酵素による、基底膜の侵食から始まる。内皮細胞（血管の管腔を裏打ちする）は、基底膜を通過して突出する。脈管形成刺激物によって、内皮細胞が、侵食される基底膜を通過して移動するように誘導する。移動する細胞は、親の血管から「出芽 (sprout)」を形成し、ここで内皮細胞が、有糸分裂および増殖を行う。内皮出芽は、互いに吸収して、毛細管ループを形成し、新たな血管を作製する。

【0525】

脈管形成がいくつかの正常組織において必要とされる新たな証拠にも関わらず、抗脈管形成治療は、腫瘍および他の疾患の処置においてなお重要である。従って、抗脈管形成治療は、本発明の併用処置における使用のために意図される。本発明の低い比較的頻繁な用量の治療剤と脈管形成を阻害する薬剤との組み合わせは、特に意図される。併用療法に関連して有用な例示的な抗脈管形成剤は、（免疫結合体とともに）上に記載される。任意の1つ以上のこのような薬剤（表Bに含まれる）は、本発明とともに併用療法において使用

され得る。アンギオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスピンが現在好ましい。

【0526】

多くの公知の抗ガン剤もまた、それらの作用機構の一部として抗脈管形成効果を有する。これらの薬剤（表Eの薬剤によって例示される）は、本発明の併用療法の局面における使用に特に企図される（これらは、上記のように、本発明の抗体に結合体化され得る）。

【0527】

【表21】

表E

抗脈管形成活性を有する抗癌剤

薬剤のクラスまたはタイプ	例
アルキル化剤	シクロホスファミド、エデルフォシン(edelfosine)、エストラムスチン、メルファラン
代謝拮抗物質	フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、UFT、テガフル、ウラシル、シタラビン
抗腫瘍抗体	ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エビルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン
トポイソメラーゼインヒビター	カンプトテシン、イリノテカン、エトポシド、トポテカン
タキサン	ドセタキセル、パクリタキセル
ビンカルカロイド類	ビンブラスチン、ビンクリスチン
種々雑多	シスプラチン、オクトレオチド

さらに、 $\alpha_v\beta_3$ に対する抗体LM609はまた、腫瘍後退を誘導し、併用療法において使用され得る。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニスト（例えば、LM609）は、脈管形成内皮細胞のアポトーシスを誘導し、静止血管に影響を与えないで残す。LM609または他の $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニストはまた、 $\alpha_v\beta_3$ とMMP-2との相互作用を阻害することによって作用し得、タンパク質分解酵素が、内皮細胞および線維芽細胞の移動において重要な役割を果たすと考えられる。

【0528】

LM609による脈管形成内皮のアポトーシスは、脈管ネットワークの残りに対するカスケード効果を有し得る。実際に、腫瘍脈管ネットワークが、増殖するための腫瘍のシグナルに完全に応答することを妨げることは、ネットワークの部分的なまたは完全な崩壊を開始し得、腫瘍細胞の死および腫瘍容積の減少を生じる。エンドスタチンおよびアンギオスタチンが同様な様式で機能することが可能である。LM609が静止脈管に影響しないが、腫瘍後退を引き起こし得るという事実は、抗腫瘍効果を得るために、腫瘍内の全ての血管が処置のために標的される必要があるわけではないことを強く示唆する。

【0529】

アンギオスタチンに対する抗体はまた、米国特許第5,520,914号（具体的に本明細書中において参考として援用される）に記載されるように使用され得る。FGFが脈管形成に関連するので、FGFインヒビターがまた使用され得る。特定の例は、アルチャラン(archaran)スルフェートのようなグリコサミノグリカンを含む、それらの主要な反復単位として、2-O硫酸化ウロン酸で配列を交代するN-アセチルグルコサミンを有する化合物である。このような化合物は、米国特許第6,028,061号（本明細書中において具体的に参考として援用される）に記載され、そして併用して使用され得る。

【0530】

(M7. VEGFインヒビター)

VEGFは、低酸素および発ガン性変異によって誘導される多機能性サイトカインである。VEGFは、胚形成における脈管ネットワークの発生および維持の最初の刺激物である。これは、強力な浸透性誘導剤、内皮細胞化学走化性剤、内皮生存因子、および内皮細胞増殖因子として機能する。その活性は、正常な胚発生に必要とされる。なぜなら、VEGFの一方または両方の対立遺伝子の標的化された破壊が、胚の死を生じるからである。

【0531】

1つ以上のVEGF阻害方法の使用は、本発明の併用療法の好ましい局面である。病理学的状態における脈管形成の第1の刺激としてのVEGFの認識は、VEGFの活性を遮断する種々の方法を導いた。開発された任意のVEGFインヒビターは、ここで、有利にこれとともに使用され得る。従って、VEGFシグナル伝達を妨害するために設計された、以下の中和抗VEGF抗体、可溶性レセプター構築物、アンチセンスストラテジー、RNAアプタマーおよびチロシンキナーゼインヒビターの任意の1つ以上が、使用され得る。

10

【0532】

適切な薬剤としては、中和抗体(Kimら、1992; Prestaら、1997; Sioussatら、1993; Kondoら、1993; Asanoら、1995)、可溶性レセプター構築物(KendallおよびTomas、1993; Aielloら、1995; Linら、1998; Millauerら、1996)、チロシンキナーゼインヒビター(Siemeisterら、1998)、アンチセンスストラテジー、RNAアプタマーおよびVEGFまたはVEGFレセプターに対するリボザイム(Salehら、1996; Chengら、1996)が挙げられる。アンタゴニスト特性を有するVEGFの改変体もまた、WO98/16551に記載されるように使用され得る。上記参考文献の各々が、本明細書中において具体的に援用される。

20

【0533】

VEGFに対するブロッキング抗体は、特に、単純さのために、特定の実施形態において好ましい。VEGFに対するモノクローナル抗体は、ヒト腫瘍異種移植片増殖およびマウスにおける腹水形成を阻害することが示されている(Kimら、1993; Meisanoら、1998; Luoら、1998a; 1998b; Borgstromら、1996; 1998; 各々が、本明細書中において参考として援用される)。抗体A4.6.1は、VEGFR1およびVEGFR2の両方に結合するVEGFを遮断し得る高親和性抗VEGF抗体である(Kimら、1992; Wiesmannら、1997; Mullerら、1998; Keytら、1996; 各々が、本明細書中において参考として援用される)。A4.6.1は、最近、一価ファージディスプレイ技術によってヒト化され、現在、抗ガン剤として第I期の臨床試験にある(Brem、1998; Bacaら、1997; Prestaら、1997; 各々が、本明細書中において参考として援用される)。

30

【0534】

A4.6.1のFabフラグメントによって結合されたVEGFのアラニン走査変異誘発およびX線結晶は、A4.6.1が結合するVEGFに対するエピトープが、アミノ酸89~94の辺りで中心であることを示した。この構造データは、A4.6.1が、VEGFをVEGFR2への結合から競合的に阻害するが、おそらく立体障害によって、VEGFがVEGFR1へ結合することを阻害することを示す(Mullerら、1998; Keytら、1998; 各々が、本明細書中において参考として援用される)。

40

【0535】

A4.6.1は、本発明とともに使用され得る。しかし、2C3(4545)と呼ばれる新規な抗体が現在好ましく、これは、VEGFと2つのVEGFレセプターのうちの1つのみとの相互作用を選択的に遮断する。2C3は、内皮細胞のVEGF媒介増殖を阻害し、強力な抗腫瘍活性を有し、そしてVEGFとVEGFR2(KDR/Flk-1)と

50

の相互作用を選択的に遮断するが、VEGFR1 (FLT-1) を遮断しない。A4. 6. 1 と対照的に、2C3 は、マクロファージ化学走化性 (VEGFR1 によって媒介される) の付随した阻害無しに、VEGFR2 によって誘導される脈管形成の特異的阻害を可能にし、従って、より安全な治療剤であると企図される。米国特許第 6, 342, 219 号、同第 6, 342, 221 号、同第 6, 416, 758 号、および同第 6, 416, 758 号は、2C3 抗体ならびに抗脈管形成治療および VEGF 阻害におけるその使用をさらに記載するために、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【0536】

(M8. アポトーシス誘導剤)

本発明の治療剤はまた、好ましくは、腫瘍 (腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞を含む) 内で任意の細胞のアポトーシスを誘導する処置方法と組み合わせられる。アポトーシスを誘導する例示的な薬剤は、(免疫結合体とともに) 上に列挙される。任意の 1 つ以上のこのようなアポトーシス誘導剤が、本発明の抗体に連結されること無しに、本発明の併用療法において使用され得る。

【0537】

多くの公知の抗ガン剤がまた、それらの作用機構の一部として、アポトーシス誘導効果を有する。これらの薬剤 (表 F における薬剤によって例示される) は、本発明の併用療法の局面における使用のために特に企図される (これらは、上記のように、本発明の抗体に結合体化され得る)。

【0538】

【表 22】

表 F

アポトーシスを誘導する抗癌剤

薬剤のクラスまたはタイプ	例
抗代謝物質	シタラビン、フルダラビン、5-フルオロー-29-デオキシウリジン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート
DNA 架橋剤	クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード
インターカレート剤	アドリアマイシン (ドキシソルビシン)、ミトキサントロン
トポイソメラーゼ II 毒	エトポシド、テニポシド
微小管指向剤	コルセミド、コルヒチン、ドセタキセル、ビンクリスチン
キナーゼインヒビター	フラボピリドール、スタウロスポリン STI571 (CPG 57148B), UCN-01 (7-ヒドロキシスタウロスポリン)
ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター	L-739749, L-744832
ホルモン	グルココルチコイド、フェンレチニド
DNA 断片化剤	ブレオマイシン
ホルモンアンタゴニスト	タモキシフェン、フィナステリド、LHRH アンタゴニスト
生物学的薬剤	TNF- α , TRAIL, 抗 CD20
タンパク質合成インヒビター	L-アスパラギナーゼ、シクロヘキシイミド、ピューロマイシン ジフテリア毒素
トポイソメラーゼ II 毒	カンプトセシン、トポテカン (topotecan)

(M9. 免疫毒素およびコアグリガンド)

本発明はまた、標的タンパク質が腫瘍細胞のマーカー、腫瘍脈管構造または腫瘍支質に向けられる、他の免疫毒素またはコアグリガンドとともに使用され得る。P E結合ペプチドを標的化するために使用するための本明細書中に記載される標的化剤のいずれかが、これらの実施形態において使用され得る。免疫毒素において、結合される薬剤は、抗細胞剤または細胞傷害剤、サイトカイン、放射線治療剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘導剤および抗チューブリン薬物を含む。コアグリガンドにおいて、結合される薬剤は、コアグリガンドである。米国特許第5, 855, 866号、同第5, 965, 132号、同第6, 261, 535号、同第6, 051, 230号、同第6, 451, 312号（免疫毒素）、同第6, 093, 399号、同第6, 004, 555号、同第5, 877, 289号、および同第6, 036, 955号（コアグリガンド）が、このような構築物を例示するために、本明細書中で具体的に参考として援用される。

10

【0539】

（M10. ADEPTおよびプロドラッグ治療）

本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディは、プロドラッグと組み合わせて使用され得、ここでこの抗体は、プロドラッグ活性化成分（例えば、抗体に接触した際にのみ、プロドラッグをより活性な形態へ変換するプロドラッグ活性化酵素）と作動可能に付随される。この技術は、一般に「ADEPT」と称され、そして例えば、WO95/13095；WO97/26918、WO97/24143および米国特許第4, 975, 278号および同第5, 568, 568号（これらは、各々具体的に本明細書中に参考として援用される）において記載される。

20

【0540】

本明細書中で使用される場合、用語「プロドラッグ」は、プロドラッグが基づく親の薬物と比較して（腫瘍血管内皮細胞を含む）標的細胞に対する減少した細胞傷害性または他の抗細胞性効果を及ぼす生物学的にかまたは薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態をいう。好ましくは、プロドラッグまたは前駆体形態は、有意な減少を及ぼすか、またはより好ましくは、「ネイティブ」または親の形態と比較して、無視できる細胞傷害性または抗細胞性効果を及ぼす。「プロドラッグ」は、活性化されているかまたは変換されて、その薬物のより活性な親の形態を生じ得る。

【0541】

プロドラッグを作製しそして使用する技術的能力は、当業者の範囲内である。Willmanら（1986）およびStellaら（1985）は、種々のプロドラッグの作製方法および使用方法に関する記載および技術をさらに供給する目的のために参考として本明細書中に各々具体的に援用される。本発明の文脈で使用され得る例示的なプロドラッグ構築物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ホスフェート含有プロドラッグ（米国特許第4, 975, 278号）、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチドベースのプロドラッグ（米国特許第5, 660, 829号；同第5, 587, 161号；同第5, 405, 990号；WO97/07118）、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ（米国特許第5, 561, 119号；同第5, 646, 298号；同第4, 904, 768号、同第5, 041, 424号）、βラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ（米国特許第4, 975, 278号）、必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグおよびさらには5-フルオロシトシン（米国特許第4, 975, 278号）および5-フルオロウリジンプロドラッグなど（これらの特許の各々は、本明細書中に参考として具体的に援用される）。

30

40

【0542】

プロドラッグの形態で使用され得る治療剤または細胞傷害性薬物の型は、実質的には限られる。より細胞傷害性薬剤は、このような送達の形態には好ましく、たとえば、コアグラント（プロドラッグとしての使用にあまり好ましくない）の送達より好ましい。プロドラッグが実質的に不活性であり、そして「放出された」かまたは活性化された薬物が、実質的にかまたは意図される目的のための活性を有するように構築物を設計することが、プ

50

ロドラッグの形成において必要とされる全てである。

【0543】

もとのプロドラッグに関する種々の改良もまた、WO 95/038380; EP 751, 144 (アントラサイクリン); WO 97/07097 (シクロプロピルインドール); およびWO 96/20169に開示されるように、公知でありかつ本明細書との使用について意図される。例えば、Kmが減少したプロドラッグは、米国特許第5, 621, 002号(本明細書中に参考として特に援用される)に記載され、これは本発明の状況において使用され得る。細胞内にて実行されるプロドラッグ治療もまた、WO 96/03151 (本明細書中に参考として特に援用される)に例示されるように公知であり、そして本明細書を用いて実施され得る。

10

【0544】

ADEPTにおける使用のために、そのプロドラッグをより活性な薬物へと活性化または変換する因子が、本発明の抗体に作動可能に結合される。従って、この抗体は、脈管形成部位内または腫瘍部位内で、プロドラッグ変換能力を局在化し、活性薬物がそのような領域のみで産生され、そして循環中または健常組織においては産生されないようにする。

【0545】

本発明の抗体に結合してプロドラッグ活性化にて機能し得る酵素としては、ホスフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアルカリホスファターゼ(米国特許第4, 975, 278号); スルフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアールスルファターゼ(米国特許第5, 270, 196号); ペプチドに基づくプロドラッグと組み合わせた使用のためのペプチダーゼおよびプロテアーゼ(例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ(米国特許第5, 660, 829号; 同第5, 587, 161号; 同第5, 405, 990号)およびカテプシン(カテプシンBおよびLを含む)); D-アミノ酸修飾プロドラッグと組み合わせた使用のためのD-アラニルカルボキシペプチダーゼ; グリコシル化プロドラッグと組み合わせた使用のための炭水化物切断酵素(例えば、 β -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ)(米国特許第5, 561, 119号; 同第5, 646, 298号); β -ラクタム含有プロドラッグと組み合わせた使用のための β -ラクタマーゼ; アミノ窒素にてフェノキシアセトアミド基またはフェニルアセトアミド基で誘導体化された薬物と組み合わせた使用のためのペニシリンアミダーゼ(例えば、ペニシリンVアミダーゼ(米国特許第5, 975, 278号)またはペニシリンGアミダーゼ); ならびに5-フルオロシトシンに基づくプロドラッグ(米国特許第4, 975, 278号)と組み合わせた使用のためのシトシンデアミナーゼ(米国特許第5, 338, 678号; 同第5, 545, 548号)が、挙げられるがこれらに限定されず、これらの特許各々は、本明細書中に参考として特に援用される。

20

30

【0546】

(N. 抗体コーティングリポソームおよび治療剤)

リポソーム処方物は、しばしば、治療剤および薬剤において使用される。しかし、最初の研究においてリポソームの生体分布は、このような処方物が、ヒトにおいて幅広く適用可能でないことを意味する。リポソームは、細網内皮系(RES)の食細胞(循環する単核食細胞ならびに肝臓および脾臓に位置する細胞を含む)によって迅速に取り込まれる。したがって、血液循環半減期は、数分と短くあり得る。

40

【0547】

「ステルス(stealth)またはステルス化」リポソームおよび処方の技術は、このように開発され、これは、リポソームがより長く循環することを可能にする。ステルス化リポソームにおける使用のための好ましい薬剤は、ポリエチレングリコール(PEG)であり、そして得られるリポソームはまた、PEG化リポソームと呼ばれる。

【0548】

毛細管中の窓の平均直径よりも直径が小さいリポソームは、循環から漏出する。迅速に増殖する腫瘍における窓の平均直径は、正常な組織よりも大きく、したがって、直径が約

50

100nmよりも小さいリポソームは、腫瘍に入り込む。ステルスリポソームは、ガン患者において腫瘍に、細胞傷害剤を送達するために使用するために提案されている。ある範囲の薬物は、ステルスリポソームに組み込まれている（シスプラチン（Rosenthalら、2002）、TNF α （Kimら、2002）、ドキソルビシン（Symonら、1999）およびアドリマイシン（Singhら、1999）（各々が、本明細書中において具体的に参考として援用される）を含む）。しかし、最近の報告は、転移性乳ガンの処置においてステルスリポソームドキソルビシンおよびビノレルビンの予期しない低い効力を示した（Rimassaら、2003）。

【0549】

本発明は、改善されたステルス化リポソーム処方物を提供し、当該分野の種々の欠点を克服し、ここで、ステルス化リポソームは、本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディと機能的に関連するかまたは「コーティング」される。9D2、3G4（ATCC4545）および本発明の類似の競合抗体が、このような使用に好ましいが、任意の抗体、またはその抗原結合領域（アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する）が使用され得る。二価抗体または抗体部分は、本発明のこれらの局面において必要とされない。

10

【0550】

任意のステルス化リポソームが、新規なリポソーム処方物の基礎を形成し得、そして好ましくは、PEG化リポソームが使用される。ステルス化リポソームは、「コーティング」される。すなわち、構築物、レセプターボディまたはベータボディと作動可能にまたは機能的に関連する。作動可能にまたは機能的に関連は、構築物、レセプターボディまたはベータボディが、標的PSまたは陰イオン性リン脂質に特異的に結合する能力を保持し、それによってステルス化リポソームおよびその任意の内容物をPSポジティブ細胞（例えば、腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞）に送達または標的化するように、なされる。

20

【0551】

本発明のコーティングステルス化リポソームは、単独で使用され得る。しかし、好ましくは、このようなりポソームはまた、1つ以上の第2の治療剤（例えば、抗ガン剤または化学療法剤（第1の治療剤が、抗体自体である））を含む。第2の治療剤は、一般的に、リポソームの「コア」内であるとして記載される。抗体への結合体のためにまたは併用療法のために、当該分野で公知であり、そして／または本明細書中に記載される任意の1つ以上の第2の抗ガン剤または化学療法剤が、本発明の抗体コーティングステルスリポソームにおいて使用され得る。例えば、任意の化学療法剤または放射線療法剤、サイトカイン、抗脈管形成剤またはアポトーシス誘導剤。化学療法剤において現在好ましいのは、抗チューブリン薬物、ドセタキセルおよびパクリタキセルである。

30

【0552】

さらに、本発明の抗体コーティングステルス化リポソームはまた、ウイルス感染および疾患を処置する際に使用するための1つ以上の抗ウイルス薬物を装填され得る。抗ガン剤とともに、抗体への結合体のためにまたは併用療法のために、当該分野で公知であり、そして／または本明細書中に記載される、第2の抗ウイルス薬物の任意の1つ以上が、本発明の抗体コーティングステルス化リポソームにおいて使用され得る。シドファビルおよびAZTは、現在好ましい例である。

40

【0553】

（O. 抗脈管、抗脈管形成および他の治療）

本発明はまた、異常な脈管形成が関与する他の疾患（プロトンビン血管を有する疾患および障害を含む）の処置において使用され得る。治療機構のみではないが、本発明の抗体、免疫結合体およびペプチドベース治療剤はまた、異常な脈管形成（例えば、種々の疾患および障害に寄与する）を有する動物および患者を処置するために使用され得る。

【0554】

抗脈管形成、プロトンビン脈管構造または他の抗脈管機構に基づくか否かに関わらず、本発明は、流行したおよび／または臨床的に重要なガン処置の分野以外の疾患を処置す

50

るために使用され、これには、以下が挙げられる：関節変形、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、グレーブズ病、血管性再狭窄（以下の再狭窄を含む：血管形成術、動静脈機能不全（A V M）、髄膜腫、血管腫および血管新生緑内障）。介入についての他の標的には、以下が挙げられる：血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、角膜移植新生血管形成、血友病性関節、肥大性癍痕、オースラー-ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫水晶体後線維増殖症、強皮症、トラコーマ、脈管接着、滑膜炎、皮膚炎、種々の他の炎症性疾患および障害、ならびに子宮内膜症。本発明によって処置可能なさらなる疾患および障害、ならびにこのような脈管形成障害の統一的な基礎が、以下に記載される。

【0555】

異常な脈管構造および脈管形成が関連する1つの顕著な疾患は、慢性関節リウマチであり、ここで、関節の滑膜内壁における血管は、脈管形成を起こす。新しい脈管ネットワークの形成に加えて、内皮細胞は、パンスス増殖および軟骨破壊に導く、因子および反応性酸素種を放出する。脈管形成に関連する因子は、慢性関節リウマチの慢性的な炎症状態に能動的に寄与し、そして維持するのを助け得る。脈管形成に関連する因子はまた、変形性関節症において役割を有し、関節の破壊に寄与する。種々の因子（V E G Fを含む）が、慢性関節リウマチおよび変形性関節炎の病態に関係することが示されている。

【0556】

異常な脈管構造および脈管形成を含む疾患の別の重要な例は、眼血管新生疾患である。この疾患は、眼の構造（例えば、網膜または角膜）への新しい血管の侵入によって特徴付けられる。それは、失明に最も一般的な原因であり、そして約20の眼の疾患に関係する。加齢性黄斑変性において、関連した視覚問題は、網膜色素上皮の真下での維管束組織の増殖を有するブルー膜における欠陥を介する脈絡膜毛細管の内殖によって引き起こされる。脈管形成損傷はまた、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶、血管新生緑内障および水晶体後線維増殖症と関連する。

【0557】

本発明に従って処置され得る角膜新生血管形成に関連する他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：流行性角結膜炎、ビタミンA欠損、コンタクトレンズ過剰装着（over wear）、萎縮性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状角膜炎乾燥症、シェーグレン症（sjogrens）、しゅさ性挫瘡、フリクテン症（phlyectenulosis）、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学的やけど、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純疱疹感染、帯状疱疹感染、原虫感染、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン辺縁変性、辺縁角膜炎、慢性関節リウマチ、全身性狼瘡、多発性動脈炎、外傷、ヴェーゲナー類肉腫症、強膜炎、スティーヴンズ-ジョンソン疾患、脈絡放射状角膜切開、および角膜移植片（graph）拒絶。

【0558】

本発明に従って処置され得る網膜／脈絡膜新生血管形成に関連する疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、パジェット病、静脈閉鎖、動脈閉鎖、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎／硝子体炎（vitritis）、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス（erythematosis）、未熟児網膜症、イールズ病、ベチェット病（Behcet's disease）、網膜症または脈絡膜炎を引き起こす感染、推定眼ヒストプラスマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天的な構造上の欠損、シュタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラスマ症、外傷およびレーザー処置後の合併症。

【0559】

本発明に従って処置され得る他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ルベオーシス（角の新生血管形成）に関連する疾患、および増殖性硝子体網膜症の全ての形態を含む維管束組織または線維性組織の異常増殖によって引き起こされる疾患（糖尿病と関連するかしないか）。

10

20

30

40

50

【0560】

慢性炎症はまた、異常な脈管構造および病理学的新脈管形成に関連する。潰瘍性大腸炎およびクローン病のようなこのような疾患状態は、新しい血管の炎症性組織への内殖とともに、組織学的変化を示す。南アメリカに見出されるバルトネラ症（細菌性感染）は、脈管内皮細胞の増殖によって特徴付けられる慢性的な段階を生じ得る。

【0561】

異常な脈管構造および脈管形成に関連する別の病理学的役割は、アテローム性動脈硬化症に見出される。血管の管腔内に形成されるプラークは、脈管形成刺激活性を有することが示されている。ヒト冠状動脈硬化の進行において、および閉塞性冠疾患における再疎通プロセスにおけるVEGFのような脈管形成マーカーの病態生理学的重要性についての特定の証拠がある。本発明は、このような状態のための有効な処置を提供する。

10

【0562】

小児期の最も頻繁な脈管形成疾患の1つは、血管腫である。ほとんどの場合において、腫瘍は良性であり、そして介入なく退行する。より重篤な場合において、腫瘍は、大きな空洞性かつ浸潤性の組織に進行し、そして臨床的な合併症を作り出す。血管腫の全身的な形態である、血管腫症（hemangiomatosis）は、高い死亡率を有する。現在使用される治療法を用いて処置され得ない治療耐性血管腫が存在する。

【0563】

新脈管形成はまた、オースラーウエーバーランデュ病、つまり遺伝性出血性毛細管拡張症のような遺伝性疾患に見出される損傷についての原因である。これは、血管またはリンパ管の複数の小さな血管腫、腫瘍によって特徴付けられる遺伝疾患である。血管腫は、皮膚および粘膜に見出され、しばしば、鼻出血（鼻血）または胃腸出血によって、ならびにときどき肺および肝動静脈瘻を伴って生じる。

20

【0564】

新脈管形成はまた、生殖および創傷治癒のような通常の生理学的プロセスに関係する。新脈管形成は、排卵、およびまた、受精後の胞胚の着床において重要な工程である。新脈管形成の阻止により、排卵をブロックするために、または胞胚による着床を防止するために無月経を誘導し得る。創傷治癒において、過剰修復または線維増殖症は、外科手順の有害な副作用であり得、そして新脈管形成によって引き起こされ得るか、または悪化され得る。接着は、手術の頻繁な合併症であり、そして小腸閉塞症のような問題に導く。これは、本発明によって処置され得る。

30

【0565】

前述の疾患および障害の各々はまた、全てのタイプの腫瘍とともに、本発明に従う処置が考えられる。米国特許第5,712,291号は、本明細書において参考として詳細に援用されており、一旦脈管形成の障害が特定の因子を用いて示されれば、その因子などを用いる異常な脈管形成に関連する広範な疾患の処置は合理的に実行できるという当該分野における知識をさらに実証する。米国特許第6,524,583号はまた、同様の目的のために、そしてこの原理が抗体に基づく治療剤を用いる脈管形成の障害および血管形成性疾患の処置にあてはまるということを詳細に実証するために、本明細書において参考として詳細に援用される。従って、腫瘍保有マウスにおける3G4抗体（ATCC 4545）の血管新生阻害効果（図17A）は、3G4などの抗体が広範な血管形成性疾患を処置するために適切である重要な証拠である。

40

【0566】

本発明はさらに、PSまたは陰イオン性リン脂質がある役割を果たす他の疾患を処置するのにける使用のために提供される。例えば、PSは細胞接着、炎症性応答および敗血症ショックに関与するので、構築物、レセプターボディまたはベータボディが、炎症性および敗血症ショックの処置において用いられ得る。

【0567】

アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質、詳細にはPSはまた、鎌状赤血球貧血に、詳細にはクリアランス機構の一部として関与する。従って、構築物、レセプター

50

ボディまたはベータボディは、鎌状赤血球貧血を処置または緩和するために用いられ得る。本発明の構築物、レセプターボディまたはベータボディはまた、寄生虫疾患を処置するため、およびマラリアを処置するために使用され得る。

【0568】

P. 抗ウイルス処置方法

本発明はさらに、ウイルス感染を処置するのににおける使用のために、必要に応じて抗ウイルス剤に結合体化された、ある範囲の構築物を提供する。この処置レジメン、および詳細には用量は一般に、本発明のガン処置局面について上記されたとおりであって、この適応性は本発明全体の利点である。作用の特定の機構（単数または複数）の理解は、本発明の抗ウイルス処置を行なうのに必要ではないが、本明細書の実施例によって支持されたとおり、ウイルス処置の基礎にある特定の理由は以下のとおりである。

10

【0569】

最も重要な機構は、ウイルス複製および宿主細胞の活性化と関連していると考えられる。ウイルス感染の間、このウイルスは、細胞の内側での複製プロセスの間に細胞を活性化する。細胞活性化のこのプロセスは、ヘルペスウイルス、C型肝炎およびHIV-1について示されるとおり、ウイルス複製に必須である。ウイルスの発達は、ウイルスおよび宿主の両方の遺伝子発現を活性化する。例えば、PichindeウイルスおよびMachupoウイルスの複製は、複製周期後期でアクチノマイシンDによって阻害され、このことは宿主細胞遺伝子転写がウイルス複製の完成に必要なことを示す。

20

【0570】

ウイルスによる宿主細胞の活性化は、細胞の陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、例えばPSおよびPEを外面化させる。詳細には、本発明者らは、ウイルス活性化が細胞内へ Ca^{2+} 流入を生じ、これがスクランブラーゼを活性化して、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはPSおよびPEを外面化させると判断する。陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、好ましくはPSおよびPEに結合する抗体、ペプチド誘導体、および結合体は、次いで活性化プロセスに結合して、これを妨害し、これによってウイルスが適切に複製され得ることを妨げる。

【0571】

本実施例によって、本発明がウイルス感染の後期プロセスにおいて機能して、ウイルスの成熟または出現をブロックすることが示される。本発明者らの研究によって、本発明の因子の阻害性効果が広範に適用可能であることが示される。なぜなら、この因子は異なる発現機構を用いるウイルス上で作動することが示されているからである。例えば、本実施例は、ゴルジ由来開口分泌小胞から逃避するヘルペスウイルス（CMV）のブロック、ならびに原形質膜から直接出芽する、アレナウイルス（Pichindeウイルス）およびパラミクソウイルス（RSV）のブロックを実証する。

30

【0572】

ウイルス感染した細胞は、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはPSおよびPEを外面化させ、これは正常には細胞内であり、すなわち、原形質膜の内面に局限される。ウイルスの逃避の間、リン脂質は、逃避の部位で再分布して、これは原形質膜からのウイルスの出芽または開口分泌の間の膜屈曲に適合し、そして陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質が、このプロセスの間に外面化される。従って、本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体は、外面化した陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはPSおよびPEに結合して、感染した細胞からのウイルスの逃避をブロックする。ウイルス感染した細胞への本発明の構築物の結合も、本実施例に示される。

40

【0573】

本発明の構築物および結合体はさらに、外面化された陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはPSおよびPEに結合し得、そしてウイルス遺伝子発現および／または複製のために必要な1つ以上のシグナル伝達経路を妨げる。

【0574】

さらに、エンベロープのあるビリオン自体は、それらの外面に、陰イオン性リン脂質（

50

例えばP S)を有する可能性が高い。ウイルスは転位酵素を欠いて、リン脂質を対称に維持するかまたは修復するので、P SおよびP Eのようなリン脂質の連続的な露出が期待される。従って、本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体は、マクロファージのような宿主細胞によるオプソニン作用、補体結合、食作用および遊離のウイルス粒子の排泄を生じ得る。

【0575】

本発明のさらなる局面において、ウイルスは、感染および／または合胞体(synctitia)形成のためにアミノリン脂質を必要とするようである。本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体はさらに、アミノリン脂質に対する結合によってウイルスのライフサイクルのこれらの局面をブロックし得る。

10

【0576】

前述の洞察に従って、そして本実施例に照らして、本発明についてのウイルス処置のスペクトルは、エンベロープの有無、DNAまたはRNAにかかわらず、任意のウイルスに拡大する。本発明の陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合する抗体、ペプチド誘導体および結合体は少なくとも部分的には、細胞の内側のウイルス複製をブロックし、そして／または細胞からのウイルスの逃避を防止するので、本発明はエンベロープのあるウイルスのみの処置にも任意の特定のウイルスにも限定されず、これは重要な利点である。例えば、本発明に引き続いて公開された研究によって、アネキシンVおよびP SのビヒクルがマクロファージのH I V-1感染を阻害し得るが、T細胞のH I V-1感染も他のウイルス、例えば、水疱性口内炎ウイルスGおよびアンホトロピックマウス白血病ウイルスも阻害できないということが報告される(Callahanら、2003)。

20

【0577】

天然には、本発明の構築物および結合体は、エンベロープのあるウイルス上で、詳細には、P SおよびP Eの、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質を有するウイルスにおいて、エンベロープの外面上で作用し、ここでこの抗体、ペプチド誘導体および結合体は、ウイルスのクリアランスおよび／または標的細胞のウイルス進入の阻害を生じる。

【0578】

従って、本発明の重要な局面は、これが普遍的に適用可能であり、例えばバイオテロの一部として作製された、組み換えの、操作された、および合成のウイルスの処置に適切であるということである。実際、本発明は、動物およびヒトの処置には限定されない。ウイルス分類群において見出される宿主のカテゴリーとしては、藻類、古細菌、細菌、真菌、無脊椎動物、マイコプラズマ、植物、原生動物、スピロプラズマおよび脊椎動物が挙げられるので、本発明を用いて、農業で重要なウイルスを含む、任意のこのような設定におけるウイルス感染および複製を阻害することができる。脊椎動物におけるウイルス感染および関連の疾患の処置は現在好ましく、そして脊椎動物に感染する、表Hのウイルスのうちの任意の1つ以上が、本発明を用いて阻害され得、そして生じた感染が処置され得る。

30

【0579】

表H

脊椎動物のウイルス

【0580】

40

【表 2 3 - 1】

科	属	種のタイプ
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i> <i>Aviadenovirus</i> <i>African Swine Fever-like Viruses</i>	<i>Human adenovirus 2</i> <i>Fowl adenovirus 1</i> <i>African swine fever virus</i>
<i>Arenaviridae</i>	<i>Arenavirus</i> <i>Arterivirus</i>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i> <i>Equine arteritis virus</i>
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus</i>	<i>Human astrovirus 1</i>
<i>Birnaviridae</i>	<i>Aquabirnavirus</i> <i>Avibirnavirus</i>	<i>Infectious pancreatic necrosis virus</i> <i>Infectious bursal disease virus</i>
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i> <i>Hantavirus</i> <i>Nairovirus</i> <i>Phlebovirus</i>	<i>Bunyamwera virus</i> <i>Hantaan virus</i> <i>Nairobi sheep disease virus</i> <i>Sandfly fever Sicilian virus</i>
<i>Caliciviridae</i>	<i>Calicivirus</i>	<i>Vesicular exanthema of swine virus</i>
<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>	<i>Chicken anemia virus</i>
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i> <i>Torovirus</i> <i>Deltavirus</i>	<i>Avian infectious bronchitis virus</i> <i>Berne virus</i> <i>Hepatitis delta virus</i>
<i>Filoviridae</i>	<i>Filovirus</i>	<i>Marburg virus</i>
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i> <i>Pestivirus</i> <i>Hepatitis C – like viruses</i>	<i>Yellow fever virus</i> <i>Bovine diarrhea virus</i> <i>Hepatitis C virus</i>
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthophepadnavirus</i> <i>Avihepadnavirus</i>	<i>Hepatitis B virus</i> <i>Duck hepatitis B virus</i>
<i>Herpesviridae</i> Subfamily <i>Alphaherpesvirinae</i> Subfamily: <i>Betaherpesvirinae</i> Subfamily <i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i> <i>Varicellovirus</i> <i>Cytomegalovirus</i> <i>Muromegalovirus</i> <i>Roseolovirus</i> <i>Lymphocryptovirus</i> <i>Rhadinovirus</i>	<i>Human herpesvirus 1</i> <i>Human herpesvirus 3</i> <i>Human herpesvirus 5</i> <i>Mouse cytomegalovirus 1</i> <i>Human herpesvirus 6</i> <i>Human herpesvirus 4</i> <i>Ateline herpesvirus 2</i>
<i>Iridoviridae</i>	<i>Ranavirus</i> <i>Lymphocystivirus</i> <i>Goldfish virus – like viruses</i>	<i>Frog virus 3</i> <i>Flounder virus</i> <i>Goldfish virus 1</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A, B</i> <i>Influenzavirus C</i> <i>Thogoto-Like viruses</i>	<i>Influenza A virus</i> <i>Influenza C virus</i> <i>Thogoto virus</i>
<i>Papovaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i> <i>Papillomavirus</i>	<i>Murine polyomavirus</i> <i>Cottontail rabbit papillomavirus</i> <i>(Shope)</i>

10

20

30

【表 2 3 - 2】

科	属	種のタイプ
<i>Paramyxoviridae</i> Subfamily <i>Paramyxovirinae</i>	<i>Parayxovirus</i> <i>Morbillivirus</i> <i>Rubulavirus</i>	<i>Human parainfluenza virus 1</i> <i>Measles virus</i> <i>Mumps virus</i>
Subfamily <i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	<i>Human respiratory syncytial virus</i>
<i>Parvoviridae</i> Subfamily <i>Parovirinae</i>	<i>Parvovirus</i> <i>Erythrovirus</i> <i>Dependovirus</i>	<i>Mice minute virus</i> <i>B19 virus</i> <i>Adeno-associated virus 2</i>
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Hepatovirus</i> <i>Cardiovirus</i> <i>Aphthovirus</i>	<i>Poliovirus 1</i> <i>Human rhinovirus 1A</i> <i>Hepatitis A virus</i> <i>Encephalomyocarditis virus</i> <i>Foot-and-mouth disease virus O</i>
<i>Poxviridae</i> Subfamily <i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i> <i>Parapoxvirus</i> <i>Avipoxvirus</i> <i>Capripoxvirus</i> <i>Leporipoxvirus</i> <i>Suipoxvirus</i> <i>Molluscipoxvirus</i> <i>Yatapoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i> <i>Orf virus</i> <i>Fowlpox virus</i> <i>Sheeppox virus</i> <i>Myxoma virus</i> <i>Swinepox virus</i> <i>Molluscum contagiosum virus</i> <i>Yaba monkey tumor virus</i>
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i> <i>Orbivirus</i> <i>Rotavirus</i> <i>Coltivirus</i> <i>Aquareovirus</i>	<i>Reovirus 3</i> <i>Bluetongue virus 1</i> <i>Simian rotavirus SA11</i> <i>Colorado tick fever virus</i> <i>Golden shiner virus</i>
<i>Retroviridae</i>	<i>Mammalian type B retroviruses</i> <i>Mammalian type C retroviruses</i> <i>Avian type C retroviruses</i> <i>Type D retroviruses</i> <i>Blv-htlv retroviruses</i> <i>Lentivirus</i> <i>Spumavirus</i>	<i>Mouse mammary tumor virus</i> <i>Murine leukemia virus</i> <i>Avian leukosis virus</i> <i>Mason-Pfizer monkey virus</i> <i>Bovine leukemia virus</i> <i>Human immunodeficiency virus 1</i> <i>Human spumavirus</i>
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i> <i>Lyssavirus</i> <i>Ephemerovirus</i>	<i>Vesicular stomatitis Indiana virus</i> <i>Rabies virus</i> <i>Bovine ephemeral fever</i>
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i> <i>Rubivirus</i>	<i>Sindbis virus</i> <i>Rubella virus</i>

哺乳動物におけるウイルス感染および関連に疾患を処置するのににおける本発明の使用が、詳細には貴重であるかまたは価値のある動物、例えば、競走馬および家庭用ペット、ならびにヒトの消費のための食品を直接生産するために（例えば、肉）または間接的に生産するために（例えば、乳および卵）用いられる動物および鳥類に関して、好ましい。ヒト処置に加えて、本発明の例示的な実施形態としては、ウマ、イヌ、ネコなどの処置；ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、バイソン、ラマ、シカ、オオジカ、および他の大型動物、ならびに仔ウシおよび仔ヒツジを含む、その若齢動物の処置が挙げられる。

【0582】

天然に存在するウイルスについてか、またはバイオテロによって作製されるウイルスについてかにかかわらず、ヒトの処置は、特に好ましい。天然に存在するウイルスおよび生

じた疾患に関して、本発明はここでもその適用において限定されない。従って、表Jにおけるウイルスの任意の1つ以上が本発明を用いて阻害され得、これによってその得られた感染および疾患が処置され得る。

【0583】

表J

ヒトにおけるウイルス疾患

【0584】

【表24-1】

疾患	ウイルス	ウイルスのタイプ
AIDS	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	<i>Retrovirus</i>
気管支炎およびウイルス肺炎	呼吸器合胞体ウイルス	<i>Paramyxovirus</i>
気管支炎	パラインフルエンザウイルス	<i>Paramyxovirus</i>
子宮頸癌	ヒトパピローマウイルス	<i>Papovavirus</i>
水疱瘡	水痘帯状疱疹ウイルス	<i>Herpesvirus</i>
デング	デングデング	<i>Flavivirus</i>
エボラ出血熱	エボラウイルス	<i>Filovirus</i>
生殖器ヘルペス	単純ヘルペスウイルス-2	<i>Herpesvirus</i>
ハンタウイルス出血熱	ハンタウイルス	<i>Bunyavirus</i>
肝炎	A型肝炎	<i>Picornavirus</i>
	B型肝炎	<i>Hepadavirus</i>
	C型肝炎	<i>Flavivirus</i>
	D型肝炎	<i>Deltavirus</i>
	E型肝炎	<i>Calcivirus</i>
インフルエンザ	インフルエンザA、BおよびC	<i>Orthomyxovirus</i>
フニン・アルゼンチン出血熱	フニンウイルス(Junin virus)	<i>Arenavirus</i>
ラッサ出血熱	ラッサウイルス	<i>Arenavirus</i>
マチュポ出血熱	マチュポウイルス	<i>Arenavirus</i>
麻疹(はしか)	麻疹ウイルス	<i>Paramyxovirus</i>
単核細胞症	エプスタインバーウイルス	<i>Herpesvirus</i>
CMV疾患(ウイルス肺炎、単核細胞症様症候群)	サイトメガロウイルス	<i>Herpesvirus</i>
重症急性呼吸器症候群(SARS)	ヒトコロナウイルス	<i>Coronavirus</i>
帯状疱疹	水痘帯状疱疹ウイルス	<i>Herpesvirus</i>
天然痘	天然痘ウイルス	<i>Poxvirus</i>
黄熱病	黄熱病ウイルス	<i>Flavivirus</i>
西ナイル病	西ナイルウイルス	
西部ウマ脳症	西部EEウイルス	<i>Togavirus</i>
肺炎、肝炎、急性呼吸器疾患	アデノウイルス	<i>Adenovirus</i>

10

20

30

40

50

【0585】

【表24-2】

疾患	ウイルス	ウイルスのタイプ
胃腸炎	ロタウイルス	<i>Rotavirus</i>
脳炎	セムリキ森林熱ウイルス	<i>Alphavirus</i>
牛痘	ワクシニアウイルス	<i>Poxvirus</i>
脳炎	ベネズエラEE	<i>Alphavirus</i>
髄膜炎、脳炎、髄膜脳炎	リンパ球性脈絡髄膜炎	<i>Arenavirus</i>
ベネズエラ出血熱	グアナリトウイルス	<i>Arenavirus</i>
リフトバレー熱(出血熱、脳炎)	リフトバレー熱ウイルス	<i>Bunyavirus</i>
マーブルグ出血熱	マーブルグウイルス	<i>Filovirus</i>
ダニ媒介性脳炎	ダニ媒介性脳炎ウイルス(TB EV)	<i>Flavivirus</i>
脳炎	ヘンドラウイルス	<i>Paramyxovirus</i>
脳炎	ニパウイルス	<i>Paramyxovirus</i>
クリミア・コンゴ出血熱	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	<i>Bunyavirus</i>
ブラジル出血熱	サビアウイルス	<i>Arenavirus</i>

本発明は詳細には、CMV関連疾患、例えば、ウイルス性肺炎、単球細胞症関連の先天性奇形（難聴および精神遅延）；気管支炎およびウイルス性肺炎、インフルエンザ、感冒およびSARSを含む、呼吸器疾患、例えばRSVによって生じる疾患；AIDS；肝炎；ウイルス感染に関連するガン；単球細胞症；および天然痘の処置における使用が考慮される。

【0586】

他の実施形態では、本発明者らは詳細には、ヒトにおいて病原性である、アレナウイルスの阻害を意図する。アレナウイルスとしては、ラッサ熱（ラッサウイルス）およびリンパ球性脈絡髄膜炎（LCMV）の原因である旧世界ウイルスが挙げられる。ラッサ熱は、西アフリカにおいて風土性であって、1年に300,000人におよぶ人が罹患し、3000例に及ぶ死亡が生じる。ラッサ熱での感染は、約10日内で熱および倦怠感を生じる。腹部疼痛、悪心、嘔吐および下痢が一般的である。咽頭炎および咳も発症し得る。神経学的症状は一般に軽度である。さらに重篤な場合には、血管漏出症候群、例えば、浮腫および胸水が存在する。患者のほぼ四分の一で出血がみられる。この疾患は、心血管系の変化を生じ得、ついにはショックおよび死亡に至る。

【0587】

アレナウイルスはまた、アルゼンチン出血熱（フニンウイルス）、ボリビア出血熱（マチュポウイルス）およびベネズエラ出血熱（グアナリトウイルス）の原因である、抗原的に異なる新世界ウイルスを含む、そのようなウイルスである。これらのウイルスの全てが、潜在的なバイオテロ兵器のCDCカテゴリーAのリストにある。

【0588】

抗腫瘍実施形態に適切な用量はまた、抗ウイルス処置に適切である。同様に、複数回の投与が慢性の感染に用いられ得、そして高用量が急性の感染に用いられ得る。ここでもガン処置局面に開示されるように、IV、IM、SC、肺または気道に対するエアロゾルとしてなど、を含む、任意の適切な経路の投与が使用され得る。

【0589】

本発明によって提供される治療剤は、広範なスペクトルの抗ウイルス活性を有する有用な因子である。多数の致命的なウイルスに対して有効であることに加えて、この因子はまた、ウイルスの正確な性質が未知である設定でさえ、ウイルスに対する曝露後に投与され得る。従って、本発明の抗ウイルス治療剤は、特定のワクチンの開発、生成または送達に伴う時間および費用とは著しく対照的に、病原体の同定と治療の送達との間に長時間を要さない。

【0590】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明者によって本発明の実施において十分に機能することが発見された技術を示し、したがって、その実施のための好ましい様式を構成すると考えられ得ることが当業者によって理解されるべきである。しかし、当業者は本開示に照らして、多くの変化が、開示されている特定の実施形態においてなされ得、さらには類似または同様の結果が本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく獲得可能であるということを理解すべきである。

【実施例】

【0591】

実施例1

(抗VCAM-1-tTFコアグリガンドを用いた腫瘍処置)

本実施例は、腫瘍保有動物に対する腫瘍脈管標的化凝固因子(「コアグリガンド(c o a g u l i g a n d)」)の投与後に生じるインビボにおける腫瘍脈管構造の特異的な凝固、および得られた抗腫瘍効果を示す。このコアグリガンドでは、VCAM-1(血管内皮接着分子-1、VCAM-1)に対する抗体を、腫瘍脈管構造に対して改変型のヒト凝固因子である短縮型組織因子(truncated Tissue Factor)(tTF)を送達するための標的因子として用いる。

【0592】

マウスVCAM-1に対するラットIgG₁抗体を分泌するMK2.7ハイブリドーマを、American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD; ATCC CRL 1909)から入手した。マウスウイルススタンパク質p30 gagに対するラットIgG₁抗体を分泌するR187ハイブリドーマをまた、ATCCから入手して、抗VCAM-1抗体についてのアイソタイプマッチングしたコントロールとして用いた。

【0593】

皮下のL540ヒトホジキン腫瘍を保有するマウス由来の主な器官および腫瘍の血管を、抗VCAM-1抗体を用いてVCAM-1発現について免疫組織化学的に検査した。陽性コントロールとして用いた抗エンドグリン抗体MJ7/18によって染色した総腫瘍血管のうち20~30%で、全体的に、VCAM-1発現が観察された。腫瘍保有動物および正常動物の両方において、心臓および肺において、VCAM-1の構成的な血管発現が見出された。VCAM-1発現が厳密に血管外である精巣では、強力な間質染色が観察された。

【0594】

皮下のL540腫瘍を保有するマウスに、抗VCAM-1抗体を静脈内注射して、2時間後にこのマウスを放血させた。この腫瘍および正常な器官を取り出して、凍結切片を調製して、免疫組織化学的に検査して抗体の位置を決定した。抗VCAM-1抗体は、腫瘍、心臓および肺の内皮細胞で検出された。染色は特異的であった。なぜなら、内皮の染色は、無関係の特異性の種アイソタイプマッチングした抗体であるR187を注射したマウスの腫瘍および器官において観察されたからである。抗VCAM-1抗体の局在化は、精巣でも心臓および肺以外のどの正常な器官でも見出されなかった。

【0595】

抗VCAM-1・tTF結合体または「コアグリガンド」を、短縮された組織因子(t

10

20

30

40

50

T F) を用いて調製した。抗 V C A M-1・t T F コアグリガン드의静脈内投与によって、腫瘍保有マウスにおいて、正常な組織における血管と対比して、腫瘍血管の選択的な血栓症が誘導される。

【0596】

0.4~0.6 cm の直径の皮下 L 5 4 0 腫瘍を保有するマウスに抗 V C A M-1・t T F コアグリガン드를投与した。コアグリガンド注射の前には、腫瘍は正常であって、均一な形態を有して壊死の領域はなかった。腫瘍は十分に血管新生されて、自発的な血栓症血管も出血も全くなかった。コアグリガンド注射の4時間内に、腫瘍血管のうち最初の染色はわずか20~30%にもかかわらず、40~70%の血管が血栓症になった。血栓症になった血管は、閉塞性の血小板凝集体、充填された赤血球およびフィブリンを含んだ。いくつかの領域では、血管は、腫瘍間質内に破裂した流出している赤血球を有した。

10

【0597】

コアグリガンド注射の24時間後まで、血管は閉塞されたままであって、過度の出血が腫瘍全体にわたって広がった。腫瘍細胞は、お互いから分離され、濃縮された核を有し、そして細胞溶解を被った。72時間まで、進行した壊死が、腫瘍全体にわたって明白であった。最初のコアグリガンド誘導性トロンビン沈着は、中枢の血管における V C A M-1 標的抗原の誘導の増大をもたらし、これによって標的化および腫瘍破壊の増幅が得られる可能性が高い。

【0598】

腫瘍血管上での抗 V C A M-1・t T F の血栓性作用は、抗原特異的である。等量で投与したコントロール試薬では (t T F 単独、抗 V C A M-1 抗体単独、t T F に加えて抗 V C A M-1 抗体または無関係な特異性のコントロールのコアグリガンド) 血栓を生じなかった。

20

【0599】

腫瘍血管の血栓に加えて、本研究によってまた、抗 V C A M-1・t T F コアグリガンズの静脈内投与が、正常な器官で血管の血栓を誘導しないことが示される。正常なマウスまたは L 5 4 0 腫瘍保有マウスの心臓および肺における血管での V C A M-1 の発現にかかわらず、抗 V C A M-1・t T F コアグリガンド投与後に血栓は生じなかった。4時間前でも24時間前でも、5~45 μ g のコアグリガンズを注射した25匹のマウスでは、血栓、組織障害、形態の変化の兆候はどれも見られなかった。同じマウス由来の心臓および肺の正常な組織学的外見は、大きい腫瘍血栓を有した。全ての他の主な器官 (脳、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、小腸、精巣) もまた、形態の変化を有さなかった。

30

【0600】

コアグリガンズ処置マウス由来の器官および腫瘍の凍結切片は、抗 T F 抗体 1 0 H 1 0、または抗ラット I g G 抗体のいずれで発色した場合でも同時発生的な染色パターンを有し、これによってこのコアグリガンズが心臓、肺および腫瘍における血管に局在することが確認された。染色の強度は、コアグリガンズが高濃度で直接切片に適用され、続いて抗 T F または抗ラット I g G のいずれかでの発色された場合に見られるものと同じであって、このことは結合の飽和がインビボで保持されていたことを示した。

【0601】

これらの研究によって、心臓および肺における正常な脈管構造での V C A M-1 に対するコアグリガンズの結合は、血栓を誘導するほど有意ではないこと、そして腫瘍脈管構造は、コアグリガンズを支持するためのさらなる因子を提供することが示される。

40

【0602】

0.3~0.4 cm^3 の L 5 4 0 腫瘍を保有する S C I D マウスにおいて、抗 V C A M-1・t T F コアグリガンズの抗腫瘍活性を決定した。4日の間隔で静脈内に3回、この薬物を投与した。抗 V C A M-1 処置したマウスの平均腫瘍容積は、他の全ての群に比較して21日の処置で有意に ($P < 0.001$) 低下した。特定のコアグリガンズで処置した全部で15匹のマウスのうち9匹が、腫瘍容積の50%より大きい低下を示した。この効果は特異的であった。なぜなら、未結合の t T F、コントロール I g G コアグリガンズ

50

、ならびに遊離の抗 V C A M - 1 抗体および t T F の混合物は腫瘍増殖に影響しなかったからである。

【0603】

実施例 I I

腫瘍血管上のホスファチジルコリン発現

心臓および肺における V C A M - 1 陽性脈管構造上の抗 V C A M - 1 ・ t T F の血栓性効果の欠失を説明するために、正常な血管と腫瘍血管との間の異なるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えば、P S および P E の局在化という本発明者らの発展させた概念を確認した。詳細には、彼らは、正常な組織における内皮細胞が、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えば P S および P E を、原形質膜のリン脂質二重相の内面に分離して、ここで P S は血栓性反応に関与することができないが；一方、腫瘍の内皮細胞は、原形質膜の外面对してアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を転位させ、ここで P S はコアグリガンドの凝固作用を支持し得るという仮説をたてた。細胞表面での P S 発現によって、凝固が可能になる。なぜなら、P S 発現によって、膜に対する凝固因子の結合が可能になり、凝固開始複合体のアセンブリが協調されるからである。

10

【0604】

腫瘍血管内皮細胞の表面に対するアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質転位の本発明者らのモデルは、本明細書において開発されたとおり、P S 発現が細胞死の後に生じず、そして必然的に細胞死を誘発しないという点で驚くべきである。従って、腫瘍上皮細胞表面でのアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えば P S および P E が、治療介入のための標的可能な実体として機能することを可能にするのに十分安定である。

20

【0605】

腫瘍血管内皮細胞が、原形質膜の管腔表面上で P S を発現するという仮説を確認するために、本発明者らは、以下の免疫組織化学研究を用いて、L 5 4 0 腫瘍保有マウスへの静脈内注射後の抗 P S 抗体の分布を決定した。

【0606】

A. 方法

両方ともマウスのモノクローナル I g M 抗体である、抗 P S 抗体および抗カルジオリピン抗体を、実施例 I V に記載のとおり、R o t e ら（1993、本明細書において参考として援用される）によって生成して、特徴付けした。3 S B の主な反応性は P S との反応であるが、3 S B はまた、正常な細胞における内部小葉部分に緊密にやはり分離される原形質膜の比較的少ない成分である、陰イオン性リン脂質、ホスファチジン酸との反応性も有する。

30

【0607】

L 5 4 0 腫瘍保有マウスに、抗 P S または抗カルジオリピンマウス I g M 抗体のいずれか 20 μ g を i v 注射した。10 分後、マウスを麻酔して、その血液循環をヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。腫瘍組織および正常組織を取り出して、急速凍結させた。器官および腫瘍の連続切片を、抗 P S 抗体の検出のために H R P 標識抗マウス I g M を用いるか、または抗 V C A M - 1 抗体、続いて H R P 標識抗ラット I g を用いて染色した。

40

【0608】

凍結された切片上で膜リン脂質を保存するために、以下のプロトコールを開発した。2 . 5 m M C a ²⁺ を含有する D P B S を用いて動物を灌流させた。組織を 3 - アミノプロピルトリエトキシシランでコーティングしたスライド上に装填して、24 時間染色した。スライドの固定にも洗浄にも、有機溶媒、ホルムアルデヒド、界面活性剤は用いなかった。2 . 5 m M C a ²⁺ および 0 . 2 % ゼラチンを含有する D P B S によってスライドを再水和した。同じ溶液をまた用いて、切片を洗浄して過剰の試薬を除去した。H R P 標識した抗マウス I g M を用いて、室温で 3 . 5 時間切片をインキュベートして、抗 P S I g M を検出した。

【0609】

50

B. 結果

この免疫組織学研究によって、抗 P S 抗体は、V C A M-1 を欠き得る腫瘍の中央領域の血管を含むほとんどの腫瘍血管に 10 分以内で局在したことが示された。V C A M-1 が陽性であった血管はまた P S についても陽性であった。従って、腫瘍における V C A M-1 発現血管上では P S の同時発現が存在する。

【0610】

インビボの局在化研究において、心臓および肺の V C A M-1 陽性脈管構造を含む正常な器官では染色された血管はなく、このことは内皮細胞の外部表面からは P S が欠けていることを示す。対照的に、正常な組織および腫瘍の切片をインビトロで抗 P S 抗体を用いて直接染色した場合、正常な組織と腫瘍、内皮または他の細胞タイプとの間には相違はみられず、このことは P S がこれらの細胞内に存在するが、腫瘍の内皮細胞の表面でのみ発現されたことを示す。

10

【0611】

P S 検出の特異性は、2つの独立した研究によって確認された。第一に、示差的に負に荷電された脂質、カルジオリピンに対するマウス I g Mモノクローナル抗体は、インビボで腫瘍にもどの器官にも存在しなかった。第二に、アセトンを用いた凍結切片の事前処置は、おそらく結合した抗 P S 抗体と一緒に脂質を抽出したという理由によって、抗 P S 抗体を用いた染色を無効にした。

【0612】

実施例 I I I

アネキシン V はコアグリガンド活性をブロックする。

20

【0613】

本実施例によって、インビトロおよびインビボにおける P S 機能をブロックする、高い親和性の P S 結合リガンド、アネキシン V を用いる研究から、コアグリガンド活性における表面 P S 発現の役割のさらなる証拠が得られる。

【0614】

(A. アネキシン V は第 X 因子のインビトロでのコアグリガンド活性化をブロックする)

アネキシン V がコアグリガンドによって誘導される第 X a 因子形成に影響を与える能力を、色素生産性アッセイによって決定した。I L-1 α 刺激した b E n d. 3 細胞を、抗 V C A M-1 $\cdot$ t T F とともにインキュベートし、そしてサポニンで透過化処理した。アネキシン V を、0.1 ~ 10 μ g / m l の範囲の濃度で添加し、そして細胞を、希釈した P r o l e x T の添加前に 30 分間インキュベートした。アネキシン V の存在下または非存在下で生成した第 X a 因子の量を、決定した。各処置を 2 連で行い、そして少なくとも 2 回繰り返した。

30

【0615】

コアグリガンド作用における表面 P S 発現の必要性はさらに、アネキシン V (これは、高親和性で P S に結合する) が、b E n d. 3 細胞に結合される抗 V C A M-1 $\cdot$ t T F がインビトロで第 X a 因子を生成する能力をブロックするという本発明者らの発見によって示される。

40

【0616】

抗 V C A M-1 $\cdot$ t T F とともにプレインキュベートされた、透過化処理された細胞に添加されたアネキシン V は、用量依存性様式で第 X a 因子の形成を阻害した (図 3)。アネキシン V の非存在下で、細胞結合コアグリガンドは、60 分、10,000 細胞あたり 95 n g の第 X a 因子を産生した。漸増量のアネキシン V (1 m l あたり 1 μ g の範囲で) の添加は、第 X a 因子の産生を阻害した。1 m l あたり 10 μ g では、アネキシン V は、第 X a 因子の産生を 58 % 阻害した。アッセイの間のアネキシン V の濃度の増加によるさらなる阻害は観察されず、このことは、アネキシン V が、1 m l あたり 10 μ g で全ての利用可能な結合部位を飽和したことを示す。

【0617】

50

(B. : アネキシンVはインビボでコアグリガンド活性をブロックする)

アネキシンVのインビボでコアグリガンド誘導性血栓症を阻害する能力を、L540ホジキン腫保有SCIDマウスにおいて試験した。腫瘍を、上記の実施例IIに記載のようにマウスにおいて増殖させた。1群あたり2匹のマウス(直径0.5cmの腫瘍サイズ)を、以下の試薬のいずれか1つで尾静脈を介して静脈内注射した: a) 生理食塩水; b) 100gのアネキシンV; c) 40μgの抗VCAM-1・tTF; d) 100μgのアネキシンV、続いて2時間後に40μgの抗VCAM-1・tTF。

【0618】

最後の注射の4時間後、マウスを麻酔し、そしてヘパリン化生理食塩水で灌流した。腫瘍を取り出し、4%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、そしてヘマトキシレン-エオシンで染色した。血栓が形成された血管および血栓が形成されていない血管の数を計数し、そして血栓の割合を算出した。

10

【0619】

アネキシンVはまた、インビボでの抗VCAM-1・tTFコアグリガンドの活性をブロックする。腫瘍保有マウスの群を、方法に記載の通りに、コントロールまたは試験試薬の1つで処置した。マウスに以下を与えた: (a) 生理食塩水; (b) 100gのアネキシンV; (c) 40μgの抗VCAM-1・tTFコアグリガンド; または (d) 100のアネキシンV、続いて2時間後に40μgの抗VCAM-1・tTFコアグリガンド。同一の結果が、1群あたり両方のマウスで得られた。

20

【0620】

自発的な血栓、出血または壊死は、生理食塩水を注射したマウス由来の腫瘍において観察されなかった。アネキシンV単独での処置は、腫瘍形態を変更しなかった。

【0621】

本明細書中で示される他のデータによれば、40μgの抗VCAM-1・tTFコアグリガンドは、全腫瘍血管の70%において血栓を生じた。血管の大部分は固まった赤血球および血餅で閉塞し、そして腫瘍細胞は互いに分離した。コアグリガンド誘導性抗腫瘍効果(すなわち、静脈内血栓)および腫瘍細胞形態における変化の両方は、マウスをアネキシンVで前処置することによって完全に消失した。

【0622】

これらの知見は、コアグリガンドの抗腫瘍効果が、腫瘍脈管構造の妨害によって媒介されることを確認する。これらのデータはまた、PSが、インビボでのコアグリガンド誘導性血栓に必須であることを実証する。

30

【0623】

実施例IV

アミノリン脂質、陰イオン性リン脂質および複合体に対する抗体の生成

本実施例は、腫瘍血管内皮細胞におけるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の転位に対するその観察に照らして、本発明者らによって設計された、そしてアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の転位に対する抗体の生成において十分に機能するように開発された、免疫プロトコルを記載する。アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えばPSおよびPEと反応性の多数の抗体が得られた。本実施例および以下の実施例において、簡便性のために、PSと反応性の抗体を「抗PS抗体(anti-PS antibody)」と命名してもよいが、特定のこれらの抗体の結合はPSには限定されず、本明細書に示されるような特定の他のアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に拡大される。

40

【0624】

A. 免疫プロトコル

さらに強力な免疫原として免疫系にアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を提示するために、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を、アミノリン脂質陽性細胞および陰イオン性リン脂質陽性細胞として処方した。他の膜成分によって囲まれる、膜に挿入されたアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質は、抗体を惹起するためのさらに良好な構

50

成およびクリアランス速度を有する。

【0625】

この意図は、この例ではPSで例示されるようなアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を発現する自家の細胞を用いて免疫コンピテントな動物を免疫することであって、ここでこの動物は、全ての自己表面抗原に対して抗体を生成しないが、膜露出リン脂質、例えばPSを外來の要素として認識する。この手順は、任意のアミノリン脂質陽性細胞および陰イオン性リン脂質陽性細胞を用いる、任意の標準的な実験動物、例えば免疫コンピテントなBALB/cマウスおよびルイス（Lewis）ラットの使用に適用可能である。

【0626】

BALB/cマウスおよびマウス内皮細胞bEnd. 3（不死化マウス（BALB/c株）内皮細胞）を最初に選択した。10%CO₂インキュベーター中で、9ml/500ml HEPES緩衝液を含有する10%DMEM中でbEnd. 3を培養した。所望の細胞が得られるまで、bEnd. 3細胞をT175 TCフラスコ中で増殖させた。代表的には、各々のフラスコは、約70～80%コンフルエンスで、約 3×10^6 個の細胞を有し、そして各々のマウスには、 1×10^6 個～ 2.0×10^6 個の細胞、 1×10^7 個におよぶ細胞をあたえなければならない。

【0627】

bEnd. 3細胞を50μM～200μMの過酸化水素を用いて1または2時間37℃で処理して、免疫の前に陰イオン性リン脂質、例えばPSを曝す。H₂O₂のストックは、[9.8M]；30%（v/v）である。これを1：1000に希釈して、次いで0.4mlを、40mlの培地を含むT175 TCフラスコ中に100μMのH₂O₂の最終濃度まで添加する。細胞を37℃で1時間維持した。回収のために、細胞を、暖かいPBS+10mM EDTAを用いて3×洗浄して、培地中の全てのBSAまたは血清タンパク質を除いた。穏やかなトリプシン処理によって細胞を取り外して、洗浄し、1000rpmで5分間遠心分離した。この上清を吸引して、適切な容積まで添加することなく細胞をDMEMに再懸濁して（各々のマウスは約 1×10^7 個の細胞を含む200μlを投与される）、氷上で保持した。

【0628】

この方式で処理した細胞を、1mlのシリンジおよび23ゲージの針を用いて各々のマウスの腹腔内に注射した（200μlの細胞懸濁液）。3～4週間の間隔で3～7回マウスを免疫した。第二のブースト（追加免疫）から開始して、各々のブーストの10日後、マウスを放血することによって免疫血清を収集した。抗PSについての血清力価をELISAによって試験した。

【0629】

自家のPS陽性細胞を用いたこれらの免疫では、自己抗体の非制限的な産生は生じなかったが、PSと反応性であるか、他のアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質と組み合わせてPSと反応性である抗体の産生に限定された。

【0630】

別の研究では、200μMの過酸化水素を用いて2時間処置したbEnd. 3内皮細胞を用いて雌性のルイス（Lewis）ラットを免疫した。この処置によって、¹²⁵I標識されたアネキシンVによって検出した場合、70～90%の細胞において外面に対する陰イオン性リン脂質の転位が生じた。処置した細胞を洗浄して脱離させて、カウントした。2百万個の細胞を滅菌PBSに再懸濁して、注射の間、3週間の間隔で5回腹腔内注射した。陰イオン性リン脂質に対するポリクローナル抗体の力価を、各々の免疫の2日後に決定した。

【0631】

B. 高力価の抗血清

陰イオン性リン脂質、例えばPSと反応性の抗体の極度に高い力価を有するマウスを得た（表1）。マウスは、なんら毒性の兆候を示さなかった。この免疫プロトコールは、ラット全体よりもマウスで有効であったが、ラットの免疫は、有効であって、9D2抗体が

10

20

30

40

50

産生された（以下を参照のこと）。

【0632】

表1

抗PS IgG抗体生成

【0633】

【表1】

力価範囲	1群あたりのマウスの数 (全体のうちの%)
1:100 - 1:1,000	2/30 (6.66 %)
1:1000 - 1:10,000	5/30 (16.6 %)
1:10,000 - 1:100,000	18/30 (60 %)
1:100,000 - 1,000,000	5/30 (16.6 %)

10

さらなる免疫において、種々のマウスを、過酸化水素処理b E n d. 3細胞を用いて3回免疫して、その血清を最初の免疫の54日後に試験した。血清内のPSと反応性のIgG抗体を、抗マウスIgG、Fc特異的二次抗体を用いて検出して、血清内のIgM抗体を抗マウスIgGμ特異的二次抗体を用いて検出した。PSと反応性のIgGおよびIgM抗体を有する多数の有効な抗血清を、この免疫プロトコルを用いて得たが、そのうちIgG抗体を有する抗血清が一般に有効であった。

20

【0634】

これらの方法をここで用いて、例えば、以下に記載の3G4抗体との効率的な競合についてスクリーニングされた抗PS抗体を含む、さらなる特定の抗PS抗体を生成することができる。代表的には、PSについての所望の抗血清のIgG力価が200,000を上回ったが、PC力価は50,000未満である場合、モノクローナル抗体を生成するために融合が実施され得る。

【0635】

また、これらの方法は、H₂O₂を用いた最初の細胞処置に限定されない。なぜなら、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現を誘導する他の方法が用いられてもよいからである。例えば、TNFおよびアクチノマイシDでの処置は、別の有用な方法である。1例では、サブコンフルエント（約85%コンフルエンス）のb E n d. 3細胞を、10ng/mlのマウスTNFおよび1μg/mlのアクチノマイシDを用いて37℃で16時間、インキュベーター中で処置した。次いで、上記の概要のような免疫手順を通じて細胞を採取した。

30

【0636】

C. IgGおよびIgMモノクローナル抗体

免疫した動物由来の脾細胞とミエロマパートナーP3X63AG8.653細胞(ATCC, Rockville, MD)とを融合することによってハイブリドーマを得た。

【0637】

腫瘍処置において有用なモノクローナル抗体を調製するための本発明者らの技術の重要な局面は、選択戦略であり、これはアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合するが、中性のリン脂質には結合しない抗体を選択するためのスクリーニングの工程を包含する。別の重要な局面は、血清の非存在下で、血清の存在下と同様に強力に、PSコーティングしたプレートに結合する抗体を選択することである。これは、抗リン脂質症候群を生じるかまたはそれに寄与すると考えられる、PSおよび血清タンパク質の複合体を認識する抗体を排除するために行なわれる。

40

【0638】

例えば、PSと反応性のモノクローナル抗体を単離するための戦略は、抗マウスIgG、Fcγ特異的二次抗体を用いて、PSコーティングプレート上のハイブリドーマ上清をスクリーニングする工程を包含した。スクリーニングを最初に、4つのリン脂質

50

(P S, ホスファチジルセリン; P E, ホスファチジルエタノールアミン; C L, カルジオリピン; および P C, ホスファチジルコリン) ならびに b E n d 3 細胞に対して行なった。中性のリン脂質、P C と反応性のクローンを、b E n d 3 細胞と非反応性のクローンと同様に破棄した。高い結合の抗 P S クローンを選択した。P S のみに反応性、または P S について強力な優先度を有するウェルを最初にサブクローニングして、他の陰イオン性リン脂質に対する結合と組み合わせた P S 反応性を示すウェルを二番目にサブクローニングした。

【0639】

以下の特定の研究においては、R o t e ら (1993) によって記載されたように生成された 3 S B、D 1 1 および B A 3 と命名されたマウスモノクローナル I g M 抗体もまた含まれた。3 S B 抗体は、抗 P S 抗体としてその文献に記載されて、D 1 1 抗体は、抗カルジオリピン (抗 C L) 抗体としてその文献に記載される。これらの抗体の生成および特徴づけの詳細は、R o t e らによって報告された (1993, 参考として本明細書に援用される)。

10

【0640】

本発明者らによって生成される各々の選択されたハイブリドーマのアイソタイプを決定した。I g G クラスの抗体は、代表的には高い親和性、インビボでの低いクリアランス速度、ならびに精製、改変および取り扱いの簡便性を含む、I g M を上回る多くの利点を有するので、それらの生成が特に所望される。相同な I g G アイソタイプを有するウェルに集中するため、I g M または異なる I g の混合物を含むウェルを破棄するかまたは再クローニングした。高度に陽性のクローンのサブクローニングを 3 ~ 4 回繰り返した。

20

【0641】

E L I S A によって決定される、代表的な I g G および I g M 抗体のアイソタイプを表 2 に示す。本発明者らは、3 G 4 に対する称号を変更する前に 3 G 4 抗体「F 3 - G 4」と最初に命名した。これは、生物学的材料におけるいかなる変化も反映しない。抗体の血清依存性または非依存性も、表 2 に記載される (実施例 X X X も参照のこと)。

【0642】

【表 2】

表 2
抗 P S 抗体のアイソタイプおよび血清依存性

名称	起源	種/アイソタイプ	血清補因子 ?
3SB	Rote <i>et al.</i> , 1993	マウス IgM κ	なし
D11	N. Rote	マウス IgM κ	
BA3	Rote <i>et al.</i> , 1993	マウス IgM κ	
3G4	本研究	マウス IgG ₃ κ	あり、 β 2-糖タンパク質 I
2aG4	本研究	マウス IgG _{2a}	あり
Ch3G4	本研究	ヒトキメラ IgG ₁	あり
9D2	本研究	ラット IgM κ	なし
P2D9	本研究	マウス IgG ₃	
1B12	本研究	マウス IgG ₁ κ	
1B9	本研究	マウス IgG ₁ κ	あり
3B10	本研究	マウス IgG ₃ κ	あり、少なくとも β 2-糖タンパク質 I
2G7	本研究	マウス IgG ₁ κ	あり
7C5	本研究	マウス IgG ₁ κ	あり
3F8	本研究	マウス IgG ₃	
7F8 V			なし

D. E L I S A プロトコールおよび初期モノクローナル抗体特徴づけ

抗体を E L I S A によってさらに研究して、3 S B および D 1 1 と比較した。本研究で用いた抗 P S E L I S A は以下のとおり行なう。特別な相違が特定されない限り、これが本出願の研究全体を通じて用いた E L I S A の形式である。

【0643】

抗原 P S を用いる E L I S A を例示する（2. 5 m l のボトル中に、P-6641 25 m g 10 m g / m l（溶媒はクロロホルム：MeOH 95：5））。同じプロトコールを用いて、他のリン脂質を用いてもよい。P S（または他のリン脂質）のストック溶液を、アリコートにして、気密容器に-30℃で保管しなければならない。好ましい96ウェルプレートは、Dynatech U底 Immulon 1（Dynatech Labs, カタログ番号011-010-3550）である。

【0644】

本明細書において用いられる標準的なブロッキング緩衝液は、P B S に溶解した10%ウシ血清である。他のブロッキング溶液は適切であるが、界面活性剤はブロックおよび洗浄溶液から排除されなければならない。一次抗体は試験サンプルまたは混合物である。好ましい二次抗体はヤギ、抗マウス I g G-H R P である。発色溶液は、10 m l の0.2 M N a₂ P O₄、10 m l の0.1 M クエン酸、O P D の10 m g の錠剤1つ、および10 μ l の過酸化水素である。停止溶液は0.18 M H₂ S O₄ である。

【0645】

このプロトコールは、以下のように P S を用いて96ウェルプレートをコーティングす

る工程を必要とする：P Sストック溶液をn-ヘキサン注で10 μ g/mlまで希釈してよく混合する。各々のウェルに50 μ lを添加して、これを1時間エバポレートさせる。200 μ lの10%血清（または他のブロッキング緩衝液）を各々のウェルに加えて、カバーして、室温で2時間、または4℃で一晩維持する。P B Sを用いてプレートを3回洗浄する。一次抗体（ブロッキング緩衝液中で希釈）を添加して、37℃で2時間インキュベートする。P B Sを用いて3回洗浄する。100 μ l/ウェルの二次抗体（代表的には、ヤギ、抗マウスI g G-H R Pまたは他の適切な二次抗体）を添加して、37℃で1時間インキュベートする。P B Sを用いてプレートを3回洗浄する。各々のウェルに100 μ lの発色溶液を添加することによってE L I S Aを発色させて、10分間発色させ、次いで、各々のプレートに100 μ lの停止溶液を加えて、O. D. を490 nmで読みと

10

【0646】

以下の結果は、9 D 2、1 B 1 2、3 G 4および1 B 9について示している。P Sについてのこれらの抗体の親和性を確認して、3 S Bに対して比較した。新規な抗体の特定の相対的な親和性は3 S Bに比較してかなり改善されている（表3）。

【0647】

表3

抗P S抗体の相対的な親和性

【0648】

【表3】

20

名称	EC ₅₀ (μ g/ml) ¹	対3SBの結合 (倍数)	EC ₅₀ (nM) ²	対3SBの親和性 (倍数)
3SB	0.468	1	0.518	1
D11	>40.0	0.011	>44.4	0.011
9D2	0.104	4.50	0.115	4.50
1B12	0.312	1.50	2.07	0.25
3G4	0.040	11.7	0.266	1.94
1B9	0.019	24.6	0.126	4.11
アネキシン V ³	0.100	4.68	2.77	0.18

30

¹ 組織培養上清の希釈に基づく；捕獲抗体として抗マウスまたはラットI g のいずれかをを用いるサンドイッチE L I S Aによって、I g GおよびI g Mの濃度を決定した。全てのクローンが平均10～15 μ g/mlのI gを分泌する。

² 変換のために用いたMW：I g M-900 kDa、I g G-150 kDa、アネキシンV-36 kDa

³ P Sに対するアネキシンVの親和性は、0.1 nM～1 nMの範囲である。この表における値は、抗P S抗体についてと同じE L I S A条件を用いてストレプトアビジン-H R Pによって検出された市販のビオチン化アネキシンVの結合に相当する。

40

【0649】

抗体の特異性は、以下のリン脂質を用いてコーティングしたプレートを用いるE L I S Aによって決定された：P S、ホスファチジルセリン；P E、ホスファチジルエタノールアミン；P I、ホスファチジルイノシトール；P A、ホスファチジン酸；P G、ホスファチジルグリセロール；P C、ホスファチジルコリン；C L、カルジオリピン；およびS M、スフィンゴミエリン。3 S BおよびD 1 1に比較した、9 D 2、1 B 1 2、3 G 4および1 B 9の特異性プロファイルを表4に示す。

【0650】

【表 4】

表 4
抗 P S 抗体のリン脂質特異性

名称	E L I S A における反応性の相対強度 ^{1,2}
3SB	PS=PA>>CL, PI, PE, PG
D11	CL=PA>>PS, PI, PE, PG
3G4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
2aG4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
Ch3G4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
9D2	PA>PS=CL>PG=PI>>PE
P2D9	PS>PE=CL (PCなし)
1B12	PS=PA>CL>PE=PI, PG
3B10	PS=PA=PI>>PE
1B9	PSのみ
2G7	PSのみ
7C5	PSのみ
3F8	PS>PE>CL (PCはほとんどないかもしれない)
7ネツ V	PS=PE=PI=PA>CL>PG

¹ >という記号は、同一の抗体濃度で試験した種々のリン脂質に対する結合における少なくとも2倍の相違を示す。

² >>という記号は、同一の抗体濃度で試験した種々のリン脂質に対する結合における少なくとも10倍の相違を示す。

【0651】

1B9、2G7および7C5という抗体は、本質的に同じく挙動する。これらの抗体は、PSのみを認識して、PSに対する結合について血清または血清タンパク質を要する。種々のリン脂質に対する1B9、2G7および7C5の結合を、10%ウシ血清の存在下でのみアッセイしたが、他の抗体の結合は、血清の有無のいずれかにおいて試験した。1B9、2G7および7C5以外の抗体については、血清の存在は、特定のリン脂質に対する結合における優先度を変化させない。3G4、3B10および9D2を含む後者の群は、血清の非存在下でPSに対する結合の好ましい特性を有する。

【0652】

3SB抗体は、血清の有無においてインタクトな細胞上のPSを認識する。3SBの主な反応性はPSとの反応であるが、これはまた、原形質膜の比較的わずかな成分であるホスファチジン酸との反応性を有する (Hinkovska-Galchevaら、1989)。3SBは本質的に、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルイノシトール、ならびにホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンとの反応性を欠く (表4)。

【0653】

E. さらに抗体の特徴づけ

3G4抗体とプラスチック固定リン脂質との反応性をさらに試験した。リン脂質を、n-ヘキサン中に50 μg/mlの濃度まで溶解させた。この溶液の100 μlを96ウェ

10

20

30

40

50

ルマイクロタイタープレートに添加した。空気中で溶媒をエバポレートしたのち、このプレートを、2 mMの Ca^{2+} を含むDPBS中に溶解した10% FBS（結合緩衝液）で2時間ブロックした。3G4抗体を33 nMの初期濃度で10%のウシ血清の存在下で結合緩衝液に希釈した。連続2倍希釈物をプレート中に調製した（1ウェルあたり100 μl ）。次いで、このプレートを2時間室温でインキュベートした。洗浄の後、HRPヤギ抗マウスIgG（1:1000希釈）を用いて、3G4を検出した。二次試薬を発色基質OPDを用い、その後マイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Palo Alto, CA）を用いて490 nmでプレートを読み取ることによって検出した。

【0654】

10

リン脂質認識の特異性を、種々のリポソームとの競合アッセイによってさらに確認した。リポソームをクロロホルム中の5 mgの単一のリン脂質（PS、PI、PC、CL、PA）の溶液から調製した。その溶液を、窒素下で乾燥させて、丸底ガラスフラスコ中に薄層を形成した。次いで、10 mlのTris緩衝液（0.1 M、pH 7.4）を添加し、そのフラスコを、2分間、5回超音波分散した。3G4（6.6 nM）を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリポソーム溶液とともに室温で1時間プレインキュベートした。その混合物を、リン脂質をコーティングしたプレートに添加した。様々なリポソームの存在下および非存在下での、固定したリン脂質に対する3G4の結合の能力を、上記のように決定した。

【0655】

20

継続的な研究により、3G4は、陰イオン性リン脂質を特異的に認識するマウスIgG₃κモノクローナル抗体であることが示された。それは、5%のウシ血清の存在下（図4）またはヒト血清の存在下で、陰イオン性リン脂質（PS、PA、CL、PI）をコーティングしたELISAプレートに強く結合する。最大の半分の結合が、3G4で0.2 nM~0.4 nMの濃度で観察された（図4）。3G4は、ELISAにおいて中性のリン脂質（PE、PCおよびSM）には結合しない。無関係の特異性のコントロールマウスIgG₃モノクローナル抗体は結合しなかった。結合は、陰イオン性リン脂質から調製されたリポソームによってブロックされたが、中性のリン脂質から調製されたリポソームではブロックされなかった（図3）。

【0656】

30

3G4は、飽和した（酸化できない）ジパルミトイル側鎖を有する合成のPS、PAおよびCLでコーティングしたELISAプレート、および単一の脂肪酸側鎖を有するリゾホスファチジン酸に結合した。結合は、5 mMのEDTAの存在によって影響を受けず、これは、結合が Ca^{2+} に依存しないことを示す。

【0657】

本実施例の研究において、血清の非存在下では、陰イオン性リン脂質でコーティングしたELISAプレートに対する結合は、90%減少された。1 mg/mlのヒトβ2-糖タンパク質Iの存在下では、完全な結合が保存された。結合は、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS、酸化型LDL、HMWキニノゲン、LMWキニノゲン、XII因子、組織プラスミノゲン活性化因子またはアネキシンA5によって影響を受けなかった。したがって、3G4抗体は、血清またはβ2-糖タンパク質Iの存在下で陰イオン性リン脂質を認識することが発見された。この特徴づけに関連するさらなる研究からの結果は、本明細書中で実施例XXXに示される。

40

【0658】

PSは、原形質膜の最も豊富な陰イオン性リン脂質であって、正常な条件下で正常な細胞において原形質膜の内部小葉に厳密に隔離される。PSはアミノリン脂質である。PEはまた、アミノリン脂質であるが、PEは天然であって陰イオン性ではない。中性のアミノリン脂質であるよりも、PEはPSと同様に挙動して、正常には原形質膜の内部小葉に厳密に隔離される。

【0659】

PIは、原形質膜の別の主な陰イオン性リン脂質であって、これはさらに正常な条件下

50

では正常な細胞における内部小葉構造に厳密に隔離される。P AおよびP Gは、原形質膜のわずかな陰イオン性リン脂質であって、これも通常は内部小葉構造に隔離される。C Lは、ミトコンドリア膜に存在する陰イオン性リン脂質であって、代表的には原形質膜には存在しない。

【0660】

P CおよびS Mは、原形質膜の、コリン含有の中性のリン脂質である。P CおよびS Mの各々は、正常な条件下では外部の小葉構造に主に局在する。

【0661】

正常な血管と腫瘍血管との間の示差的なアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現についての本発明者らのモデルを踏まえて、選択されたプロトコルを用いて開発された抗体で、中性のリン脂質、P CおよびS Mと反応したものはなかった。1 B 9抗体は、P Sと特異的であったが、9 D 2、1 B 1 2および3 G 4は、表4に示される優先度で陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合した。9 D 2抗体も実施例V Iに記載される。

10

【0662】

実施例V

外面化したホスファチジルセリンは腫瘍血管の全体的なマーカーである。

【0663】

本実施例によって、P Sの露出がマウスにおいて増殖する10個の異なる固形腫瘍の各々について内皮細胞上で生じ、実施例I Iに記載されるL 5 4 0腫瘍モデルには限定されないことが示される。

20

【0664】

インビボにおける外面化したP Sは、種々のタイプのヒトおよびマウスの腫瘍を保有するマウスへP Sに対するモノクローナル抗体を静脈内注射することによって検出された。抗P S抗体は、全ての10個の異なる腫瘍モデルにおいて血管内皮に特異的に結合することが示される。同じマウス由来の正常な器官における血管内皮は染色されなかった。アイソタイプマッチしたコントロールモノクローナル抗体は、腫瘍細胞または正常細胞のいずれにも局在しなかった。アポトーシス性細胞がまた免疫組織化学的に同定されたが、ここで腫瘍における極めて少数の内皮細胞がアポトーシスのマーカーを発現した。

【0665】

30

従って、本実施例によって、腫瘍における血管内皮細胞はP Sを外面化するが、正常な血管はP Sを外面化しないことが示される。露出したP Sを有するほとんどの腫瘍内皮細胞はアポトーシスを起こさなかった。従って、P Sは、腫瘍脈管構造の豊富でかつ利用しやすいマーカーであって、腫瘍血管画像化および治療について用いることができる。

【0666】

A. L 5 4 0、H 3 5 8およびH T 2 9腫瘍

これらの研究で用いた抗P S抗体は、3 S Bと命名されたマウスモノクローナルI g M抗体だった（実施例I V、R o t eら、1993）。3 S Bは、主にP Sに結合するがまた、P Sのような分布を有する比較的わずかな陰イオン性リン脂質であるP Aとも反応する。用いた抗C L抗体は、D 1 1と命名されたマウスモノクローナルI g M抗体であった（実施例I V、R o t eら、1993）。

40

【0667】

腫瘍または正常な血管内皮でのP S露出は最初に、3つの動物腫瘍モデルで試験された：L 5 4 0ヒトホジキンリンパ腫、N C I H 3 5 8ヒト非小細胞肺癌（N S C L C）およびH T 2 9ヒト結腸直腸ガン。インビボで腫瘍を増殖させるため、 2×10^6 個の細胞を、S C I Dマウスの右脇腹に注射して、腫瘍を0.8~1.2 cmの直径にさせた。

【0668】

大きい腫瘍（約800 mm³を超える容積）を保有するマウスに、20 μgの抗P Sまたは抗C L抗体のいずれかを、尾静脈を介して静脈内注射した。注射の1時間後、マウスを麻酔して、その血液循環を、ヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。腫瘍および正

50

常な器官を取り出して、凍結切片の調製のために急速凍結した。ヤギ抗マウス I g M (μ 特異的) - H R P 結合体、続いてカルバゾールでの発色を用いてマウス I g M を検出した。1 切片あたり少なくとも 1 0 個の無作為な領域を × 4 0 の倍率で検査して、陽性血管の平均割合を算出した。

【 0 6 6 9 】

抗 P S 抗体は、マウス I g M の検出によって示されるとおり、インビボで 3 つの腫瘍全て (H T 2 9、L 5 4 0 および N C I - H 3 5 8) の脈管構造に特異的に存在した。この最初の研究では、腫瘍における染色された血管の平均割合は、H T 2 9 について 8 0 %、L 5 4 0 について 3 0 %、そして N C I - H 3 5 8 について 5 0 % であった。腫瘍の全ての領域における血管が染色され、小さい毛細管および大きい血管の両方が染色されていた。

10

【 0 6 7 0 】

どの正常組織においても抗 P S 抗体での血管染色は観察されなかった。腎臓では、尿管は抗 P S および抗 C L のレシピエントの両方で染色されて、これはこの器官を通じた I g M の分泌に関連する。抗 C L 抗体は、腎臓以外のどのような腫瘍組織または正常組織においても検出されなかった。これらの知見によって、腫瘍内皮のみが原形質膜の外部に P S を露出させることが示される。

【 0 6 7 1 】

B. 小さいおよび大きい L 5 4 0 腫瘍

膜の内面に対して P S を隔離する能力を腫瘍脈管構造が失う時点を推定するため、1 4 0 ~ 1 6 0 0 m m ³ の容積におよぶ L 5 4 0 腫瘍において、抗 P S 局在化を検査した。

20

【 0 6 7 2 】

マウスをその腫瘍サイズに応じて 3 つの群に分けた：1 4 0 ~ 3 0 0、3 5 0 ~ 8 0 0 および 8 0 0 ~ 1, 6 0 0 m m ³。小さい L 5 4 0 腫瘍 (3 0 0 m m ³ まで) を保有する 3 匹のマウスでは抗 P S A b は検出されなかった。抗 P S A b は、中間のサイズの L 5 4 0 腫瘍の群において 5 匹のうち 3 匹の動物に、そして大きい L 5 4 0 腫瘍を保有する全てのマウスにおいて (4 匹中 4 匹) 局在した (表 5)。全ての P S 陽性血管の割合 (汎内皮マーカー M e c a 3 2 によって同定される) は、L 5 4 0 中間群において 1 0 ~ 2 0 % であって、大きい L 5 4 0 腫瘍の群において 2 0 ~ 4 0 % であった (表 5)。

【 0 6 7 3 】

表 5

中間および大きいサイズの腫瘍において検出された P S 外面化

30

【 0 6 7 4 】

【表 5】

腫瘍サイズ (mm ³)	陽性腫瘍数／総数 *	PS陽性血管／総数†(%)
350-800	3/5	10-20
850-1,600	4/4	20-40

* L 5 4 0 C y 腫瘍を保有するマウスを、腫瘍サイズに応じて 3 つの群に分割した。2 0 μ g の抗 P S 抗体を静脈内注射して、1 時間循環させた。抗マウス I g M ペルオキシダーゼ結合体を用いて凍結切片でマウス抗体を検出した。

40

† 汎内皮 A b M e c a 3 2 を用いて血管の総数を決定した。P S 陽性および M e c a 陽性の血管を腫瘍の 1 断面あたり 4 領域でカウントした。同じ群内の P S 陽性血管の範囲 (%) を示す。

【 0 6 7 5 】

C. L 5 4 0、H 3 5 8、H T 2 9、C o l o 2 6、B 1 6 および 3 L L 腫瘍

同じ抗 P S (3 S B) 抗体および抗 C L (D 1 1) 抗体を用いて、腫瘍および正常血管内皮上の P S 露出を、さらなる 3 つの動物腫瘍モデル (全部で 6 つ) を用いるさらなる研究において試験した：L 5 4 0 ヒトホジキンリンパ腫、N C I H 3 5 8 ヒト非小細胞肺

50

ガン（NSCLC）、HT29ヒト結腸直腸ガン、Colo26マウス結腸ガン、B16マウス黒色腫、および3LLマウス肺腫瘍。

【0676】

これらの研究では、SCIDマウスにおいて腫瘍を皮下で増殖させて、 $0.4 \sim 0.7 \text{ cm}^3$ の容積にさせた。1群あたり3匹以上のマウスを用いた。抗PSまたは抗CLマウスIgM抗体（ $30 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）を含む $200 \mu\text{l}$ の生理食塩水を静脈内注射した。30分後、このマウスを屠殺して、放血して、その血液循環をヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。ほとんどの器官および腫瘍を回収して、凍結切片の調製のために急速凍結した。ヤギ抗マウスIgM（ μ 特異的）HRP結合体を用い、続いてカルバゾールを用いた発色によって、マウスIgMを検出した。

10

【0677】

腫瘍の連続切片を、マウス血管の汎内皮マーカーに対するモノクローナル抗体MECA32を用いて染色した。PS陽性血管を形態学的に、そして抗マウスIgMおよびMECA32での同時染色によって同定した。1切片あたり少なくとも10の無作為な領域（1領域あたり 0.317 mm^2 ）を、2つの独立した観察によって盲検的に検査した。PSについて陽性に染色したMECA32陽性血管の割合を算出した。各々のタイプの3つの腫瘍を、各々2つの別の研究において検査した。平均値および標準誤差（SE）を算出した。各々の群における総血管数およびPS陽性血管数の腫瘍間の変動は約10%であった。

【0678】

20

この研究の6つの腫瘍全てがPS陽性血管を有した（表6A）。3SBによるPSの検出は、特異的であった。なぜなら、抗CL抗体を用いては腫瘍内皮の染色は観察されなかったからである（表6A）。抗PSまたは抗CL抗体の血管局在化は、腎臓以外の正常な器官では観察されなかった（抗PSおよび抗CLレシピエントの両方における尿細管染色は、この器官を通じたIgMの分泌を反映する）。

【0679】

表6A

腫瘍脈管に対する抗PS抗体の特異的局在化

【0680】

【表6A】

30

組織	抗-PS*	抗-CL
L540腫瘍	19.3 ± 3.3	0
H358腫瘍	15.6 ± 4.1	0
HT29腫瘍	4.2 ± 1.6	0
B16腫瘍	40.6 ± 5.4	0
3LL腫瘍	5.3 ± 3.7	0
Colo 26腫瘍	12.4 ± 2.4	0
副腎	0	0
脳	0	0
心臓	0	0
腎臓	0 [†]	0 [†]
小腸	0	0
肝臓	0	0
肺	0	0
膵臓	0	0
脾臓	0	0
精巣	0	0

40

* この結果は、1領域の 0.317 mm^2 あたりのMECA32染色された血管のうちのPS陽性血管の平均（ $\pm \text{SE}$ ）割合として示される。各々のタイプの6つの腫瘍を解析した。1領域の 0.317 mm^2 あたりのMECA32陽性血管の平均数は、それぞれL540、H358、HT29、B16、3LLおよびColo26腫瘍について25、21、17、18、27および $22 \pm 10\%$ の血管であった。

50

† 非抗原特異的尿細管染色は、抗 P S および抗 C L レシピエントの両方で可視であった。

【0681】

これらの研究では、P S 陽性血管の割合は、C o l o 2 6 腫瘍での 1 0 % から B 1 6 腫瘍での 4 0 % に及んだ。抗 P S I g M は、腫瘍の全ての領域において毛細血管および細静脈の内腔表面に存在した。P S 陽性血管は、壊死および壊死の周囲の領域において特に一般的であるようである。陽性の血管は一般に形態学的異常を示さなかったが、これは光学顕微鏡によって明らかになった。壊死領域にたまたま局在した血管は、悪化の形態学的兆候を示した。抗 P S 抗体（ただし抗 C L 抗体ではない）はまた、壊死性およびアポトーシス性の腫瘍細胞に局在した。

【0682】

これらの制御された研究によって、P S は種々の腫瘍において血管内皮の内腔表面に一貫して露出されるが、正常な組織には露出されず、そして腫瘍脈管構造発現はモデル特異的ではないことが実証される。

【0683】

D. P S 陽性腫瘍血管のほとんどがアポトーシス性ではない。

【0684】

二重標識技術を用いて、腫瘍切片におけるアポトーシス性内皮細胞を同定した。内皮細胞を、汎内皮的な細胞マーカーである M E C A 3 2 を用いて同定した。2 つの独立したマーカー：瀕死の細胞における細胞質の変化を同定する、カスパーゼ 3 の活性フォーム（K r a j e w s k a ら、1 9 9 7）、および核変化を有する細胞を同定する、断片化された D N A（G a v r i e l l i ら、1 9 9 2）を用いてアポトーシス細胞を免疫組織化学的に同定した。

【0685】

ウサギ抗カスパーゼ 3 特異的抗体（R & D、M i n n e a p o l i s, M N）、続いてアルカリホスファターゼに結合体化された抗ウサギ I g G（A P, P i e r c e, R o c k f o r d, I L）とのインキュベーションによって、活性なカスパーゼ 3 を検出した。他の腫瘍切片を、検出試薬として抗ジゴキシゲニンアルカリホスファターゼ結合体を用いて、T u n e l アッセイ（A p o p T a g ^{T M} キット、O n c o r, M D）によって解析した。切片をアポトーシスマーカー（ピンク）および内皮細胞マーカー、M E C A 3 2（褐色）について二重に染色した。内皮細胞およびアポトーシス細胞のマーカーが同時に存在する場合、両方の色が同じ細胞で明白に可視であった。

【0686】

6 つのタイプの腫瘍のうち 5 つ（H T 2 9、H 3 5 8、B 1 6、C o l o 2 6、L 5 4 0）において、内皮細胞は、いずれのアポトーシスマーカーも示さなかった（表 7）。腫瘍のうち 6 番目のタイプである 3 L L は、壊死の領域に局在した 2 ～ 3 のアポトーシス内皮細胞を示した。対照的に、アポトーシス悪性細胞は、全てのタイプの腫瘍において共通であった。アポトーシス腫瘍細胞の割合は、L 5 4 0 腫瘍における 1 ～ 2 % から 3 L L 腫瘍における 1 2 . 6 ～ 1 9 . 6 % に及んだ。

【0687】

表 7

腫瘍におけるアポトーシスマーカーの発現

【0688】

10

20

30

40

【表 7】

腫瘍タイプ	活性カスパーゼ3		Tunel アッセイ	
	腫瘍細胞 (全体に対する%)*	腫瘍血管	腫瘍細胞 (全体に対する%)*	腫瘍血管
3LL	19.8 ± 4.3	<1.0 [†]	12.6 ± 3.6	0
HT29	13.7 ± 2.3	0	7.8 ± 2.5	0
H358	5.8 ± 2.0	0	4.3 ± 1.6	0
Colo 26	5.3 ± 1.5	0	4.1 ± 1.5	0
B16	4.2 ± 1.8	0	3.5 ± 1.6	0
L540	2.3 ± 1.0	0	1.6 ± 0.5	0

* カスパーゼ 3 または T u n e l のいずれかについて陽性であった腫瘍細胞または腫瘍血管の割合を、1 切片あたり 1 0 倍大きいパワーで決定した。この分野を、腫瘍の中央を通じて端部から 2 つの垂直方向にそって無作為に選択した。6 匹のマウス由来の腫瘍における陽性の細胞または血管の割合の平均 (± S E) を示す。

† 3 L L 腫瘍の壊死領域に時折存在する血管 (1 0 0 を超える内の 1) は、アポトーシスの両方のマーカーを示した。

【0 6 8 9】

E. M D A - M B - 2 3 1 および M e t h A 腫瘍

腫瘍血管内皮細胞上での P S 露出をまた、マウスで増殖している M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳房腫瘍において、および皮下で増殖しているマウス M e t h A 線維肉腫において検査した。これらの研究において用いた抗体は、実施例 I V に記載のように生成された、9 D 2 抗体であって、これは陰イオン性リン脂質と反応性である。

【0 6 9 0】

実施例 V I に詳細に記載されるように、9 D 2 は、L 5 4 0、N C I - H 3 5 8 および B 1 6 腫瘍における腫瘍血管に、そして S C I D マウスの乳腺脂肪パッドにおいて同所性に増殖している M D A - M B - 2 3 1 乳房腫瘍のモデルおよび皮下で増殖しているマウス M e t h A 線維肉腫に局在した。9 D 2 は、全ての 5 つの腫瘍において腫瘍血管に局在した。腫瘍における血管内皮細胞は、別個の膜染色を示した。9 D 2 抗体はまた、壊死およびアポトーシス性腫瘍細胞の膜および細胞質に局在した。9 D 2 抗体の血管局在は、試験された 1 0 個の正常な器官のうち 9 個で観察されなかったが、ここでは腎臓における尿細管の非特異的染色が観察された。

【0 6 9 1】

二重染色研究も実施したが、ここでは同所性 M D A - M B - 2 3 1 乳房腫瘍を保有するマウスにビオチン化した 9 D 2 抗体を静脈内注射して、その後に凍結した切片を後に F I T C 結合体化 M E C A 3 2 を用いて染色した (実施例 V I)。M E C A 3 2 陽性血管のうち約 4 0 % が 9 D 2 に結合した。

【0 6 9 2】

F. M D - M B A - 4 3 5 腫瘍

さらなる乳ガンモデルにおいては、腫瘍血管内皮上の P S 露出を、マウスで増殖している M D A - M B - 4 3 5 ヒト乳ガン細胞中で検査した。これらの研究で用いた抗体は、3 G 4 抗体のキメラバージョン (c h 3 G 4) である。3 G 4 抗体生成は実施例 I V に記載され、そしてキメラ 3 G 4 抗体の生成は、実施例 X I X に詳細に記載される。M D A - M B - 4 3 5 モデルにおける腫瘍血管内皮に対する c h 3 G 4 の局在化は、実施例 X I X にさらに詳細に記載されており、図 2 2 に示される。

【0 6 9 3】

要するに、腫瘍を M D - M B A - 4 3 5 細胞を用いて樹立して、キメラ 3 G 4 抗体のビオチン化バージョンおよび無関係の特異性のコントロール I g G を投与した。腫瘍切片を

Cy3結合体化ストレプトアビジンで染色してビオチン化タンパク質を検出した。MECA 32抗体に続いてFITCタグ化抗ラットTgG二次抗体を用いる二重染色を行なって、血管内皮を検出した。この検出方法は、赤および緑を用いてビオチン化タンパク質および血管内皮細胞を標識して、その結果、内皮細胞に結合したビオチン化タンパク質は、集束型 (converged) 画像で黄色にみえる (図22)。この研究によって、腫瘍脈管内皮細胞に対するキメラ3G4抗体の特異的な局在化が示された。

【0694】

類似の研究において、インビボにおいて3G4が腫瘍血管に選択的に局在化する能力を、抗体をi.p. またはi.v. 注射し、1時間後、6時間後、または24時間後にそのマウスを放血することによって決定した。腫瘍および正常組織の凍結切片を、マウス免疫グロブリンの存在について染色した。検出可能な免疫グロブリンを有さないことを確認したSCIDマウスを使用して、バックグラウンド染色を避けた。これらの研究において、切片を、抗マウスCD31で対比染色して、血管内皮を検出し、画像を統合した。局在した3G4とCD31との間の染色の一致を、特異的な局在化の証拠とみなした。その領域において特に強い緑または赤の蛍光が占めていなければ、一致した染色は黄色に見えた。脈管局在化の抗原特異性は、アイソタイプがマッチするコントロール抗体であるBBG3を注射したマウスに由来する腫瘍における内皮染色の欠如によって確認された。

【0695】

これらの研究において、3G4は、統合した画像によって決定した場合、同所性MDA-MB-435乳房腫瘍を有するマウスへのi.p. またはi.v. 注射後に、平均40±10%の腫瘍血管に局在化した。3G4のi.p. 注射後の腫瘍脈管への局在化は、注射1時間後に、可視的であり最大で注射後6時間までであったが、i.v. 注射した3G4は、注射1時間以内に最大の染色を示した。標識した脈管は、腫瘍のすべての領域で可視的であったが、壊死およびその周りで特に豊富であった。より大きい脈管において、単一の脈管内のPS曝露の異種が、ときどき観察された。3G4が腫瘍間質に漏出した領域もまた、いくつかの脈管の内皮の周りで可視的であった。腫瘍壊死およびその周りの腫瘍細胞が染色された。壊死腫瘍細胞の染色は、コントロール抗体のBBG3を注射したマウス由来の腫瘍では観察されず、これは、3G4を注射したマウスにおける壊死腫瘍細胞の局在化が抗原特異的であることを示す。

【0696】

正常組織における脈管内皮への3G4の局在化は、3G4またはコントロール抗体 (BBG3) をi.v. 注射したマウスでは4時間以前に観察されなかった。試験した正常組織は以下である：心臓、肺、肝臓、胆嚢、食道、胃、膵臓、十二指腸、盲腸、直腸、腎臓、副腎、脾臓、脳、眼、唾液腺および卵巣。これらの正常組織の非脈管成分もまた染色されなかった。

【0697】

G. RIP-タグ腫瘍

10番目のモデルについて、腫瘍血管内皮に対するPSの露出を、多段階の発現の「RIP-Tag」トランスジェニックマウスモデル (RIP1-Tag 2) において検査した。このトランスジェニックマウスモデルでは、あらゆるマウスが、インスリン産生β細胞におけるSV40 T抗原 (Tag) ガン遺伝子の発現の結果として12~14週齢までに膵臓の島腫瘍を発症する。腫瘍は、過剰増殖性島から多段階で発症して、悪性に行進するには血管形成性の切り替えを要する。マトリックスメタロプロテイナーゼ9が血管形成切り替えを制御する (REF)。

【0698】

UCSFの病理学の教授であるDonald McDonald博士と共同してRIP1-Tag 2モデルにおいて、9D2局在化研究を行なった。全てのマウスが小さい高度に血管新生された固形腫瘍を有する場合、9D2を、10週齢で開始してRIP1-Tag 2マウスに静脈内注射した。厚い (80 μm) 腫瘍切片の二重染色を実施して、腫瘍および正常な膵臓に局在した9D2およびCD31を同定した。膵臓腫瘍における血管の約

10

20

30

40

50

50% (CD31陽性)が、局在化した9D2を有したが、正常な島における血管は染色されなかった。コントロールラットIgMを注射されたマウスが有した腫瘍血管の染色は弱くかつまれであった。内皮細胞をこえる血管外組織への9D2およびコントロールラットIgMのある程度の漏出がまた出現した。

【0699】

H. 腫瘍局在化研究の概要

本発明者らは、多くの様々な腫瘍を有するマウスの腫瘍血管への、種々の抗PS抗体の局在化を研究した。そのような研究から合わせた結果が、以下の表6Bに要約される。抗PS抗体は、すべての腫瘍の腫瘍血管に局在化するが、脈管局在化は正常な器官では観察されない(表6B)。

【0700】

【表6B】

表 6B

腫瘍および正常な脈管に対する抗PS抗体の局在化

組織	局在化
腫瘍組織	
L540 ホジキン	++
H358 NSCLC	++
HT29 結腸	+++
Colo 26 結腸	++
B16 黒色腫	+++
3LL 肺	+++
MDA-MB-231	+++
MDA-MB-435	+++
Rip-Tag	+++
正常組織	
副腎	-
脳	-
心臓	-
腎臓	-
腸	-
肝臓	-
肺	-
膵臓	-
脾臓	-
精巣	-

従って、本実施例によって、腫瘍中の血管内皮細胞がその管腔表面にPSおよび陰イオン性リン脂質を外面化して、ここでそれらはインビボにおいて抗PS抗体によって結合され得ることが確認される。PSは、正常組織における血管内皮細胞の外面には欠けており、このことはPS認識抗体、アネキシンVおよび他のリガンドが、固形腫瘍における血管の選択的画像化または破壊のための細胞毒性薬物、凝固剤および放射性核種を送達するために用いられ得ることを示す。

【0701】

PS陽性腫瘍内皮細胞は、ほとんどの部分について、この研究で用いられる腫瘍において生存可能であると考えられた。これは、アポトーシスのマーカーを示さず、これは、VCAM-1、Eセレクトインおよび他の急速に代謝されたタンパク質の発現によって示されたとおり、形態学的にインタクトであってかつ代謝的に活性である。アポトーシスの指標としてしばしばみなされるが、PS露出は、悪性細胞(Raoら、1992)、(Uts

ug iら、1991) 活性化血小板 (Roteら、1993)、ならびに種々の段階の遊走、細胞間質浸潤および融合の胚性トロホブラスト (Adlerら、1995) を含む、いくつかのタイプの生存細胞において、観察されている。

【0702】

細胞死に対するPS露出とコミットメントとの間の関係がないことはまた、プロアポトーシス刺激の除去後にPSの非対称性および増殖を正常に修復するプレアポトーシス性Bリンパ球細胞上で示されている (Hammillら、1999)。正常な生存細胞において、PS露出はおそらく、細胞への Ca^{2+} フラックスを誘導するリガンドーレセプター相互作用のような表面事象によって誘発される (Dillonら、2000)。 Ca^{2+} フラックスは、スクランブラーゼを活性化して (Zhaoら、1998)、アミノリン脂質転位酵素を同時に阻害する (Comfuriusら、1990)。

10

【0703】

腫瘍血管上のPSは、いくつかの理由のためにガン画像化または治療についての標的として魅力的である：PSは豊富である (1細胞あたり約 3×10^6 個の分子)；PSは腫瘍内皮細胞の管腔表面にあり、これは血液中の血管標的化因子による結合について直接利用可能である；PSは、多様な固形腫瘍において腫瘍内皮細胞のうち高い割合で存在し、PSは、今まで試験された全ての正常組織における内皮細胞には欠けている。従って、腫瘍脈管構造上の未結合の抗体、血管標的因子およびPSに対する画像化剤は、ヒトでのガンの検出および処置のために用いることができる。

20

【0704】

実施例VI

陰イオン性リン脂質を腫瘍血管の表面上に露出させる。

【0705】

陰イオン性リン脂質は、正常な条件下で、哺乳動物細胞の原形質膜の外部小葉からはほとんど欠けている。例えば、細胞表面上のホスファチジルセリンの露出が、アポトーシス、壊死、細胞損傷、細胞活性化および悪性転換の間に生じる。本実施例は、陰イオン性リン脂質に対して結合する特定の抗体および天然のリガンドの両方の局在化によって実証されるとおり、陰イオン性リン脂質がインビボにおいて腫瘍脈管構造上で上方制御されることを示す。

30

【0706】

陰イオン性リン脂質を特異的に認識するモノクローナル抗体9D2を、種々の同所性または異所性の腫瘍を保有するマウスに注射した。他のマウスには、陰イオン性リン脂質に結合する天然のリガンドであるアネキシンVを投与した。9D2およびアネキシンVの両方は、全ての腫瘍における血管内皮に、そしてまた壊死の領域中のおよびその周囲の腫瘍細胞に特異的に局在した。腫瘍血管において15～40%の内皮細胞が染色された。正常な内皮細胞では局在化は検出されなかった。

【0707】

腫瘍の微小環境に存在することが公知の種々の要因および腫瘍関連状態を、9D2およびアネキシンV結合によって判定されるように、培養された内皮細胞における陰イオン性リン脂質の露出を生じる能力について試験した。低酸素/再酸素化、酸性度、トロンビンおよび炎症性サイトカインは全てが陰イオン性リン脂質の露出を誘導した。過酸化水素もまた強力な誘導因子であった。炎症性サイトカインおよび低酸素/再酸素化との併用処置によって相加作用よりも大きい効果が得られた。従って、インビボにおける腫瘍内皮上の陰イオン性リン脂質の実証された露出は、サイトカインおよび反応性酸素種による傷害および活性化によって生じる可能性が高い。この機構にかかわらず、陰イオン性リン脂質は、腫瘍血管標的化、画像化および治療について現在用いることができる腫瘍血管のマーカーである。

40

【0708】

A. 材料および方法

1. 材料

50

Na^{125}I は、Amersham (Arlington Heights, IL) から入手した。ダルベッコ改変イーグル組織培養培地、および Ca^{2+} および Mg^{2+} を含有するダルベッコPBSをGibcoから入手した (Grand Island, NY)。ウシ胎仔血清をHyclone (Logan, Utah) から入手した。L- α -ホスファチジルセリン、L- α -ホスファチジルコリン、カルジオリピン、L- α -ホスファチジルエタノールアミン、L- α -ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、O-フェニレンジアミン、過酸化水素およびトロンビンをSigma (St. Louis, MO) から入手した。24ウェルの平底プレートをFalcon (Becton DickinsonおよびCo., Lincoln Park, NJ) から入手した。

10

【0709】

組み換え肝細胞増殖因子 (HGFまたは散乱因子) およびアクチノマイシンDは、Calbiochem (San Diego, CA) からであった。組み換えマウスインターロイキン- 1α 、 β および腫瘍壊死因子 α (TNF α) を、R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。ユニバーサルタイプI (Universal Type I) のインターフェロン (全てのタイプのインターフェロンの代わりになるハイブリッドタンパク質) をPBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ) から購入した。組み換えのヒト血管内皮増殖因子121 (VEGF)、ヒト血小板由来増殖因子-BB、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-10) およびヒト線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) をPeproTech (Rocky Hill, NJ) から購入した。

20

【0710】

2. 抗体

MECA32、汎マウス内皮細胞抗体は、Dr. E. Butcher (Stanford University, CA) から入手して、免疫組織学的研究のための陽性コントロールとして用いた。この抗体の詳細は公表されている (Leppinkら、1989)。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に結合体化したウサギ抗ラット免疫グロブリン二次抗体、ラット抗マウス免疫グロブリン二次抗体、ならびにヤギ抗マウス二次抗体および抗ラット二次抗体は、Daco (Carpinteria, CA) またはJackson ImmunoResearch Labs (West Grove, PA) のいずれかから購入した。

30

【0711】

これらの研究で用いた9D2抗体は、実施例IVに記載されたように生成した。9D2は、陰イオン性リン脂質と反応性のラットモノクローナル抗体である。9D2のリン脂質特異性のさらなる特徴付けは、本実施例の結果の節に記載される。

【0712】

3. 細胞

末期の疾患を有する患者由来のL540Cyホジキンリンパ腫細胞は、V. Diehl教授 (Koeln, Germany) から提供された。NCI-H358ヒト非小細胞肺癌は、Adi Gazdar博士 (Southwestern Medical Center, Dallas, TX) から提供された。Meth Aマウス線維肉腫およびMDA-MB-231ヒト乳がんは、American Type Cell Collection (Rockville, MD) から入手した。マウス脳内皮腫株bEnd. 3は、Werner Risau教授 (Max Planck Institution, Munich, Germany) から提供されて、10% FBSを有するDMEM中で維持した。成体ウシ大動脈内皮 (ABAE) 細胞は、Clonetics (San Diego, CA; Walkerville, MD) から購入した。ABAE細胞は、10% 血清および2 ng/ml のbFGFを含有するDMEM中で維持した。

40

【0713】

50

4. 組織培養

b E n d . 3 , A B A E細胞およびL 5 4 0 C yリンパ腫以外の全ての腫瘍細胞を、10%ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン、2 単位/ml ペニシリンGおよび2 μ g/ml ストレプトマイシンを補充したDMEM中で維持した。L 5 4 0 C y細胞は、同じ添加物を含むRPMI 1640中で維持した。細胞を週に1回継代培養した。0.2% EDTAを含有するPBSにおいて0.125%トリプシンを用いてb E N d . 3細胞のトリプシン処理を行なった。インビトロ研究については、24ウェルプレートにおいて1 mlの培養培地に 10×10^3 細胞/mlの密度で内皮細胞を播種して、アッセイでの使用の前に48~96時間インキュベートした。各々の研究の24時間前に培地を再生した。

10

【0714】

5. プラスチック固定リン脂質との反応性

リン脂質をn-ヘキサンに50 μ g/mlの濃度まで溶解した。この溶液の100 μ lを96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加えた。空気中の溶媒のエバポレーション後に、このプレートを、2 mM Ca^{2+} を含有するDPBSに溶解した10%ウシ胎仔血清（結合緩衝液）を用いて2時間ブロックした。

【0715】

初期濃度6.7 nMで、10%血清の存在下において結合緩衝液中で、9D2抗体またはアネキシンVを希釈した。連続2倍希釈物をプレート中で調製した（1ウェルあたり100 μ l）。次いで、このプレートを室温で2時間インキュベートした。このプレートを洗淨して、それぞれHRPに対して結合体化したヤギ抗ラットIgMおよびウサギ抗ヒトアネキシンVによって、続いてHRPに結合体化されたヤギ抗ウサギIgGによって（全て1:1000希釈）、9D2およびアネキシンVを検出した。色素生産性の基質OPDを用い、続いてマイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Palo Alto, CA）を用いて490 nmでプレートを読み取ることによって、二次試薬を検出した。

20

【0716】

9D2抗体結合の特異性を、無関係の特異性のコントロールのラットIgM（Pharmingen, San Diego, CA）を用いることによって確証した。 Ca^{2+} 依存性であるリン脂質に対するアネキシンV結合の特異性を、5 mM EDTAを含有するDPBS中に試薬を希釈することによって決定した。さらなる陰性コントロールは、0.2%の界面活性剤Tween 20を含有する結合緩衝液を用いてプレートを洗淨する工程から構成された。この処置によって脂質を抽出して、これによってプラスチックに吸着されたリン脂質を除去する。9D2抗体もアネキシンVも、界面活性剤で洗淨したプレートには結合しなかった。

30

【0717】

6. 培養された内皮細胞の表面上の陰イオン性リン脂質の検出

内皮細胞が約70%コンフルエンスに達するまで内皮細胞を増殖させた。PS露出を誘導するために、細胞を H_2O_2 （200 μ M）を用いて37℃で1時間処置した。コントロールのスライドおよび処置したスライドを Ca^{2+} および Mg^{2+} 含有DPBSを用いて洗淨して、同じ緩衝液に希釈した0.25%グルタルアルデヒドで固定した。50 mMの NH_4Cl との5分間のインキュベーションによって過剰なアルデヒド基をクエンチした。リン脂質の検出に対する界面活性剤および有機溶媒の効果を試験するために、いくつかのスライドをアセトンを用いるか（5分）、または1%（v/v）Triton TM X-100を含有するPBSを用いてプレインキュベートした。

40

【0718】

細胞をDPBS（ Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および0.2%（w/v）ゼラチン含有）を用いて洗淨して、1 μ g/mlのビオチン化アネキシンV（Pharmingen, San Diego, CA）とともに、または1 μ g/mlの9D2抗体とともにインキュベートした。インキュベーションの2時間後、細胞を0.2%ゼラチン緩衝液とともに洗淨して

50

、ストレプトアビジン-HRP (1:500希釈)とともにインキュベートした。無関係の特異性のラット IgMおよびストレプトアビジン単独を、これらの研究における陰性コントロールとして用いた。全ての工程を室温で行なった。O-フェニレンジアミン (0.5 mg/ml) および過酸化水素 (0.03% w/v) を含有するクエン酸-リン酸緩衝液、pH 5.5 を添加することによって HRP 活性を測定した。15 分後、100 μ l の上清を 96 ウェルプレートに移して、100 μ l の 0.18 M H_2SO_4 を添加して、その吸光度を 490 nm で測定した。あるいは、PS 陽性細胞をカルバザール基質の添加によって検出して、不溶性の赤褐色の沈殿を得た。各々の研究を、二連でかつ少なくとも 2 回繰り返して行なった。

【0719】

7. リン脂質に対する 9D2 および アネキシン V 結合のリポソームによる阻害

リン脂質認識の特異性をさらに、種々のリポソームを用いた競合アッセイによって確認した。リポソームを、5 mg の単一のリン脂質を含有するクロロホルムの溶液から調製した。この溶液を窒素下で乾燥して、丸底ガラスフラスコ中に薄層を形成させた。次いで、10 ml の Tris 緩衝液 (0.1 M、pH 7.4) を添加して、フラスコを 2 分間に 5 回超音波処理した。9D2 または アネキシン V (6.66 nM) を 200 μ g/ml のリポソーム溶液とともに室温で 1 時間プレインキュベートした。この混合物をリン脂質コーティングしたプレートまたは内皮細胞単層に加えた。異なるリポソームの有無において固定されたリン脂質または細胞表面に対して 9D2 が結合する能力を上記のように決定した。

【0720】

8. 固定された PS に対する結合についての 9D2 および アネキシン V の競合

10 倍モル過剰の N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン (Sigma, MO) を用いて精製されたタンパク質を室温で 1 時間インキュベートすることによって、ビオチン化 9D2 抗体および アネキシン V を調製した。遊離のビオチンを PBS に対する透析によって除去した。ビオチン化手順は、いずれのタンパク質の PS 結合能力も損なうことはなかった。競合研究について、未改変のタンパク質およびビオチン化タンパク質を 10 倍モル過剰の未改変のタンパク質と事前混合した。次いで、この混合物を PS コーティングプレートに加えた。結合した試薬を、1:1000 に希釈されたストレプトアビジン-HRP 結合体によって検出した。競合物の非存在下での各々の試薬の PS への結合を 100% 値として採用した。

【0721】

9. 皮下移植された腫瘍の増殖

局在化研究のために、 2×10^7 個の L540 ヒトホジキンリンパ腫細胞または他の腫瘍タイプの 1×10^7 個の細胞を SCID マウス (Charles River, Wilmington, MA) の右脇腹に皮下注射した。腫瘍を 0.4~0.7 cm^3 の容積まで到達させた。1 群あたり最小 3 匹の動物のを用いた。研究を少なくとも 3 回繰り返した。

【0722】

10. ヒト MDA-MB-231 乳ガンの同所性モデル

雌性の nu/nu マウスまたは SCID マウスを Charles River から購入した。MDA-MB-231 ヒト乳腺ガン細胞を、公表されたプロトコール (Price, 1996) に従って乳腺脂肪パッドに移植した。要するに、マウスを麻酔して外胸部にわたって皮膚に 5 mm の切開を作製した。乳腺パッドを露出させて、0.1 ml の生理食塩水に再懸濁した 1×10^7 個の MDA-MB-231 細胞の注射のための正確な部位を確認した。

【0723】

11. インビボにおける腫瘍保有マウスにおける陰イオン性リン脂質の検出

9D2 または アネキシン V が凍結組織の切片に直接付与される免疫組織化学技術では、原形質膜の内部小葉構造と外部小葉構造との上の陰イオン性リン脂質の間が識別されない

10

20

30

40

50

。外部に位置するリン脂質を検出するために、本質的に以前に記載されたような方法を行なった（実施例V；Ranら、1998）。腫瘍保有SCIDマウスに、50 μ gの9D2もしくはビオチン化9D2抗体、または100 μ gのビオチン化アネキシンVのいずれかを静脈内注射した。60分後にマウスを屠殺して、その血液循環を放血して、以前に記載されたようにヘパリン処理生理食塩水を用いて灌流させた（Burrowsら、1992）。全ての主な器官および腫瘍を回収して、凍結切片の調製のために急速凍結させた。

【0724】

切片を10%血栓含有PBSでブロックした。スライド処理の間のリン脂質の損失を妨げるために、界面活性剤および有機溶媒をブロッキング緩衝液および洗浄緩衝液から除外した。ヤギ抗ラットIgM（ μ 特異的）-HRP結合体を用い、続いてカルバゾールまたはDABを用いた発色によって、ラットIgMを検出した（Friesら、1993）。HRPに結合体化されたストレプトアビジンによってビオチン化試薬を検出した。

10

【0725】

生理食塩水または無関係の特異性のラットIgMを注射したマウス由来の腫瘍切片を陰性コントロールとして使用した。さらなるコントロールは、1%Triton溶液またはアセトン中で10分間、スライドをインキュベートする工程から構成された。これらの処置によってリン脂質が抽出される。これらの条件下でシグナルを検出した。1つの強拡大視野あたりの陽性血管の数を $\times 100$ の倍率で決定した。1切片あたり少なくとも10の視野を試験して、陽性の血管の平均割合を算出した。9D2またはアネキシンVの存在下におけるこの方法による切片の染色によって、インビボにおいて試薬による結合に利用可能な外面化した陰イオン性リン脂質を有する細胞を検出する。

20

【0726】

12. PS陽性腫瘍血管の同定および定量

局在化した9D2抗体またはアネキシンVを有する構造を、DAB染色した切片上の形態学的外観によって、および凍結組織の連続切片上の汎内皮細胞マーカーMECA32を用いた同時染色によって、血管として同定した。腫瘍の連続切片においてMECA32、9D2またはアネキシンVによって染色した血管をカウントすることによって、DAB染色した切片上の定量を行なった。9D2抗体、コントロールラットIgMまたはアネキシンVを注射した6匹のマウス由来の各々の腫瘍タイプの6つのスライドを試験した。1切片あたり少なくとも10個の無作為の視野（1視野あたり0.317 mm^2 ）を、2人の独立した観察者によって、盲検的にスコア付けした。9D2、アネキシンVまたはMECA32によって染色された血管の平均数および標準誤差を算出した。各々の腫瘍タイプ群において決定した9D2またはアネキシンVの陽性血管の平均数を、同じ腫瘍群におけるMECA32陽性血管の平均数と比較した。9D2またはアネキシンV陽性血管の割合を算出した。

30

【0727】

さらなる研究において、MDA-MB-231腫瘍（0.3~0.7 cm^3 の容積）を保有するマウスに、50 μ gのビオチン化9D2、コントロールIgMまたはアネキシンVを静脈内注射した（1群あたりマウス6匹）。ビオチン化試薬を最初にストレプトアビジン-Cy3結合体とともにインキュベートして、PBS中で洗浄し、次いでMECA32抗体、その後FITCタグ化抗ラットIgG二次抗体とともにインキュベートした。それぞれ、Cy3（赤）およびFITC（緑）蛍光について適切なフィルターでとった単一の画像をデジタルカメラによって撮影して、コンピューターに送信した。黄色（融合された緑および赤の蛍光の結果）を示す10個の無作為の視野（1視野あたり0.317 mm^2 ）の画像を、MetaViewソフトウェアの補助によって重ね合わせた。同じ方法を用いて、コントロールラットIgMまたは生理食塩水を注射したマウス由来の腫瘍を解析した。9D2またはアネキシンVが局在化した血管の割合を以下のように算出した：1視野あたりの黄色の血管の平均数を緑の血管の平均数（総数）で割って100を掛ける。

40

【0728】

B. 結果

50

1. 9D2抗体およびアネキシンVのリン脂質特異性

9D2抗体は、ELISAにおいて、特異的に陰イオン性リン脂質（PS、PA、CL、PI、PG）を認識して、中性のリン脂質（PE、PCおよびSM）とは有意な反応性を有さなかった（図2A；表8）。ELISAにおけるリン脂質に対する9D2の結合の強度の順序は、 $PA > PS = CL > PG = PI$ であった。結合は抗原特異的であった。なぜなら無関係の特異性であるいくつかのコントロールラットIgMでは結合は観察されなかったからである。ELISAプレートに吸着された任意の陰イオン性リン脂質に対する9D2の結合は、任意の陰イオン性リン脂質から調製されたリポソームによってブロックされたが、任意の中性のリン脂質から調製されたリポソームによってはブロックされなかった。

【0729】

【表8】

表8

9D2およびアネキシンVのリン脂質特異性

リン脂質		正常な条件下での原形質膜における量および位置 ^a	結合のEC ₅₀ (pM)	
名称	タイプ		9D2	アネキシンV
PS	陰イオン性アミノPL	ほとんどのPL（15%）が内側に位置した	12	100
PA	陰イオン性PL	わずかなPL（1%未満）	2	100
PG	陰イオン性PL	わずかなPL（1%未満）	100	250
PI	陰イオン性PL	わずかなPL（7%）が主に内側に位置した	100	50
CL	陰イオン性PL	原形質膜には欠ける	15	130
PE	中性アミノPL	ほとんどのPL（22%）が主に外側に位置した	>8000	100
SM	中性コリンPL	ほとんどのPL（9%）が外側に位置した	>8000	>8000
PC	中性コリンPL	ほとんどのPL（46%）が外側に位置した	>8000	>8000

^a Fridrikssonら、1999から採用した総リン脂質の割合。割合は異なる細胞タイプについて変化し得る。

【0730】

アネキシンVはまた、陰イオン性リン脂質に結合したが、その結合はアネキシンVが中性のリン脂質であるPEにも強力に結合するという点で9D2の結合よりも特異性が劣った。ELISAにおけるリン脂質に対するアネキシンVの結合の強度の順序は、 $PI > PS = PE = PA = CL > PG$ であった（表8）。アネキシンVについてのこれらの知見は、初期のデータと一致する（Andreeら、1990）。

【0731】

9D2の結合は、5mM EDTAの存在によっては影響されず、このことはこの結合には陰イオン性リン脂質に対する結合にCa²⁺を要さないことを示した。対照的に、陰イオン性リン脂質に対するアネキシンの結合は、陰イオン性リン脂質またはPEに対する結合についてCa²⁺に対するその公知の依存性から予想されるように、5mM EDTAの存在下で無効にされた（Schlaepferら、1987；BlackwoodおよびErnst、1990）。

【0732】

9D2もアネキシンVも、リン脂質でコーティングされているELISAプレートに結合せず、そのため0.2% Tween含有生理食塩水で洗浄され、それらの結合が吸着されたリン脂質に対したものであったことが確認された。9D2およびアネキシンVは、ヘパリンにも、硫酸ヘパランにも、または二本鎖もしくは一本鎖のDNAにも検出可能には

10

20

30

40

50

結合しなかった。

【0733】

2. 9D2抗体およびアネキシンVは、PSに対するお互いの結合を交差ブロックしなかった

9D2抗体およびアネキシンVがPSに対する結合について競合するか否かを試験するために、PSコーティングしたプレート上でビオチン化タンパク質を用いて、交差ブロック研究を行なった。ビオチン化9D2抗体およびアネキシンVの結合を、それぞれ10倍モル過剰の未改変9D2およびアネキシンVによってブロックした(表9)。しかし、未改変のアネキシンVは、ビオチン化9D2がPSプレートに対して結合する能力に影響しなかった。同様に、未改変の9D2抗体の添加は、ビオチン化アネキシンVがPSプレートに対して結合する能力に影響しなかった(表9)。

【0734】

【表9】

表9

9D2およびアネキシンVは、PSに対する結合を交差ブロックしない

PS結合タンパク質	競合物 ^a	結合(コントロール%) ^b
ビオチン化アネキシンV	アネキシンV	8%
ビオチン化9D2	アネキシンV	93%
ビオチン化アネキシンV	9D2	95%
ビオチン化9D2	9D2	5%

^a アネキシンVまたは9D2抗体は、ビオチン化試薬を10倍モル過剰上回って事前混合された。マイクロタイタープレート上のPSに対するビオチン化試薬の結合を、ストレプトアビジン-HRPによって検出した。

^b 競合物の非存在下でのビオチン化試薬の反応性を100%とした。三連の決定の平均値を示す。SDは、平均値の10%未満であった。

【0735】

これらの結果によって、9D2抗体およびアネキシンVが、PSコーティングプレートに対するお互いの結合を交差ブロックしないことが示される。なぜなら9D2抗体およびアネキシンVはPS分子上の異なるエピトープを認識するか、またはプラスチック上に吸着されたPSの異なる構成を認識するからである

3. 細胞表面上に外面化された陰イオン性リン脂質に対する結合

細胞表面に対する9D2抗体およびアネキシンVの結合を、マウスbEnd.3内皮細胞またはウシABAE細胞を用いて試験した。9D2もアネキシンVも、静止条件下でいずれの細胞タイプの非透過性単層にも結合しなかった。このことは、原形質膜の陰イオン性リン脂質のほとんどが細胞質ドメインに対して正常に隔離されることを示す。対照的に、内皮細胞の90~100%においてアポトーシスを生じる条件下で細胞をTNFαおよびアクチノマイシンDとともにプレインキュベートした場合、強力な染色が観察された。

【0736】

9D2およびアネキシンVが細胞表面上のリン脂質に結合されたことを確認するために、H₂O₂処置したbEnd.3細胞を、種々の競合するリポソームの有無において9D2抗体またはアネキシンVとともにインキュベートした。陰イオン性リン脂質は、それらが毒性濃度未満(100~200μM)のH₂O₂を用いて事前処置された場合に、非アポトーシス性の生存可能なbEnd.3細胞上に露出された(Randra, 2002)。

【0737】

H₂O₂処理されたbEnd.3細胞に対する9D2抗体の結合は、陰イオン性リン脂質を含むリポソームによって阻害されたが、中性のリン脂質を含むリポソームによっては阻害されなかった(図3)。細胞に対する9D2結合の阻害の大きさは、プラスチック固定されたリン脂質を用いて得られた結果に極めて一致して、PA>PS>CL>PG>PIの順で変化した(図2Aおよび図2B)。同様に、H₂O₂処置した細胞に対するアネキシンVの結合は、PS、PA、PE、CLならびに、それより低い程度ではPIおよび

P Gを含むリポソームによってブロックされた。S MまたはP Cを含むリポソームは、プラスチック固定されたリン脂質を用いて得られた結果と全く一致して、細胞に対するアネキシンV結合をブロックしなかった。

【0738】

これらの結果によって、 H_2O_2 処置された内皮細胞における陰イオン性リン脂質に9 D 2が結合するが、アネキシンVは陰イオン性リン脂質に加えてP Eに結合することが確認された。

【0739】

4. インビボにおける細胞上で外面化した陰イオン性リン脂質の検出

9 D 2またはアネキシンVが凍結組織の切片に直接加えられる、直接免疫組織化学技術では、原形質膜の内部小葉構造および外部小葉構造の上の陰イオン性リン脂質の間は識別されない。外側に位置するリン脂質を検出するために、9 D 2およびアネキシンVを腫瘍保有マウスに静脈内注射して、腫瘍血管に対する局在化を直接免疫組織化学によって決定した。

【0740】

種々のタイプの固形腫瘍を保有するマウスに、9 D 2抗体またはビオチン化アネキシンVを静脈内注射して、その1時間後に屠殺して、その腫瘍および正常な組織を取り出して、凍結切片を調製した。組織の凍結切片を切断して、HRP標識抗ラットIgMを用いるか、HRP標識化ストレプトアビジンを用いて染色して、注射後にどの細胞に9 D 2およびアネキシンVが結合したかを決定した。血管を形態学的に、そして連続切片上の汎内皮細胞抗体MECA32によるその陽性の染色から同定した。

【0741】

5. 腫瘍保有マウスにおける9 D 2抗体およびアネキシンの体内分布

9 D 2抗体およびアネキシンVは、この研究に含まれた5つ全ての腫瘍において腫瘍血管に局在した（図4；表10）。腫瘍は以下であった：SCIDマウスの乳腺脂肪パッドにおいて正所性に増殖しているヒトMDA-MB-231乳ガン；皮下で増殖しているヒトL540ホジキン腫瘍；皮下で増殖しているヒトNCI-H358 NSCLC；皮下で増殖しているマウスB16黒色腫、および皮下で増殖しているマウスMeth A線維肉腫。

【0742】

【表10】

表10

腫瘍血管に対する9 D 2およびアネキシンVの特異的な局在化

組織	9 D 2抗体 ^a	ラットIgMコントロール	アネキシンV ^b
腫瘍			
MDA-MB-231	40.6±5.4	—	45.3±5.6
L540cy	19.3±3.3	—	16.7±3.9
NCI-H358	15.6±4.1	—	ND
B16	23.4±4.5	—	21.3±6.6
Meth A	25.7±6.8	—	ND
正常			
副腎	—	—	—
脳	—	—	—
心臓	—	—	—
腎臓	— ^c	— ^c	—
小腸	—	—	—
肝臓	—	—	—
肺	—	—	—
膵臓	—	—	—
脾臓	—	—	—
精巣	—	—	—

^a 腫瘍保有マウスにおける9 D 2抗体およびラットIgMコントロールの局在を、抗体（

10

20

30

40

50

50 μg) の注射、生理食塩水を用いてマウスの血液循環を灌流させること、および抗マウス IgM ペルオキシダーゼ結合体を用いることにより組織の切片上で抗体を検出することによって決定した。1 領域 0.317 mm^2 あたりの MECA32 染色血管の PS 陽性血管の平均 ($\pm$ SE) 割合として結果を示す。各々のタイプの 6 つのサンプルを解析した。1 領域 0.317 mm^2 あたりの MECA32 陽性血管の平均数は、それぞれ、MDA-MB-231、L540cy、H358、B16 および MethA 腫瘍について 23、25、21、18 および 19 ± 10 の血管であった。

^b アネキシン V の局在化は、ビオチン化アネキシン V 注射と、それに続くストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ結合体を用いる凍結切片上での検出によって決定された。

^c 非抗原特異的尿細管染色は、9D2 およびコントロール抗体レシピエントの両方で可視であった。

10

【0743】

9D2 およびアネキシン V は、本質的に同じパターンの染色を示した。腫瘍血管に対する 9D2 抗体の局在化は特異的であった。なぜなら腫瘍内皮の染色が無関係な特異性のラット IgM で観察されなかったからである。おそらく、腫瘍血管外へのコントロールラット IgM の漏出がある程度まで生じるが、血管外の IgM の染色は、間接的な免疫組織化学によって識別するには拡散しすぎているかまたは弱すぎた。

【0744】

9D2 抗体またはアネキシン V の血管局在化は、試験した 10 個の正常な器官のうち 9 つでは観察されなかった (表 10)。腎臓では、抗原特異的ではないと考えられる尿細管の染色が観察された。おそらくは尿細管を通した IgM またはその代謝物の分泌のおかげで、この器官は 9D2 およびコントロールラット IgM レシピエントの両方で染色された。生理学的な血管形成の部位である卵巣は試験しなかった。

20

【0745】

9D2 およびアネキシン V 陽性血管の割合は、MDA-MB-231 腫瘍における 40% から H358 腫瘍における 15% に及んだ。陰イオン性リン脂質陽性血管は、腫瘍の全ての領域における毛細管および血管の管腔表面に存在したが、特に壊死の領域およびその周辺では優勢であった。ほとんどの陰イオン性リン脂質陽性血管は、光学顕微鏡によって明らかである形態学的異常を示さなかった。まばらに存在する血管、詳細には壊死領域に位置する血管は、悪化の形態学的兆候を示した。9D2 抗体およびアネキシン V はまた、壊死細胞およびアポトーシス腫瘍細胞に局在したが、コントロール IgM の局在化は検出不能であった (図 4)。

30

【0746】

これらの知見によって、陰イオン性リン脂質は、種々の腫瘍における血管内皮細胞の管腔表面に存在するが、正常な組織には存在しないことが実証される。

【0747】

6. 二重染色研究

正所性 MDA-MB-231 乳房腫瘍を保有するマウスにビオチン化 9D2 抗体、ビオチン化コントロール IgM またはビオチン化アネキシン V を静脈内注射した二重染色研究を行なった。1 時間後、マウスを屠殺して、その腫瘍を取り出して、凍結切片を切断した。次いで腫瘍切片を Cy3 結合体化ストレプトアビジンを用いて染色して、ビオチン化タンパク質を検出し、FITC 結合体化 MECA32 を用いて染色して血管内皮細胞を検出した。この検出方法では赤および緑によってビオチン化タンパク質および血管内皮細胞を標識した。ビオチン化タンパク質が内皮に結合した場合、集束型画像 (converged image) は黄色になる。

40

【0748】

これらの研究では、ビオチン化 9D2 およびアネキシン V はほとんどが、血管内皮に結合するようであった。なぜならそれらの染色パターンは、MECA32 の染色パターンに収斂したからである。間接的な免疫組織化学によって得られた結果と極めて一致して、約 40% の MECA32 陽性血管が 9D2 およびアネキシン V に結合した。腫瘍間質への

50

ビオチン化タンパク質の漏出は、二重染色で検出されたが、それは間接的な免疫組織化学によっては明らかではなかった。

【0749】

ビオチン化タンパク質は、血管のうちわずか（約5%）の周囲の血管内皮の外側に見出された。無関係の特異性のビオチン化ラット IgM を注射されたマウス由来の腫瘍において、ビオチン化 IgM はまた、血管のうちほぼ同様の割合（約5%）の周囲の腫瘍間質に漏出したが、ほとんどは血管内皮によって結合されないようであった。おそらく、二重染色技術によって検出されるが、ただし間接的な免疫組織化学技術によっては検出されない、血管外遊出した 9D2 および アネキシン V の検出は、過去の技術のさらに大きい感度、および 2 つの染色パターンが比較され得るさらに大きい精度を反映する。注射されていないコントロール腫瘍は、ストレプトアビジン-Cy3 によって完全に染色され、このことは赤い蛍光が局在化されたタンパク質に相当することを示す。

10

【0750】

実施例 VII

腫瘍環境における陰イオン性リン脂質膜転位

腫瘍血管内皮細胞に固有のインビボ表面マーカーとしてのアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発見によって、このような分子の転位および外膜発現に対する腫瘍の微小環境の効果をさらに検討するように本発明者らは促された。本実施例は、腫瘍内の条件を模倣する特定の条件に対して細胞内皮をインビトロで暴露することによって、インタクトな生存可能な細胞において、初期に観察されたアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質表面発現が再現されることを示す。

20

【0751】

A. 材料および方法

1. アネキシン V のヨウ素化

組み換えヒトアネキシン V は、ET12a-Panionic リン脂質 1 プラスミド (University of Washington, Seattle の J. Tait 博士から入手) で形質転換した E. coli から精製した。タンパク質の純度および PS に対する結合を、それぞれ SDS-PAGE および PS コーティングされたプラスチックで確認した。ウサギポリクローナル、アフィニティー精製抗アネキシン V 抗体を用いて PS に結合したアネキシン V を検出した。アネキシン V は、Bocci (1964) によって記載されたとおりクロラミン T を用いて ^{125}I で放射性標識した。比活性は、Brandford アッセイ (1976) で測定した場合、タンパク質 $1\text{ }\mu\text{g}$ あたり約 $1 \times 10^6\text{ cpm}$ であった。

30

【0752】

2. 内皮細胞処置

表 11 に挙げた濃度のサイトカインまたは増殖因子を用いて内皮細胞を処置した。全ての試薬を 10% の血清を含む培地中で希釈して、細胞とともに 37°C で 24 時間インキュベートした。

【0753】

低酸素の効果を研究するため、細胞を 24 ウェルプレートに播種して、48 時間、加湿した正常酸素雰囲気 ($21\% \text{O}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$) 中でインキュベートさせ、その後に密閉したチャンバ (Billups Rothenberg Inc., Del Mar, Ca) 中で加湿した低酸素雰囲気 ($1\% \text{O}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $94\% \text{N}_2$) に移した。細胞を低酸素チャンバにおいて 37°C で 24 時間インキュベートして、次いで 37°C で正常酸素環境に 4 時間戻した。この細胞を同一継代からの平行培養と比較して、同じ日に播種して、完全に正常酸素条件下で維持した。いくつかの研究において、低酸素チャンバに移す前に、IL-1 α (10 ng/ml) および TNF α (20 ng/ml) を培地に加えた。

40

【0754】

酸性微小環境の効果を試験するために、必要量の HCl を用いて種々の pH (7.3 から 6.2 の間におよぶ) に調節した、重炭酸塩を欠く増殖培地に細胞を曝露させた。CO

50

^{2} の非存在下で 37°C で細胞をインキュベートした。培養の 24 時間の間、培養培地が割り当てられた pH を保持することを確認した。これらの実験条件は、ウシまたはマウスの内皮細胞のいずれにも毒性ではなく、結合した単層の細胞形態学にも生存度にも影響を有さなかった。

【0755】

3. ^{125}I 標識したアネキシン V による培養内皮細胞上での PS の検出

上記の試薬を用いた処置後に、処置した細胞およびコントロール細胞を、 7.1 ピコモルの ^{125}I 標識アネキシン V ($200\text{ }\mu\text{l}$ / ウェル) を含有する結合緩衝液とともにインキュベートした。室温での 2 時間のインキュベーション後、細胞を徹底的に洗浄して、 0.5 M の NaOH に溶解した。 0.5 ml の全体容積をプラスチックチューブに移して、ガンマカウンターでカウントした。 5 mM EDTA の存在下で非特異的結合を決定して、実験値から差し引いた。その結果を、 1×10^6 個の細胞について正規化した、細胞結合したアネキシン V の正味のピコモルとして表現した。

【0756】

アクチノマイシン D および $\text{TNF}\alpha$ (各々の成分の 50 ng/ml) で同時に処置した細胞上で、アネキシン V の最大結合を決定した。以前に報告されたとおり、これらの因子は、内皮細胞のうち $90 \sim 100\%$ でアポトーシスおよび PS 露出を生じる (Lucasら、1998)。未処置の細胞に対する ^{125}I アネキシン V の基礎的な結合を、 10% 血清を含む培地の存在下で決定した。未処置の培養物に結合した ^{125}I アネキシン V の量を、処置した培養物における量から差引きした。PS の露出を以下の式に従って算出した：実験条件下の細胞結合アネキシン V (ピコモル) を最大アネキシン V 結合 (ピコモル) で割り、 100 を掛けた。各々の研究を二連で行い、少なくとも 3 回行なった。平均値を算出した。これらの別の実験からの SE の平均値は 5% 未満であった。

【0757】

4. 培養した内皮細胞および MDA-MB-435 腫瘍細胞における PS の検出

HUVEC 細胞および腫瘍細胞を 8 ウェルチャンバースライド上で約 70% コンフルエンスまで増殖させた。PS 曝露を誘導するために、細胞を無血清培地中で H_2O_2 ($200\text{ }\mu\text{M}$) で 37°C にて 1 時間処理した。細胞を DPBS で洗浄し、無血清培地中に希釈した $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の 3G4 抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。DPBS で穏やかに洗浄したのち、細胞を PBS 中の 4% (v/v) パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。

【0758】

Texas Red 標識ファロイジン (Molecular Probes, Eugene, OR) で細胞骨格を同時染色するために、細胞を PBS 中の 0.1% Triton-X100 で 5 分間透過性にした。Texas Red 標識ファロイジン (1% BSA を含む PBS 中の $1:50$ 希釈) および FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (1% BSA を含む PBS 中の $1:200$ 希釈) を、室温で 1 時間インキュベートした。細胞核を、DAPI で対比染色した。無関係の特異性のマウス IgG₃ および二次抗体単独を、これらの研究においてネガティブコントロールとして用いた。各研究を二連で行い、少なくとも 2 回繰り返した。

【0759】

他の、研究において H_2O_2 処理した細胞を、 0.25% トリプシンで分離させ、洗浄し、 0.05% w/v アジ化ナトリウムおよび $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の 3G4 を含む氷冷 DME M に 1 時間懸濁させた。細胞ペレットを 1% BSA を含む PBS で洗浄し、FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 ($1:200$ 希釈) を含む同じ緩衝液に 30 分間懸濁させた。3 回洗浄したのち、細胞ペレットを、 1% PBS および 0.05% w/v アジ化ナトリウムを含む PBS に懸濁させた。生/死の識別のために、ヨウ化プロピジウムを FACS 分析の前に添加した。

【0760】

B. 結果

1. H_2O_2 による誘導

マウスbE nd. 3内皮細胞を、50,000細胞/ウェルの初期密度で播種した。24時間後に細胞を、漸増濃度(10 μ M~500 μ M)の H_2O_2 とともに37℃で1時間インキュベートするか、または未処置のままにした。インキュベーションの終わりに細胞を0.2%ゼラチン含有PBSで3回洗浄して、0.25%グルタルアルデヒドで固定した。同一のウェルを抗PS IgMで染色するか、またはトリプシン処理してトリパンブルー排除試験によって生存度について評価した。抗PS染色のために、2%ゼラチンを用いた10分間のブロッキング後に、細胞を2 μ g/mlの抗PS抗体とともにインキュベートし、続いて抗マウスIgM-HRP結合体を用いて検出した。

【0761】

10

高濃度の H_2O_2 に対する内皮細胞の暴露によって約90%の細胞においてPS転位が生じる。しかし、これには、基板からの細胞の脱離および約50~60%までの細胞生存度の低下をともなう。細胞生存度の低下を伴う表面PS発現の関連は理解可能であるが、それでもなお約90%の転位が観察され、これには細胞生存度のわずかな50~60%の低下しか伴わないということは注目される。

【0762】

より低濃度の H_2O_2 を用いることで、細胞生存度において感知できるほどの低下なしに有意なPS発現が得られた。例えば、PSは20 μ M程度の低濃度で H_2O_2 を用いて、全ての H_2O_2 処置したウェルにおける約50%の細胞の細胞表面で検出された。これらの低い H_2O_2 濃度下で、プラスチックおよびお互いに対して強固に結合したままの細胞は、形態学的変化を示さず、そして細胞傷害性の兆候も有さなかったことに注目することが重要である。詳細な解析によって本質的に100%の細胞間接触、適切な細胞形状の保持およびインタクトな細胞骨格が明らかになった。

20

【0763】

従って、低レベルの H_2O_2 によって誘導された50%のPS表面発現が細胞集団で観察され、ここでは細胞生存度は、コントロールの未処置細胞に同一であった(すなわち、95%)。高い H_2O_2 濃度に関連したPS発現には、細胞損傷と伴い、そして高い H_2O_2 濃度に対して曝露されたPS陽性細胞は、脱落されて、浮かび、そして細胞骨格が破壊されていた。

【0764】

30

低濃度 H_2O_2 の存在下での細胞生存度の維持は、他の実験からのデータと一致する。例えば、Schorerら(1985)は、15 μ M H_2O_2 で処置したヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)が平均90~95%の生存度(5%~10%の傷害として報告された)であったが、1500 μ M H_2O_2 に暴露された細胞ではわずか0~50%の生存度(50%~100%損傷された)であったことを示した。

【0765】

インビトロにおける腫瘍環境を模倣するための H_2O_2 の使用はまた、腫瘍環境が、 H_2O_2 および他の反応性酸素種を生成する炎症性細胞、例えば、マクロファージ、PMNおよび顆粒球において豊富であるという点でも適切である。安定な腫瘍血管マーカーと前には決して結び付けられていないが、炎症性細胞は、 H_2O_2 の存在を要する反応性酸素種に関する機構によって内皮細胞損傷を媒介することが公知である(Weissら、1981; Yamadaら、1981; Schorerら、1985)。実際に、インビトロにおけるPMNの刺激は、細胞死(クロム遊離アッセイによって測定される)も細胞剥落も生じることのない、致死に至らない内皮細胞損傷を生じるのに十分な H_2O_2 の濃度を生じること; およびこれらの H_2O_2 濃度がインビボで局所的に獲得可能であることが研究によって示されている(Schorerら、1985)。

40

【0766】

現在のインビトロ転位データは、抗PS抗体がインビボで腫瘍血管内皮細胞に特異的に局在して、正常な組織における細胞には結合しないことを示す、初期の結果と相関している。インビボのような濃度の H_2O_2 が細胞完全性を破壊することなく内皮細胞表面に対

50

するP S転位を誘導するという知見は、もとのインビボデータおよび本発明者らの治療アプローチを確認することに加えて重要な意味を有する。

【0767】

ヒト、ウシおよびマウスの内皮細胞は全てが、正常な条件下ではP S陰性であることが公知である。任意の以前に考証されたP S発現は常に、細胞損傷および／または細胞死に関連している。これは正常な生存度が維持される本研究においては事情が異なる。これによって、腫瘍血管内皮におけるP S転位が、細胞損傷とは関係のない生化学的機構によって媒介されることが示される。これは、形態学的にインタクトな内皮細胞におけるP S表面発現の最初の実証であり、そしてP S発現がアポトーシス経路（単数または複数）から切り離され得るという最初の開示であると考えられる。本発明の実現可能性に戻れば、これらの観察によってやはり、P Sが一過性ではなく持続できる腫瘍血管のマーカーであって、治療介入のための適切な候補物であることが確認される。

10

【0768】

2. トロンビンによる誘導

トロンビンはまた、P S発現を増大するが、 H_2O_2 と同じ程度までではないことが観察された。このデータはまた、本発明者らによって開発されたP S発現の腫瘍誘導モデルの欠くことのできない部分である：正常組織におけるトロンビン誘導性P S表面発現はまた、さらなる凝固物である。なぜなら、P S発現は凝固開始複合体のアセンブリを協調させるからである。

【0769】

腫瘍環境は、腫瘍血管が凝固する傾向があるように血栓促進性（プロトロンビン性）であることが公知である（米国特許第5, 877, 289号）。トロンビンは、凝固カスケードの産物であるので、これは腫瘍血管に存在する。実際、トロンビンの存在は、VCAM発現を誘導して、これは本発明者らが腫瘍血管の標的可能マーカーとしてVCAMを開発する能力に貢献する（米国特許第5, 855, 866号；同第5, 877, 289号）。従って、トロンビンがまたP S発現を誘導するということを示す本発明のデータは、裸の抗体および治療結合体を用いてアミノリン脂質を標的化することに関係し、さらに組織因子を含む抗VCAMコアグリガンドの有益な効果を説明する（実施例I）。

20

【0770】

3. 酸化ストレスの他の因子

インビトロにおけるマウスbEnd. 3またはウシABAE細胞を、多くの腫瘍の微小環境に存在する（Lichtenfeldら、1996；Harrisら、1996）種々の濃度の因子および条件、例えば、低酸素／再酸素化、トロンビン、酸性度、炎症性サイトカインおよび過酸化水素を用いて24時間処置した（表11）。

30

【0771】

P Sおよび陰イオン性リン脂質の外面化を、 ^{125}I アネキシンV結合を測定することによって定量した。アネキシンV結合の量を、アクチノマイシンDおよびTNF- α を用いる併用処置によって、細胞のうち90～100%のアポトーシスが誘導された細胞での量と比較した。アクチノマイシンDおよびTNF α は、文献報告（Raoら、1992）とよく一致して、両方の細胞タイプにおいて 10^6 個の細胞あたり6.2ピコモルのアネキシンVの結合（1細胞あたり 3.8×10^6 個のアネキシンVの分子）を誘導した。この値を外面化された陰イオン性リン脂質の最大レベルとした。

40

【0772】

【表 1 1】

表 1 1

腫瘍環境を再生させることによる P S の誘導

処置	濃度	¹²⁵ I-アネキシン V (最大結合%)	
		A B A E 細胞	b E n d. 3 細胞
10%血清を含む培地	N/A	0	0
アクチノマイシン D + TNF α	各 50 ng/ml	100	100
VEGF	20 ng/ml	0	0
FGF-2	20 ng/ml	0	0
散乱因子	40 ng/ml	0	0
TGF β_1	20 ng/ml	0	0
PDGF-BB	20 ng/ml	0	0
IL-10	20 ng/ml	0	0
IL-8	20 ng/ml	0	0
IL-6	20 ng/ml	0	0
IL-1 α	10 ng/ml	6.4	7.5
IL-1 β	10 ng/ml	5.8	5.5
インターフェロン	40 ng/ml	8.6	2.8
TNF α	20 ng/ml	7.4	13.7
トロンビン	50 nM	8.8	17.4
低酸素	1% O ₂	15.0~17.5	22.5
低酸素+IL-1 α	上と同じ	26.0	31.0
低酸素+TNF α	上と同じ	33.0	36.0
pH 6.6	N/A	20.2	18.9
過酸化水素	200 μ M	95.5	98.4

表 1 1 では、用いられるサイトカイン、増殖因子およびトロンビンの濃度を、培養された内皮細胞に対して最大の刺激効果を有する文献の値から選択した。これらの濃度は、形態学的外観、脱落のないこと、およびトリパンブルーの取り込みのないことによって判定されるとおり、試験の期間（24 時間）を通じて毒性を生じなかった。使用される H₂O₂ の濃度は、選択された条件下で細胞傷害性を生じない最大濃度であった。

【0773】

¹²⁵I アネキシン V の基礎的な結合を増殖培地単独の存在下で決定した。アクチノマイシン D および TNF α を用いた併用処置によるアポトーシスの導入後に最大の P S 露出を決定した。3 つの別の研究からの繰り返しの平均を示す。標準誤差は 5 % 未満であった。

【0774】

未処理の細胞を、アネキシン V または抗 P S（9 D 2）抗体結合によって判定されるように、外面化した P S をほとんど欠いた（表 1 1）。増殖媒体単独の存在下での基礎的結合は、それぞれ A B A E および b E n d. 3 細胞について、0.44 および 0.68 ピコモルの ¹²⁵I アネキシン V であった。これは、同じ条件下で約 10 % の細胞がビオチン化アネキシン V に結合するという知見とよく関連して、それぞれ、A B A E および b E n d. 3 細胞について約 7.1 % および 10.9 % の最大の結合に相当した。

【0775】

VEGF、HGF、FGF、TGF β_1 、PDGF、IL-6、IL-8 および IL-10 は、未処置の細胞について基礎的レベルを上回って ¹²⁵I アネキシン V の結合を増大しなかった。炎症伝達物質（IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α およびインターフェロン）は、A B A E 細胞について最大レベルの 5 ~ 8 % および b E n d 3 細胞について 3 ~ 14 % に及ぶ、P S および陰イオン性リン脂質の転位において少ないが再現性の増大を生じた。

【0776】

低酸素／再酸素化、トロンビンまたは酸性の外部条件（pH 6.8 ~ 6.6）によって、A B A E 細胞については最大レベルの 8 ~ 20 %、および b e n d. 3 細胞については

最大レベルの17～22%におよぶ、PSおよび陰イオン性リン脂質の中程度の高い外面化が誘導された。100～200 μMの過酸化水素を用いた処置後にPSおよび陰イオン性リン脂質転位における最大の増加が観察された。この処置によって、¹²⁵IアネキシンV結合によって判定されるように、両方の細胞タイプにおけるPSのほぼ完全な(95%)外面化が生じた(表11)。免疫組織化学的に判定されたとおり、ABAEおよびbEnd.3細胞の70%より多くがビオチン化アネキシンVに結合した。

【0777】

PSおよび陰イオン性リン脂質転位が低酸素/再酸素化、トロンビン、酸性度、TNFα、IL-1またはH₂O₂を用いた処置によって生成された内皮細胞は、アッセイの期間(24時間)中、マトリックスに結合したままであり、細胞間接触を保持し、トリパンブルー色素を排除する能力を保持した。誘導性因子が除去されるか、または培養条件が正常に戻された後に、正常なPSおよび陰イオン性リン脂質の配向は、ほとんどの細胞において24～48時間後に回復された。H₂O₂の直接の適用によって、または低酸素/再酸素化、酸性度、トロンビンもしくは炎症性サイトカインによって間接的に、生み出された穏やかな酸化的ストレスが生存可能な内皮細胞上のPSおよび陰イオン性リン脂質の一過性の転位を誘発することがこれらの結果によって示される。

【0778】

4. 炎症性サイトカインおよび低酸素/再酸素化の併用効果

ABAEおよびbEnd.3細胞をIL-1αまたはTNFαの存在下で低酸素/再酸素化に供した場合、強化されたPSおよび陰イオン性リン脂質露出が観察された。サイトカインの非存在下で、低酸素/再酸素化は、ABAE細胞によるPS露出を、アポトーシス濃度のアクチノマイシンDおよびTNFαで処置した細胞について最大レベルの15%～17.5%まで増大した。毒性未満の濃度のIL-1αまたはTNFαの存在下で、低酸素/再酸素化は、陰イオン性リン脂質露出をそれぞれ最大の26%および33%まで増大した(図5; 表11)。低酸素/再酸素化の非存在下でのサイトカインの効果との比較によって、サイトカインおよび低酸素/再酸素化の組み合わせがPS露出に対して相加作用よりも大きい作用であったことが示される。同様の効果がbEnd.3細胞上で観察された。

【0779】

従って、腫瘍環境においては、低酸素/再酸素化によって誘導されたPSおよび陰イオン性リン脂質の露出は、炎症性サイトカインによって、そしておそらくは酸性度およびトロンビンのような他の刺激によって増幅され得る。

【0780】

これらのインビトロ研究は、インビボにおける腫瘍内皮細胞に対するPS露出の機構の解明に役立った。それらによって、インビボにおいて腫瘍における刺激を模倣する細胞傷害性を生じずに、種々の要因が内皮細胞に対するPS露出を誘導するということが示される。低酸素とその後の再酸素化、酸性度およびトロンビンが、生存可能な内皮細胞上のPS露出を最も増大した。炎症性サイトカイン(TNFαおよびIL-1α)はまた、PS露出の弱いが明確な誘導を生じた。

【0781】

これらの条件は、以下の理由によってインビボでの腫瘍における主な誘導性刺激である可能性が高い: i) PS陽性内皮細胞は、低酸素、酸性度、血栓症になった血管、および浸潤性宿主白血球が通常観察される、壊死および壊死の周囲の領域において優勢である; ii) 低酸素/再酸素化がインビトロにおける内皮細胞に対するTNFαおよびIL-1の弱いPS露出活性を増幅するという知見は、低酸素およびサイトカイン分泌腫瘍および宿主細胞が共存する腫瘍におけるインビボ状況と相関する; iii) 低酸素/再酸素化およびトロンビンは、NADPHオキシダーゼ様膜酵素の活性化を通じて内皮細胞において反応性酸素種(ROS)を生成することが報告されている(Zuluet al., 1995)。悪性細胞によって生成されたROSは、内皮細胞の損傷に寄与し得る(Shaughnessy et al., 1989)。過酸化水素は、本研究において見出された培養された内皮細胞

胞上のPS露出の最も強力な誘導因子であって、これによってROSの関与についての直接の支持が得られる。

【0782】

外面化したPSによって、凝固因子がその上に濃縮およびアセンブルする陰性のリン脂質表面が得られる。これは、長らく認識されている腫瘍内皮上の凝固促進性の状況に寄与し得る。PSはまた、腫瘍への白血球浸潤を補助する、循環しているマクロファージ（McCoyら、1986）、Tリンパ球（Quら、1996）および多形核球細胞についての結合部位を提供する。腫瘍内皮上のPSに対する活性化マクロファージ、多形核球細胞および血小板の結合は、反応性酸素種のさらなる分泌およびPS露出のさらなる増幅をもたらし得る。

10

【0783】

5. H₂O₂処理したHUVECおよびMDA-MB-435細胞に対する抗体結合

H₂O₂処理した、および未処理のHUVECおよびMDA-MB-435細胞に対する3G4抗体の結合を、フローサイトメトリーによって分析した（図5A）。H₂O₂処理条件は、上記のように確立し、原形質膜の外面における陰イオン性リン脂質の曝露を誘導した。

【0784】

H₂O₂での処理前にいずれの細胞も検出可能なレベルで3G4に結合しなかった。H₂O₂での処理後、3G4で染色しその後FITC-抗マウスIgGで染色した細胞の平均蛍光強度は、BBG3で処理しその後二次試薬で処理した細胞の平均蛍光強度と比べて約10倍であった。H₂O₂処理した細胞は、ヨウ化プロピジウムで染色されず、これは、これらの外側の膜がインタクトであることを示す。3G4結合は、陰イオン性リン脂質から調製したリポソームによってブロックされたが、中性のリン脂質から調製したリポソームではブロックされず、これは、3G4が細胞の陰イオン性リン脂質に結合することを示す。

20

【0785】

細胞表面における3G4抗体の分布を決定するために、H₂O₂処理したHUVECおよびMDA-MB-435細胞を、間接免疫蛍光によって3G4で染色し、蛍光顕微鏡を用いて試験した（図5B、図5C、図5Dおよび図5E）。3G4抗体は、H₂O₂処理したHUVECおよびMDA-MB-435細胞の原形質膜の別個の領域を染色した。細胞膜の染色された領域は、H₂O₂で処理した内皮細胞に観察される「膜泡」と類似の、小さい表面泡が現れた（Hastieら、1997；van Gorpら、2002）。H₂O₂で処理した細胞は、コントロール抗体であるBBG3によって染色されず（図5B、5D）、これは、細胞への3G4の結合が抗原特異的であることを示す。同一の染色パターンが、FITC標識アネキシンA5で観察された。3G4陽性のH₂O₂で処理した細胞は、H₂O₂の添加1時間後に試験した場合、核濃縮の形態学的兆候を示さず、内皮細胞中の過酸化物誘導性膜泡がグルタチオン酸化と関連し、アポトーシスと関連せず、可逆的ではあり得ないという報告（van Gorpら、2000）と一致する。

30

【0786】

したがって、これらの知見は、3G4抗体が通常はHUVECまたはMDA-MB-435細胞の表面に存在せず、細胞がH₂O₂で処理された場合に細胞表面に曝露される陰イオン性リン脂質に結合することを示す。

40

【0787】

（実施例XIII：アネキシン結合体の抗腫瘍効果）

アミノホスホリピドが腫瘍脈管構造の安定なマーカーであるという驚くべき知見はまた、抗体-治療剤構築物がガン治療に使用され得ることを意味する。標的剤としての抗体の使用に加えて、本発明者らは、アネキシン、および他のアミノホスホリピド結合タンパク質もまた、治療剤を腫瘍脈管構造に特異的に送達するのに使用され得ると結論付けた。以下のデータは、アネキシン-TF構築物のインビボ投与から生じる抗腫瘍効果を示す。

【0788】

50

(A. 方法)

アネキシンV-tTF結合体を調製し、そして固形腫瘍を有するnu/nuマウスに投与した。この腫瘍は、少なくとも約 1.2 cm^3 の腫瘍を形成したヒトHT29結腸直腸腺ガン細胞から形成された。アネキシンV-tTFコアグリガンド($10\text{ }\mu\text{g}$)を静脈内投与し、そして24時間循環させた。生理食塩水で処置したマウスを、コントロールマウスとして別々に維持した。1日の処置期間の後、このマウスを屠殺し、そして放血させ、そしてこの腫瘍および主な器官を分析のために採取した。

【0789】

(B. 結果)

アネキシンV-tTF結合体が、HT29腫瘍保有マウスにおいて特定の腫瘍血管凝固を誘導することを見出した。アネキシンv-tTF結合体処置した動物における腫瘍血管の約55%が、1回の注射後に血栓形成した。対照的に、コントロール動物の腫瘍脈管構造において血栓、最小限に現れた。

【0790】

実施例IX

3SB抗PS抗体の抗腫瘍効果

本実施例は、同系および異種の腫瘍モデルを用いる抗PS抗体の抗腫瘍効果を示す。本研究で用いる3SB抗体は、PS(およびPA)に結合するが、本質的にPEとの反応性は欠く。この抗PS抗体は、血栓および腫瘍壊死を伴った腫瘍血管傷害を生じた。

【0791】

抗PS抗体の効果を、3SB抗体を用いる同系および異種の腫瘍モデルにおいて最初に試験した。同系のモデルについて、マウス結腸直腸ガンColo26の 1×10^7 個の細胞(Dr. Ian Hart, ICRF, Londonから入手)をBALB/cマウスの右脇腹に皮下注射した。異種モデルにおいては、雄性CB17 SCIDマウスの右脇腹に 1×10^7 個の細胞を皮下注射することによってヒトホジキンリンパ腫L540異種移植片を樹立した。処置の前に約 $0.6\sim 0.9\text{ cm}^3$ のサイズまで腫瘍を増殖させた。

【0792】

腫瘍保有マウス(1群あたり4匹)に $20\text{ }\mu\text{g}$ の3SB抗PS抗体(IgM)、コントロールのマウスIgMまたは生理食塩水を腹腔内注射した。48時間の間隔で処置を3回繰り返した。動物を腫瘍測定および体重について毎日モニターした。腫瘍容積を実施例Iに記載のとおり算出した。腫瘍が 2 cm^3 に達するか、または腫瘍が壊死もしくは潰瘍形成の兆候を示す前にマウスを屠殺した。

【0793】

同系および異種の腫瘍の両方の増殖を3SB抗PS抗体を用いた処置によって効率的に阻害した(図6Aおよび図6B)。抗PS抗体は、血栓および腫瘍壊死を伴った腫瘍血管傷害を生じた。ブロックされた血管の周囲の血餅の存在および腫瘍塊の分解が証明された。

【0794】

定量的に、3SB抗PS抗体処置は、大きいColo26腫瘍(図6A)およびL540腫瘍(図6B)を保有するマウスにおけるコントロール腫瘍容積の60%まで腫瘍増殖を阻害した。生理食塩水またはコントロールのIgMで処置したマウスでは、腫瘍増殖の遅延は見出されなかった。抗PS抗体で処置したマウスでは毒性は観察されず、正常な器官では、未処置または生理食塩水で処置されたマウスと識別できない、未変化の形態が保存されていた。

【0795】

腫瘍の退行は最初の処置の24時間後に開始して、腫瘍はその後6日間サイズが低下し続ける。これは同系および免疫無防備状態+腫瘍モデルの両方で観察され、このことはこの効果が免疫状態依存性機構(単数または複数)によって媒介されることを示した。さらに、腫瘍負荷の減少は、 1500 mm^3 より大きい腫瘍を保有するコントロールのマウスに比べて、動物の意識の覚醒の向上および一般的に健常な外観を伴っていた。最初の処置

の7～8日後に腫瘍の再増殖が生じた。

【0796】

L540腫瘍の抗PS処置で得られた結果は以下の利用のためにさらに納得される。とりわけ、L540腫瘍処置において観察された腫瘍壊死は、L540腫瘍においてPSに陽性に染色された血管の割合がHT29およびNCI-H358腫瘍におけるよりも少ないという事実にかかわらず生じた。このことは、他の腫瘍タイプを処置した場合、さらに急速な壊死が生じる可能性が高いということを意味する。さらに、L540腫瘍は、清澄な組織学的切片を提供して、実際に壊死に対して耐性であることが公知なので、一般に実験モデルとして選択される。

【0797】

実施例X

陰イオン性リン脂質に対する抗体(9D2)の抗腫瘍効果

本実施例は、インビボにおける抗腫瘍研究において、PSおよび他の陰イオン性リン脂質に結合する、9D2抗体の効果を実証する。

【0798】

陰イオン性リン脂質9D2に結合する高用量($>150\mu\text{g}$)のラット抗体を、H358腫瘍を保有するヌードマウスに注射した。免疫局在化研究によって、これが腫瘍内皮に強力に局在した(4+)が、正常な血管による9D2の非特異的な結合が、高用量に起因していくらか低いレベルで観察されたことが示された(無関係の特異性のコントロールのIgM抗体について観察されるように)。

【0799】

腹水産物にL540腫瘍を有するSCIDマウスに9D2を腹腔内注射した場合、腫瘍は壊死して崩壊した。L540腫瘍を有するSCIDマウスへのコントロール抗体(MK2.7、ラットIgG)の注射の際、同様の効果は観察されなかった。

【0800】

次いで、インビボでのL540腫瘍の増殖に対する9D2抗PS抗体の効果をさらに正確に決定した。腫瘍が $200\sim 250\mu\text{l}$ に達した場合、処置を開始した(0日)。0日から7日まで、マウスに約 $150\mu\text{g}$ のIgM($200\mu\text{l}$ 上清)または $200\mu\text{l}$ の10%DMEMを腹腔内注射した。7日から22日まで、マウスに約 $300\mu\text{g}$ のIgM($400\mu\text{l}$ 上清)または $400\mu\text{l}$ の10%DMEMを腹腔内注射した。22日が処置の最終日であって、マウスを屠殺した。

【0801】

表12に示すとおり、10～22日まで、腫瘍増殖は一般に約40%～50%まで阻害される。研究の終わりに、 $2000\mu\text{l}$ 容積を超える腫瘍を有するのはコントロール群での9匹中9匹に比べて、処置群ではわずか4匹のマウスであった。

【0802】

10

20

30

【表 1 2】

表 1 2

インビボでの L 5 4 0 腫瘍における抗 P S 抗体の効果

処置開始後 日数	平均腫瘍容積 (μ l)		阻害 (%)	2 0 0 0 μ l を超える腫瘍 容積を有するマウス数	
	コントロール	処置		コントロール	処置
0	3 4 1	3 2 0	6. 2	0	0
1	4 6 4	3 2 5	1 0. 8	0	0
3	4 1 2	4 1 5	0	0	0
7	6 8 7	4 5 5	3 3. 8	0	0
1 0	9 0 4	5 4 4	3 9. 9	1 / 9	0
1 3	9 4 5	5 4 5	4 2. 4	1 / 9	0
1 5	1 3 7 3	6 8 5	5 0. 1	4 / 9	1 / 1 0
1 7	1 4 2 6	8 4 2	4 1. 0	4 / 9	4 / 1 0
2 0	1 9 9 2	9 8 7	5 0. 5	6 / 9	4 / 1 0
2 2	2 5 6 0	1 3 6 5	5 3. 3	9 / 9	4 / 1 0

別のインビボ研究では、C B 1 7 S C I D マウスにおける L 5 4 0 腫瘍の増殖に対するラット抗 P S 抗体の効果、腫瘍細胞注射後 4 5 日間追跡した。これらの腫瘍保有マウスを、毎日 3 0 0 μ g の抗 P S 抗体を腹腔内に用いて処置するか、またはコントロールとして毎日 3 0 0 μ l の 1 0 % D M E M を腹腔内に用いて処置した。腫瘍処置の種々のパラメーターは、コントロールに比べて処置群において著しく良好であった（表 1 3）。

【 0 8 0 3 】

【表 1 3】

表 1 3

インビトロでの L 5 4 0 腫瘍に対する抗 P S 抗体の効果

他のパラメーター	コントロール	処置
退行した腫瘍の% ¹ (処置後 6 0 日)	0	4 0 %
退行した腫瘍の% ¹ (処置後 9 0 日)	0	2 0 %
二次腫瘍の平均値 (μ l) ²	5 3 7 $\pm$ 3 0	3 6 6 $\pm$ 5 6

¹ 処置後示した時点で（6 0 日対 9 0 日）、処置したマウスにおいては測定するには腫瘍が小さすぎる

² リンパ節における転移

さらなる研究では、9 D 2 抗体を、L 5 4 0 腫瘍を有するマウスに 1 週あたり 3 回 1 0 0 μ g の用量で腹腔内注射した。週に 2 回ノギスで腫瘍サイズを測定した。コントロール群に比較した抗腫瘍効果を図 7 に示す。カッコの数は、1 群あたりのマウスの総数あたりの退行した腫瘍を有するマウスの数を示す。

【 0 8 0 4 】

実施例 X I

抗 P S 抗体 3 G 4 の抗腫瘍効果

本実施例は、同系および異種の腫瘍モデルにおいて抗 P S 抗体 3 G 4 を用いて、さらなる抗腫瘍効果を実証する。本研究で用いる 3 G 4 抗体は、P S および他の陰イオン性リン脂質に結合する I g G 抗体である（実施例 I V）。

【 0 8 0 5 】

A. 動物腫瘍研究についてのプロトコール

同系および異種の腫瘍モデルにおいて 3 G 4 の効果を検討した。動物腫瘍処置研究のための一般的プロトコールは以下のとおり行なう。特に相違を示さない限り、これは本出願の研究全体にわたって用いたプロトコールである。

【 0 8 0 6 】

動物は、Charles River Laboratories から入手した。マウスは 4 ~ 5 週齢の雌性 C. B - 1 7 S C I D または Fox Chase S C I D マウス

スである。マウスをオートクレーブしたケージで、無菌の食物および水で、無菌的な取り扱いで飼育した。ラミナーフローのフードにおいて全ての手順を行なった。マウスを1週間馴化させて、次いで耳にタグを付けて、血液サンプル（約75～100 μ l）を尾静脈から採取して、ELISAによって漏出をチェックする。漏出ELISA試験をできないマウスは試験手順には用いるべきではない。耳にタグ付けして血液サンプルを取り出した2～3日後に、乳房の脂肪パッド（MFP）に、または右の脇腹に皮下的に、腫瘍細胞をマウスに同所性に注射する。

【0807】

同所性モデルでは、 1×10^7 個の細胞を含む0.1 mlのDMEMを麻酔されたマウスのMFPに局所注射する。マウスを0.075 mlのマウスカクテル腹腔内注射によって麻酔する。このマウスカクテルは5 ml ケタミン（100 mg/ml）；2.5 ml キシラジン（20 mg/ml）；1 ml アセプロマジン（10 mg/ml）；1 ml 滅菌水である。投与量は、30分間にわたりIP経路を介して体重20～30グラムあたり0.1 mlである。

【0808】

つまさき／足のピンチに応答しないことを測定した場合、一旦マウスを麻酔すれば、マウスを左を下にして横にさせて、頭部のすぐ後ろおよび右前脚／背中領域周囲を70%エタノールで拭く。2～3 mmの切開を右前脚のすぐ後ろ（胸部側方）で行い、これによって、皮膚弁を持ち上げた場合、白っぽい脂肪パッドが明らかになる。1 mlのシリンジおよび27ゲージの針を用いて0.1 mlの細胞を脂肪パッドに注射して、この脂肪パッドに小疱を生成する。9 mm滅菌創傷クリップを用いて切開を閉鎖する。マウスをそのケージに戻して、麻酔から覚醒して動くまで観察する。術後の健康状態を確認し、もし窮迫の何らかの兆候が観察されれば、その動物にアセトアミノフェン（0.24 mg/ml）＋コデイン（0.024 mg/ml）を含む飲料水を与える。創傷クリップは1週後に除去する。この方法を用いて、細胞を選択された部位に正確において、皮下領域には入れない。腫瘍は14～15日では約200 μ lの容積（L×W×W）であって、摂取率は本質的に100%である。

【0809】

皮下モデルにおいては、マウスに代表的には、 1×10^7 個の細胞を含む0.2 mlを注射する。マウスを麻酔せず、ただしマウス皮膚の確実なグリップを用いて拘束して、右脇腹を曝す。23ゲージの針を備える1 mlのシリンジを用いて、マウスの皮膚の直下に 1×10^7 個の細胞を含む200 μ lを注射して、小疱が示される。注射部位からの少量の液体漏出が観察されるのは珍しいことではない。この漏出を減らすために皮下注射から針を抜く場合にねじれ運動を用いてもよい。腫瘍容積はL×W×Hによって測定する。

【0810】

灌流プロトコールでは、マウスに1000 Uのヘパリンを含有する0.2 mlの生理食塩水を静脈内注射する。次いで、0.1 mlのマウスカクテルを用いたマウス腹腔内注射によってマウスを鎮静する。つまさき／足にピンチングされる場合に反射がないということで測定されるように一旦マウスが十分に鎮静されれば、胸腔を開口して心臓および肺を露出させる。チューブおよび灌流ポンプに接続した30ゲージ針を左心室に挿入する。右心室を切りとって、これによって血液を滴下させ得る。1分あたり1 mlの速度で12分間、生理食塩水をポンピングする。灌流の終わりに、この針およびチューブを抜き取る。免疫組織化学または病理にいずれかのさらなる研究のために組織を取り出す。

【0811】

B. 腫瘍処置結果

同系モデルについては、Meth Aマウス線維肉腫腫瘍細胞を用いた。異種モデルの1つにおいて、ヒトMDA-MB-231乳ガン細胞を、乳腺脂肪パッドに播種した。別の異種モデルでは、細胞を注射することおよび腫瘍を処置の前に500 mm³を超えるサイズまで増殖させることによって、大きいヒトホジキンリンパ腫L540異種移植片を樹立した。腫瘍保有マウス（1群あたり10匹）に、コントロールに対して、100 μ gの

3 G 4 抗 P S 抗体 (I g G) を腹腔内注射した。処置は週に 3 回繰り返した。動物を腫瘍測定のために週に 2 回モニターした。

【 0 8 1 2 】

同系および異種の腫瘍の両方の増殖は、3 G 4 抗 P S 抗体での処置によって効率的に阻害された。最初の 2 0 ~ 3 0 日間の処置を図 8 A、図 8 B および図 8 C に示す。この抗体は、腫瘍血管損傷、局所的血栓および腫瘍壊死を生じた。

【 0 8 1 3 】

同系の M e t h A 腫瘍細胞の処理は特に首尾よく、そして乳腺脂肪パッドにおいて増殖しているヒト M D A - M B - 2 3 1 乳ガン細胞の処置も腫瘍退行を生じた (図 8 A および図 8 B) 。壊死に耐性であることが公知の大きい L 5 4 0 腫瘍を保有するマウスでさえ、3 G 4 抗体処置は、コントロールに比べて腫瘍増殖を阻害した。腫瘍増殖の遅延はコントロールマウスでは見いだされなかった。抗 P S 抗体で処置したマウスでは毒性は観察されなかった。

【 0 8 1 4 】

腫瘍をまた M D - M B A - 4 3 5 細胞を用いて樹立して上記のように処置した。これらの腫瘍の増殖はまた、3 G 4 抗体での処置によって効率的に阻害された。6 0 日間の大きい L 5 4 0 腫瘍、M D A - M B - 2 3 1 および M D - M B A - 4 3 5 腫瘍細胞の処置を図 8 D、図 8 E および図 8 F に示す。この抗体は、腫瘍血管損傷、血栓および壊死および腫瘍増殖の遅延を生じ、毒性の証拠はなかった。

【 0 8 1 5 】

M D - M B A - 4 3 5 ルシフェラーゼ細胞は、B a r c e l o n a、S p a i n の A n g e l s S i e r r a J i m e n e z 博士から入手して、1 0 % D M E M 中で増殖させた。マウスに上記のような腫瘍細胞を注射して、注射の 2 週後にこの腫瘍を測定して容積を記録した。同様の平均容積 (2 0 0 m m ³) の腫瘍でのマウスの処置を、コントロールに対して、実施例 X I X に記載のように生成した、3 G 4 抗体およびキメラ 3 G 4 抗体を用いて行った。1 5 日の腹腔内注射 (8 0 0 μ g) によって処置を開始して、3 5 日の 4 0 0 μ g の最終注射まで 2 ~ 3 日ごとに 2 0 0 μ g の注射を続けた。腫瘍容積およびマウス体重を注射の日に測定した。マウスを屠殺して、生理食塩水を 1 2 分間灌流させた。器官および腫瘍を取り出して、液体窒素中で急速凍結させて、免疫組織化学的解析のために腫瘍を切片化した。

【 0 8 1 6 】

この研究によって、コントロールに対して、3 G 4 抗体およびキメラ 3 G 4 抗体の両方とも腫瘍増殖を効率的に遅延させたことが示された (図 8 G) 。

【 0 8 1 7 】

実施例 X I I

C M V に対する抗 P S 抗体の抗ウイルス効果

驚くべきことに、腫瘍脈管構造からウイルス感染へ分野を切り替えて、本発明者らは次に、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体がまた抗ウイルス効果を発揮する可能性が高いと判断した。本実施例は実際に、サイトメガロ (C M V) 感染の処置において 3 G 4 抗体を最初に用いて、これが真実であることを示す。

【 0 8 1 8 】

A. 方法

1. インビトロにおける C M V 感染細胞の処置

6 ウェルプレート中のヒト二倍体包皮線維芽細胞 (H H F - R 2) のコンフルエントな単層を、前に記載されたように、緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現するヒト C M V A D 1 6 9 を用いて、M O I = 0 . 0 1 で感染させた (B r e s n a h a n ら、1 9 9 6) 。要するに、この細胞を、1 ウェルあたり 1 m l の総容積でウイルスとともに、3 7 ° C で 9 0 分間インキュベートした。感染の間、プレートを 3 0 分ごとに穏やかにロッキングさせた。感染後、細胞上清を取り出して D M E M / 1 0 % F B S / p e n - s t r e p (1 ウェルあたり 2 m l) を各々のウェルに添加した。

【0819】

3 G 4 またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体 G V 3 9 G の希釈物 (1 0 0 μ g / m l および 5 0 μ g / m l) をウェルに添加した。感染した細胞を 3 7 $^{\circ}$ C で、全部で 1 9 日間インキュベートさせた。各々のウェルにおいて培地および抗体を 3 日ごとに交換した。1 9 日目に各々のウェル由来の細胞および上清を回収して、プラークアッセイを行なうまで - 8 0 $^{\circ}$ C で凍結させた。

【0820】

2. 蛍光顕微鏡

組み換え CMV は、S V 4 0 プロモーターの制御下で G F P を発現する。従って、感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑になる。これらの研究では、抗体で処置した CMV 感染細胞は、2 日目、3 日目および 9 日目に蛍光顕微鏡下で観察された。

10

【0821】

3. プラークアッセイ

標準的プロトコールと用いてプラークアッセイを行なった。要するに、凍結細胞細胞懸濁液を 3 7 $^{\circ}$ C で急速に融解して、1 0 0 0 r p m で 1 分間、遠心分離によって碎片を除去した。細胞上清の種々の希釈物を、6 ウェルプレート中の H H F - R 2 細胞のサブコンフルエントな単層に加えて、その細胞を 3 7 $^{\circ}$ C で 9 0 分間インキュベートさせた (このプレートを 3 0 分ごとに穏やかにロッキングさせた)。感染後に、細胞上清を取り出して、2 m l の D M E M / 1 0 % F B S と交換した。4 日目に、各々のウェルの上清を取り出して、細胞に 0 . 0 1 % の低融点のアガロース / D M E M / 1 0 % F B S を重層した。このプレートを感染後、3 7 $^{\circ}$ C で、全部で 1 4 日間インキュベートさせた。1 4 日目に、感染した単層を 1 0 % 緩衝化ホルマリンで固定して、メチレンブルーで染色して、プラークを可視化した。

20

【0822】

B. 結果

1. 3 G 4 が CMV のウイルス伝播を阻害する

3 G 4 が CMV 感染および複製に対して阻害性効果を有するか否かを検討するために、コンフルエントなヒト線維芽細胞を、低い m . o . i で CMV を添加する前に、3 G 4 で前処置した。これらの研究において用いられる CMV は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現する。従って、感染された細胞は、蛍光顕微鏡下で観察された場合に緑になる。

30

【0823】

処置の 3 日目に、抗体の 5 0 μ g / m l および 1 0 0 μ g / m l の両方を用いて、未処置のウェルにおいて、および 3 G 4 またはアイソタイプマッチングコントロール抗体 G V 3 9 G で処置したウェルにおいて、両方とも単一の感染細胞が存在する。従って、3 G 4 を用いた線維芽細胞の処置は、細胞へのウイルスの侵入を有意に阻害しないようである。

【0824】

しかし、9 日目には、3 G 4 処置対コントロール G V 3 9 G 処置ウェルにおける感染細胞の数に劇的な相違が存在する (図 9 A および図 9 B ; 上側の右のパネルを中央および下部の右側のパネルと比較する)。ウイルスは、コントロールウェルにおいては単層の約 8 0 % に感染しているが、ウイルスは、3 G 4 処置ウェルにおいては最初の単一感染した細胞に限定される。従って、3 G 4 は、もとの感染細胞から周囲の細胞への CMV の伝播を制限する。ウイルス伝播の阻害は、細胞が 1 0 0 μ g / m l (図 9 A) および 5 0 μ g / m l (図 9 B) で処置された場合に観察される。

40

【0825】

2. ウイルス阻害は、抗体濃度依存性である

低 m . o . i での抗ウイルス効果に必要な 3 G 4 の濃度を決定するために、感染した細胞を、異なる濃度の 3 G 4 およびコントロール抗体 G V 3 9 G で処置した。図 1 0 に示されるように、3 G 4 を 1 0 0 μ g / m l および 5 0 μ g / m l で用いて細胞間の伝播の完全な阻害が観察される。細胞を 2 5、1 2 . 5 および 6 . 2 5 μ g / m l の 3 G 4 で処置した場合、G F P 陽性 CMV 感染細胞の数が増大される。3 G 4 は、これらのさらに低濃

50

度の一次感染細胞からのウイルス伝播を完全には妨げないが、依然として意味のある抗ウイルス効果を有する。なぜなら、GV39G処置したコントロールウェルに比較して3G4処置したウェルでは、みられるGFP陽性CMV感染細胞はわずかであるからである（図10）。

【0826】

3. 低M. O. Iでのウイルスロードの定量

抗体処置後のウイルスロードを決定するプラークアッセイを行なうことによって3G4の抗ウイルス効果を定量した。このコントロールは、未処置の細胞、GV39G抗体、およびC44抗体を用いるさらなる抗体コントロール、コルヒチンに対するマウスIgG2aアイソタイプ抗体を含んだ。

10

【0827】

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3G4で感染させた感染細胞の処置（m. o. i = 0.01 pfu/細胞）によって、コントロールGV39G処置細胞に比較して、ウイルス力価において劇的である6 log₁₀の低下が得られた（図11A）。この障害は、ウイルス複製のほぼ99.9999%阻害に変換する。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度での3G4を用いた処置によって、3G4での処置によって、GV39G処置に比較してウイルス力価の3.5のlog₁₀の低下が生じる。3G4を25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で用いたところ、結果はさらに劇的であって、6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でさえ阻害効果がやはり観察される（図11A）。

【0828】

20

4. 高M. O. I.でのウイルスロードの定量

3という高m. o. i.で感染された線維芽細胞の3G4処置によってまた、ウイルス力価の劇的な低下が生じる。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、3G4での処置は、コントロールのGV39G処置細胞に比較してウイルス力価の5 log₁₀の低下が生じた（図11B）。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、3G4が、GV39Gに比較して3 logまでウイルス複製を阻害した（図11B）。

【0829】

5. 後期段階での複製の阻害

CMV複製サイクルのどの段階が3G4によってブロックされるかを決定するために、タイミング的な添加研究を行なった。このために、感染後種々の時点で高m. o. i.で感染した線維芽細胞に3G4を加えた。ウイルスロード（細胞および上清の両方において）を標準的なプラークアッセイを用いて定量した。

30

【0830】

感染後24時間までの3G4の添加によって、ウイルス力価におけるlog₁₀の5～6の低下が生じた（図11C）。しかし、3G4の添加が48時間まで遅れた場合、3G4の阻害性効果は、log₁₀で2まで低下して、添加が72時間～96時間まで遅れた場合、阻害性効果がさらに低下された。これによって、感染後24～48時間の間に生じるCMV複製の後期段階を3G4が妨害することが示される。従って、3G4は、感染もごく早期もしくは早期の遺伝子発現も有意に妨害しない。これは、例えば、後期遺伝子発現、ウイルスDNA合成、ウイルスパッケージングまたは出現に対してよりも、ウイルス複製周期の後期に作用する。

40

【0831】

実施例XIII

RSVに対する抗PS抗体の抗ウイルス効果

実施例XIIに示されるCMVに対する劇的な抗ウイルス効果に加えて、本実施例は、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）複製の阻害における3つの異なる抗PS抗体の使用を実証する。

【0832】

A. 方法

1. インビトロにおけるRSV感染細胞の処置

50

A 5 4 9 細胞を、3つのC o a s t e r 1 2 ウェル組織培養プレートにおいて1 0 0 %コンフルエンスまで増殖させた。2 0 0 μ Lの最小基本イーグル培地を全てのウェルに添加した。抗リン脂質抗体 (A b) を各々のプレートの9つのウェルに添加 (1 0 0 μ L に1 0 0 μ g) して、3 0 分後に最初の9ウェルのうちの6つにおける細胞をR S V長型株を含む1 0 0 μ Lの容積を1のM O Iで用いて感染させた。3つの残りのウェルを感染されていない、抗体処置ウェルのまま残した。抗体を有さない3つの他のウェルを、R S Vを上記と同じM O Iで用いて感染させた。

【0 8 3 3】

各々のプレートを用いて3つの異なる抗体：3 G 4、3 S Bおよび1 B 9を試験した (実施例 I V)。細胞を5 % C O ₂ において4 0 °Cで2時間インキュベートして、次いで6 0 0 μ Lの培地を、各々のウェルに添加して1 mLにした。A 5 4 9細胞プレートをコントロールとして同じ条件で維持した。上清を感染後に4時間、24時間および72時間で収集した。各々の時点で、各々のプレートから4つのウェルをサンプリングした：1つのウェルにはA b処理細胞のみがあり、2つのウェルにはA b処理した/R S V感染細胞があり、そして1つのウェルにはR S V感染細胞のみがあった。このサンプルをプラークアッセイまで-8 0 °Cで凍結させた。

10

【0 8 3 4】

2. プラークアッセイ

プラークアッセイを前に記載の通り行なった (K i s c hら、1 9 6 3 ; G r a h a mら、1 9 8 8)。要するに、凍結細胞の細胞上清を3 7 °Cで急速融解させた。未希釈の細胞上清から3段の1 0 倍希釈を行なった：1 0⁻¹、1 0⁻²および1 0⁻³。各々の希釈の1 0 0 μ Lに加えて未希釈のサンプルを、全て3連の8 0 %コンフルエントH e p - 2細胞株プレートに接種した。プレートを5 % C O ₂、4 0 °Cインキュベーターに5日間入れた。5日目に、このプレートを発色させて、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色して、各々のウェルにおけるプラークを明らかにした。このプラークを、解剖顕微鏡を用いてカウントして、p f u (プラーク形成単位) /m LにおけるR S Vウイルスロードを算出した。

20

【0 8 3 5】

B. 結果

図1 2に示されるとおり、3 S Bまたは1 B 9のいずれかを用いるR S V感染細胞の処置によって、ウイルス複製の対数低下が生じた。感染した細胞を3 G 4で処置した場合、抗ウイルス効果が、さらに証明された。3 G 4を用いた処置によって、ウイルス力価において2 l o g₁₀の低下が得られた (図1 2)。障害は、C M Vで見られるよりも低く、これは3 G 4の濃度が低かった (2 5 ~ 5 0 μ g /m l) ためである可能性が最も高い。

30

【0 8 3 6】

実施例 X I V

短鎖抗 P S 抗体

抗腫瘍因子単独として、腫瘍に対して結合した治療因子を送達するための標的化因子として、および抗ウイルス剤としての使用を含む、本明細書に記載される抗 P S 抗体の多くの使用を考慮すれば、本実施例は、短鎖 (s c F v) 抗 P S 抗体を生成するのに適切な技術を記載しており、すなわち、ここではV_HドメインおよびV_Lドメインがペプチドリンカーによって一般に結合される短鎖ポリペプチド鎖に存在する。

40

【0 8 3 7】

A. ファージ抗体ライブラリーの調製

細菌ライブラリーの二次ストック (約1 $\times$ 1 0¹⁰ クローン) を1 0 0 μ g /m lアンピシリンおよび1 %グルコースを含む1 0 0 m l 2 $\times$ T Yに接種した。これをO Dが6 0 0 n mで0. 5になるまで、3 7 °Cで振盪しながら増殖させた。

【0 8 3 8】

M 1 3 K O 7ヘルパーファージを1 0¹³ p f uで添加して、3 7 °Cの水浴中で振盪せずに3 0 分間インキュベートさせた。感染した細胞を3, 5 0 0 gで1 0 分間遠心分離し

50

た。このペレットを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピリシンおよび $75\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含む 200ml の $2\times\text{T Y}$ に再懸濁して、振盪しながら 30°C で一晩インキュベートさせた。

【0839】

培養物を $10,800\text{g}$ で 10 分間遠心分離した。 $1/5$ 容積の PEG/NaCl を上清に加え、十分に混合させて、 4°C に 1 時間おいた。次いで、 $10,800\text{g}$ で 30 分間遠心分離した。このペレットを 40ml の PBS に再懸濁して 8ml PEG/NaCl を添加した。これを混合して 4°C に 20 分間おいた。次いで、これを $10,800\text{g}$ で 10 分間遠心分離して、上清を吸引した。このペレットを 2ml の 10% ヒト血清に再懸濁して、微小遠心分離機で $11,600\text{g}$ で 10 分間遠心分離して、残りの細菌の破片のほとんどを除去した。

10

【0840】

プレパン (pre-pan) するために、 10% ヒト血清におけるファージ抗体ライブラリーを PC コーティングディッシュに添加して、室温で 60 分間インキュベートした。

【0841】

B. ビオチン化リポソーム上の選択

$20\mu\text{mol}$ のホスファチジルイノシトールおよび $20\mu\text{mol}$ のビオチン化ホスファチジルセリンを 10ml のヘキサンに溶解した。この溶液を、回転エバポレーターを用いてフラスコの表面上に薄層に乾燥させた。 2ml PBS を添加して、槽を 4°C で 30 分間超音波処理した。

20

【0842】

次いで、 $100\mu\text{l}$ のファージ scFv および $100\mu\text{l}$ ビオチン化リポソームを 10% のヒト血清の存在下で混合して、室温で 1 時間穏やかに回転させた。室温で 30 分間 $600\mu\text{l}$ 2.5% カゼイン/ 0.5% BSA を添加することによって $100\mu\text{l}$ ストレプトアビジン $\text{M}-280$ ダイナビーズを用いてブロッキングを行なった。 $4\sim5$ 分間、 MPC-E (Magnetic Particle Concentrator from Dynal) を用いてブロッキング緩衝液からビーズを分離した。

【0843】

$100\mu\text{l}$ の PBS にビーズを再懸濁した。 $100\mu\text{l}$ のブロックされたストレプトアビジンダイナビーズ (Dynabeads) をビオチン化抗原に結合したファージに添加して、室温で 15 分間穏やかに回転させた。 MPC-E を用いて 5 分間分離を達成して、上清を流し出した。これを 1ml PBS を用いて 5 分間洗浄した。各々の洗浄のために、ビーズを再懸濁して MPC-E を用いて沈下させた。

30

【0844】

最終的に、ファージを $300\mu\text{l}$ 100mM トリエーテルアミンに 30 分間再懸濁することによってビーズから溶出させた。 $150\mu\text{l}$ 1M Tris $\text{pH}=7.4$ を中和のために添加した。 MPC-E を用いてビーズを再度分離した。

【0845】

$150\mu\text{l}$ のファージ上清を用いて、対数期の 10ml TG1 細菌に感染させた。 10ml の培養物を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンの存在下で 37°C で 1 時間振盪させた。アンピシリンを最終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ まで添加して、さらに 1 時間振盪させた。 10^{13}pfu M13 ヘルパーファージをこの培養物に添加して、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む 100ml 2T Y 培地に移して、 37°C で 1 時間振盪させた。カナマイシンを最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ まで添加して、 30°C で一晩振盪させた。

40

【0846】

ファージ調製手順を繰り返して、選択手順をさらに $3\sim4$ 回繰り返した。

【0847】

C. モノクローナル単鎖抗体 ELISA

プレートからの個々の HB2151 コロニー (4回の選択後) を、 96 ウェルプレート中に $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンおよび 1% グルコースを含有する $500\mu\text{l}$ $2\times$

50

TY中に接種して、37℃で一晩振盪しながら(300rm.)増殖させた。このプレートからの5μlを、1ウェルあたり100μg/mlのアンピシリンを含有する500μl 2×TYを含有する第二の96ウェルプレートに移して、振盪しながら37℃で3時間増殖させた(OD600=0.9)。

【0848】

100μg/mlアンピシリン、10mM IPTG(最終濃度は1mM)を含有する50μl 2×TYを各々のウェルに添加して、これを振盪しながら30℃で一晩増殖させた。これを1,800gで10分間遠心分離して、以下のELISAにおいて100μlの上清を用いた。

【0849】

10μg/mlの濃度で、エタノールに溶解したPSを用いて、96ウェルプレート(DYNEX IMMULON(登録商標)1B)をコーティングした(P6641 10mg/ml溶媒は、クロロホルム:MeOH 95:5であった)。10μg/mlのPCを同じ方法でコーティングした。これらのプレートを冷室で4℃でエバポレートした。250μl 2.5%カゼインを各々のウェルに添加して、そのプレートをカバーして、37℃で1時間ブロックした。

【0850】

PBSを用いてウェルを3回リンスして、可溶性のscFvを含有する100μl/ウェル 10%ヒト血清および100μl/ウェルの上清を添加して、37℃で60分間インキュベートした。溶液を廃棄して、PBSを用いて6回洗浄した。100μl 9E10を含有する5%カゼイン/0.5% BSA-PBS(1:5000希釈)を各々のウェルに添加して、37℃で1時間インキュベートしてPBSを用いて6回洗浄した。100μl HRPヤギ抗マウス抗体(1:10000希釈)を各々のウェルに添加して、37℃で1時間インキュベートして、PBSを用いて5回洗浄した。100μl 0.05%OPDを各々のウェルに添加して、5分間発色させた。100μl 0.18M H₂SO₄を添加して反応を停止させてO.D. 490で読み取った。

【0851】

抗原陽性クローンを2×TYAGプレート上にストリークして、30℃で一晩増殖させた。陽性の単一のコロニーを3ml 2×TYAG培地中に拾い上げて、37℃で12時間増殖させた。プラスミドを抽出して、scFv遺伝子挿入物を酵素消化およびPCRによってチェックした。正確なサイズの挿入物を有するものを配列決定した。

【0852】

正確なサイズの挿入物を有するコロニーを100ml 2×TYAG培地中で増殖させて、37℃ OD 600=0.5で振盪させた。これらを900ml 2×TYAに移して、OD600=0.9まで増殖させた。1M IPTGを最終濃度1mMに添加して30℃で一晩振盪させた。前と同じELISA方法を用いて上清をチェックした。Ni⁺アガロースアフィニティークロマトグラフィーを用いて周辺質画分からscFvタンパク質を精製した。

【0853】

D. 結果

4回のパンニング後、以下のクローンはPSプレート上の見込みのあるELISAシグナルを生じて、正確なサイズの挿入物を有する:3E5、3A2、G5、C8、E4および4D5。これらをサブクローニングさせたが、ここではE4は、5つの陽性のサブクローンを有して、4D5は、5つの陽性のサブクローンを有した(表14)。

【0854】

表14

PSプレートでのELISA

【0855】

10

20

30

40

【表 1 4】

0.099	0.107	0.118	0.115	0.100	0.094	0.084	0.086	0.166	0.164	0.102	0.191
0.113	0.106	0.127	0.150	0.128	0.097	0.078	0.087	0.190	0.144	0.102	0.154
0.122	0.115	0.117	0.112	0.105	0.097	0.085	0.088	0.230	0.071	0.168	0.150
0.107	0.108	0.121	0.123	0.107	0.101	0.083	0.085	0.191	0.246	0.186	0.150
0.138	0.121	0.114	0.131	0.100	0.096	0.082	0.079	0.183	0.187	0.275	0.171
0.118	0.115	0.116	0.132	0.099	0.094	0.082	0.086	0.185	0.073	0.208	0.102
0.111	0.176	0.126	0.118	0.096	0.087	0.123	0.087	0.144	0.226	0.112	0.126
0.102	0.107	0.131	0.125	0.089	0.102	0.082	0.084	0.188	0.073	0.142	0.151
3E5		3A2		G5		C8		E4		4D5	

10

一旦陽性クローンが同定されれば、それらのクローンを配列決定した。S c F v 核酸およびクローン 3 A 2 のタンパク質の配列を、それぞれ配列番号 5 および配列番号 6 に示す。陽性クローンを大規模に増殖させて、N i c k e l アガロースアフィニティークロマトグラフィーを用いて s c F v を精製させた。P h a s t ゲル電気泳動を用いて、精製された s c F v を得た。

【0 8 5 6】

実施例 X V

P E 結合ペプチド誘導体の合成

本実施例は、腫瘍およびウイルス疾患を処置するのにおける使用のための例示的な P E 結合ペプチド誘導体および結合体の設計および合成に関する。例示的なデュラマイシン誘導体の構造は、図 1 3 A ~ 図 1 3 O のパネルに示されており、これは以下の説明に合致する。

20

【0 8 5 7】

A. D L B

0. 3 8 7 m l の 0. 1 M N a H C O ₃ を含有する水に溶解された 0. 5 m g (0. 2 5 μ m o l) のデュラマイシンを 0. 1 1 3 m g (0. 2 5 μ m o l) の N H S - L C - ビオチン (S i g m a) に添加した。この反応混合物を室温で 1 時間、次いで 4 ° C で一晚インキュベートさせた。サンプルをシリカカラムにロードして、0. 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A) を用いて洗浄して、0. 1 % T F A および 7 0 % C H ₃ C N を用いて溶出させた。この溶出物を収集して、遠心分離によって濃縮した。総収量は 0. 5 m g であった (図 1 3 A) 。

30

【0 8 5 8】

B. D I B

0. 2 8 6 m l の 0. 1 M N a H C O ₃ を含有する水に溶解された 0. 5 m g (0. 2 5 μ m o l) のデュラマイシンを 0. 0 3 4 m g (0. 2 5 μ m o l) の 2 - イミノオラン塩酸塩 (2 - I T) に添加した。この混合物を室温で 1 時間インキュベートさせた。0. 1 3 m g (0. 2 6 μ m o l) のヨードアセチル-L C - ビオチン (P i e r c e) を添加して、その反応物を室温で 1 時間、そして 4 ° C で一晚インキュベートさせた。サンプルをシリカカラムにロードして、0. 1 % T F A を用いて洗浄して、0. 1 % T F A および 7 0 % C H ₃ C N を用いて溶出させた。この溶出物を収集して、遠心分離によって濃縮した。総収量は 0. 5 m g であった (図 1 3 B) 。

40

【0 8 5 9】

C. (D L B) ₄ N A

0. 5 m l の 0. 1 M N a H C O ₃ を含有する水に 1. 9 m g (0. 9 4 μ m o l) のデュラマイシンを溶解した。ここに、0. 4 m g (0. 8 8 μ m o l) の N H S - L C - ビオチン (S i g m a) を含有する 2 0 0 μ l ジメチルホルムアミド (D M F) を添加した。この混合物を室温で 4 時間インキュベートさせた。1 0 m g (0. 1 7 μ m o l) ニュートラビジン (N A) を含有する 1 m l をこの反応混合物に添加して、これを室温で 2 時間、次いで 4 ° C で一晚インキュベートさせた。次いでこの反応混合物を、P B S 緩衝液を含む G - 2 5 カラム (容積 5 0 m l) 上にロードさせた。この画分を収集して、S D

50

S PAGE (phast gel) によって解析した。タンパク質含有画分 (7~16) を一緒にプールして、0.22 μm フィルターを通した濾過によって滅菌して、280 nm での吸光度を測定することによって濃度を決定した。総収量は 5.1 mg であった。

【0860】

次いで、サンプルを FPLC によって分画した。以下に相当する 3 つのピークを収集した：ピーク 1：[(DLB)₄NA]₃ (画分 17~23)；ピーク 2：[(DLB)₄]₂ (画分 24~33) およびピーク 3：(DLB)₄NA (画分 35~48)。全てのサンプルを 0.22 μm のフィルターを通した濾過によって滅菌した。得られた最終収量は以下であった：0.34 mg の [(DLB)₄NA]₃；0.59 mg の [(DLB)₄]₂ および 1.41 mg の (DLB)₄NA (図 13C)。

10

【0861】

D. (DLB)₄NA-F

0.61 mg の (DLB)₄NA を含有する PBS 緩衝液を、0.005 mg N-ヒドロキシスクシンイミジルフルオレセイン (NHS-フルオレセイン) (Sigma) を含有する DMF に添加した。この混合物を室温で 1 時間インキュベートした。次いで、この反応物を PD10 カラム (10 ml) に分画した。(DLB)₄NA-F を、タンパク質含有画分 (3 および 4) に溶出させて、これと一緒にプールして、0.22 μm フィルターを通した濾過によって滅菌した。総収量は 0.5 mg であった (図 13D)。

【0862】

E. (DIM)_nH IgG

20

ヒト IgG (H IgG) を最初に以下のとおり精製した：1.3 ml H IgG (これは、1 mM EDTA、pH 9 を有するホウ酸緩衝液に 100 mg/ml H IgG、2.5 mg/ml グリシンおよび 3 mg/ml アルブミンを含んだ) を、FPLC (S200、250 ml) カラムに加えた。この画分を収集して、phast gel 上で SDS PAGE によって解析した。単量体の IgG を含む画分 (21~32) を一緒にプールして、0.22 μm フィルターを通した濾過によって滅菌した。280 nm での吸光度によって決定される総収量は 111 mg であった。

【0863】

精製した H IgG (55 mg を 1.3 ml のホウ酸緩衝液、pH 9 に含む) を、0.5 ml の、SMCC (Pierce) を含む DMF に 1.003 mg に添加した。この混合物を室温で 1 時間インキュベートした。同時に、6 mg のデュラマイシンを含む別の反応混合物 (3 μmol；0.5 ml 0.1 M NaHCO₃ に溶解される) および 0.413 mg 2-IT (3 μmol；0.1 M NaCO₃ に含まれる) を室温で 1 時間インキュベートさせた。反応の終了後、2 つの反応混合物を合わせて、室温で 2 時間、そして 4 °C で一晩インキュベートさせた。この反応産物を、phast gel 上の SDS PAGE によって解析した。この反応産物を、ホウ酸緩衝液、pH 9 を含む FPLC カラムにロードした。三量体 (5~14)、二量体 (15~24)、および単量体 (25~37) に相当する FPLC 画分をプールして、0.22 μm フィルターを通した濾過によって滅菌した。単量体の総収量は 54.6 mg であった。5~7 つのデュラマイシン基を H IgG の各々の分子に結合させた (図 13E)。

30

40

【0864】

F. (DIM)_nH IgG-F

1 mg (0.7 ml) の (DIM)_nH IgG を、5 μl の、NHS-フルオレセインを含有する DMF に添加した。反応混合物を室温で 1 時間インキュベートして、PD-10 カラムで脱塩した。タンパク質含有画分 (2~3) をプールして、0.22 μm フィルターを通した濾過によって滅菌した。総収量は 0.9 mg であった (図 13F)。

【0865】

G. (DIM)_nH IgG-B および [(DIM)_nH IgG]₂-B

[(DIM)_nH IgG]₂ のビオチン化誘導体を合成するために、0.66 mg (1 ml) の [(DIM)_nH IgG]₂ を 8 μl の、1 mg/ml の NHS-LC-ビオチ

50

ン (P i e r c e) を含有するDMFに添加した。この混合物を室温で1時間インキュベートした。次いで、この反応混合物をPD-10カラムで脱塩した。タンパク質含有画分(3および4)をプールして、0.22 μmフィルターを通した濾過によって滅菌した。最終の収量は0.46 mgであった。

【0866】

単量体(DIM)_nH I g Gのビオチン化を同じ様式で行なった。要するに、1.06 mg (0.75 ml)の(DIM)_nH I g Gを、12 μlの1 mg/ml NHS-LC-ビオチンを含有するDMFに添加した。室温での1時間のインキュベーション後、反応産物をPD-10カラムで脱塩した。タンパク質含有画分(3および4)をプールして、0.22 μmフィルターを通した濾過によって滅菌した。最終の収量は0.62 mgであった(図13G)。

10

【0867】

H. (D I B)₄NA

2 mg (0.99 μmol)のデュラマイシンを、0.5 ml 0.1 M NaHCO₃に溶解して、0.136 mg (0.99 μmol)の2-ITに添加した。この反応混合物を室温で1時間インキュベートした。その後、0.483 mg (0.95 μmol)のヨードアセチル-LC-ビオチン(P i e r c e)を添加してその反応混合物を室温で1時間インキュベートした。10 mg (0.17 μmol)のニュートラビジンを含む1 mlのH₂Oを添加して、4℃で一晩インキュベートした。反応混合物をFPLCによって分画した。3つの異なるピークを収集してプールした：[(D I B)₄NA]₃(画分17~23)；[(D I B)₄NA]₂(画分24~33)および(D I B)₄NA(画分35~48)。全てのサンプルを0.22 μmのフィルターを通した濾過によって滅菌した。得られた最終収量は以下であった：0.87 mgの[(D I B)₄NA]₃；1.25 mgの[(D I B)₄NA]₂；および1.83 mgの(D I B)₄NA(図13H)。

20

【0868】

I. (D I B)₄NA-B

J. 0.23 mg (0.3 μmol)の(D I B)₄NAを、0.9 μgのNHS-LC-ビオチン(P i e r c e)に添加した。この反応物を室温で1時間インキュベートして、次いでPD10カラムで脱塩した。総収量は0.04 mgであった(図13I)。

30

【0869】

H. DS-1

0.5 ml 0.1 M NaHCO₃を含有する水に溶解した5 mg (2.5 μmol)のデュラマイシンを、0.319 mg (2.6 μmol)の1,3プロパンスルトンに添加した。この混合物を4℃で一晩インキュベートした。このサンプルをシリカカラムにロードして、0.1% TFAで洗浄して、0.1% TFAおよび70% CH₃CNを用いて溶出させた。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は5 mgであった(図13J)。

【0870】

K. DS-2

0.3 ml 0.1 M NaHCO₃を含有する水に溶解した1 mg (0.497 μmol)のデュラマイシンを、0.072 mg (0.523 μmol)の2-ITに添加した。この反応混合物を室温で1時間インキュベートした。0.125 mg (0.49 μmol)のSBF-塩化物(P i e r c e)を添加した。この反応混合物を室温で1時間および4℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は1 mgであった(図13K)。

40

【0871】

L. DS-3

0.4 ml 0.1 M NaHCO₃を含有する水に溶解した1 mg (0.497 μm

50

0.1) のデュラマイシンを、0.109 mg (0.592 μmol) の2-スルホ安息香酸環状無水物に添加した。この反応物を室温で1時間、4℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラム上で精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は1 mgであった (図13L)。

【0872】

M. DS-4

0.5 ml の、0.1 M NaHCO_3 を含有する水に溶解した0.25 mg (0.124 μmol) のデュラマイシンを、0.017 mg (0.124 μmol) の2-ITに添加した。この反応混合物を室温で1時間インキュベートした。次いで、この混合物を0.049 mg (0.124 μmol) のEllman試薬に添加した。この混合物を室温で2時間および4℃で一晩インキュベートした。250 μl の1 mg/ml の4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸一ナトリウム塩水和物を100 μl の1 mg/ml 2-ITに添加した。この反応物を室温で1時間インキュベートした。50 μl の反応混合物を前の反応物に添加して、室温で1時間インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した (図13M)。

【0873】

N. DS-5

0.5 ml 0.1 M NaHCO_3 を含有する水に溶解した5 mg (2.5 μmol) のデュラマイシンを、0.356 mg (2.6 μmol) の1,3-ブタンスルトンに添加した。この混合物を4℃で一晩インキュベートした。このサンプルをシリカカラムにロードして、0.1% TFAで洗浄して、0.1% TFAおよび70% CH_3CN で溶出した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は5 mgであった (図13N)。

【0874】

O. DC-1

0.5 ml 0.1 M NaHCO_3 を含有する水に溶解した0.25 mg (0.124 μmol) のデュラマイシンを、0.017 mg (0.124 μmol) の2-ITに添加した。この反応混合物を室温で1時間インキュベートした。次いで、この混合物を0.049 mg (0.124 μmol) のEllman試薬に添加した。この混合物を室温で2時間および4℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した (図13O)。

【0875】

実施例XVI

デュラマイシン誘導体はPEに特異的に結合する

本実施例は、実施例XVにおいて合成されたデュラマイシン誘導体がPSに特異的であり、従って細胞不浸透性の標的化または抗ウイルス剤に対して連結すること、ならびに腫瘍およびウイルス疾患の処置における使用によって設計されたとおり用いることができることが示される。

【0876】

デュラマイシン誘導体の特異性、詳細には他のリン脂質よりもPEに対する結合を試験するために、一連の競合ELISAを行なった。PEに対する結合についてDIBまたはDLBのいずれかと競合するデュラマイシン誘導体の能力を以下の方法で試験した。

【0877】

PEおよびPCをエタノール中で別々に溶解した。最終濃度は5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。96ウェルELISAプレート (DYNEX IMMULON (登録商標) 1B) の各々のウェルに100 μl を添加した。これらのプレートを冷室において4℃でエバポレートした。250 μl 2.5% カゼインを各々のウェルに添加して、カバーして37℃で1時間ブロックした。ブロッキング緩衝液を破棄して、100 μl 2.5% カゼインを各ウェルに添加した。(DIM) nHIGG、(DIB) 4NA、(DLB) 4NA、DS

10

20

30

40

50

、デュラマイシンおよびD I Bのようなプレートを横切る連続希釈としてデュラマイシン化合物を添加した。

【0878】

(D I M)_n H I g Gの出発濃度は、1.4 mg/mlであって、(D I B) 4 N A 出発濃度は800 μg/mlであって、(D L B) 4 N A 出発濃度は800 μg/mlであった。これらを37℃で1時間インキュベートして、P B Sを用いて5回洗浄した。100 μl H R P-ストレプトアビジン(1:5000希釈)を各々のウェルに添加して、37℃で1時間インキュベートして、P B Sを用いて5回洗浄した。100 μlの0.05% O P Dを各々のウェルに添加して、5分間発色させた。100 μl 0.18 M H₂ S O₄を添加して、反応を停止させて、O. D. 490で読み取った。

10

【0879】

得られたデータを作表して、次いでグラフにプロットした。図14Cおよび図14Dにおけるデータによって例示されるように、デュラマイシン誘導体の濃度の増大につれて、490 nmでの吸光度は低下して、このことはデュラマイシン誘導体が、ホスファチジルエタノールアミンに対する結合について、D I BおよびD L Bと競合することを示す。

【0880】

デュラマイシン構築物のリン脂質結合プロフィールを、さらなるE L I S Aを用いて確認した。各々の試験脂質P S、P E、P I、C L、P C、P G、S Mおよびコレステロールをエタノール中に別々に溶解して、これを用いてE L I S Aプレートをコーティングした。デュラマイシン化合物を、このプレートを横切って連続希釈として添加した。インキュベーションおよび洗浄工程の後に、上記のように、二次検出試薬を各々のウェルに添加して、比色アッセイを用いて反応性を決定した。

20

【0881】

デュラマイシンビオチン誘導体、D I BおよびD L Bについて代表的なリン脂質結合プロフィールを図14Aに示した。D I BおよびD L Bは、P Eについて特異的であり、ここではP S、P I、C L、P C、P GおよびS Mの各々についての結合は無視できるかまたは検出不能であることが示されている。(D I M)_n H I g G-Bおよび[(D I M)_n H I g G]₂-Bは本質的にD L Bと同じ結合プロフィールを有した。P Sに対する最小結合は、高濃度のD I Bで観察されたが(図14A)、これは、この研究の状況では意味がない。なぜならP Sに対する結合は、P E結合について飽和しているかまたは最大半減のD I B濃度では検出不能であったからである。従って、このデュラマイシン構築物はホスファチジルエタノールアミンに特異的に結合する。

30

【0882】

血清はデュラマイシン誘導体によるP E結合に対して有意な効果を有さないことも示された。これは血清(B S A)の有無におけるP EコーティングE L I S Aプレートに対するデュラマイシンビオチン誘導体であるD L Bの結合によって例示されており、ここでは結合プロフィールは有意な相違を示さない(図14B)。

【0883】

実施例X V I I

P E結合ペプチド誘導体の抗ウイルス効果

40

実施例X I Iおよび実施例X I I Iに示されるとおり、抗P S抗体によって媒介される抗ウイルス効果に加えて、本実施例は、他の共通のアミノリン脂質P Eに特異的に結合するペプチド誘導体の抗ウイルス効果を実証する。

【0884】

A. 方法

1. インビトロにおけるC M V感染細胞の処置

6ウェルプレートにおけるヒト二倍体包皮線維芽細胞(H H F-R 2)のコンフルエント単層を、実施例X I Iに記載されるように、M O I=0.01で、緑色蛍光タンパク質(G F P)を発現するヒトC M V A D 1 6 9を用いて感染させた(B r e s n a h a n ら、1996)。この細胞を1ウェルあたりの1.5 mlの総容積でウイルスとともに3

50

7℃で90分間インキュベートした。感染の間、30分ごとにこのプレートを穏やかにロッキングさせた。感染の後に、細胞上清取り出して、DMEM/10% FBS/pens strep (1ウェルあたり2ml)を各々のウェルに添加した。

【0885】

デュラマイシン誘導体(DLB)₄NA、(DIM)_nHIGG、DS-1、DS-2、DS-3およびDC-1の種々の希釈物を、ウイルスの添加前にそのウェルに添加してその後に感染させた。感染した細胞を37℃で全部で14日間インキュベートさせた。各々のウェルにおいて培地およびデュラマイシン誘導体を3日ごとに置き換えた。

【0886】

2. 蛍光顕微鏡

実施例XIIに記載のとおり、組み換えCMVは、SV40プロモーターの制御下でGFPを発現する。従って、感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑に見える。これらの研究では、デュラマイシン誘導体で処置したCMV感染した細胞は、4日および6日に蛍光顕微鏡下で観察された。

【0887】

B. 結果

4日目に、未処理のウェルならびに(DLB)₄NAおよび(DIM)_nHIGGで処理したウェルに単一の感染したGFP陽性緑色細胞がある(図15、左パネル)。従って、これらのデュラマイシン誘導体でのHHF-R2細胞の処置は、細胞へのウイルスの侵入を阻害しないようである。デュラマイシン誘導体DS-1、DS-2およびDS-3が細胞へのウイルス進入を阻害するといういくつかの前段階的な証拠がある。

【0888】

(DLB)₄NAおよび(DIM)_nHIGGでの処置の6日後、未処置ウェル対デュラマイシン誘導体処置ウェルにおける感染したGFP陽性細胞の数は著しく異なる(図15、中央のパネル)。6日目までに、ウイルスは、未処理のウェルにおいて周囲の細胞に4日目にみられる単一の感染した細胞から伝播した(図15、上部、左パネルと中央パネルを比較する)。しかし、(DLB)₄NAおよび(DIM)_nHIGGで処理したウェルにおいては6日目において、ウイルスは、もとの1つだけ感染した細胞に限定される(図15、中央および底部、左パネルと中央パネルを比較する)。

【0889】

従って、(DLB)₄NAおよび(DIM)_nHIGGは、CMVの伝播を、もとの感染した細胞から周囲の細胞に制限する。細胞を種々の濃度の(DLB)₄NA(100μg/mlおよび50μg/ml)および(DIM)_nHIGG(200μg/mlおよび100μg/ml)で処理した場合の、ウイルス伝播の阻害を観察する。

【0890】

実施例XIII

3G4抗体の利点

実施例IVに記載のように、本発明者らの固有のプロトコールによって開発された3G4抗体は、文献の抗PS抗体を上回る多くの利点を有するが、これには卓越した抗PS抗体である3SBが挙げられる(Roteら、(1993))。本実施例は、これらの特有の利点を記載する。

【0891】

A. クラスおよび特異性

3G4はIgG抗体であり、一方3SBはIgMである。IgGクラスの抗体は、高い親和性、インビボにおける低いクリアランス速度、ならびに精製、改変および取り扱いの容易さを含む、IgMを超える多くの利点を有する。IgM抗体である3SBのPS結合の、3G4および別のIgG抗体との比較を図19Aおよび図19Bに示す。

【0892】

3G4は、ほぼ同じ強度を有する陰イオン性リン脂質であるPS、PA、PI、PGおよびCLと強力に反応して、アミノリン脂質PEに対しては弱い強度で結合する。これは

10

20

30

40

50

、P CおよびS Mとの反応性は有さず、そして結合特異性プロフィール：P S = P A = P I = P G > C L >> P Eを有する（実施例 I V；表 4）。3 G 4は、ヘパリンにも、硫酸ヘパランにも、または二本鎖もしくは一本鎖のD N Aにも、ウエスタンブロットでb E n d. 3細胞から抽出された細胞タンパク質にも検出可能には結合しない。3 G 4の結合は、5 m M E D T Aの存在によって影響されず、このことはC a ²⁺が陰イオン性リン脂質に対する3 G 4結合に必要なことを示す。3 G 4は、リン脂質でコーティングされたE L I S Aプレートに結合せず、そのため0. 2 % T w e e n 2 0を含む生理食塩水で洗浄されて、これによってこの結合が吸収されたリン脂質に対してであったことが確認された。

【0893】

3 G 4によって認識されるエピトープは、陰イオン性リン脂質のホスホグリセロールコア内に存在すると考えられ、これは全ての哺乳動物種由来のリン脂質において同じである。従って、この抗体は、マウスおよびヒトのリン脂質の両方と反応し、これは前臨床開発および臨床開発について重要である。3 G 4は、天然のリガンドであるアネキシンVよりも陰イオン性リン脂質に対してさらに特異的である。3 G 4とは異なり、アネキシンVはまた、生理学的な濃度のC a ²⁺で、中性のリン脂質に強力に結合する。

【0894】

陰イオン性リン脂質についての3 G 4の特異性は、異なるリン脂質から形成されたリポソームを用いて、免疫されたP Sに対する3 G 4結合と競合するアッセイによって確認された。5 m gの単一のリン脂質を含むクロロホルムの溶液からリポソームを調製した。この溶液を窒素下で乾燥させて、丸底ガラスフラスコにおいて薄層を形成させた。次いで、10 m lのT r i s緩衝液（0. 1 M、p H 7. 4）を添加して、このフラスコを2分間5回超音波処理した。3 G 4抗体（0. 1 μ g / m l）を、緩衝液かまたは種々のリン脂質リポソームのいずれかに添加して、室温で30分間プレインキュベートさせた。この混合物をP Sコーティングプレートに添加して（標準的ブロッキング後）、1時間インキュベートして、洗浄し、二次抗体を添加した。1時間後、このプレートを洗浄して、O P Dを用いて5分間発色させた。

【0895】

実施例 I Vに示されるとおり、3 G 4は、固定されて、固定されたP Eに対してより少ない程度まで結合するが、固定されたP Cに対しては結合しないとき、P S、P A、P I、P GおよびC Lに結合する。種々のリポソームの有無において、3 G 4が固定されたP Sに結合する能力を図20に示す。これらのリポソーム競合研究からの結果によって、E L I S Aプレートに対して吸着されたP Sに対する3 G 4の結合は、P S、P A、P I、P GおよびC Lから調製されたリポソームによってブロックされたが、P EおよびP Cから調製されたリポソームは、3 G 4結合において検出可能な低下を生じなかったことが示される（図20）。また、S Mリポソームは、阻害性ではなかった。

【0896】

B. 細胞増殖の阻害

3 G 4は、P Sおよび他の陰イオン性リン脂質を外表面化する、活性化された、分裂中の、傷害されたアポトーシスおよび悪性の細胞に結合する。3 G 4抗体は、インビトロにおいて内皮細胞の増殖を阻害して、静止期細胞と対照的に、分裂している内皮細胞の顕著な選択性阻害を示す。

【0897】

インビトロにおけるb E n d. 3細胞の増殖に対する、抗P S抗体3 G 4、9 D 2、3 B 1 0、1 B 9、2 G 7、7 C 5および3 S Bの効果を決定した。b E n d. 3細胞（10, 000 / ウェル）を48ウェルプレートに播種して、結合させた。20 % D M E M 単独（コントロール）または抗体を含む20 % D M E M（1ウェルあたりの20 μ g ~ 40 μ g 総I g G）を、播種後4時間添加した。各々のクローンを2つの別のプレートにおいて三連で試験した。細胞を48時間後および96時間後に脱離させた。細胞カウントを各々のウェルにおいて決定した。1処置あたりの平均細胞数を算出した。

【0898】

3 G 4および9 D 2抗体が、特に有効であって、続いて、3 S Bおよび3 B 1 0であって、1 B 9、2 G 7および7 C 5は阻害性効果が少ない。各々の抗体が、静止期の（コンフルエントな）細胞とは対照的に、分裂している（サブコンフルエントな）内皮細胞の選択性阻害を示す。競合的研究において、3 G 4が最大の阻害効果を示し、続いて9 D 2であって、その各々が3 S Bよりも阻害性であった（図1 6）。

【0899】

C. 抗腫瘍効果

3 G 4は、インビボにおいて腫瘍血管内皮細胞の表面に結合する。種々の腫瘍を保有するマウスに静脈内注射した場合、3 G 4は腫瘍に特異的かつ一貫して局在するが、正常な器官には局在しない。染色は腫瘍血管内皮（図2 2）、壊死領域および個々の悪性細胞で観察された。腫瘍には、腫瘍内皮および腫瘍細胞の両方の同時の標的を可能にする、3 G 4についてのマルチ結合部位が存在する。

【0900】

3 G 4は、インビボにおいて血管形成および腫瘍増殖を抑制し、そして腫瘍保有マウスにおいて検出可能な器官毒性を示さない。最初の研究では、抗体が腫瘍血管損傷を生じ、血管分布および腫瘍壊死を低下させる、同系および異種の腫瘍モデルにおいて3 G 4は、印象的な抗腫瘍効果を示している（実施例X I）。樹立された腫瘍の退行は、処置された動物のうち3 0 %～5 0 %で観察されている。

【0901】

3 G 4抗体の代表的な血管新生抑制および血管標的化効果を、それぞれ図1 7 Aおよび図1 7 Bに示す。3 G 4で処置したMDA-MB-2 3 1正所性腫瘍を保有するヌードマウスからの腫瘍切片の解析によって、全ての処置腫瘍において血管新生抑制効果が明らかになった。図1 7 Aは、コントロール抗体とは対照的に、3 G 4で処置したマウスからの腫瘍の代表的画像を示す。このコントロールの腫瘍は、壊死の兆候を示さず、そして腫瘍血管上で検出された汎内皮細胞マーカーCD 3 1によって実証されるように、高度に血管新生されている（図1 7 A、左パネル）。対照的に、3 G 4で処置したマウスからの腫瘍は、8 0～9 0 %の壊死およびCD 3 1陽性構造のほぼ完全な消失を示し、これによってこの処置は実質的な血管新生抑制効果を生じたことが示される（図1 7 A、右パネル）。

【0902】

3 G 4の抗ガン活性の別の成分は、腫瘍血管損傷の誘導である。これは、同じコントロール研究に由来するH & E染色腫瘍の代表的な画像を提供する、図1 7 Bに例示される。コントロール腫瘍における血管は十分に灌流され、形態学的にインタクトであり、そして生存可能な分裂している腫瘍細胞によって囲まれる（図1 7 B、左パネル）。対照的に、3 G 4処置された動物における血管は、分解している内皮細胞層を有することが頻繁に観察され、脱落した内皮細胞によって、そしておそらくは裸出された血管に誘引される宿主細胞によってブロックされる（図1 7 B、右パネル）。3 G 4処置された腫瘍における代表的な血管によって、周囲の腫瘍細胞の前壊死性層によって示されたとおり、機能の損失が明確に示される（図1 7 B、右パネル）。

【0903】

これらの研究において、同所性MDA-MB-2 3 1腫瘍を有するマウスの3 G 4処置もまた、腫瘍中の血漿容積を減少させ、脈管密度を低下させた。血漿マーカーであるFITC-デキストランの減少によって判断した場合、BBG 3処置マウスと比べて、6 0 %の減少割合が3 G 4処置マウスの総血漿容積で観察された。3 G 4処置マウス由来の腫瘍中の1平方ミリメートルあたりのCD 3 1陽性脈管の平均数は、BBG 3処置マウス由来の腫瘍において 160 ± 20 であるのに比べて、 50 ± 15 であり、3 G 4処置後の約7 0 %の腫瘍血管分布の減少を示す。

【0904】

まとめると、3 G 4を用いる正所性のMDA-MB-2 3 1腫瘍の処置後の組織学的検査によって以下が示される：1）腫瘍における約5 0 %の血管における血管内皮の分解；

10

20

30

40

50

2) 腫瘍内皮細胞への白血球の結合および腫瘍間質への単核細胞の浸潤; 3) 血小板凝集および赤血球による腫瘍血管の閉塞; 4) 3 G 4 処置マウス対未処置マウス由来の腫瘍における微小血管密度の70%低下; および5) V T A に代表的な、腫瘍細胞の末梢辺縁の生存を伴う、腫瘍の中央壊死。従って、3 G 4 抗体の一次抗腫瘍作用は、腫瘍脈管構造に対する効果を通じて発揮される。他の機構、詳細には腫瘍細胞自体に対する抗体依存性の細胞傷害性が、抗腫瘍効果に寄与する可能性が高い。これは重要であって、末梢の辺縁における腫瘍細胞を含む、さらに多くの腫瘍細胞の殺傷を可能にし得る。

【0905】

フォローアップ研究において、腫瘍増殖に対する3 G 4 の効果は、同系（マウスM e t h A 線維肉腫）、皮下異種腫瘍（L 5 4 0 ヒトホジキンリンパ腫）および正所性腫瘍（ヒトM D A - M B - 2 3 1 乳ガンおよびヒトM D A - M B - 4 3 5 乳ガン）を含む他のマウスモデルにおいて試験されている。3 G 4 抗体を有するマウスの処置によって、それぞれ、これらの腫瘍の90%、65%および50%および70%の増殖遅延が生じた。小さい腫瘍（0.1 cm 直径）および十分樹立された腫瘍（0.3 cm 直径、200 mm³）の両方とも同様に阻害された。抗P S 処置は、M e t h A 保有マウスの50%およびM B A - M D - 2 3 1 腫瘍を有するマウスの30%において長期の完全な緩和を誘導した。3 G 4 は、免疫応答性のマウスにおいて最高の阻害性効果を有する。ヒト胸部腫瘍がマウスの乳腺脂肪パッドにおいて増殖されるヒト胸部腫瘍（M D A - M B - 2 3 1 およびM D A - M B - 4 3 5）の正所性モデルは重要である。なぜなら、これらは、ヒトの胸部内で増殖するヒト胸部腫瘍の実際的かつ現実的なモデルであるからである。

【0906】

D. 安全性プロフィール

3 G 4 抗体は、文献で記載される抗リン脂質抗体とは異なる。代表的には、抗リン脂質抗体は、凝固カスケードを妨害する病原性抗体とみなされる。それらは、インビトロにおいて凝固反応を阻害してインビボで血栓を生じる。対照的に3 G 4、9 D 2 および同様の抗体は、病原性効果のない治療抗体である。

【0907】

1. 凝固

血清の非存在下と同じく血清の存在下で強力にP S コーティングプレートに結合する抗体を同定するためのスクリーニングを用いて、好ましくは所望の抗体が選択されるべきであるという本発明者らの認識から、3 G 4、9 D 2 および同様の抗体の基部の重要な局面が得られる。この新規な展開によってP S タンパク質および血清タンパク質の複合体を認識する抗体を同定して排除する能力が得られる。なぜならこのような複合体は、抗リン脂質症候群および関連の病態の原因であるかまたはその重要な要因であると考えられるからである。

【0908】

インビトロにおける血液凝固の研究において、組織因子（T i s s u e F a c t o r）（T F）-誘導性凝固の弱い阻害が、高用量の3 G 4 抗体を用いて観察された。それより低い用量を用いる他の研究では、3 G 4 処置マウス由来のカルシウム再添加血清は、組織因子の存在下においてB B G 3 処置マウス由来のカルシウム再添加血漿と同じ速度で凝固した。またインビトロにおける細胞プラス組織因子への100 μg/ml の3 G 4 の添加は、プロプレックス（p r o p l e x）における凝固因子X a の生成速度に影響しなかった（外因系凝固経路）。

【0909】

インビトロにおける高い抗体レベルを用いるT F 誘導性凝固の弱い阻害にかかわらず、3 G 4 抗体はインビボで試験されており、正常マウスでも腫瘍保有マウスでも血栓の合併症を生じない（例えば、実施例X I を参照のこと）。3 G 4 抗体はまた、インビボにおいてサルで試験されており、有意な副作用は観察されていない。

【0910】

2. 低い毒性または毒性のないことの他の指標

3 G 4 はマウスにおいて毒性を有さないか毒性が低いという最初の証拠は、3 G 4 が毒性の証拠なしにマウスにおいてハイブリドーマとして増殖するという知見によってもたらされる。また、1 m g の精製された 3 G 4 が腹腔内に注射された場合、毒性は観察されなかった。

【0911】

系統的なインビボ研究がここで行なわれており、ここでは3匹の8週齢のBALB/cマウスの群に100 μ g の精製した3 G 4 または同位体マッチしたコントロールIgG₃ (BBG3) を2～3週間の間に週に3回、腹腔内注射した。毒性の生理学的兆候は観察されておらず、そして器官毒性も形態学的異常の組織病理学的兆候も、3 G 4 処置されたマウスから取り出された主な器官の切片で検出されていない。以下のパラメーターを特に試験した。

10

【0912】

体重に関して、3 G 4 処置したマウスはBBG3処置マウスと同じ速度で体重増加した。初期の研究において体重の低下は観察されなかった。毒性の身体的兆候、例えば、脱毛、食欲の低下などは観察されなかった。赤血球、血小板、白血球、絶対リンパ球カウントまたは絶対好中球カウントを含む血球カウントでは変化はない。

【0913】

コントロール動物と比べて、血液学的な毒性の証拠は何も同定されなかった。末梢血組成は正常であり（完全血球算定微分の測定に基づく）；赤血球形態の評価は血管内溶血の証拠を示さず（すなわち、分裂赤血球が存在しない）；全血凝固パラメータ（PT、APTT、D-ダイマー）は正常であった。血球数（赤血球、血小板、白血球を含む）も、リンパ球絶対数も好中球絶対数も、変化はなかった。

20

【0914】

骨髓細胞質を解析するために、3 G 4 またはBBG3処置マウス（6注射、100 μ g）由来の骨髓のパラフィン切片を、総細胞質および細胞組成について試験した。処置動物における骨髓は本質的に完全に細胞性であった（若齢の哺乳動物について予想されるとおり）。赤血球、顆粒球、リンパ球性前駆体および巨核球が正常な数で存在した。

【0915】

まとめると、高用量の3 G 4（0.1 m g）を用いて2～3週間の間、週に3回処置した200匹を超えるマウスで、毒性の事例は観察されていない。2 m g より多い程度の用量が与えられた場合でさえ、毒性の兆候は示されなかった。マウスは正常な肉体的兆候、骨髓細胞質、白血球カウント、組織学および凝固機能を保持している。

30

【0916】

3 G 4 抗体はまた安全性研究においてサルに投与されており、副作用は観察されていない。

【0917】

血液クリアランス動態の研究はまたマウスで行なわれた。3 G 4 を、Bolton Hunter 試薬を用いて放射ヨウ素標識して、マウスに静脈内注射した（25 g）。血液のサンプルを、種々の時点後に尾静脈を介して取り出した。3 G 4 の血液クリアランスは、マウスのマウスIgGに代表的であった。クリアランスのα相の半減期は3時間であって、β相の半減期は5日であった。分布の容積は正常であった（100 ml/kg）。これらの研究によって3 G 4 は、正常な宿主組織とは反応せず、加速されたクリアランスをもたらすことが示される。

40

【0918】

ヒト化3 G 4 抗体もまた、アテローム硬化症のウザギに投与され、安全であることを示した。

【0919】

3. サル安全性研究

ヒト化3 G 4 抗体（以下の実施例XIXを参照のこと）もまた、安全性研究においてサルに投与され、有意な副作用は観察されていない。ヒト化3 G 4 抗体を、100 mg/kg

50

gまで単一のボーラスでカニクイザルにI V投与した。これは計算される治療用量(1 mg/kg)の100倍である。

【0920】

副作用のないレベル(NOAEL)は、反復投与において約10 mg/kg/週であった。10~100 mg/kgの用量ではAPTTおよびPTにおける一過性の延長があった。血球数(白血球、赤血球および血小板を含む)も、他の臨床化学も変化はなかった。

【0921】

E. 抗ウイルス効果

3G4抗体はまた、有意な抗ウイルス効果を発揮する。実施例XIIIに示されるとおり、3G4を用いたRSV感染細胞の処置は、3SBを用いて観察される効果よりも優れていた。従って、これらの結果によって、文献における目立った抗PS抗体である3SBを上回る3G4抗体の別の利点が強調される(Rotera(1993))。

【0922】

3G4抗体はまた、インビトロ(実施例XI)においてCMVを阻害するのに、そしてインビボにおいて(実施例XXI) mCMVに感染されたマウスの生存を増強するのにいて極めて有効であることが示される。それに加えて、3G4抗体は、ラッサ熱の感染因子であるPichindeウイルス感染を阻害することがさらに示される(実施例XIV)。ウイルス感染後に示される本明細書の細胞表面PS露出、および3G4抗体がワクシニアウイルスに感染した細胞に結合する能力(実施例XXIII)によって、3G4抗体が、広いスペクトルの抗ウイルス剤として大きい能力を有することが示される。

【0923】

実施例XIX

3G4抗体、CDR配列およびキメラ

従って3G4抗体は、血管新生阻害、抗腫瘍血管、および抗ウイルス剤の合わせた特性を保有する。細胞分裂、血管新生、腫瘍増殖およびウイルス性感染に対する3G4の阻害活性は、明白な毒性の欠失とともに考慮すれば、血管新生障害、ガン、糖尿病およびウイルス性感染の処置を含む、この抗体についての広範な治療指標を示す。

【0924】

3G4抗体と実質的に同じエピトープを認識する抗体は、例えば、免疫により、血管新生阻害、抗腫瘍血管および抗ウイルス治療の1つ以上における使用のために生成され得、そして抗体競合研究によって確認され得る。3G4抗体と実質的に同じエピトープに結合する抗体はまた、本明細書に提供される3G4抗体の配列の知識から生成され得る。本実施例によって3G4抗体の相補性決定領域(CDR)の配列およびその配列情報の用途が得られる。

【0925】

A. 3G4抗体配列

抗体の可変領域のもとの配列を、3G4抗体を生成するハイブリドーマからRACEによって得て、そしてその配列を確証した。3G4抗体CDR1-3の重鎖(VH)の可変領域の核酸およびアミノ酸の配列は、それぞれ配列番号1および配列番号2によって提示される。

【0926】

配列番号1および配列番号2は、図18Aに示されるようにマウスのリーダー配列および定常鎖配列の一部を含む。リーダー配列は、配列番号2のアミノ酸1~19によって提示され、そして成熟タンパク質は図18Aにおける矢印によって示されるように始まる。十分な相補性決定領域の配列情報は、VSSを含む配列部分までの成熟タンパク質の配列によって含まれ、その後のアミノ酸は抗原結合には必須ではない。従って、核酸配列におけるBstEII部位は、機能的なマウス可変領域を調製するため、例えば、ヒト定常領域上への接合における使用のための便利な部位として用いられ得る(図18A)。

【0927】

実際には、3G4-2BVH配列は、Lonza pEEベクターを用いてBstEII

10

20

30

40

50

部位のヒト γ 1定常領域上に接合されている。得られた産物はマウスリーダー配列を含み、そのVHは、図18Aにおいて示される様式でヒトCH1配列に結合され、ここでASTLGPSVFPLAPSSKSTSG（配列番号7）は、ヒトCH1配列の第一の部分に相当する。

【0928】

3G4抗体CDR1-3の軽鎖（V κ ）の可変領域の核酸およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号3および配列番号4によって示される。配列番号3および配列番号4はここでも、配列番号18Bに示されるとおりマウスリーダー配列および定常鎖配列の一部を含む。このリーダー配列は、配列番号4のアミノ酸1~22であり、その成熟タンパク質は、図18Bにおける矢印によって示されるとおり始まる。TVFを含む配列部分までの成熟タンパク質の配列によって、十分な相補性決定領域の配列情報が含まれ、その後ろのアミノ酸は、抗原結合に必須ではない。従って、核酸配列におけるBbsI部位は、機能的なマウス可変領域を調製するため、例えば、ヒト定常領域上への接合における使用のための便利な部位として用いられ得る（図18B）。

【0929】

実際には、3G4-2BVL配列は、Lonza pEEベクターを用いてBstEI部位のヒト κ 定常領域上に接合されている。得られた産物はマウスリーダー配列を含み、そのVLは、図18Bにおいて示される様式でヒトCL1配列内に結合され、ここでIFPPSDEQLKSGTAS（配列番号8）は、ヒト κ 定常領域配列の第一の部分に相当する。

【0930】

B. 3G4キメラ抗体の生成および特徴づけ

マウス相補性決定領域およびヒト定常領域を含むキメラ構築物（ch3G4）を生成して、もとのマウス抗体と本質的に同じように挙動することが示された。

【0931】

マウス3G4抗体を、ヒトマウスキメラ抗体（Avanir（Xenerex）Biosciences, San Diego, CA）に変換した。マウスV_Hをクローニングして、Lonza 2BVHベクターのBstEII部位のヒト γ 1定常領域に接合した。マウスV_Kをクローニングして、Lonza 2BVLベクターのBbsI部位のヒトK定常領域に接合した。この配列を確証した。全体的構築物をCHO細胞において発現させて、精製した。このヒト-マウスキメラ（「ヒト化」）抗体はバビツキシマブと称されている。

【0932】

得られたch3G4は、リン脂質コーティングELISAプレートに対してマウス3G4が結合するのと少なくとも同じように結合する。リン脂質のパネルに対するキメラ3G4のインビトロ結合プロフィールを図21に示しており、ここでPS、PA、CL、PIおよびPGに対する結合は、同様に示される。この結合は抗原特異的である。なぜなら無関係の特異性のコントロール抗体とは結合が観察されなかったからである。特定の研究では、キメラ3G4対3G4抗体の見かけ上最大の結合が観察された；これは、二次抗体の優れた結合に起因し得る。

【0933】

C. ヒト化抗体の抗腫瘍効果

インビボでは、ch3G4は、腫瘍血管内皮細胞に局在して、抗腫瘍効果を発揮する。マウスにおいて増殖しているMDA-MB-435ヒト乳ガン細胞におけるch3G4の抗腫瘍効果は、実施例XIに記載されて、図8Gに示される。キメラ抗体を用いるMDA-MB-435腫瘍を有するマウスの処置は、コントロールとは対照的に腫瘍増殖を効率的に遅延させた。

【0934】

ch3G4の局在化を、マウスで増殖するMDA-MB-435ヒト乳ガン細胞において試験した。マウスにビオチン化ch3G4または無関係の特異性のコントロールIgG

10

20

30

40

50

を静脈内注射した。1時間後、マウスを放血させて、その腫瘍を取り出して凍結切片を切り出した。ビオチン化試薬を最初にストレプトアビジンCy3結合体とインキュベートして、PBS中で洗浄し、次いでMECA抗体とともに、続いてFITCタグ化二次抗体とともにインキュベートした。それぞれCy3の蛍光（赤）およびFITCの蛍光（緑）について適切なフィルターでとった単一の画像を、デジタルカメラで撮ってコンピューターに移した。黄色（融合した緑および赤の蛍光の生成物）を示す集束型（converged）画像を、Metaviewソフトウェアの補助によって重ね合わせた。

【0935】

この二重染色方法において、ビオチン化タンパク質および血管内皮を赤および緑で標識する。ビオチン化タンパク質を内皮に結合する場合、この集束型画像は黄色にみえる。図22に示されるとおり、ビオチン化ch3G4は、腫瘍血管内皮細胞に結合する。なぜなら染色パターンはMECA32のパターンに収斂するからである。

10

【0936】

バビツキシマブはまた、放射標識され、ラットにおける同系前立腺腫瘍に存在することが示されている。減少した腫瘍灌流もまた、バビツキシマブで処置した腫瘍保有ラットで観察された。

【0937】

D. 3G4の組換えIgG2aアイソタイプの生成および特徴づけ

マウス3G4抗体のヒトキメラ（ch3G4）は、ヒトIgG₁アイソタイプ（hIgG₁）である。ch3G4マウスIgGホモログは、マウスIgG_{2a}アイソタイプ（mIgG_{2a}）を必要とする。この構築物を作製し、試験し、親抗体と本質的に同じようにふるまうことを示した。

20

【0938】

Lonza発現ベクターpEE12.4およびpEE6.4を、Peregrine Pharmaceuticals Incの承諾を経てLonza Biologicsから入手した。ベクターの使用、トランスフェクション、およびトランスフェクトしたNS0マウス骨髓腫細胞のスクリーニングを、Lonza Biologicsの「Operating Procedures for use with: NS0 Myeloma cells」にしたがって行った。簡単に述べると、3G4軽鎖コード配列を、3G4ハイブリドーマ細胞株から単離した全RNAからRT-PCRによって増幅した。RT-PCRプライマーは、増幅されたフラグメントがLonza pEE12.4ベクターへのクローニングのためにXmaIおよびEcoRI制限酵素部位を増幅産物のいずれかの末端に含むように設計した。

30

【0939】

3G4重鎖の可変領域を、3G4ハイブリドーマ細胞株から単離した全RNAからRT-PCRによって増幅した。プライマーは、増幅されたフラグメントがLonza pEE6.4ベクターへのクローニングのためにHindIIIおよびXmaI制限酵素部位を増幅産物のいずれかの末端に含むように設計した。マウスIgG2a定常領域を、Dr. Shozo Izuiによって提供されたプラスミドベクターからPCRによって増幅した。PCRプライマーは、pEE6.4+3G4VHベクターへのクローニングのためにBstIIおよびEcoRI制限部位を増幅産物のいずれかの末端に有するように設計した。重要なことは、BstEII部位を、3G4 VH可変領域配列上流とインフレームであるように設計したことである。重鎖および軽鎖構築物を、単一の二重遺伝子ベクター（12.4 3G4 IgG2a）に、両方のベクターをSalIおよびNotIで切断することによって合わせた。重鎖および軽鎖コード領域を、UT Southwestern sequencing core facilityで配列決定することによって確認した。

40

【0940】

12.4 3G4 IgG2aベクターを、エレクトロポレーションによってNS0細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの後、NS0細胞を希釈し、グルタミ

50

ンを欠く培地中の96ウェルプレートにプレーティングした。構築物でトランスフェクトした細胞のみ（ポジティブ選択のためにグルタミンシンターゼ遺伝子を含む）が、グルタミンの非存在下で増殖し得る。その後2ヶ月にわたり、種々のトランスフェクト体をP S-E L I S Aによって抗体分泌について同定しスクリーニングした。最も多い量の抗体を分泌するトランスフェクト体を大規模培養で増殖させて、純粋な抗体を生成した。その抗体を3 G 4抗体について使用されるのと同じ精製プロトコルを用いて精製した。

【0941】

I g G 2 a 重鎖および3 G 4 軽鎖（C_κ）のアミノ酸配列は、図2 Cおよび図2 Dに示されるように、それぞれ、配列番号10および配列番号11に示される。

【0942】

予期されるように、精製した2 a G 4抗体は、150 k D aのバンドとしてS D S-P A G Eゲル上で移動し、P S-E L I S Aにおいて一定の親和性かつ3 G 4と本質的に同じ特異性でP Sに結合する。したがって、2 a G 4は、3 G 4と同じプロフィールで陰イオン性リン脂質に結合する（上の表4を参照のこと）。

【0943】

マウスI g G_{2 a}アイソタイプを、ヒトキメラのc h 3 G 4（バビツキシマブ）についてのより良いモデルを提供するために主に生成した。マウスI g G_{2 a}アイソタイプはまた、マウスI g G₃（マウス3 G 4抗体の現在のアイソタイプ）よりもより安定であると考えられる。2 a G 4抗体は、増強されたA D C Cにより、3 G 4 I g G₃よりも強力な抗腫瘍効果を生じ得る。

【0944】

2 a G 4抗体は、3 G 4およびc h 3 G 4抗体、ならびにコントロールとしてC 4 4抗体とともに、マウスW i D r（結腸がん）モデルでの予備研究において試験されている。腫瘍が小さい場合（1群あたり10匹のマウス）、処置を5日目に開始した。100 μ gの各抗体を1週間あたり3回注射し、腫瘍増殖をモニタリングした。試験抗体の3種すべてが、本質的に同程度の腫瘍増殖を示した。

【0945】

実施例X X

ドセタキセルとの併用療法における3 G 4抗体

本実施例は、3 G 4抗体および化学療薬ドセタキセルを用いる腫瘍処置のための併用療法に関する。これらの薬剤は、腫瘍脈管構造内皮細胞および腫瘍細胞区画を攻撃するように設計されて、毒性の低い相乗的な処置をもたらす。この結果によって、この併用療法は、処置効率を実際に有意に増強したことが示された。

【0946】

A. F cドメイン媒介性抗腫瘍効果

インビトロでの腫瘍細胞に対する阻害効果について3 G 4抗体を試験した。腫瘍細胞に対する直接の阻害効果は観察されなかった。従って、3 G 4抗体の抗腫瘍効果は、F cドメイン媒介性の免疫エフェクター機能の増強、例えば、抗体媒介性食作用、A D C C、C D Cおよびサイトカイン産生の刺激、またはこれらの機構の組み合わせの増強を含む可能性が高い。

【0947】

マクロファージによるP S陽性細胞の食作用に対する3 G 4の効果を評価した。蛍光腫瘍細胞をH₂O₂で処置してP S露出を誘導した。次いで、処置細胞および未処置の細胞を収集して3 G 4抗体またはコントロールの抗体（B B G）と接触させた。次いで、マウス骨髄マクロファージを添加して、このマクロファージが蛍光腫瘍細胞を食菌する能力を、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

【0948】

3 G 4は、マクロファージによるP S陽性細胞の食作用を3倍を超えて増大し得ることが確認されている（図23）。この知見によって、3 G 4抗体のF cドメインが抗体の抗腫瘍効果に寄与するという本発明者らの推論が支持される。すなわち、F cドメインは、

10

20

30

40

50

宿主免疫エフェクター機能を活性化し、次いでこれが抗腫瘍効果を発揮する。従って3G4抗体は、NK細胞の溶解活性を増強してさらに有効なADCCをもたらす。

【0949】

B. ドセタキセルは、内皮細胞上のPS露出を誘導する。

【0950】

ドセタキセルの皮下濃度による内皮細胞上でのPS露出の誘導をFACS解析によってインビトロで試験した。ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト微小血管内皮細胞(HUVEC)を10nMのドセタキセルで24時間処置して、FACSによって試験した。処置されたHUVECおよびHMVECの両方とも、未処置細胞に比べて3G4結合における有意な増大を示した(それぞれ、図24Aおよび図24B)。48時間および72時間のドセタキセルインキュベーションをまた行なった。

10

【0951】

C. ドセタキセルは、腫瘍細胞上のPS露出を誘導する。

【0952】

臨床未満の濃度のドセタキセルによるPS露出のインビトロ誘導をまた、腫瘍細胞株のパネルを用いるFACS解析によって試験した。マウスLewis肺癌腫3LL、マウス結腸ガンColo26およびヒト乳ガンMDA-MB-435細胞を10nMのドセタキセルを用いて24時間処置して、FACSで試験した。試験した全ての腫瘍細胞株は、未処置の細胞と比較して3G4結合の有意な増大を示した(それぞれ、図25A、図25Bおよび図25C)。48時間および72時間のドセタキセルインキュベーションをまた行なった。マウス黒色腫B16およびマウス線維肉腫MethA腫瘍細胞株をさらに試験して、また未処置の細胞と比較して3G4結合における有意な増大が示された。

20

【0953】

ヒト乳ガンMDA-MB-231細胞を10nMのドセタキセルを用いて24時間処置して、キメラ3G4抗体(ch3G4)またはコントロールのヒトIgGのいずれかともにインキュベートしてFACSによって解析した。これらの結果によって、抗体結合における有意な増大が抗原特異的であることおよびキメラ抗体が親の3G4抗体のように挙動することが示される(図26)。

【0954】

D. ドセタキセルは腫瘍脈管におけるPS曝露を誘導する

30

コントロールされた研究からの結果は、ドセタキセルが腫瘍脈管におけるPS曝露を増加させることを示す。そのような研究において、マウスのドセタキセル処置は、陰イオン性リン脂質を曝露する腫瘍脈管の割合を35%~60%増大させた。正常組織の脈管では、ドセタキセルでの全身処置後でさえ、PSの誘導は観察されなかった。

【0955】

E. 3G4およびドセタキセルを用いた相乗的な腫瘍処置

従って、本発明者らは、臨床濃度未満のドセタキセルを用いた内皮細胞および腫瘍細胞の処置が3G4結合を有意に増大することを示した。それらによってまた、3G4抗体が、表面上にPSが露出されている腫瘍細胞のマクロファージ媒介性食作用を促進することが示された。従って、ドセタキセルによって媒介される3G4結合の増大は腫瘍細胞の食作用および3G4抗体のFcドメインによって媒介される他の抗腫瘍効果、例えば、NK細胞の溶解活性を増強して、さらに有効なADCCをもたらす。他の研究によってまた、ドセタキセルを用いた乳ガン患者の処置は血清のIFN- γ 、IL-2、IL-6およびGM-CSFサイトカインのレベルの増大、ならびにNKおよびLAK細胞の活性の増強をもたらすことが示されている(Tsavarisら、2002)。

40

【0956】

従って、ドセタキセルとの3G4の組み合わせ治療の抗腫瘍効果を、ヒトMDA-MB-435乳ガンを保有するSCIDマウスにおける正所性モデルにおいて試験した。正所性MDA-MB-435ヒト乳ガンを保有するマウスを、腹腔内に3G4のみ(100 μ g/1用量)、ドセタキセルのみ(10mg/kg)または3G4をドセタキセルと組み

50

合わせて（それぞれ $100 \mu\text{g} / 1$ 用量および $10 \text{mg} / \text{kg}$ ）用いて、3週間、週に3回投与して処置した。処置は腫瘍細胞移植後6日で開始した。

【0957】

これらの研究により、同所性MDA-MB-435ヒト乳房腫瘍を有するマウスの3G4とドセタキセルとによる処置が、腫瘍増殖を93%阻害したことが示された。広まったMDA-MB-435腫瘍を有するマウスの3G4とドセタキセルとによる処置は、肺における腫瘍コロニーの平均数を93%減少させ、半数の動物が腫瘍を発症しなかった。両方の腫瘍モデルにおいて、組み合わせの抗腫瘍効果は、ドセタキセルまたは3G4単独の抗腫瘍効果に対して統計学的に有利である（ $p < 0.01$ ）。併用療法は、腫瘍における腫瘍脈管密度および血漿容積を、個々の薬物がなす程度よりも大きく減少させる。併用療法は、ドセタキセル単独と同様にマウスに対して毒性ではない。これらの結果は、アジュバント療法と同様に、3G4が乳がん患者においてドセタキセルの治療効力を増強し得ることを示す。

10

【0958】

F. 3G4は薬物耐性の乳房腫瘍に対するシスプラチンの活性を増強する

3G4抗体はまた、動物において薬物耐性の乳房腫瘍に対するシスプラチンの活性を増強する。マウスに薬物耐性の乳房腫瘍を接種し、20日目の後に処置した。処置群は、シスプラチン単独、3G4抗体単独、アイソタイプがマッチするコントロール抗体（BBG3）または、3G4抗体と併用したシスプラチンであった。

【0959】

コントロール動物における腫瘍は迅速に増殖し続けた。シスプラチン単独または3G4抗体単独で処置したマウスにおいて、腫瘍増殖が遅延された。組み合わせ処置群（シスプラチンと3G4抗体）は、最も良い抗腫瘍応答を示した。したがって、3G4のような抗体は、薬物耐性腫瘍に対してでさえ、シスプラチンのような化学療法剤の有効性を増強する。

20

【0960】

G. 膵臓癌の併用療法

膵臓癌に対して改善された処置の緊急の必要性が存在する。ヒトにおいて、膵臓癌を有する患者についての全体的な長期生存率は、4%未満である。膵臓癌患者のうちの約70~80%が、肝臓への転移に起因して治療に失敗し、現在、転移性疾患に対する有効な治療は存在しない。

30

【0961】

Pan02マウス膵臓腺癌細胞を免疫応答性C57Bl/6マウスの膵臓に注射した。腫瘍細胞の注射の5日後に処置を開始した。処置群は、コントロールとしてPBS、3G4抗体単独（ $100 \mu\text{g}$ ）、ゲムシタビン単独（ 3.5mg ）、またはゲムシタビンと併用した3G4抗体（それぞれ、 3.5mg および $100 \mu\text{g}$ ）であった。ゲムシタビンは、ピリミジン系代謝拮抗物質である。腫瘍細胞注射の22日後に動物を犠牲にし、腫瘍重量を決定した。

【0962】

これらの研究において、ゲムシタビンおよび3G4抗体の両方が、有意な抗腫瘍効果を示した3G4抗体を併用してゲムシタビンで処置した動物は、各々の薬剤よりも、副作用（例えば、体重減少）を伴わずに、有意に増強された抗腫瘍効果を示した。結節、腹膜および肝臓転移もまた、ゲムシタビンまたは3G4抗体単独のいずれかでの処置において有意に減少された。ここでも、3G4抗体を併用してゲムシタビンで処置した動物は、各々の薬剤単独と比べた場合、有意に減少した結節、腹膜および肝臓転移を示した。重要なことは、ゲムシタビンと3G4抗体との組み合わせで処置した動物において、検出可能な肝臓への転移が存在しなかったことである。このことは有意であり、ヒトでの場合、肝臓への転移は、膵臓癌の診断後の最も頻繁な死因である。

40

【0963】

これらの研究はまた、組み合わせ処置群において腫瘍へのマクロファージの有意な浸潤

50

を示した。微細血管密度が、3 G 4 抗体単独およびゲムシタビンと併用した3 G 4 抗体での処置の際に減少した。

【0964】

H. 照射および3 G 4 による肺癌の処置

肺癌を有するマウスの研究において、10 Gyの焦点照射は、二重標識研究で示されるように、腫瘍血管内皮におけるPSの曝露を誘導した。処置段階において、照射および3 G 4 抗体単独は、抗腫瘍効果を示した。この場合も、処置モダリティ（すなわち、照射および3 G 4 抗体）の組み合わせは、最も高い抗腫瘍効果を示した。

【0965】

(I. 樹状細胞上のFcγRに対するアポトーシス腫瘍細胞の3 G 4 標的化)

3 G 4 に加えてドセタキセルで処置したマウス由来の腫瘍はまた、コントロールの腫瘍に比較して異常な量のリンパ球を含んだ。この現象は腫瘍細胞を崩壊させることによる免疫細胞の代表的な化学誘引に相当しているが、これはまた、免疫エフェクター細胞上のFcγRに対するFc結合を通じて媒介された3 G 4 による免疫系の活性化を反映し得る。

【0966】

腫瘍内免疫細胞浸潤に対する3 G 4 およびドセタキセル投与の効果を特徴付けるために、これらの浸潤に存在する細胞のタイプを、マクロファージ、抗中球、顆粒球、NK細胞および活性化リンパ球の特異的マーカーに対する抗体を用いる、腫瘍組織の凍結切片および／またはパラフィン切片の免疫染色によって同定することができる（Pharming en, San Diego, CA）。この浸潤物の程度、表現型および活性化状態を等級付けしてもよい。IL-2 およびINFを含む免疫細胞に浸潤することによるサイトカイン産生はまた、免疫組織化学的技術を介して解析され得る。血清サイトカインレベルは、ELISAによって評価され得、そして細胞内染色を用いて、サイトカイン産生を担う特定の細胞区画を同定することができる。従って、腫瘍細胞の増殖およびアポトーシスに対する、浸潤する免疫細胞の効果は、体系的に評価することができる。

【0967】

前述のデータに照らして、本発明者らは、さらに樹状細胞上のFcγレセプター（Fc（γ）R）に対するアポトーシス腫瘍細胞の3 G 4 媒介性標的化によって乳ガンの免疫療法の力価を増強する方法を企図する。有効な細胞性および体液性の免疫応答を誘導する効率的な抗原提示は、腫瘍ワクチンおよび免疫療法の発達に重要である。樹状細胞（DC）は、腫瘍関連抗原に対して細胞傷害性Tリンパ球をプライムする最も強力な抗原提示細胞（APC）である。樹状細胞（DC）による腫瘍抗原提示の改善は、さらに強力な腫瘍ワクチンの開発をもたらすはずである。

【0968】

DCのFc（γ）Rレセプター媒介性の内面化による抗原提示は、液体相の抗原飲作用と比較して1,000倍まで増強され得る。アポトーシス腫瘍細胞（ATC）は、樹状細胞ロードのための抗原の優れた供給源である。なぜなら複数の腫瘍特異的抗原（公知および未知の両方）が、ナイーブなT細胞に対して効率的に提示され得、特定のエピトープのロックに起因する可能性が低い免疫系回避変体の出現が生じるからである。動物研究では、ATCでパルスされたDCは、インビトロおよびインビボで強力な抗腫瘍免疫を生じることが示されている。しかし、最近のデータでは、ATC単独では、抗腫瘍免疫を活性化するためにいくらか効率が悪いことが実証されており、これはおそらくその効率の悪い取り込みおよびDC成熟を誘導する能力の欠如による。

【0969】

最近の研究ではまた、アポトーシス腫瘍細胞に対する抗腫瘍抗体の結合によって形成されたATC免疫複合体は、DC上のFc（γ）Rに対して標的化され得ることが実証された。ATC単独と比較して、ATC免疫複合体は、DCによってより効率的に内面化され、DC活性化および成熟を誘導するのに比べてより効率的であって、そしてさらに重要なことには、ATC免疫複合体はMHC IおよびMHC II制限抗原提示の両方を有意に増強し得、従って、強力な抗腫瘍TヘルパーおよびCTL免疫を誘導する。

【0970】

従って、本発明者らは、体液性および細胞性の抗腫瘍免疫の両方を増強する本発明の抗PS抗体を用いることを考えて、ATCベースのDC腫瘍ワクチンの有効性をブーストする。PSは、普遍的であって、アポトーシス腫瘍細胞の最も豊富な特異的マーカーであるので、本発明の抗体、詳細には3G4のパネルは、ATC上のPSに結合し得る。3G4-ATC複合体のFc(γ)R媒介性内面化を通じて、3G4が300%までアポトーシス腫瘍細胞のDC取り込みを増強し得ることを、本発明者らは既に実証している。従って、Fc(γ)Rを通じて媒介されたDCによってATCの取り込みを増強することによって、3G4および同様の抗体は、MHC IおよびMHC II制限抗原提示の両方を大きく増強し得、強力な体液性および細胞性抗腫瘍免疫の両方を誘導し得、ATCベースのDC腫瘍ワクチンの有効性をブーストし得るとということが判断されている。これは、インビボにおいて、Th1、CTLおよび抗体応答の誘導における、3G4-ATC免疫複合体をロードされたDCの有効性を確立することによって、およびインビボにおいて3G4-ATC免疫複合体をロードされたDCの免疫によって誘導された抗腫瘍免疫の力価を決定することによって、実証され得る。

10

【0971】

(実施例XXI)

(抗PS抗体は、インビボにおいてCMV感染を処置する)

実施例XIIに示されるインビトロのCMVに対する抗ウイルス効果に従い、本実施例は、CMVウイルスのマウスバージョン、mCMVを感染させたマウスの生存の増大が実証される。

20

【0972】

Balb/Cマウス(6週齢、1群あたり5匹のマウス)を、 5×10^5 pfuのmCMV RVG102を用いて腹腔内感染させた。このマウスを3G4抗体(マウス1匹あたり1mg)または上記のヒトマウスキメラ抗体ch3G4(マウス1匹あたり1mg)で1日目に腹腔内処置した。未処置のマウスをコントロールとして使用した。その後、マウス1匹あたり0.5mgの抗体またはキメラ抗体を用いて4日ごとに、26日までマウスを処置した。マウスを感染後90日間、生存についてモニターした。

【0973】

3G4抗体の親およびキメラ型の両方を用いた処置によって、mCMV感染マウスの生存の向上が得られた。3G4またはch3G4を用いて処置したマウスは、感染マウスのうち25%しか生存しなかった、未処置のマウスと比較して、それぞれ100%および80%の生存を有した(図27)。

30

【0974】

(実施例XXII)

(インビボにおいてPE結合ペプチド誘導体はCMV感染を処置する)

実施例XVIIに示されるCMVに対するインビトロの抗ウイルス効果に加えて、本実施例によって、デュラマイシンビオチン誘導体であるDLBがmCMVで感染されたマウスの生存を向上させたことが実証される。

【0975】

Balb/Cマウス(1群あたり6週齢、マウス5匹)を、 5×10^5 pfuのmCMV RVG102で腹腔内感染させた。これらのマウスを、マウス1匹あたり20μgのデュラマイシン誘導体DLBを用いて1日目に、そして4日ごとに腹腔内処置した。未処置のマウスをコントロールとして使用した。マウスを感染後90日間、生存についてモニターした。

40

【0976】

デュラマイシンビオチン誘導体であるDLBを用いた処置によって、mCMV感染マウスの生存が向上した。DLBで処置したマウスは、マウスのうち25%しか感染から生存しなかった未処置のマウスと比較して、100%の生存を有した(図28)。

【0977】

50

(実施例 X X I I I)

(抗 P S 抗体は、ウイルス感染した細胞に結合する)

本実施例によって、ウイルス感染が細胞表面で P S 露出を誘導することおよび抗 P S 抗体がウイルス感染した細胞に結合することが示される。F A C S 解析において実証される細胞表面に対するキメラ 3 G 4 抗体の結合の増大によって示されるように、ワクシニアウイルスに感染した細胞は P S 陽性になる。

【0978】

トリプシン処理されたワクシニアウイルスを 2 という高い m. o. i で用いて U 9 3 7 細胞を感染させた。要するに、ワクシニアウイルスを、等容積の 0. 2 5 m g / m l のトリプシンを用いて 3 7 °C で 3 0 分間処置した。このウイルスを 0. 5 m l の総容積で U 9 3 7 細胞に添加した。1. 5 時間後、新鮮な培地を細胞に添加して、細胞を T 2 5 フラスコ中において 3 7 °C で 2 日間インキュベートさせた。未感染の細胞をコントロールとして使用した。

【0979】

感染した U 9 3 7 細胞および未感染の U 9 3 7 細胞を、一次抗体を用い、コントロールとしてキメラ 3 G 4 抗体 (c h 3 G 4) またはヒト I g G (H I g G) のいずれかを用いて染色した。細胞を洗浄して、正常なマウス血清を用いてブロックし、次いで一次抗体を用いて氷上で 4 5 分間染色した。3 回の洗浄後、1 : 4 0 0 希釈のヤギ抗ヒト F I T C 結合体化二次抗体を用いて細胞を染色して、F A C S c a n で解析した。

【0980】

F A C S 解析からの結果によって、未感染の U 9 3 7 細胞上で得られたシフト (図 2 9 A、右 (緑) ピーク) と比較して、ワクシニアウイルスで感染された U 9 3 7 細胞上に c h 3 G 4 での有意なシフト (図 2 9 B、右 (緑) ピーク) が存在することが示される。従って本研究によって、ワクシニアウイルスを用いた細胞の感染が、細胞表面上での P S 露出をもたらすこと、および抗 P S 抗体 3 G 4 のキメラバージョンが、これらのウイルス感染した細胞に対して結合し得ることが示される。

【0981】

(実施例 X X I V)

(P i c h i n d e ウイルスに対する抗 P S 抗体の抗ウイルス効果)

C M V および R S V に対する抗ウイルス効果に加えて、本実施例によってさらに、抗 P S 抗体がインビトロで P i c h i n d e ウイルス感染を阻害することが示される。P i c h i n d e ウイルスは新世界 (N e w W o r l d) アレナウイルスであって、ヒトでは非病原性であり、ラッサ熱の動物モデルにおいて用いられる。

【0982】

V e r o 細胞のコンフルエントな単層を、P i c h i n d e ウイルスを 0. 0 1 p f u / 細胞という低 m. o. i. で用いた感染後、3 G 4 抗体またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体である G V 3 9 G で処置した。要するに、細胞を 1 ウェルあたり 1 m l の総容積で、3 7 °C で 9 0 分間、ウイルスとともにインキュベートさせた。感染の間、プレートを 3 0 分ごとにおだやかにロッキングさせた。感染後、細胞上清を取り出して、D M E M / 1 0 % F B S / p e n - s t r e p を各々のウェルに添加した (1 ウェルあたり 2 m l)。2 日目に、細胞を、トリプシンを用いて回収して、B i o c o a t チャンバスライドに固着させた。それらを固定して、ポリクローナルウサギ抗 P I C 血清、続いてビオチン結合体化ヤギ抗ウサギ二次 (二次抗体単独では、図 3 0 C に示されるように染色を生じない) を用いて染色した。1 0 0 細胞の領域あたりの感染細胞の数をカウントした。

【0983】

3 G 4 を用いて処置した細胞では、ウイルスは、ほぼ 1 0 0 個の細胞中約 1 個に達する、暗い赤に染まる単一の細胞に限定される (図 3 0 A)。これらはおそらく、C M V で見られるように、ウイルスによってもともと感染された細胞である (実施例 X I I)。しかし、コントロールの C V 3 9 G 抗体で処置した細胞では、ウイルスは全ての細胞に伝播し

10

20

30

40

50

て感染した（図30B）。

【0984】

ウイルス複製の障害のこのパターンは、3G4を用いてCMV感染ヒト線維芽細胞を処置した場合に観察されたパターンと類似である。従って、抗PS抗体である3G4は、図30Dにおいて定量されるように、細胞から細胞へのPichindeウイルスの伝播を効率的に妨げる。

【0985】

（実施例XXV）

（PE結合ペプチド誘導体を用いる腫瘍処置）

デュラマイシン誘導体の抗ウイルス効果に加えて、インビトロおよびインビボの両方で、本実施例は、腫瘍脈管構造に対するデュラマイシン誘導体の局在化および関連の抗腫瘍効果を実証する。

【0986】

（A. デュラマイシンHuIgG結合体での腫瘍処置）

ヒトIgG（HIgG）を実施例XVに記載されるように最初に精製した。精製したHIgGを、SIA布林カーを用いてデュラマイシンに連結して、得られた（D-SIA B）_n HIgG結合体を精製した。

【0987】

マウス線維肉腫細胞株MethAを増殖させて、対数期に回収して、DPBSに再懸濁させた。約 10^6 個のMethA腫瘍細胞を6～8週齢のBALB/c雄性マウスの背中中央に皮下注射した。移植の5日後、マウスを2つの群に無作為に分離した（ $n=15$ ）。10日目から、1つの群には腹腔内注射によって $150\mu\text{g}$ のデュラマイシンHuIgG結合体を連続して2週間投与した。もう一方の群にはコントロールとして同じ量のHuIgGを投与した。腫瘍容積を週に2回測定して、式 $1/2ab^2$ を用いて算出した（ここで、「a」は腫瘍の長軸であって、「b」は、腫瘍の短軸である）。腫瘍が約 1400mm^3 のサイズに達したとき、マウスを屠殺した。

【0988】

デュラマイシンHIgG結合体は、ヒトIgGコントロールと比較して、BALB/cマウスにおいて $150\mu\text{g}/\text{日}$ の用量でMethA腫瘍増殖を阻害した（図31）。

【0989】

（B. デュラマイシンHuIgG結合体は腫瘍脈管構造に局在する）

腫瘍サイズが 500mm^3 に達したとき、上記と同じMethAマウス腫瘍モデルを用いて、 $100\mu\text{g}$ （D-SIA B）_n HIgGを含有する $100\mu\text{l}$ PBSを、尾静脈を介して注射した。同じ量のヒトIgGをコントロールとして注射した。4時間後、マウスを屠殺して正常な生理食塩水を用いて5分間、1%パラホルムアルデヒドを用いて10分間灌流させた。腫瘍および他の主な器官を切り取って液体窒素中で凍結させた。OCTに埋め込んだ後、組織を $10\mu\text{m}$ の切片に凍結切片化してシラン処理したスライドにおいた。冷アセトン中での10分間の固定後に、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgGを用いてスライドを染色して、デュラマイシンHuIgGの体内分布を検出した。Meca32およびペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ラットIgGを用いて組織の血管構造を検出した。

【0990】

本研究によって、処置した動物においてデュラマイシンHIgG結合体が腫瘍血管脈管構造に局在することが示された。

【0991】

（実施例XXVI）

（デュラマイシン結合体の生体分布および特性）

本実施例は、インビトロにおける細胞不浸透性デュラマイシン誘導体の毒性の欠失、インビボで投与されたデュラマイシン誘導体の体内分布、およびデュラマイシン抗体結合体がマクロファージによるアポトーシス細胞の食作用を増大する能力を実証する。

【0992】

(A. デュラマイシンービオチン結合体は細胞毒性ではない)

本発明のデュラマイシン誘導体および結合体は、親のデュラマイシン分子の非特異的な毒性効果を最小にするように設計する。多くの実施例では、これは細胞不浸透性基に対するデュラマイシンの連結によって達成される（実施例XV）。

【0993】

ビオチン化デュラマイシン構築物DLBを実施例XVに記載の通り調製した。未改変のデュラマイシン化合物およびDLBを、MTTアッセイを用いてHUVEC上での細胞毒性効果について試験した。未改変のデュラマイシンは用量依存性の毒性を示したが、DLBは毒性ではなく、未処置のコントロールにマッチした（図32）。 10

【0994】

(B. 肺におけるマクロファージに対するデュラマイシンービオチン結合体の局在化)

ヒト乳ガン細胞株MDA-MB-435を増殖させて、対数期に回収して、DPBSに再懸濁した。約 10^7 個の細胞を、6～8週齢の雌性無胸腺ヌードマウスの乳房の脂肪パッドに注射した。100 μ gデュラマイシンービオチンを含む100 μ l PBSを尾静脈を介して注射した。4時間後、マウスを屠殺して正常な生理食塩水を用いて5分間、1%パラホルムアルデヒドを用いて10分間灌流させた。心臓、肺、肝臓、腎臓、脳、小腸、胸腺および脾臓を含む主な器官を切り取って液体窒素中で凍結させた。OCTに埋め込んだ後、組織を10 μ mの切片に凍結切片化してシラン処理したスライドにおいた。冷アセトン中での10分間の固定後に、Cy3標識したストレプトアビジンを用いてスライドを染色してデュラマイシンービオチン構築物の体内分布を検出した。Meca32およびFITC標識したヤギ抗ラットIgGを用いて組織の血管構造を検出した。 20

【0995】

MDA-MB-435腫瘍を保有するヌードマウスへのデュラマイシンービオチン結合体の静脈内注射によって、腫瘍細胞、尿細管および肺のマクロファージにおける薬物の沈着が得られた。肝臓に最小の沈着があり、脳、小腸、精巣には検出可能な分布はない。肺におけるマクロファージに対する局在は、本発明の抗ウイルスの実施形態において利用され得る。

【0996】

(C. デュラマイシンー抗体結合体はアポトーシス細胞の食作用を増強する) 30

デュラマイシンー抗体結合体（デュラマイシンーC44、DuC44）がアポトーシス細胞の食作用を増大する能力を次に検討した。

【0997】

マクロファージを単離して、マウス骨髄から培養した。BMマクロファージの単離、培養および刺激のために用いられる培地は、2mMグルタミン、0.37% (w/v) NaHCO₃、10% (v/v) 熱不活性化されたFCSおよび0.5ng/ml マウスGM-CSFを含むDMEMであった。25ゲージの針を通じた完全培地のジェットを用いて、解剖した大腿骨から骨髄細胞を無菌的にフラッシュさせた。次いでこの細胞を完全培地1mlあたり約 3×10^5 個の細胞の密度に調節して、8ウェルチャンバスライド中の0.5mlアリコートに分配した。 40

【0998】

加湿チャンバ中において37℃で、5%CO₂中で1時間細胞をインキュベートして、マクロファージを固着させかつ広げさせた。各々のウェルに5mlの暖めたPBSを添加することによって非固着細胞を取り出して、プレートを穏やかに叩くことによって非固着細胞を再懸濁して、このスライドを軽くたたいて非固着細胞を廃棄した。この洗浄を全部で3回行なった。細胞を7.5% (v/v) CO₂ 雰囲気下において37℃で5日間維持した。細胞を用いるまで、完全培地を1日おきに交換した。

【0999】

以下の方法を用いて、蛍光細胞トレーサーを用いてHL-60標的細胞を標識した。1バイアル色素の含量を90 μ LのDMSOに溶解して、PBS中で10 μ Mに希釈するこ 50

とによって、使用の直前に10 mM CFDA SEストック溶液を調製した。HL-60細胞ペレットを得るために遠心分離を用いて、上清を吸引した。細胞をCFDA/PBSに再懸濁して、37℃で15分間インキュベートした。サンプルを遠心分離して上清を吸引した。細胞を培地に再懸濁してさらに30分間インキュベートした。細胞生存度および蛍光が95%を超えることを確認した。

【1000】

この食作用アッセイにおいて、標識されたHL-60細胞をUV254 nmに5分間露出して、37℃で1時間インキュベートしてアポトーシスを誘導した。10⁴個のアポトーシス性HL-60細胞をマクロファージとともに1時間インキュベートした。デュラマイシンC44結合体を10 μg/mlの濃度で含んだ。同じ濃度のマウス抗体BBG3を陰性コントロールとして用いて、3G4抗体をまた比較のために含んだ。Hoechst 33342を、最後の45分間に、10 μg/mlの濃度で培地に添加した。

10

【1001】

スライドをPBSで3回洗浄して、15分間4%パラホルムアルデヒド中で固定した。スライドをラット抗マウスCD11抗体（CD11は、マクロファージマーカーである）で染色して、0.2%ゼラチン中で1時間希釈して洗浄し、テキサスレッド標識ヤギ抗ラット二次抗体を用いて染色した。

【1002】

細胞を蛍光顕微鏡下で解析した。マクロファージはCD11マーカーに起因して赤い細胞として同定された。アポトーシス細胞を食菌したマクロファージは、標的細胞における蛍光トレーサーに起因して緑の細胞として同定される。赤および緑の細胞をカウントして、食作用を取り込みの食作用陽性の割合として定量する。

20

【1003】

この研究によって、デュラマイシン抗体結合体DuC44がマクロファージによるアポトーシス性HL-60細胞の食作用を増強したことが示される（図33）。従って、デュラマイシン部分は、アポトーシス細胞の表面に結合して、これによって結合体の突出する抗体部分がマクロファージによって認識されることが可能になる。従ってこのデュラマイシン-抗体結合体は、3G4抗体に類似して機能した。予想どおり、Fc領域を欠く3G4抗体の（Fab）₂フラグメントは、コントロールレベルを超える食作用を誘導しなかった。

30

【1004】

初期の研究では、デュラマイシン-ビオチン結合体がインビボにおいて肺投与後にマクロファージに局在することが示されたので、本研究において示されるアポトーシス細胞のマクロファージ媒介性食作用の刺激は、本発明の治療用途のために、例えば肺ウイルス感染を処置するのににおいて重要な意味を有する。

【1005】

実施例XXVII

腫瘍治療時におけるマクロファージの浸潤

前述の実験に示すように、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体は癌治療に有効である。例えば、3G4抗体は、腫瘍血管に特異的に局在し、腫瘍血管の破壊をもたらし、かつ、複数のマウスモデルにおいて毒性をもたらすことなく腫瘍増殖を遅らせる（実施例XI；実施例XVII）。本実施例は、腫瘍を抱える動物に対する3G4治療もまた、単球白血球の腫瘍血管内皮に対する結合をもたらし、マクロファージの腫瘍への浸潤を誘発することを示す。

40

【1006】

A. 方法

8-10匹の雌性SCIDマウスから成るグループに、2×10⁷個のL540細胞、または同所的に1×10⁷個のMDA-MB-435またはMDA-MB-231細胞を皮下に注入した。BALB/Cマウスに1×10⁶個のMeth A細胞を皮下に注入した。腫瘍を、平均直径0.8-1 cm（L540）、0.6-0.7 cm（MDA-MB

50

－435)、0.5－0.7 cm (MDA-MB-231)、または<0.1 cm (Meth A)となるまで増殖させた。次に、マウスを、100 µgの3G4抗体、またはコントロール抗体(BBG3)を週に3回2－3週腹腔に投与して処置した。週に3回、腫瘍サイズおよび体重について動物を監視した。コントロールマウスの腫瘍が直径1.5－2 cmに達した時動物を屠殺した。

【1007】

B. 結果

同所性MDA-MB-435およびMDA-MB-231腫瘍を抱えるマウスの3G4による治療は、単球白血球の、腫瘍血管内皮に対する結合、および腫瘍間隙組織への浸潤をもたらした(図6A、図6B、図6C、および6D)。この図において、赤色染色は内皮を示し、緑色染色はマクロファージを示し、青色染色は核を示す。

10

【1008】

3G4処理腫瘍における血管には、しばしば単球白血球が詰まっているが(図6D)、一方、コントロールの、BBG3-処理マウスの腫瘍では、血管に結合する白血球はほんの散発的にしか見られなかった(図6C)。3G4処理マウスでは、BBG3処理マウスに比べて、驚くほど多数の単球白血球が腫瘍の間隙組織に浸潤していた(図6Bと図6Aを比較せよ)。

【1009】

腫瘍血管に結合し、かつ腫瘍中に浸潤した細胞のほとんど全て(>90%)が、単球/マクロファージマーカーF4/80, M1/70 (CD11b, Mac-1)およびFcγR(図6A、図6B、図6C、および図6D)。細胞は、好中球マーカー、Ly-6G、NK細胞マーカー、Ly-49、および樹状突起細胞マーカー、CD11cを持たなかった。SCIDマウスから予期されたように、リンパ球マーカーは存在しなかった。以上まとめると、結果から、腫瘍血管に結合し、腫瘍間隙組織に浸潤する細胞は、それぞれ、単球およびマクロファージであることが示された。

20

【1010】

実施例XXVII

F(ab')₂断片は腫瘍治療に有効である

アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体、例えば、3G4は、腫瘍治療に有効である(実施例XI;実施例XXVII)。本実施例は、3G4抗体のF(ab')₂断片も、元の3G4抗体と同程度に腫瘍治療に有効であることを示す。

30

【1011】

コントロール設定実験において、腫瘍マウスを、3G4抗体、3G4抗体のF(ab')₂断片、または異性体適合コントロール抗体(BBG3)のいずれかで処置した(9日目)。コントロール動物の腫瘍は急速に増殖を続けたが、一方、3G4抗体、または、3G4抗体のF(ab')₂断片で処置したマウスでは、腫瘍増殖は有意に遅くなった(図8)。F(ab')₂断片は、元の抗体と少なくとも同程度に有効であり(図8)、F(ab')₂断片の抗腫瘍作用は、これらの実験では過小評価されている可能性がある。

【1012】

これは、3G4のような抗体は、PS発現腫瘍血管および腫瘍細胞に対する、単球およびマクロファージの炎症反応惹起能力を強化するという仮説を支持する。3G4のような抗体は、腫瘍血管上のPSの、宿主の炎症反応に対する抑止を阻止するため、マクロファージが炎症性サイトカイン、例えば、TNF-α、IL-1、およびその他を分泌することを可能とし、このため腫瘍内皮の直接傷害、さらに腫瘍内部への宿主細胞の招集が可能とされる(図7)。

40

【1013】

実施例XXIX

アネキシンV二量体は、モノマーよりも優れて腫瘍血管に局在する

実施例XXVIIおよび実施例XXVIIIは、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体による腫瘍治療におけるマクロファージの役割に関する。これらのデー

50

タおよびその他の情報から、本発明人達は、全体発明の内のレセプター本体局面を発展させた。この実施態様を支えるものとして、アネキシンVのホモの二量体を作製したところ、対応するアネキシンVモノマーよりも優れて腫瘍血管に局在することが判明した。

【1014】

実施例XXX

3G4および β 2GPIのPSに対する協調結合

本実施例は、3G4抗体とPSとの相互作用は、血漿タンパク質、 β 2糖タンパク質I (β 2GPI) に依存することを明らかにする。3G4は β 2GPIに対しドメインIIにおいて結合するが、このドメインIIは、APS患者から単離された病原性抗体（一般に、 β 2GPIドメインIを認識する）とは結合しない。データから、PS陽性細胞に対する結合を含むPS結合の強化には、3G4/ β 2GPIの2価の複合体が必要であることが示された。なぜなら、3G4 Fab'断片はこの活性を持たないからである。PS陽性細胞に対する、3G4/ β 2GPIの2価複合体の結合は、本発明のFc- β 2GPI構築物の使用、すなわち同様に、二量体である該構築物の、PS陽性細胞を標的とし、従って癌およびウイルス感染のような疾患を治療するための使用を支持する。

【1015】

A. 材料および方法

1. 材料

ダルベッコの改変イーグル培養液 (DMEM) およびトリプシン/EDTAは、Mediatech, Inc. (Herndon, バージニア州) から入手した。ウシ胎児血清 (FBS)、ヒトの正常血清、ラットの正常血清、およびマウスの正常血清は、Biomedia (Foster City, カリフォルニア州) から入手した。ヒトの新鮮血漿は、Carter Blood Care (ダラス、テキサス州) から入手した。血清無添加ハイブリドーマ培養液、Synthecol NS0添加剤、L- α -ホスファチジルセリン (PS)、ウシ血清アルブミン (BSA)、および、ニワトリ卵白由来のオボアルブミン (OVA) は、Sigma Chemical Co., (セントルイス、ミズーリ州) から入手した。DEAEセルロース、ヘパリン-セファローズ、およびHybond-P膜は、Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) から入手した。1-パルミトイル-2-ヒドロキシー-sn-グリセロール-3-フォスフォコリン [リゾフォスファチジルコリン (LPC)] は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, アラバマ州) から入手した。96ウェルImmulon-1Bおよび-2HBマイクロタイタープレートは、Thermo Lab Systems (Franklin, マサチューセッツ州) から入手した。Tris-HCl勾配SDS-PAGEゲルおよびOpti-4CN基質キットは、Biorad (Hercules, カリフォルニア州) から入手した。8ウェル・ガラスチェンバーは、BD Biosciences (ベッドフォード、マサチューセッツ州) から入手した。

【1016】

2. 抗体

陰イオン性リン脂質PSに結合するよう免疫化された、3G4マウスモノクローナル抗体は、実施例IV、および本明細書の他の実施例に記載される抗体である（また、Ran et al., 2005も参照されたい）。3G4は、もともと、ハイブリドーマ上清において生産されたものであるが、その後、マウスIgG2a異性体に転換され（実施例XIX、D）、現在では、NS0マウス骨髄腫細胞系統において生産されている。

【1017】

NS0細胞は、10% FBS添加DMEM、または、Synthecol NS0添加剤含有の、血清無添加ハイブリドーマ培養液にて培養した。3G4のヒトのIgG1キメラ版も作製され（実施例XIX、B）、Peregrine Pharmaceuticals, Inc. (Tustin, カリフォルニア州) によって血清無添加条件下に生産された。この抗体は“バビツキシマブ”と呼ばれる。

【1018】

マウスの抗ヒト $\beta 2$ GPI（抗 $\beta 2$ GPI、または α - $\beta 2$ GPI）mAbを、US Biological（Swampscott, マサチューセッツ州）より入手した。C44、コルヒチン特異的マウスIgG2a mAbを分泌するハイブリドーマを、米国基準菌株保存機関（Rockville, メリーランド州）から入手し、3G4および抗 $\beta 2$ GPIに対するコントロールとして用いた。Rituximab（ヒトIgG1キメラmAb）を、UT Southwestern pharmacyから入手し、ch3G4に対するコントロールとして用いた。培養上清において生産された抗体は全て、前述の実施例に記載するやり方で精製した（また、Ran et al., 2003も参照されたい、なお、この文献を引用により本明細書に特異的に含める）。二次抗体は全て、Jackson ImmunoResearch Labs（West Grove, ペンシルバニア州）から入手した。

10

【1019】

3. 抗体断片の調製

3G4 F(ab')₂は、プロテアーゼ、ペプシンとインキュベーションすることによって作製した。3G4 Fab、およびコントロールFab 7H11（抗アデノウイルス）は、プロテアーゼ、パパインとインキュベーションすることによって作製した。抗体切断産物は全てFPLCにて精製し、SDS-PAGEにて確認した。

【1020】

4. ヒト血漿からの $\beta 2$ GPIの精製

ヒト $\beta 2$ GPI（h $\beta 2$ GPI）は、事実上前述の通りにヒトの血漿から精製した（Polzet al., 1980; Wurm et al., 1984、なお、引用によりそれぞれを本明細書に特異的に含める）。簡単に言うと、プールされた血漿に過塩素酸（70%）を、最終濃度が1.57%（v/v）となるように加えた。沈殿を捨て、上清を、飽和Na₂CO₃にてpH7.5に調整し、次いで、50mM Tris, pH8.0に対して十分な透析を行った。この物質を、50mM Tris, pH8.0で平衡させたDEAEセルロースカラムに対して与え汚染物質を除いた。次に、DEAEカラム流出物を、50mM Tris, pH8.0で平衡させたヘパリンセファロース・アフィニティークラムに与え、結合タンパク質を、1.0M NaClを用いて溶出した。最後に、この $\beta 2$ GPI調製品をPBSに対して透析し、タンパク質A/Gでさらに精製し、汚染性のIgGを除去した。最終調製品は、非還元性SDS/PAGEおよびクーマシー染色で示されるように、50kDaの所に均一なバンドを含んでいた。

20

30

【1021】

5. $\beta 2$ GPIおよび $\beta 2$ GPIドメインの構築と発現

$\beta 2$ GPIの純粋な組み換え全長形態、および欠失形態を作製するために、酵母のシャトル発現ベクターpPIC6 α A（Invitrogen）および宿主株Mut⁺X-33（Invitrogen）を用いた。この発現ベクターは、アルコール（メタノール）オキシダーゼ遺伝子（AOX1）の5'プロモーターおよび3'転写終止配列を含む。ベクターはまた、組み換え異種タンパク質が培養液へ分泌されるようにするために、AOX1プロモーターの下流に、外来cDNAが融合可能な酵母 α 接合因子シグナル配列を持つ。P. pastorisにおける発現は、哺乳類細胞におけるものと同様の、グリコシル化およびジスルフィド結合形成を実現する。

40

【1022】

発現構築物を作製するために、下記の五つの発現構築物を、ヒト $\beta 2$ GPI cDNAを用いて製造した。

【1023】

(1) コグネイトのシグナルペプチドを持たない、 $\beta 2$ GPI cDNA全体コード領域（ドメイン1-5）、

5'プライマー；5'-GGAAATTCGGACGGACCTGTCCCAAGC-3'
'（配列番号12）

50

(2) ドメイン1欠失(ドメイン2-5)

5'プライマー; 5'-GG A A T T C G T A T G T C C T T T T G C-3' (配列番号13)

(3) ドメイン1および2欠失(ドメイン3-5)

5'プライマー; 5'-GG A A T T C G C T C C C A T C A T C T G C-3' (配列番号14)

(4) ドメイン1-3欠失(ドメイン4-5)

5'プライマー; 5'-GG A A T T C G T A A A A T G C C C A T T C-3' (配列番号15)、および、

(5) ドメイン5のみ

5'プライマー; 5'-GG A A T T C G C A T C T T G T A A A G T A C-3' (配列番号16)

全ての断片のPCRにおいて共通の3'プライマー、5'-T T C T A G A T T A G C A T G G C T T T A C-3' (配列番号17)が用いられた。PCR増幅断片は、 α 接合因子シグナル配列の直接下流側の、p P I C α AのE c o R IおよびX b a I制限部位の間にインフレームに挿入された。C-末端において組み換えタンパク質がc-mycエピトープまたはH i s タグに融合することを防止するために、各断片の末端に終止コドンを導入した。プラスミド構築物を、100 μ g/mlのプラスチシディンの存在下に大腸菌に移し、制限分析とヌクレオチド配列によって確認した。構築物(1)、(2)、(3)、(4)、および(5)によって発現される組み換えタンパク質は、グリコシル化前、それぞれ、約36、29、24、16、および、9 kDaのタンパク質をコードした。

【1024】

発現クロンの形質転換およびスクリーニングのために、組み換えプラスミド構築物を、制限酵素S a c Iによって直線化し、精製し、10 μ gを用いて、宿主株X-33をスフェロプラスト法(I n v i t r o g e n)によって形質転換した。上記構築物のそれぞれについて形質転換株を、400 μ g/mlのプラスチシディンを含むYPD(酵母抽出ペプトンデキストロース培養液)プレートに4日間インキュベートして選択した。真の統合株を決めるために、各構築物についていくつかのクロンを、400 μ g/mlのプラスチシディンを含むYPDプレートに再度線条接種した。次に、各構築物について10クロンを、最小デキストロース(MD)および最小メタノール(MM)プレートに線条接種した。MDおよびMMの両プレートにおいて等しく好調に増殖する、各構築物当たり5クロンを、液体MDおよびMM培養液にて、24、48、72、96、および120時間育成した。各クロンについて各時点における上清およびペレットを、抗ヒト β 2GPIポリクロナール抗体を用いウェスタンブロットで分析した。上清中にタンパク質の最高発現を示したクロンを、その後の大規模調製のために用いた。

【1025】

組み換えタンパク質の大規模精製のために、I n v i t r o g e nの推薦する培養条件を用いて組み換えタンパク質を生産した。各クロンの出発培養物を、5mlの、最小グリセロール複合体緩衝(BMGY)培養液中で活発に攪拌しながら30℃で一晩培養した。細胞を収集し、25mlのBMGYに接種するのに用い、2日間育成した。次に、この25ml培養体から得られた細胞を用いて、1Lの最小メタノール複合体緩衝(BMMY)培養液(1.0%メタノール)に接種した。培養を、活発に攪拌しながら30℃で4日間続け、100%メタノールを24時間置きに加え(最終濃度1.0%)、タンパク質発現を維持した。培養液を遠心(4000 $\times$ g、15分)にて澄清にし、上清を、50mM T r i sバッファーにて4℃で2日間透析し、次いで、50mM T r i sバッファーで平衡させたD E A E-セファセルカラムに与えた。通流液を収集し、ヘパリン-セファローズカラムに与えた。 β 2GPIを、1.0M N a C lを用いてヘパリン-セファローズカラムから溶出し、50mM T r i sバッファーに対して透析し、A m i c o n濃縮機を用いて濃縮し、ウェスタンブロットにて分析した。各タンパク質のN-末端の配列決定を行い、 α 因子リーダー配列の切断を確認した。タンパク質収率は、10mg/L (

全長 $\beta 2\text{ GPI}$)から 25 mg/L ($\beta 2\text{ GPI}$ ドメインV)まで変動した。

【1026】

6. 「ニック入り」 $h\beta 2\text{ GPI}$ の調製

ニック入り $h\beta 2\text{ GPI}$ は、ヒトの血漿から精製された元の $h\beta 2\text{ GPI}$ から前述のようにして調製した。 $h\beta 2\text{ GPI}$ を、プラスミン被覆ビーズと共に 37°C で17時間インキュベートした。ビーズを遠心で取り除き、切断されたタンパク質を含む上清を回収した。精製産物のウェスタンブロット分析により、このニック入り $\beta 2\text{ GPI}$ 調製品は、プラスミン非含有であり、プラスミンの自己分解産物も含まないことが示された(抗プラスミンまたは抗アンギオスタチン抗体に対して無反応)。N-末端配列分析から、 $\beta 2\text{ GPI}$ のN-末端に対応するもの、および、 $\text{Lys } 317/\text{Thr } 318$ 切断部位に生成された新規配列から成る2個のN-末端が明らかにされた。

10

【1027】

7. 抗PS ELISA

アッセイは下記のようにして実行した(さらにRan et al., 2005を参照;なお、この文献を引用により本明細書に特異的に含める)。PS-塗布Immunlon 1Bマイクロタイタープレートに $1\% \text{OVA (w/v)}$ において一晩ブロックした。翌日、血清含有または血清非含有上清から精製した3G4について、初期濃度 13.33 nM から2倍ずつの連続希釈液を調製した。希釈は、 $1\% \text{OVA}$ 、または 10% の、ウシ、ヒト、ラット、または、マウスの非加熱不活性化血清を用いて行った。プレートを 37°C で1時間インキュベートし、3G4の結合を検出した。ELISA実験は全て少なくとも3回実行した。

20

【1028】

8. 抗 $h\beta 2\text{ GPI}$ ELISA

アッセイは、前述の通りに、ただし下記の改変を加えて行った。 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、ニック入り $h\beta 2\text{ GPI}$ 、または組み換え $h\beta 2\text{ GPI}$ ペプチドを、96ウェルImmunlon 2HBマイクロタイタープレート上に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度で塗布し一晩置いた。次に、プレートを、 $1\% \text{OVA}$ に室温で1時間浸してブロックした。3G4、ch3G4、または抗 $\beta 2\text{ GPI}$ を、 $1\% \text{OVA}$ にて 13.33 nM の初期濃度に希釈し、2倍ずつの連続希釈を調製した。プレートを 37°C で1時間インキュベートし、抗体結合を検出した。ELISA実験は全て少なくとも3回実行した。

30

【1029】

9. ウェスタンブロット

タンパク質サンプルは、非還元性SDSサンプルバッファーにおいて 95°C で5分間加熱した。次にサンプルを、 $\text{Tris-HCl } 4-15\%$ 勾配のSDS-PAGEゲルに負荷し、Mini Protean II装置(Biorad)を用いて分離した。分離されたタンパク質をPVDF膜に移し、 $3\% \text{BSA (w/v)}$ で一晩ブロックした。膜を、 $3\% \text{BSA}$ において $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈した、抗 $\beta 2\text{ GPI}$ 、3G4、またはコントロールマウスIgGによって探査し、十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGとインキュベートした。膜を、Opti-4CN基質キットを用いて現像した。

【1030】

40

10. 内皮細胞におけるPS露出の誘発および検出

成熟ウシ大動脈内皮(ABAE)細胞を、 $10\% \text{FBS}$ および 2 mM L-グルタミンを添加したDMEMにおいて維持した。ABAE細胞を、 $0.25\% \text{トリプシン}/0.02\% \text{EDTA}$ に短時間暴露することによって、下集密状態の培養体から取り出し、8-ウェル・チェンバースライドに、 2×10^4 細胞数/ウェルとなるように撒いた。一晩培養後、細胞をPBSで穏やかに洗浄し、 $200\text{ }\mu\text{M}$ リゾフォスファチジルコリン(LPC)で処理してPS露出を誘発した。LPC-処理は、 $10\% \text{FBS}$ 、または 10% 正常マウス血清(MS)のいずれかにおいて、3G4、ch3G4、またはコントロールIgGの存在下に 37°C で30分実行した。LPC-処理を $10\% \text{MS}$ で実行する場合、 $h\beta 2\text{ GPI}$ を、補因子として加えた。これは、そうしないと、3G4/ch3G4が、MS中の

50

PSに結合できないからである。

【1031】

PS露出は、免疫蛍光染色によって定量した。細胞はPBSにて十分洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド(w/v)にて固定し、ビオチン接合抗マウス二次抗体と共にインキュベートした。次に、細胞を、FITC-接合ストレプトアビジン(Jackson ImmunoResearch)とインキュベートして抗体結合を検出した。PBSに溶解した0.1%Triton-X100によって細胞の透過性を強化し、テキサス赤接合ファロイジン(Molecular Probes, Eugene, オレゴン州)および4', 6-ジアミジノー-2-フェニルインドール(DAPI; Molecular Probes)によってカウンター染色した。画像は、Nikon顕微鏡に取り付けたCool snapデジタルカメラ(Photometrics, Tuscon, アリゾナ州)を用いて捕捉し、MetaVueソフトウェア(Universal Imaging Corporation, Downingtown, ペンシルベニア州)で処理した。

10

【1032】

11. ABAE細胞に対する抗体結合の定量

抗体結合面積は、画像中の輝いているピクセルの数を定量することが可能な、MetaVue画像分析ソフトウェアを用いて求めた。FITC蛍光画像を用いて抗体結合を定量した。DAPI蛍光の対応画像を用いて、視野に存在する細胞の数についてFITC画像を正規化した。小さいFITC/DAPI比は、小さい抗体結合面積を示し、一方、大きいFITC/DAPI比は、大きい結合面積を示す。FITC/DAPI比は、選択された条件下における抗体結合の基礎量に対する、抗体結合面積の増減を定めるのに用いられた。各分析には200×倍率の、5枚の画像を用いた。データは、標準偏差を表す誤差バー付きの、FITC/DAPI平均相対比として表した。

20

【1033】

B. 結果

1. 3G4は、PS-塗布マイクロタイタープレートに結合するのに血清因子を必要とする

血清含有培養液(SCM)、または血清非含有培養液(SFM)から精製した3G4抗体は、連続希釈を10%FBSで行った場合、PS-塗布マイクロタイタープレートに結合する(図9A、実線)。一方、連続希釈を1%OVA(ウシ血清タンパク質を欠如する)で行った場合、SFMから精製した3G4はPSに結合しない(図9A、点線、黒四角)。この所見は、ウシ血清に存在するある因子が、3G4とPSの間の相互作用を仲介することを示す。

30

【1034】

興味あることに、SCMから精製した3G4は、連続希釈が1%OVAで行われた場合でも弱いながらPSに結合する(図9A、点線、黒上向き三角)。これは、SCM中で培養した3G4の精製は、3G4とPSの間の相互作用を仲介するのに必要な血清タンパク質を完全には除去しないことを示唆する。従って、後述の実験は、SFMから精製した3G4を用いて行った。

【1035】

2. 様々な動物種由来血清中のPSに対する3G4結合

他の哺乳動物種由来の血清が、3G4とPSの間の相互作用を仲介可能かどうかを決めるために、3G4の連続希釈を、10%マウス、ラット、ヒト、またはその他の血清で行った。3G4は、ウシ血清の存在下と全く同様に、ラットおよびヒト血清の存在下にPSに結合した(図9B)。しかしながら、3G4は、マウス血清の存在下ではPSに結合しなかった(図9B)。別の実験で、3G4は、ハムスター、フェレット、モルモット、ウサギ、およびサル血清の存在下ではPSに結合した。従って、3G4によって認識される血清タンパク質のエピトープは、マウスを除き、試験した全ての哺乳動物種において保存されている。

40

【1036】

50

3. 3 G 4 は、血清糖タンパク質 β 2 G P I に結合する。

【1037】

1980年代後半、静脈および動脈血栓症、血小板減少症、および／または、反復性流産を抱える患者のコホートが、抗リン脂質 (a P L) 抗体を有することが示された (H u g h e s e t a l. , 1986 ; D e l e z e e t a l. , 1989)。これらの患者は「抗リン脂質症候群」 (A P S) を有すると記述された。1990年代初期、多くの所謂 a P L 抗体は直接リン脂質を認識するのではなく、リン脂質に対して親和性を持つ血清タンパク質に結合することが明らかになった (G a l l i e t a l. , 1990 ; M c N e i l e t a l. , 1990)。従って、陰イオン性リン脂質と相互作用を持つことが知られる、一連の血清タンパク質について、3 G 4 との反応性の有無に関し

10

【1038】

β 2 G P I については、ヒトの β 2 G P I (h β 2 G P I) をマイクロタイタープレートに塗布し、マウス抗ヒト β 2 G P I 抗体 (抗- β 2 G P I)、3 G 4、または、無関係な特異性を持つ、コントロールマウス I g G 2 a (コントロール m I g G) と共にインキュベートした。予想通り、抗- β 2 G P I は、h β 2 G P I に結合したが、一方、コントロール m I g G は結合しなかった (図 10 A)。3 G 4 も、h β 2 G P I 塗布プレートに強力に結合した (図 10 A)。

【1039】

β 2 G P I が、3 G 4 によって認識される唯一の血清タンパク質であるかどうかを決めるために、精製 h β 2 G P I および 10 % ヒト血清を、S D S - P A G E ゲルの上に走らせ、免疫ブロットのために膜支持体に移した。3 G 4 は、50 - k D a の精製 h β 2 G P I、ヒト血清における同様サイズの単一バンドを検出した。3 G 4 免疫ブロットは、抗- β 2 G P I 抗体によって作製されるブロットと事実上同一であった。これは重要である。コントロールの m I g G は全くタンパク質を検出しなかった。以上まとめると、これらのデータは、3 G 4 が血清タンパク質 β 2 G P I に結合することを示す。

20

【1040】

陰イオン性リン脂質と相互作用を持つことが知られる、他のヒト血清タンパク質についても、3 G 4 との反応性の有無について E L I S A で調べた。等量の特定タンパク質をマイクロタイタープレートに塗布し、1 % O V A にてブロックし、3 G 4 の連続希釈液とイ

30

ンキュベートした。プレートを十分に洗浄し、抗体結合を、ペルオキシダーゼ標識二次検出抗体によって検出した。実験は全て陽性、および陰性コントロール抗体を含んでおり、予期した通りに作動した。免疫ブロットおよび E L I S A の結果を表 15 に示す。この表から、 β 2 G P I は、3 G 4 にとっての共同結合因子であると特定される。

【1041】

【表 15】

表 15

リン脂質と相互作用する血清タンパク質との 3G4 反応性

血清タンパク質	3G4 反応性
アネキシン V	-
β 2-糖タンパク質 I	+
XII 因子	-
キニゲン	-
酸化型 LDL	-
7° プロテイン C	-
7° プロテイン S	-
7° プロトロンビン	-
tPA	-

4. 3G4 は、ドメイン I I において β 2 GPI に結合する

β 2 GPI は、五つのドメインを持つが、その内の第 5 ドメインが、陰イオン性リン脂質に対する結合に与る。 β 2 GPI のどのドメインが 3G4 抗体によって認識されるかを決めるために、種々のドメイン構造を持つ組み換えヒト β 2 GPI 構築物を作製し、全長の h β 2 GPI 組み換え体と共に調べた。これらのドメイン構築物は、N-末端からの連続短縮によって作製したので、各 N-末端ドメインが下記のように順に欠如する。すなわち、全長 h β 2 GPI 組み換え体は、ドメイン I-V を含む；ドメイン I を欠失させた h β 2 GPI はドメイン I I-V を含む；ドメイン I および I I を欠失させた h β 2 GPI はドメイン I I I-V を含む；ドメイン I、I I、および I I I を欠失させた h β 2 GPI はドメイン I V-V を含む；および、ドメイン I、I I、I I I、および I V を欠失させた h β 2 GPI はドメイン V のみを含む。

【1042】

等量の全長 h β 2 GPI および、前記各 h β 2 GPI ドメイン構築物をマイクロタイタープレートに塗布し、3G4 の連続希釈とインキュベートした。この実験から、 β 2 GPI のドメイン I I を含む h β 2 GPI 構築物（ドメイン I-V、およびドメイン I I-V）のみが 3G4 によって検出されることが明らかにされた（図 10B）。ドメイン I が欠失されても、3G4 は、ドメイン I I-V に対し同様にしっかりと結合した（図 10B）。従って、3G4 は、ドメイン I I において β 2 GPI に結合する。

【1043】

APS 患者から単離した病原性抗体に関して知られる情報に徴するならば、3G4 がドメイン I I において β 2 GPI に結合するというこの所見は重要である。APS 患者から単離した、病原性の、抗- β 2 GPI 抗体は、一般に、 β 2 GPI のドメイン I を認識する（de Laat et al., 2005a）。APS 患者から得られる、ドメイン I I を認識する抗- β 2 GPI 抗体は、多くの場合病原性ではない。各種動物モデルにおいて実施された広範な毒物学的実験においても 3G4 関連の毒性が見られていないが、これがその理由を説明するものと考えられる。

【1044】

5. PS 露出細胞に対する、3G4 と β 2 GPI の協調結合

β 2 GPI 塗布マイクロタイタープレート使用による抗- β 2 GPI 抗体結合の特徴解明は、タイプや、場合によってはマイクロタイタープレートのロットにまで依存して観察される不一致のために問題が多かった（de Laat et al., 2004a）。さらに生理的な条件下で上記所見を確かめるために、生細胞結合アッセイを開発した。このアッセイは、膜破壊剤であるリゾフォスファチジルコリン（LPC）による処理によって PS 露出を誘発した後、内皮細胞膜表面に対する抗体の結合を検出し、測定する。

【1045】

このアッセイでは、A B A E細胞を、200 μ M L P Cの存在または不在下に、D M E M + 10 % F B Sに溶解した3 G 4またはコントロールのm I g Gと30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色し、細胞表面に対する抗体の結合を視像化した。3 G 4またはm I g G結合のピクセル面積は、M e t a V u eソフトウェアを用いて定量した。数値は全て、非L P C処理細胞に対する3 G 4の結合、これを1に設定、に対する相対値である。

【1046】

3 G 4が、正常条件下でA B A E細胞培養液に添加されても、細胞に対する結合は観察されない。しかしながら、A B A E細胞を、L P Cの存在下に3 G 4とインキュベートすると、多数の、3 G 4結合点が容易に検出される。L P Cは、一過性の膜の歪みを誘発することが知られるが(K o g u r e e t a l. , 2003)、これが、膜の非対称の喪失、およびP Sの露出を招くと考えられる。

【1047】

定量化によって、3 G 4結合面積は、L P C処理によって500倍を超えて増加するが、一方、コントロールのm I g Gの結合は検出されないままであることが示された。同様の結果が前にも得られた。すなわち、H₂O₂によるP S露出の誘発後、3 G 4とP S結合性分子であるアネキシンVとは、内皮細胞に結合した(実施例V I ; 実施例V I I ; さらにR a n e t a l. , 2005を参照されたい)。

【1048】

重要なことであるが、L P C処理A B A E細胞は、膜不透過の染料、ヨウ化プロピジウムまたはD A P Iによって染色されなかった。これは、3 G 4は、原形質膜の内部小葉ではなく、細胞表面のP Sに結合することを示す。

【1049】

P S露出内皮細胞に対する3 G 4の結合に β 2 G P Iが必要かどうかを決めるために、ウシ β 2 G P Iからの干渉を防ぐために、10 % F B Sではなく10 % M Sを含む培養液において生細胞結合アッセイを実施した。上に示したように、3 G 4は、M Sの存在下ではP Sに結合しない。さらに、免疫プロットにおいて、3 G 4は、10 % M Sにおいて全くタンパク質を検出できなかった。これは、3 G 4がマウス β 2 G P Iを認識しないことを示す。

【1050】

この実験では、M Sに存在するマウスI g Gの検出によって惹起されるバックグラウンドを防ぐために、ヒトのキメラ3 G 4 (c h 3 G 4)を用いた。A B A E細胞を、10 % M SおよびL P Cの存在下にc h 3 G 4とインキュベートしたが、抗体結合は検出されなかった(図11)。一方、結合反応に精製h β 2 G P Iを加えたところ、c h 3 G 4の広範な結合が見られた(図11)。これは、c h 3 G 4の結合がh β 2 G P Iに依存することを示す。全ての状況において、c h 3 G 4の結合はL P C処理に依存し、かつ、無関係の特異性を持つコントロールのヒトI g Gを用いた場合結合は検出されなかった。

【1051】

興味あることに、10 % M SおよびL P Cの存在下に、A B A E細胞をh β 2 G P Iとインキュベートし、細胞を十分に洗浄し、次に、h β 2 G P Iの結合を検出するためにc h 3 G 4とインキュベートすると、きわめて僅かではあるがc h 3 G 4結合が検出された(図11)。この所見は、h β 2 G P Iは、c h 3 G 4の不在下ではP S露出内皮細胞には結合しないことを示し、かつ、 β 2 G P Iは、生理的条件下で陰イオン性リン脂質膜表面に対して低度の親和性を持つとする報告と一致する(W i l l e m s e t a l. , 1996 ; B e v e r s e t a l. , 2005)。以上まとめると、これらのデータは、c h 3 G 4およびh β 2 G P Iは、P S露出A B A E細胞に結合するためには同時に存在しなければならないことを示し、これは、c h 3 G 4は、陰イオン性リン脂質表面に対する β 2 G P Iの親和性を強化することを示唆する。

【1052】

6. 3 G 4 の協調結合には、 β 2 G P I の脂質結合領域が必要である

P S 露出内皮細胞、および他の陰イオン性リン脂質に対する β 2 G P I と 3 G 4 (および c h 3 G 4) の協調結合には β 2 G P I の脂質結合領域が必要であることを確かめるために、「ニック入り」h β 2 G P I による生細胞結合アッセイを行った。ニック入り h β 2 G P I は、ドメイン V の脂質結合領域内におけるプラスミン介在性切断のために、P S および他の陰イオン性リン脂質に結合することができない (Hunt et al., 1993; Hunt and Krilis, 1994)。

【1053】

A B A E 細胞を、L P C 無添加の下に、c h 3 G 4、および h β 2 G P I またはニック入り h β 2 G P I とインキュベートすると、c h 3 G 4 結合は検出されない (図 1 2 A)。L P C の存在下では、h β 2 G P I は、P S 露出 A B A E 細胞に対する c h 3 G 4 の結合を仲介することができる (図 1 2 A)。この生細胞アッセイで結合が見られなかったのは、c h 3 G 4 がニック入り h β 2 G P I に結合できなかったためではない。なぜなら、c h 3 G 4 は、ニック入り h β 2 G P I にも、h β 2 G P I にも、等量のタンパク質がマイクロタイタープレートに塗布されている場合、結合するからである (図 1 2 B)。これらの所見は、c h 3 G 4 / h β 2 G P I 複合体は、L P C 処理後、h β 2 G P I ドメイン V の脂質結合領域を通じて、A B A E 細胞上に露出した P S および他の陰イオン性リン脂質を検出することを示す。

【1054】

7. β 2 G P I の協調結合には、抗体の 2 価性は必要である。

【1055】

前述のデータから、3 G 4 は、陰イオン性リン脂質に対する β 2 G P I の親和性を強調することによって、P S および陰イオン性リン脂質を検出することが示唆される。興味あることに、多くの A P S 患者から単離された抗 β 2 G P I 抗体も、陰イオン性リン脂質表面に対する β 2 G P I の親和性を増すことが知られている (Beveris et al., 2004)。さらに、この現象は、2 価の、抗体- β 2 G P I 複合体の形成に依存する。

【1056】

P S および陰イオン性リン脂質に対する 3 G 4 / β 2 G P I 複合体の結合に、2 価性が必要なのかどうかを確定するために、L P C-処理 A B A E 細胞を、精製 h β 2 G P I、および種々の量の c h 3 G 4 とインキュベートした。c h 3 G 4 結合面積は、濃度依存的に増加し、抗体対 β 2 G P I 比が 2 : 1 の時にピークに達する (図 1 3)。c h 3 G 4 の濃度がそれ以上増すと、結合の濃度依存性低下が得られた。c h 3 G 4 濃度と、P S 露出内皮細胞に対する結合との間に見られるこのベル型関係から、膜表面における、c h 3 G 4 / β 2 G P I の 2 価の複合体の形成が示唆される。抗体濃度がきわめて高いところでは、1 価の複合体と 2 価の複合体の間の競合によって、L P C-処理 A B A E 細胞に結合する c h 3 G 4 / β 2 G P I 複合体の量に減少が生じる。

【1057】

P S 露出内皮細胞に対する結合に 2 価性が必要なのかどうかをさらに調べるため、3 G 4 F (a b')₂ および 3 G 4 F a b' モノマーを作製し、天然 3 G 4 による生細胞結合アッセイに用いた。予期した通り、天然 3 G 4 は、L P C-処理 A B A E 細胞に結合したが、未処理細胞には結合しなかった (図 1 4 A)。当量濃度の 3 G 4 F (a b')₂ も、L P C-処理 A B A E 細胞には結合したが、3 G 4 F a b' の結合はほとんど検出されなかった (図 1 4 A)。A B A E 細胞において、3 G 4 F a b' の結合は、マイクロタイタープレートに塗布された β 2 G P I に結合する濃度よりも 1 0 0 0 倍高い 2 μ M の濃度でも検出されなかった (図 1 4 B)。

【1058】

さらに、3 G 4 F a b' は、L P C-処理 A B A E 細胞に対する c h 3 G 4 / β 2 G P I 結合を濃度依存的に抑制したが (図 1 4 C)、一方、無関係な特異性を持つコントロール F a b' は抑制しなかった。3 G 4 F a b' が c h 3 G 4 結合を抑制できるという

ことは、3 G 4 F a b ' が β 2 G P I に結合が可能であること、および、3 G 4 F a b ' / β 2 G P I のモノマー複合体が、P S 露出内皮細胞に結合することができないことを裏付ける。これらのデータは、陰イオン性リン脂質表面に対する結合には、3 G 4 / β 2 G P I の 2 価の複合体が必要であるという仮説を支持する。

【1059】

図10Bに示すように、3 G 4 は、ドメイン I I において β 2 G P I に結合し、図12 A および 12 B に示すように、3 G 4 (および c h 3 G 4) および β 2 G P I が、内皮細胞の上に露出した P S に対し協調結合するためには、 β 2 G P I ドメイン V の脂質結合領域が必要とされる。さらに、ここに示されたように、露出 P S に対する 3 G 4 (および c h 3 G 4) および β 2 G P I の協調結合のためには抗体の 2 価性が必要である。従って、本発明人達は、膜の外表面、例えば、活性化内皮細胞、腫瘍血管内皮細胞、および腫瘍細胞の外、ウイルス感染細胞上に露出される P S に対する、抗体と β 2 G P I の協調結合のモデルを提示する (図15)。

【1060】

実施例 X X X I

F c - β 2 G P I の調製と特徴解明

本実施例は、F c - β 2 G P I 構築物の調製および特徴解明に関する。この構築物では、マウス I g G_{2a} の F c 領域が、完全長のマウスの β 2 G P I (ドメイン I - V) に結合されて、マウス F c - β 2 G P I、すなわち F c - m β 2 G P I を生成する。このマウス I g G_{2a} F c は、二量体形成ドメイン、およびエフェクター機能付与ドメインとして用いられる。得られた F c - β 2 G P I の二量体構築物は、いずれも P S を露出させる、腫瘍血管およびウイルス感染細胞に対する標的輸送を含む、様々な用途を持つ。F c 領域を用いる利点は、F c - β 2 G P I 構築物は、宿主の免疫システムによって攻撃の対象とされる標的細胞をマークすることができることである。

【1061】

A. 調製

各種 F c - β 2 G P I 構築物が設計されてきたけれども、本実施例の、例示の F c - β 2 G P I (F c - m β 2 G P I) 構築物は、N-末端としてマウスの F c 領域を用い、C-末端としてマウスの β 2 G P I のドメイン I - V を用いる。このようにして、F c - β 2 G P I は、2 個の、全長マウス β 2 G P I タンパク質の N-末端に結合した、マウス I g G_{2a} 由来の、ジスルフィド結合ヒンジ領域、および、F c 領域の 2 個の C_H2 および C_H3 ドメインを含む (図16)。

【1062】

発現プラスミドを調製するために、3 G 4 軽鎖のシグナル配列を、2 a G 4 構築物から増幅した。ヒンジ、C_H2 および C_H3 ドメインを含むマウス I g G_{2a} F c 領域を、2 a G 4 構築物から P C R にて増幅し、かつ、マウス β 2 G P I を、購入したマウス肝臓 R N A から R T - P C R にて増幅した。得られた F c - m β 2 G P I タンパク質配列を図18Aに示す。m I g G κ シグナル配列 (配列番号 18) は切断され、成熟 F c - m β 2 G P I を配列番号 19 (図18A) として残す。

【1063】

プラスミドマップを図17に示すが、プラスミドの全体配列は、配列番号 25 として提示される。F c - m β 2 G P I 構築物は、F u G E N E 6 試薬によって C H O 細胞の中にトランスフェクトされる。2 日後、上清を採取し、いくつかのアッセイに使用した。

【1064】

対応するヒトの F c - β 2 G P I (F c - h β 2 G P I) も、図18Bの配列情報を用いて調製することが可能である。該配列情報は、ヒトの I g G 1 重鎖定常域の、例示のアミノ酸配列 (アクセス番号 P 0 1 8 5 7 ; 配列番号 21)、および、ドメイン I、I I、I I I、I V、および V の場所を含む、ヒトの β 2 G P I の全体配列 (アクセス番号 1 C 1 Z A ; 配列番号 22) を提供する。ヒトのヒンジ、C_H2 および C_H3 ドメインは、配列番号 23 の F c - h β 2 G P I を実現するために、ヒトの β 2 G P I のドメイン I、I

I、III、IV、およびVに結合されてもよい。

【1065】

B. Fc-mβ2GPIは二量体である。

【1066】

選ばれたシステムは、Fc-mβ2GPIを発現するのに有効であった。図19は、二つの異なるFc-mβ2GPIクローン(#8および#18)による捕捉アッセイの結果を示す。該アッセイにおいて、Fc-mβ2GPI細胞培養上清は、抗マウスIgGに結合する。

【1067】

Fc-mβ2GPIタンパク質のサンプルについてゲル電気泳動を行った。非還元ゲル条件下では、二量体について予想されたサイズのバンドが検出された(ゲルにおける見かけのMwは150kDa)。還元条件下では、より小さいサイズの複数のバンドが検出された(ゲルにおける見かけのMwは~90-100kDa)。

【1068】

C. Fc-mβ2GPIは、PS、およびPS露出細胞に結合する

Fc-mβ2GPIは、PS塗布プレートの上でPSに結合が可能であった。PSをコートさせたマイクロタイタープレートを用い、Fc-mβ2GPI細胞培養上清(#8および#18)が、濃度依存的にPSに結合することが確かめられた(図20)。

【1069】

3G4抗体、およびキメラ版(ch3G4、またはバビツキシマブ)に共通することであるが、Fc-mβ2GPI結合はPSに限られたのではなく、他の陰イオン性リン脂質に拡張される。リン脂質結合アッセイ(10%FBSに溶解した)の結果から、Fc-mβ2GPI細胞培養体の上清は、陰イオン性リン脂質、PS、PA、PI、およびPGには結合するが、中性脂質、PC、およびSMには結合しないことが示された。

【1070】

Fc-mβ2GPIはまた細胞表面に露出したPSにも結合することが可能である。アポトーシスを経過する細胞は、外表面にPSを露出する。アポトーシスを経過するABAE細胞を用いた実験では、Fc-mβ2GPIが、アポトーシス細胞を染めることが見出された(図22A、図22B、および図22C)。矢印はアポトーシス細胞をマークする。アポトーシス細胞は丸く、濃密な核を持つ。

【1071】

細胞はまた、アポトーシスを経過せずとも表面にPSを提示するように誘発することが可能である。ABAE細胞をLPCの存在下にインキュベートすると、一過性の膜の歪みが生じ、これが、膜の非対称の喪失、およびPSの露出を招く。LPC処理ABAE細胞を用いると、Fc-mβ2GPIはまた、細胞表面に露出したPSに結合することが、緑色に染まった小さいピンポイントとして認められた(図23Aおよび図23B)。ピンポイント染色は、非LPC処理細胞の上、またはコントロール上清を用いた場合は見られなかった。

【1072】

実施例XXXII

β2GPI二量体は、PS露出内皮細胞に結合する

実施例XXXに記載される結果に従い、さらに、実施例XXXIIに記載される情報の正当性を跡づけるために、本実施例は、β2GPIの二量体は、3G4抗体の不在下でもPS露出内皮細胞に結合することを示すデータを提供する。

【1073】

これらの実験では、β2GPIの人工的二量体を用いる。この人工的二量体は、因子XIのapple 4ダイマー化ドメインのC-末端にhβ2GPIを融合することによって作製した。このβ2GPIは、本出願で前述したような、Fc領域に結合されることによって得られる利点を持たない。にも拘わらず、この二量体がPS露出細胞に対して結合することは、PS-陽性細胞に対する結合のためにFc-β2GPIの二量体を用いるこ

10

20

30

40

50

とを正当化する。

【1074】

A B A E細胞は、P S露出を誘発するためにL P Cで処理し、精製h β 2 G P I、h β 2 G P I二量体、または、破壊された脂質結合ドメインを含む、h β 2 G P I変異二量体とインキュベートした。予期した通り、L P C処理A B A E細胞に対するh β 2 G P Iモノマーの結合は無視できるレベルであった(図24A)。一方、h β 2 G P I二量体は、L P C処理細胞に対しては強力に結合したが(図24B)、非L P C処理細胞には結合しなかった(図24D)。h β 2 G P I二量体の結合はまた、機能的な脂質結合ドメインに依存することが判明した(図24C)。これらのデータは、 β 2 G P Iの2価の構築物は、P S露出細胞に結合することを示す。

10

【1075】

本発明のF c- β 2 G P I二量体はまた、P S露出細胞、例えば、腫瘍血管細胞、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、およびウイルス粒子に結合する。しかしながら、F c- β 2 G P I構築物は、F c領域が、宿主のエフェクター機能を増進し、病気治療を強化するというさらに別の利点を持つ。P S陽性標的細胞に治療主体を送達するために、さらに別の薬剤、例えば、毒素、サイトカイン、放射性同位元素、薬剤等を、F c- β 2 G P I構築物に結合させてもよい。

【1076】

本明細書に開示され、請求される組成物および方法は全て、本開示に徴すれば面倒な実験を要することなく作製および実行することが可能である。本発明の組成物および方法は、好ましい実施態様という観点で記載されているけれども、組成物および方法に対し、本明細書に記載される方法の工程において、または工程の順序において、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく変更を加えることが可能であることは当業者には明白であろう。さらに具体的に言うと、化学的にも生理的にも関連する、ある介在因子を、本明細書に記載される介在因子の代わりに用い、しかも他方では、同じまたは類似の結果を実現することが可能であることは明白であろう。当業者には明白な、このような代替物および改変は全て、付属の特許請求項によって定義される、本発明の精神、範囲、および概念の中に含まれるものとする。

20

【1077】

(参考文献)

30

【1078】

【数 1】

Abrams and Oldham, *In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*, Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

Adler, Ng, Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR," *Biol. Reprod.*, 53(4):905-910, 1995.

Alving, Banerji, Fogler and Alving, "Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate", *Clin. Exp. Immunol.*, 69:403-408, 1987.

Anderson, Croyle, Lingrel, "Primary structure of a gene encoding rat T-kininogen," *Gene*, 81(1):119:28, 1989.

Andree, Reutelingsperger, Hauptmann, Hemker, Hermens, Willems, "Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers," *J. Biol. Chem.*, 265:4923-4928, 1990.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Aoki, Uenaka, Aoki, Umeda and Inoue, "A novel peptide probe for studying the transbilayer movement of phosphatidylethanolamine," *J. Biochem.*, 116:291-297, 1994.

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.

Baca *et al.*, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.

Balasubramanian, Chandra, Schroit, "Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes; the role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition," *J. Biol. Chem.*, 272:31113-17, 1997a.

Balasubramanian, Chandra, Schroit, "Macrophage recognition of phosphatidylserine-expressing cells: the role of beta(2)-glycoprotein I in immune clearance," *Blood*, 90:2864, 1997b.

Balasubramanian, Schroit, "Characterization of phosphatidylserine-dependent beta(2)-glycoprotein I macrophage interactions - implications for apoptotic cell clearance by phagocytes," *J. Biol. Chem.*, 273:29272-77, 1998.

Balasubramanian and Schroit, "Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death," *Annu. Rev. Physiol.*, 65:701-734, 2003.

【 1 0 7 9 】

【数 2】

- Balasubramanian, Maiti, Schroit, "Recruitment of beta-2-glycoprotein 1 to cell surfaces in extrinsic and intrinsic apoptosis, *Apoptosis*, 10:439-446, 2005.
- Barbas, Kang, Lerner, Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88(18):7978-7982, 1991.
- Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:4457-4461, 1992.
- Barras, Bain, Hoekstra and Lerner, "Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461, 1992. 10
- Beck, Luster, Miller, "Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice," *Int. J. Cancer*, published online: 13 Dec 2005, DOI: 10.1002/ijc.21684, to be published in volume 118, edition 10, 2006.
- Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988. 20
- Bernier and Jolles, "Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain," *Biochim. Biophys. Acta*, 790(2):174-181, 1984.
- Bernier, Tresca, Jolles, "Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol," *Biochim. Biophys. Acta*, 871(1):19-23, 1986.
- Bevers, Rosing, Zwaal, "Development of procoagulant binding sites on the platelet surface," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 192:359-371, 1985.
- Bevers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and beta(2)-glycoprotein I or prothrombin," *Clin. Immunol.*, 112:150-160, 2004. 30
- Bevers, Janssen, Comfurius, *et al.*, "Quantitative determination of the binding of beta(2)-glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets," *Biochem. J.*, 386:271-279, 2005.
- Bevilacqua, "Endothelial-leukocyte adhesion molecules," *Ann. Rev. Immunol.*, 11:767-804, 1993.
- Bitbol, Fellmann, Zachowski, Devaux, "Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta*, 904(2):268-282, 1987. 40
- Blackwood and Ernst, "Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins," *Biochem. J.*, 266(1):195-200, 1990.

【 1 0 8 0 】

【数 3】

- Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker, Strauss, "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(11):6349-6354, 1998.
- Bocci, "Efficient labeling of serum proteins with ¹³¹I using chloramine T," *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 15:449-456, 1964.
- Bombeli, Karsan, Tait, Harlan, "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant," *Blood*, 89(7):2429-2442, 1997. 10
- Borgstrom *et al.*, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.
- Borgstrom *et al.*, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo*," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.
- Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J*, 6(14):3290-3299, 1992. 20
- Borrebaeck and Moller, "In vitro immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens," *J. Immunol.*, 136(10):3710-3715, 1986.
- Boustead, Brown, Walker, "Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver," *Biochem. J.*, 291:601-608, 1993.
- Boyle, Pohlman, Cornejo, Verrier, "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion," *Ann. Thor. Surg.*, 62(6):1868-1875, 1996.
- Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976. 30
- Branch, Rote, Dostal, Scott, "Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine," *Clin. Immun. Immunopathol.*, 42:63-75, 1987.
- Breier, Blum, Peli, Groot, M., Wild, Risau, Reichmann, "Transforming growth factor-B and RAS regulate the VEGF/VEGF-Receptor system during tumor angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 97:142-148, 2002.
- Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2:9-20, 1998. 40
- Bresnahan, Boldogh, Thompson, and Albrecht, "Human Cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1," *Virology*, 224:150-160, 1996.

【 1 0 8 1 】

【数 4】

- Bruggemann, Williams, Bindon, Clark, Walker, Jefferis, Waldmann, Neuberger, "Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies," *J. Exp. Med.*, 166:1351-1361, 1987.
- Brujin and Dinklo, "Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease," *Lab. Invest.*, 69:329-335, 1993.
- Burke *et al.*, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science*, 236, 806-812, 1987. 10
- Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1993.
- Calderon and DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a schwann cell line," *J. Neuro. Res.*, 49:372-380, 1997.
- Callahan *et al.*, *J. Immunol.*, 170:4840-4845, 2003 20
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.
- Carnemolla *et al.*, "A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors," *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.
- Chen, Stone, Woon *et al.*, "Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease?" *Thrombosis Res.*, 114:101-111, 2004. 30
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Caveness, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- Chonn, Semple, Cullis, "Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes *in vivo*, suggesting a significant role in the immune clearance of 'non-self' particles," *J. Biol. Chem.*, 270:25845-49, 1995.
- Choung, Kobayashi, Inoue, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Hemolytic activity of a cyclic peptide Ro09-0198 isolated from *Streptovorticillium*," *Biochim. Biophys. Acta.*, 940:171-179, 1988a. 40
- Choung, Kobayashi, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes," *Biochem. Biophys. Acta.*, 940:180-187, 1988b.

【 1 0 8 2 】

【数 5】

- Christiansen, Sims, Hamilton, "Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17(1):164-171, 1997.
- Clapp *et al.*, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.
- Clark, "Antibody Engineering IgG Effector Mechanisms," *Chemical Immunology*, 65:88-110, 1997.
- Cleve, Rittner, "Further family studies on the genetic control of beta 2-glycoprotein I concentration in human serum," *Humangenetik*, 7:93-97, 1969.
- Comfurius, Senden, Tilly, *et al.*, "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1026(2):153-160, 1990.
- Contreras, Villar, Alonso, Kolesnick, and Goni, "Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes," *J. Biol. Chem.*, 278:37169-37174, 2003.
- Coughlin *et al.*, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- D'Amato *et al.*, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.
- D'Angelo *et al.*, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N- terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- Dachary-Prigent, Toti, Satta, Pasquet, Uzan, Freyssinet, "Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 22:157-164, 1996.
- Daleke, "Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry," *J. Lipid Res.*, 44:233-242, 2003.
- Daum, "Lipids of mitochondria," *Biochim. Biophys. Acta*, 822(1):1-42, 1985.
- Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- Demo, Masuda, Rossi, *et al.*, "Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay," *Cytometry*, 36(4):340-348, 1999.
- de Laat, Derksen, de Groot, "beta(2)-glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome," *Clin. Immunol.*, 112:161-168, 2004a.

【 1 0 8 3 】

【数 6】

- de Laat, Derksen, Urbanus, Roest, de Groot, "beta(2)-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome," *Blood*, 104:3598-3602, 2004b.
- de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot, "IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta(2)-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis," *Blood*, 105:1540-1545, 2005a.
- de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot, "Pathogenic anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta(2)-glycoprotein I only after a conformational change," *Blood*, published online: DOI 10.1182/blood-2005-05-1943, 2005b. 10
- Deleze, Alarconsegovia, Valdesmacho, Oria, Deleon, "Relationship between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in patients with systemic lupus-erythematosus and apparently healthy women," *J. Rheumatol.*, 16:768-772, 1989.
- Denekamp, "Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, 9:267-282, 1990.
- Devaux, "Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21:417-439, 1992. 20
- Devitt, Pierce, Oldreive, Shingler, Gregory, "CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine," *Cell Death Differ.*, 10:371-382, 2003.
- DeVore *et al.*, "Phase I study of the antineovascularization drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burrichter, Schaadt, "Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications," *Cancer Surveys*, 4:399-416, 1985. 30
- Dillon, Mancini, Rosen, *et al.*, "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation," *J. Immunol.*, 164(3):1322-1332, 2000.
- Donati and Falanga, "Pathogenic mechanisms of thrombosis in malignancy," *Acta Haematol.*, 106(1-2):18-24, 2001.
- Drouvalakis and Buchanan, "Phospholipid specificity of autoimmune and drug induced lupus anticoagulants; association of phosphatidylethanolamine reactivity with thrombosis in autoimmune disease," *J. Rheumatol.*, 25(2):290-295, 1998. 40
- Droz, Patey, Paraf, Chretien, Gogusev, "Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors," *Lab. Invest.*, 71:710-718, 1994.
- Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3(3):77-85, 1991.

【 1 0 8 4 】

【数 7】

Edgington, Mackman, Brand, Ruf, "The structural biology of expression and function of tissue factor," *Thromb. Haemost.*, 66(1):67-79, 1991.

Emoto, Kobayashi, Yamaji, Aizawa, Yahara, Inoue and Umeda, "Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:12867-12872, 1996.

Emoto, Toyama-Sorimachi, Karasuyama, Inoue and Umeda, "Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells," *Exp. Cell Res.*, 232:430-434, 1997. 10

Fadok, Bratton, Konowal, Freed, Westcott, Henson, "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF," *J. Clin. Invest.*, 101:890-898, 1998.

Fadok, Bratton, Rose, Pearson, Ezekewitz, Henson, "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells," *Nature*, 405:85-90, 2000.

Fadok, de Cathelineau, Daleke, Henson, Bratton, "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by microphages and fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, 276:1071-1077, 2001a. 20

Fadok, Bratton, Guthrie, Henson, "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases," *J. Immunol.*, 166:6847-6854, 2001b.

Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.

Folkman *et al.*, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983. 30

Fotsis *et al.*, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.

Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.

Frater-Schroder *et al.*, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987. 40

Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.

Fridriksson, Shipkiva, Sheets, Holowka, Baird and McLafferty, "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry," *Biochemistry*, 38: 8056-8063, 1999.

【 1 0 8 5 】

【数 8】

Fries, Williams, Atkins, Newman, Lipscomb, Collins, "Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation," *Am. J. Pathol.*, 143:725-737, 1993.

Gaffet, Bettache, Bienvenüe, "Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation: evidence for a vectorial outflux specific to aminophospholipids," *Biochem.*, 34:6762-6769, 1995.

Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.

Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993.

Gagliardi *et al.*, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.

Galli, Comfurius, Maassen Hemker, de Baets, van Breda-Vriesman, Barbui, Zwaal, Bevers, "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor," *Lancet*, 335(8705):1544-1547, 1990.

Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers, "Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors," *Haematologica*, 78(1):1-4, 1993.

Gallucci and Matzinger, "Danger signals: SOS to the immune system," *Curr. Opin. Immunol.*, 13:114-119, 2001.

Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, 119(3):493-501, 1992.

Gefter *et al.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Giovarelli *et al.*, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes," *J. Immunol.*, 164, 3200-3206, 2000.

Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition*, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.

Good *et al.*, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.

Graham, *et al.*, "Primary respiratory syncytial virus infection in mice," *J. Med. Virol.*, 26(2):153-62, 1988.

Grant *et al.*, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.

【 1 0 8 6 】

【数 9】

- Hammill, Uhr, Scheuermann, "Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death," *Exp. Cell Res.*, 251(1):16-21, 1999.
- Hamon, Broccardo, Chambenoit, Luciani, Toti, Chaslin, Freyssinet, Devaux, McNeish, Marguet, Chimini, "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine," *Nat. Cell Biol.*, 2:399-406, 2000
- Haran *et al.*, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994. 10
- Harris, Zhang, Moghaddam, Fox, Scott, Pattison, Gatter, Stratford, Bicknell, "Breast cancer angiogenesis--new approaches to therapy via antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting," *Breast Cancer Res. Treat.*, 38(1):97-108, 1996.
- Hasegawa, Suzuki, Ishii, Takakuwa, Tanaka, "Establishment of two distinct anti-cardiolipin antibody-producing cell lines from the same individual by Epstein-Barr virus transformation," *Throm. Res.*, 74(1):77-84, 1994.
- Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992. 20
- Hastie, Patton, Hechtman, Sherpo, "Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model," *Free Rad. Biol. Med.*, 22:955-966, 1997.
- Hayashi, Nagashima, Terui, Kawamura, Matsumoto and Itazaki, "The structure of PA48009; the revised structure of duramycin," *J. Antibiotics*, XLIII(11):1421-1430, 1990.
- Hellerqvist *et al.*, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.
- Henson, Bratton, Fadok, "The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?" *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:627-633, 2001. 30
- Herrmann and Devaux, "Alteration of the aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1027(1):41-46, 1990.
- Hinkovska-Galcheva, Petkova, Koumanov, "Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation," *Cryobiology*, 26(1):70-75, 1989.
- Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997. 40
- Holash *et al.*, "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- Hori, Chae, Murakawa, Matoba, Fukushima, Okubo, Matsubara, "A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein," *Gene*, 140(2):293-294, 1994.

【 1 0 8 7 】

【数 1 0】

Hori *et al.*, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.

Hotchkiss, Ashton, Mahmood, Russell, Sparano, Schwartz, "Inhibition of endothelial cell function *in vitro* and angiogenesis *in vivo* by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", *Mol. Cancer Ther.*, 1 (13):1191-200, 2002.

Hristova and Needham, In: *Stealth Liposomes*, Lasic D. and Martin, F., Eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 35-49, 1993.

10

Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.

Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice," *Cancer Res.*, 65:4408-4416, 2005.

Hughes, Harris, Gharavi, "The anticardiolipin syndrome," *J. Rheumatol.*, 13:486-489, 1986.

20

Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of beta-2-glycoprotein-I critical for lipid-binding and anticardiolipin antibody cofactor activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2141-2145, 1993.

Hunt and Krilis, "The 5th domain of beta(2)-glycoprotein-I contains a phospholipid-binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies," *J. Immunol.*, 152:653-659, 1994.

Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic, Lerner, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.

Igarashi, Umeda, Tokita, Soo Nam, Inoue, "Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse," *Thrombosis Res.*, 61:135-148, 1991.

30

Ingber *et al.*, "Angiostatin: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.

Iwamoto *et al.*, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.

Jackson *et al.*, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.

40

Jankowski, Vreys, Wittevrongel *et al.*, "Thrombogenicity of beta(2)-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster," *Blood*, 101:157-162, 2003.

Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.

【 1 0 8 8 】

【数 1 1】

- Jirholt, Ohlin, Borrebaeck, Soderlind, "Exploiting Sequence Space: Shuffling *In Vivo* Formed Complementarity Determining Regions Into a Master Framework," *Gene*, 215:471-476, 1998.
- Jones and Hall, "A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein," *Biochim. Biophys. Acta*, 1080(1):78-82, 1991.
- Jones, Dear, Foote, Neuberger, Winter, *Nature*, 321(6069):522-525, 1986. 10
- Julien, Tournier, Tocanne, "Differences in the transbilayer and lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Exp. Cell. Res.*, 208(2):387-389, 1993.
- Julien, Tournier, Tocanne, "Basic fibroblast growth factor modulates the aminophospholipid translocase activity present in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Eur. J. Biochem.*, 230:287-297, 1995.
- Julien, Millot, Tocanne, Tournier, "12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate inhibits aminophospholipid translocase activity and modifies the lateral motions of fluorescent phospholipid analogs in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Experimental Cell Res.*, 234:125-131, 1997. 20
- Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.
- Kang, Barbas, Janda, Benkovic, Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- Katsuragawa, Kanzaki, Inoue, Hirano, Mori, Rote, "Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits *in vitro* human trophoblastic hormone production and invasion," *Biology of Reproduction*, 56:50-58, 1997. 30
- Kellermann, Lottspeich, Henschen, Muller-Esterl, "Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication," *Eur. J. Biochem.*, 154(2):471-478, 1986.
- Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.
- Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997. 40
- Keyt *et al.*, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.

【 1 0 8 9 】

【数 1 2】

- Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.
- Kim *et al.*, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841-844, 1993.
- Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999. 10
- Kim *et al.*, "Immunohistological analysis of immune cell infiltration of a human colon tumor xenograft after treatment with Stealth liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha and radiation", *Int. J. Oncol.*, 21(5):973-9, 2002.
- Kisch, and Johnson, "A plaque assay for respiratory syncytial virus," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:583-9, 1963.
- Kitamura, Takagaki, Furuto, Tanaka, Nawa, Nakanishi, "A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens," *Nature*, 305(5934):545-549, 1983. 20
- Kitamura, Kitagawa, Fukushima, Takagaki, Miyata, Nakanishi, "Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution," *J. Biol. Chem.*, 260(14):8610-8617, 1985.
- Kitamura, Ohkubo, Nakanishi, "Molecular biology of the angiotensinogen and kininogen genes," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10(Suppl 7):S49-S53, 1987.
- Kitamura, Nawa, Takagaki, Furuto-Kato, Nakanishi, "Cloning of cDNAs and genomic DNAs for high-molecular-weight and low-molecular-weight kininogens," *Methods Enzymol.*, 163:230-240, 1988. 30
- Kleinman *et al.*, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.
- Kogure, Nakashima, Tsuchie, Tokumura, Fukuzawa, "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine," *Chemistry and Physics of Lipids*, 126:29-38, 2003.
- Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976. 40
- Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1234-1241, 1993.

【 1 0 9 0 】

【数 1 3】

- Konieczny, Bobrzecka, Laidler, Rybarska, "The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides," *Haematologia*, 14(1):95-99, 1981.
- Krajewska, Wang, Krajewski, *et al.*, "Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease," *Cancer Res.*, 57(8):1605-1613, 1997.
- Kuzu, Bicknell, Fletcher, Gatter, "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors," *Lab. Invest.*, 69(3):322-328, 1993. 10
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.
- Lee *et al.*, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998. 20
- Leppink, Bishop, Sedmak, Henry, Ferguson, Streeter, Butcher, Orosz, "Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration," *Transplantation*, 48(5):874-877, 1989.
- Levy, Gharavi, Sammaritano, Habina, Lockshin, "Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody," *J. Clin. Immunol.*, 10(3):141-145, 1990.
- Lichtenbeld, Van Dam-Mieras, Hillen, "Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance," *Neth. J. Med.*, 49(1):42-51, 1996.
- Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998. 30
- Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998b.
- Linder and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996. 40
- Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.

【 1 0 9 1 】

【数 1 4】

- Liu, Moy, Kim, Xia, Rajasekaran, Navarro, Knudsen, Bander, "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium", *Cancer Res.*, 57:3629-3634, 1997.
- Lucas, Garcia, Donati, Hribar, Mandriota, Giroud, Buurman, Fransen, Suter, Nunez, Pepper, Grau, "Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells," *Eur. J. Immunol.*, 28(11):3577-3586, 1998.
- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a. 10
- Luo *et al.*, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.
- Lupu, Moldovan, Ryan, Stern, Simionescu, "Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolaemia on rabbit aortic endothelium," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4(5):743-752, 1993.
- Lutters, Meijers, Derksen, Arnout, de Groot, "Dimers of beta(2)-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta(2)-glycoprotein I-anti-beta(2)-glycoprotein I antibody complexes," *J. Biol. Chem.*, 276:3060-3067, 2001. 20
- Majewski *et al.*, "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Maneta-Peyret, Bessoule, Geffard, Cassagne, "Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine," *J. Immun. Meth.*, 108:123-127, 1988.
- Maneta-Peyret, Freyburger, Bessoule, Cassagne, "Specific immunocytochemical visualization of phosphatidylserine," *J. Immun. Methods*, 122:155-159, 1989. 30
- Manetti *et al.*, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.
- Manfredi, Rovere, Galati, Heltai, Bozzolo, Soldini, Davoust, Balestrieri, Tincani, Sabbadini, "Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus - I. Opsonization by antiphospholipid antibodies," *Arthritis and Rheumatism*, 41:205-214, 1998.
- Martin, Reutelingsperger, McGahon, *et al.*, "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl," *J. Exp. Med.*, 182:1545-1556, 1995. 40
- Massey *et al.*, *Nature*, 328:457-458, 1987.
- Matzinger, "An innate sense of danger," *Semin. Immunol.*, 10:399-415, 1998.
- McEvoy, Williamson, Schlegel, "Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(10):3311-3315, 1986.

【 1 0 9 2 】

【数 1 5】

- McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(11):4120-4124, 1990.
- Mehdi, Naqvi, Kamboh, "A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (beta(2)-glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding," *Eur. J. Biochem.*, 267:1770-1776, 2000.
- Menon, Rahman, Ravirajan, Kandiah, Longhurst, McNally, Williams, Latchman, Isenberg, "The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies", *J. Autoimmunity*, 10:43-57, 1997. 10
- Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.
- Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996. 20
- Mills, Brooker, Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Miyakis, Robertson Krilis, "Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome - lessons from knockout mice," *Clin. Immunol.*, 112:136-143, 2004.
- Moldovan, Moldovan, Simionescu, "Binding of vascular anticoagulant alpha (annexin V) to the aortic intima of the hypercholesterolemic rabbit. An autoradiographic study," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5:921-928, 1994. 30
- Moore *et al.*, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.
- Morrison, Johnson, Herzenberg, Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984.
- Morrison, Wims, Kobrin, Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.
- Muller, *et al.*, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998. 40
- Muyldermans, Cambillau and Wyne, "Recognition of Antigens by Single-Domain Antibody Fragments: The Superfluous Luxury of Paired Domains," *TRENDS*, 26(4):230-235, 2001.

【 1 0 9 3 】

【数 1 6】

- Munro, "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases," *European Heart Journal*, 14:72-77, 1993.
- Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.
- Nakamura *et al.*, Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Chapter 27.
- Nakamura and Racker, "Inhibitory Effect of Duramycin or Partial Reactions Catalyzed by (Na^+ , K^+)-Adenosinetriphosphatase from Dog Kidney," *Biochemistry*, 23(2):385-389, 1984. 10
- Nakanishi, Ohkubo, Nawa, Kitamura, Kageyama, Ujihara, "Angiotensinogen and kininogen: cloning and sequence analysis of the cDNAs," *Clin. Exp. Hypertens.*, 5(7-8):997-1003, 1983.
- Nilsson, Kosmehl, Zardi, Neri, "Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice," *Cancer Res.*, 61(2):711-716, 2001. 20
- Nimpf, Bevers, Bomans *et al.*, "Prothrombinase activity of human-platelets is inhibited by beta-2-glycoprotein-I," *Biochimica et Biophysica Acta*, 884:142-149, 1986.
- Nimpf, Wurm, Kostner, "Beta2-glycoprotein-I (Apo-H) inhibits the release reaction of human-platelets during Adp-induced aggregation," *Atherosclerosis*, 63:109-114, 1987.
- Nimpf, Wurm, Kostner, "Interaction of beta-2-glycoprotein-I with human-blood platelets - influence upon the Adp-induced aggregation," *Thrombosis and Haemostasis*, 54:397-401, 1985.
- Nuttall, Irving and Hudson, "Immunoglobulin V_H Domains and beyond: Design and Selection of Single-Domain Binding and Targeting Reagents," *Current Pharma. Biotech.*, 1(3):253-262, 2000. 30
- Ohizumi, Tsunoda, Taniguchi, Saito, Esaki, Makimoto, Wakai, Tsutsumi, Nakagawa, Utoguchi, Kaiho, Ohsugi, Mayumi, "Antibody-based therapy targeting tumor vascular endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 236:493-496, 1997.
- Oikawa *et al.*, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.
- O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994. 40
- O'Reilly *et al.*, "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.
- Orr, Wang, Lafrenie, Scherbarth, Nance, "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis," *J. Pathology*, 190:310-329, 2000.

【 1 0 9 4 】

【数 1 7】

- Padlan, "Anatomy of the Antibody Molecule," *Mol. Immunol.*, 31:169-217, 1994.
- Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.
- Patey, Vazeux, Canioni, Potter, Gallatin, Brousse, "Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells: Expression in tumors but not in inflammatory responses," *Am. J. Pathol.*, 148:465-472, 1996.
- Pepper *et al.*, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*," *J. Cell Sci.*, 108(Pt 1):73-83, 1995. 10
- Perry, Hall, Bell, Jones, "Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions," *Biochem. J.*, 301(Pt 1):235-242, 1994.
- Pierangeli, Colden-Stanfield, Liu *et al.*, "Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells *in vitro* and *in vivo*," *Circulation*, 99:1997-2002, 1999.
- Polz, Wurm, Kostner, "Investigations on beta-2-glycoprotein-I in the rat - isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions," *Int. J. Biochem.*, 11:265-270, 1980. 20
- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.
- Price, "Metastasis from human breast cancer cell lines," *Breast Cancer Research Treatment.*, 39:93-102, 1996.
- Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin, "Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds," *J. Clin. Immunol.*, 10(4):200-203, 1990. 30
- Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy, "Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells," *J. Biochem.*, 317(Pt 2):343-346, 1996.
- Quinn *et al.*, CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- Ran, Gao, Duffy, Watkins, Rote, Thorpe, "Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Cancer Res.*, 58(20):4646-4653, 1998. 40
- Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of activated endothelial cells and tumor blood vessels," *Proceedings of AACR*, No. 2615 (Abstract):527, 2002a.
- Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels," *Cancer Res.*, 62 6132-6140, 2002b.

【 1 0 9 5】

【数 1 8】

- Ran and Thorpe, "Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 54: 1479-1484, 2002.
- Ran, Huang, Downes, Thorpe, "Evaluation of novel antimouse VEGFR2 antibodies as potential antiangiogenic or vascular targeting agents for tumor therapy," *Neoplasia*, 5:297-307, 2003.
- Ran, He, Huang, *et al.*, "Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice," *Clin Cancer Res.*, 11:1551-1562, 2005. 10
- Rao, Tait, Hoang, "Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line (OC-2008). Contrasting effects on cell surface factor VIIa/tissue factor activity and prothrombinase activity," *Thromb. Res.*, 67(5):517-531, 1992.
- Rauch, Tannenbaum, Tannenbaum, Ramelson, Cullis, Tilcock, Hope, Janoff, "Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems," *J. Biol. Chem.*, 261(21):9672-9677, 1986.
- Rauch and Janoff, "Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87(11):4112-4114, 1990. 20
- Ravirajan, Harmer, McNally, Hohmann, Mackworth-Young, Isenberg, "Phospholipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus", *Ann. Rheumatic Diseases*, 54:471-476, 1995.
- RayChaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.
- Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science* 245, 175-177, 1989. 30
- Riechmann, Clark, Waldmann, Winter, "Reshaping human antibodies for therapy," *Nature*, 332(6162):323-327, 1988.
- Riechmann and Muyldermans, "Single Domain Antibodies: Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains," *J. Immunol. Methods.*, 231:25-38, 1999.
- Rimassa *et al.*, "Unexpected low efficacy of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) and vinorelbine in the treatment of metastatic breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 77 (2):185-8, 2003. 40
- Rosenthal *et al.*, "A phase I study of SPI-077 (Stealth liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer", *Investigational New Drugs*, 20(3)343-9, 2002.

【 1 0 9 6】

【数 1 9】

- Rote, Ng, Dostal-Johnson, Nicholson, Siekman, "Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 66:193-200, 1993.
- Rote, Chang, Katsuragawa, Ng, Lyden, Mori, "Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human choriocarcinoma cells," *Am. J. Reprod. Immun.*, 33:114-121, 1995.
- Rote, "Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss," *Am. J. Reprod. Immun.*, 35:394-401, 1996. 10
- Roubey, Eisenberg, Harper, Winfield, " Anticardiolipin autoantibodies recognize beta(2)-glycoprotein-I in the absence of phospholipid - importance of Ag density and bivalent binding," *J. Immunol.*, 154:954-960, 1995.
- Ruf, Rehemtulla, Edgington, "Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function," *Biol. Chem.*, 266:2158-2166, 1991.
- Ruf and Edgington, "Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*," *FASEB J.*, 8:385-390, 1994. 20
- Sakamoto *et al.*, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998. 30
- Sanlioglu, Williams, Samavati, Butler, Wang, McCray, Ritchie, Hunninghake, Zandi, and Engelhardt, *J. Biol. Chem.*, 32:30188, 2001.
- Schlaepfer, Mehlman, Burgess, Haigler, "Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(17):6078-6082, 1987.
- Schoentgen, Saccoccio, Jolles, Bernier, Jolles, "Complete amino acid sequence of a basic 21-kDa protein from bovine brain cytosol," *Eur. J. Biochem.*, 166(2):333-338, 1987.
- Schorer, Rick, Swaim, Moldow, "Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production; exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury," *J. Lab. Clin. Med.*, 106:38-42, 1985. 40
- Schousboe, "Beta-2-glycoprotein-I - a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood-coagulation pathway," *Blood*, 66:1086-1091, 1985.

【 1 0 9 7 】

【数 2 0】

- Seigneuret and Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(12):3751-3755, 1984.
- Sessions and Horwitz, "Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts," *FEBS Lett.*, 134(1):75-78, 1981.
- Shaughnessy, Buchanan, Turple, Richardson, Orr, "Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species" *Am. J. Path.*, 134(4):787-796, 1989. 10
- Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.
- Sheng, Sali, Herzog, Lahnstein, Krilis, "Site-directed mutagenesis of recombinant human beta(2)-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity," *J. Immunol.*, 157:3744-3751, 1996.
- Sheu *et al.*, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997. 20
- Shotwell, Stodola, Michael, Lindenfelser, Dworschack and Pridham, "Antibiotics Against Plant Disease. III. Duramycin, a New Antibiotic from *Streptomyces Cinnamomeus* Forma *Azacoluta*, *N. Utiliza. Res. Dev. Div.*, 80:3912-3915, 1958.
- Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989. 30
- Siemann, Mercer, Lepler, Rojiani, "Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy," *Int. J. Cancer*, 99:1-6, 2002.
- Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.
- Siim, Lee, Shalal-Zwain, Prujin, McKeage, Wilson, "Marked potentiation of the antitumor activity of chemotherapeutic drugs by the antivascular agent 5, 6-dimethyloxanthene-4-acetic acid (DMXAA)," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 51:43-52, 2004. 40
- Simantov, Lasala, Lo *et al.*, "Activation of cultured vascular endothelial-cells by antiphospholipid antibodies," *J. Clin. Invest.*, 96:2211-2219, 1995.
- Singh *et al.*, "Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment", *Journal of Controlled Release*, 59(1):43-53, 1999.

【 1 0 9 8】

【数 2 1】

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.

Sipos *et al.*, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.

Sluiter, Pietersma, Lamers, Koster, "Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression," *J. Cardiol. Pharmacol.*, 22:S37-S44, 1993.

Smirnov, Triplett, Comp, Esmon, Esmon, "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies," *J. Clin. Invest.*, 95(1):309-316, 1995.

Soares, Shaughnessy, MacLarkey, Orr, "Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells *in vitro* and during metastasis *in vivo*," *Laboratory Invest.*, 71(4):480-489, 1994.

Soderlind, Ohlin and Carlsson, "Complementarity-Determining Region (CDR) Implantation: A Theme of Recombination," *Immunotech.*, 4:279-285, 1999.

Soderlind, Strandberg, Jirholt, Kobayashi, Alexeiva, Aberg, Nilsson, Jansson, Ohlin, Wingren, Danielsson, Carisson and Borrebaeck, "Recombining Germline-Derived CDR Sequences for Creating Diverse Single-Framework Antibody Libraries," *Nature Biotech.*, 18:852-856, 2000.

Soff *et al.*, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.

Staal-van den Brekel, Thunnissen, Buurman, Wouters, "Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma," *Virchows Arch.*, 428:21-27, 1996.

Staub, Harris, Khamashta, Savidge, Chahade, Hughes, "Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis," *Ann. Rheum. Dis.*, 48(2):166-169, 1989.

Steinkasserer, Barlow, Willis *et al.*, "Activity, disulfide mapping and structural modeling of the 5th domain of human-beta-2-glycoprotein-I," *FEBS Letters*, 313:193-197, 1992.

Steinkasserer, Estaller, Weiss, Sim, Day, "Complete nucleotide and deduced amino-acid-sequence of human beta-2-glycoprotein-I," *Biochem. J.*, 277:387-391, 1991.

Stella *et al.*, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Stone, Ruf, Miles, Edgington, Wright, "Recombinant soluble human tissue factor secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and refolded from *E. coli* inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity, and physical characterization," *Biochem. J.*, 310(2):605-614, 1995.

【1 0 9 9】

【数 2 2】

Sunderkotter, Steinbrink, Goebeler, Bhardwaj, Sorg, "Macrophages and angiogenesis," *J. Leukocyte Biol.*, 55:410-422, 1994.

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex," *Blood*, 86(8):3083-3089, 1995.

Sugi and McIntyre, "Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies," *Thromb. Haemost.*, 76(3):354-360, 1996a.

10

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to kininogen- phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation," *Thromb. Res.*, 84(2):97-109, 1996b.

Sugimura, Donato, Kakar, Scully, "Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumor cell surfaces," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(3):365-373, 1994.

Symon *et al.*, "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes", *Cancer*, 86(1):72-8, 1999.

Tada *et al.*, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.

20

Tait and Smith, "Phosphatidylserine receptors: role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells," *J. Biol. Chem.*, 274(5):3048-3054, 1999.

Takano *et al.*, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.

Tanaka *et al.*, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.

30

Test and Mitsuyoshi, "Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry," *J. Lab. Clin. Med.*, 130(2):169-182, 1997.

Thornhill, Kyan-Aung, Haskard, "IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils," *J. Immunol.*, 144:3060-3065, 1990.

Thorpe *et al.*, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.

40

Thorpe and Ran, "Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature", *Cancer J. Sci. Am.*, 6(Suppl 3):S237-S244, 2000.

Thorpe, "Vascular targeting agents as cancer therapeutics," *Clin. Cancer Res.*, 10:415-427, 2004.

【 1 1 0 0】

【数 2 3】

Tolsma *et al.*, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.

Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, Boulamatsis, "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes", *Brit. J. Cancer*, 87(1):21-7, 2002.

Umeda, Igarashi, Nam, Inoue, "Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody," *J. Immun.*, 143(7):2273-2279, 1989.

10

Umeda and Emoto, "Membrane Phospholipid Dynamics During Cytokinesis: Regulation of Actin Filament Assembly by Redistribution of Membrane Surface Phospholipid", *Chem. Phys. Lipids*, 101:81-91, 1999.

Utsugi, Schroit, Connor, Bucana, Fidler, "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes," *Cancer Res.*, 51(11):3062-3066, 1991.

20

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.

van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.

van Gorp, Broers, Reutelingsperger, Bronnenberg, Hornstra, Dam-Mieras, Heemskerk, "Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis," *Am. J. Physiol.*, 277:C20-C28, 1999.

30

van Gorp, Hornstra, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Function of glutathione peroxidase in endothelial cell vitality," *Arch. Biochem. Biophys.*, 382(1):63-71, 2000.

van Gorp, Heeneman, Broers, Bronnenberg, Van Dam-Mieras, Heemskerk, "Glutathione oxidation in calcium- and p38 MAPK-dependent membrane blebbing of endothelial cells," *Biochim. Biophys. Acta*, 1591(1-3):129-138, 2002.

van Lummel, Pennings, Derksen, Urbanus, Lutters, Kaldenhoven, de Groot, "The binding site in β 2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V," *J. Biol. Chem.*, 280(44):36729-36, 2005.

40

Vitetta *et al.*, "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma," *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.

Vlachoyiannopoulos, Beigbeder, Duelanes, Youinou, Hunt, Krilis, Moutsopoulos, "Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus

【 1 1 0 1 】

【数 2 4】

- erythematosus: their correlation with anticardiolipin antibodies and beta 2 glycoprotein-I plasma levels," *Autoimmunity*, 16(4):245-249, 1993.
- Vogt, Ng, Rote, "A model for the antiphospholipid antibody syndrome: Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 174:700-707, 1996.
- Vogt, Ng, Rote, "Antiphosphatidylserine antibody removes Annexin V and facilitates the binding prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 177:964-972, 1997. 10
- Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic *et al.*, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.
- Wakamatsu, Choung, Kobayashi, Inoue, Higashijima and Miyazawa, "Complex Formation of Peptide Antibiotic Ro09-0198 with Lysophosphatidylethanolamine: ¹H NMR Analysis in Dimethyl Sulfoxide Solution," *Biochemistry*, 29(1):113-118, 1986. 20
- Waltenberger *et al.*, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.
- Wamil *et al.*, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- Wang and Joseph, "Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells," *Free Rad. Biol. Med.*, 28(8):1222-1231, 2000. 30
- Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- Whitworth, Pak, Esgro, Kleinerman, Fidler, "Macrophages and Cancer," *Cancer Meta. Rev.*, 8:319-351, 1990.
- Wiesmann, *et al.*, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- Weiss, Young, LoBuglio, Slivka and Nimeh, "Role of Hydrogen Peroxide in Neutrophil-Mediated Destruction of Cultured Endothelial Cells, " *J. Clin. Invest.*, 68:714-721, 1981. 40
- Williamson and Schlegel, "Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells," *Molec. Mem. Biol.*, 11:199-216, 1994.
- Willems, Janssen, Pelsers *et al.*, "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody-beta(2)-glycoprotein I complexes to lipid membranes," *Biochemistry*, 35:13833-13842, 1996.

【 1 1 0 2 】

【数 2 5】

- Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff *et al.*, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- Woodle, Engbers, Zalipsky, *Bioconjugate Chem.*, 5:493-496, 1994.
- Wurm, "beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles," *Int. J. Biochem.*, 16:511-15, 1984. 10
- Xie, Padron, Liao, Wang, Roth and De Brabander, "Salicylhalamide A inhibits the V₀ sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A₁," *J. Biol. Chem.*, 279(19):19755-63, 2004.
- Yamada, Moldow, Sacks, Craddock, Boogaens and Jacob, "Deleterious Effects of Endotoxin on Cultured Endothelial Cells: An *in vitro* Model of Vascular injury," *Inflammation*, 5:115-116, 1981.
- Yamamura *et al.*, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993. 20
- Yasuda, Tsutsumi, Chiba *et al.*, "Beta(2)-glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis," *Atherosclerosis*, 152:337-346, 2000.
- Yasuda *et al.*, *Blood*, 103:3766-3772, 2004.
- Yoon *et al.*, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett.*, 97(1):83-91, 1995. 30
- Yoshida *et al.*, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.
- Zhao, Zhou, Wiedmer, Sims, "Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface," *J. Biol. Chem.*, 273:6603-6606, 1998.
- Zhou, Zhao, Stout, Luhm, Wiedmer, Sims, "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids," *J. Biol. Chem.*, 272(29):18240-18244, 1997. 40
- Ziche *et al.*, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998.

【 1 1 0 3】

【数 2 6】

Zulueta, Yu, Hertig, Thannickal, Hassoun, "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 12(1):41-49, 1995.

Zwaal, Bevers, Comfurius, Rosing, Tilly, Verhallen, "Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance," *Mol. Cell. Biochem.*, 91:23-31, 1989.

Zwaal and Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells," *Blood*, 89(4):1121-1132, 1997.

10

【図面の簡単な説明】

【1104】

下記の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある局面をさらに具体的に説明するために含まれる。本発明は、本明細書に記載される特定の実施態様の説明と組み合わせて、一つ以上の、これらの図面を参照することによってさらによく理解されよう。本特許の米国ファイルは、カラーでプリントされた少なくとも1枚の図面を含む。カラー図面（単複）を含む本特許のコピーは、請求および必要手数料を支払うことによって特許および商標局から入手することが可能である。

【図1】図1。3G4抗体で処置したマウスにおいて白血球が腫瘍に浸潤する。MDA-MB-231同所腫瘍を抱えるヌードマウスを、100 μg/用量の3G4抗体、または、同じ用量の、異性体適合コントロール抗体で週3回処置した。処置の終了時に、動物を還流し、腫瘍を急速凍結し、切断し、染色し、白血球を検出した。図には、腫瘍に浸潤する白血球が示される。

20

【図2A】図2A、図2B、図2C、および図2D。3G4抗体および2aG4抗体の、相補性決定域(CDR)のDNAおよびアミノ酸配列。3G4抗体の重鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2A; 配列番号1、および配列番号2)、および、該抗体の軽鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2B; 配列番号3、および配列番号4)、および、DNA配列中には制限部位が示される。リーダー配列は、成熟配列と区別される。成熟配列の開始位置は、図2Aおよび図2Bのそれぞれにおいて第1の矢印で示される。各可変配列を、ヒトの定常域に植え継ぐ例示の手段が記載される。すなわち、それぞれのヒトの定常域配列(配列番号7および配列番号8)の最初の部分が、図2Aおよび図2Bのそれぞれにおいて第2の矢印で示される。IgG2a重鎖および3G4軽鎖(C_K)のアミノ酸配列は、それぞれ、図2Cおよび図2Dに示す配列番号10および配列番号11によって表される。

30

【図2B】図2A、図2B、図2C、および図2D。3G4抗体および2aG4抗体の、相補性決定域(CDR)のDNAおよびアミノ酸配列。3G4抗体の重鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2A; 配列番号1、および配列番号2)、および、該抗体の軽鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2B; 配列番号3、および配列番号4)、および、DNA配列中には制限部位が示される。リーダー配列は、成熟配列と区別される。成熟配列の開始位置は、図2Aおよび図2Bのそれぞれにおいて第1の矢印で示される。各可変配列を、ヒトの定常域に植え継ぐ例示の手段が記載される。すなわち、それぞれのヒトの定常域配列(配列番号7および配列番号8)の最初の部分が、図2Aおよび図2Bのそれぞれにおいて第2の矢印で示される。IgG2a重鎖および3G4軽鎖(C_K)のアミノ酸配列は、それぞれ、図2Cおよび図2Dに示す配列番号10および配列番号11によって表される。

40

【図2C】図2A、図2B、図2C、および図2D。3G4抗体および2aG4抗体の、相補性決定域(CDR)のDNAおよびアミノ酸配列。3G4抗体の重鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2A; 配列番号1、および配列番号2)、および、該抗体の軽鎖のDNAおよびアミノ酸配列(図2B; 配列番号3、および配列番号4)、および、DNA配列

50

中には制限部位が示される。リーダー配列は、成熟配列と区別される。成熟配列の開始位置は、図2 Aおよび図2 Bのそれぞれにおいて第1の矢印で示される。各可変配列を、ヒトの定常域に植え継ぐ例示の手段が記載される。すなわち、それぞれのヒトの定常域配列（配列番号7および配列番号8）の最初の部分が、図2 Aおよび図2 Bのそれぞれにおいて第2の矢印で示される。IgG2a重鎖および3G4軽鎖（C_κ）のアミノ酸配列は、それぞれ、図2 Cおよび図2 Dに示す配列番号10および配列番号11によって表される。

【図2 D】図2 A、図2 B、図2 C、および図2 D。3G4抗体および2aG4抗体の、相補性決定域（CDR）のDNAおよびアミノ酸配列。3G4抗体の重鎖のDNAおよびアミノ酸配列（図2 A；配列番号1、および配列番号2）、および、該抗体の軽鎖のDNAおよびアミノ酸配列（図2 B；配列番号3、および配列番号4）、および、DNA配列中には制限部位が示される。リーダー配列は、成熟配列と区別される。成熟配列の開始位置は、図2 Aおよび図2 Bのそれぞれにおいて第1の矢印で示される。各可変配列を、ヒトの定常域に植え継ぐ例示の手段が記載される。すなわち、それぞれのヒトの定常域配列（配列番号7および配列番号8）の最初の部分が、図2 Aおよび図2 Bのそれぞれにおいて第2の矢印で示される。IgG2a重鎖および3G4軽鎖（C_κ）のアミノ酸配列は、それぞれ、図2 Cおよび図2 Dに示す配列番号10および配列番号11によって表される。

【図3】図3。競合リン脂質リポソームによる、不活化PSに対する3G4抗体結合の抑制。リン脂質塗布マイクロタイタープレートを、10%ウシ血清に溶解した0.016から33nMの濃度範囲を持つ3G4で処理した。結合抗体を、ヤギ抗マウスIgG-HRPを用いて検出した。各種リン脂質から調製したリポソームによる競合アッセイは、陰イオン性リン脂質が、3G4（6.7nM）のPSに対する結合に競合可能であることを示す。

【図4】図4。3G4のリン脂質に対する結合。リン脂質塗布マイクロタイタープレートを、10%ウシ血清に溶解した0.016から33nMの濃度範囲を持つ3G4で処理した。結合抗体を、ヤギ抗マウスIgG-HRPを用いて検出した。3G4は、PS、PI、PA、およびCLを含む陰イオン性リン脂質には特異的に結合するが、PE、PC、およびSMを含む中性脂質には結合しない。

【図5】図5 A、図5 B、図5 C、図5 D、および図5 E。未処置のHUV EC、およびMDA-MB-435細胞に対する3G4結合の、H₂O₂処理による誘発を、FACS（図5 A）、および免疫組織化学（図5 B、図5 C、図5 D、および図5 E）で示した。図5 A、HUV ECまたはMDA-MB-435細胞は、H₂O₂で37℃で1時間処理した。細胞は洗浄し、トリプシンで培養皿から遊離した。細胞は、3G4（実線）、またはコントロールマウスIgG3（BBB3）（点線）で染色し、FACSによるサイトフルオロメトリーで分析した。装置は、未処置細胞（ヨウ化プロピジウム陰性）に対しゲート調整した。図5 A、上段左、HUV EC；上段右、H₂O₂処理HUV EC；下段左、MDA-MB-435；下段右、H₂O₂処理MDA-MB-435。図5 B、図5 C、図5 D、および図5 E。未処置、非透過性増強H₂O₂処理HUV ECに対する3G4結合の形態を、接着細胞を上述のようにH₂O₂処理し、細胞を洗浄し、それを3G4またはコントロールのマウスIgG₃、BBG3で染色し、次いでFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体（緑色）で染色して求めた。次に、細胞を、パラフォルムアルデヒドにて固定し、透過性増強した。細胞骨格を、テキサス赤標識ファロイジン（赤色）で染色し、核をDAPI（青色）でカウンター染色した。3G4は、原形質膜の不連続領域に結合するので、膜の小胞体の外観を持つ。図5 Bは、BBG3で染めたHUV EC；図5 Cは、3G4で染めたHUV EC；図5 Dは、BBG3で染めたMDA-MB-435細胞；および、図5 Eは、3G4で染めたMDA-MB-435細胞である。H₂O₂で処理しなかった細胞は3G4によって染色されなかった。スケールバーは50μmを表す。

【図6】図6 A、図6 B、図6 C、および図6 D。ホスファチジルセリンおよび陰イオン性リン脂質に対する抗体によって、単球の腫瘍血管に対する結合、および、マクロファ-

10

20

30

40

50

ジの腫瘍に対する浸潤がもたらされる。ヒトの同所性乳癌を抱える S C I D マウスに、100 μ g のコントロール抗体 B B G 3 (図 6 A および図 6 C) または 3 G 4 抗体 (図 6 B および図 6 D) を 1 週間 3 回 2 週間腹腔投与した。腫瘍は、M D A - M B - 4 3 5 (図 6 A および図 6 B)、または M D A - M B - 2 3 1 (図 6 C および図 6 D) であった。腫瘍の凍結切片を調製した。マウスのマクロファージと単球は、ラット抗マウス M 1 / 7 0 (M a c - 1) 抗体の投与、次いで F I T C 標識抗ラット I g G (緑色) によって検出した。抗 F 4 / 8 0 および抗 F c γ R 抗体は、抗 M 1 / 7 0 抗体によるものと一致する染色パターンを示した。血管は、ハムスター抗マウス C D 3 1、次いでテキサス赤標識抗ハムスター I g G (赤色) の投与によって検出した。核は、D A P I によって視像化した (青色)。図 6 A は、コントロール B B G 3 で処理したマウスの腫瘍で、マクロファージによる散発的な浸潤を示す。図 6 B は、3 G 4 によって処理されたマウスの腫瘍で、多量なマクロファージの浸潤を示す。図 6 C は、B B G 3 で処理したマウスからのコントロール腫瘍であり、血管に結合する単球が見られないことを示す。図 6 D は、3 G 4 で処理されたマウスの腫瘍であり、腫瘍血管内皮の腔面に結合する単球を示す (矢印)。図 6 A および図 6 B のスケールバーは 50 μ m を表し、図 6 C および 6 D のものは 10 μ m を表す。

10

【図 7】図 7。食作用の休止相と炎症相。3 G 4 抗体による腫瘍治療実験から、3 G 4 のような抗体が、P S 発現腫瘍内皮細胞からの P S シグナル伝達を阻止するという仮説が提出される。正常時には、腫瘍内皮細胞の P S が、腫瘍血管および腫瘍細胞に結合するマクロファージによる炎症反応を抑えると考えられる (休止相)。3 G 4 のような抗体が存在すると、抗体が P S に結合するので、マクロファージの P S レセプターは結合相手を持たない。次に、マクロファージは、T N F - α 、I L - 1、およびその他の炎症性サイトカインを分泌し、これらのサイトカインが腫瘍内皮を直接損傷し、さらに新たな宿主細胞を腫瘍部位に招集する (炎症相)。

20

【図 8】図 8。3 G 4 抗体の F (a b ') ₂ 断片は、抗腫瘍剤として 3 G 4 と同程度に有効である。マウスに 1 日目で腫瘍を接種し、9 日目に 3 G 4 抗体、3 G 4 抗体の F (a b ') ₂ 断片、または異性形適合コントロール抗体 (B B G 3) で処置した。コントロール動物における腫瘍は急速に増殖を続けた (黒四角) が、一方、3 G 4 抗体 (黒丸)、または、3 G 4 抗体の F (a b ') ₂ 断片 (黒下向き三角) で処置したマウスでは、腫瘍増殖は有意に遅くなり、かつ、F (a b ') ₂ 断片は、3 G 4 と少なくとも同程度に有効であった。

30

【図 9】図 9 A および図 9 B。P S 塗布マイクロタイタープレートに対する 3 G 4 の結合は血清依存性である。図 9 A、3 G 4 抗体は、ウシ血清含有媒体 (S C M) または血清無添加媒体 (S F M) の中で育成した細胞から精製した。マイクロタイタープレートに P S を塗布し、1 % O V A でブロックした。3 G 4 の連続希釈を、10 % ウシ胎児血清 (F B S)、または、鶏卵白身から得た 1 % オボアルブミン (O V A) で調製した。図 9 A、マイクロタイタープレートに P S を塗布し、1 % O V A にてブロックした。3 G 4 S F M の連続希釈を、図示の動物種、マウス、ラット、ヒト、およびウシの 10 % 血清において調製した。

【図 10 A】図 10 A および図 10 B。3 G 4 は、血漿タンパク質 β 2 G P I に結合し (図 10 A)、 β 2 G P I ドメイン I I において結合する (図 10 B)。図 10 A、マイクロタイタープレートに、ヒト血漿から精製したヒト β 2 G P I (h β 2 G P I) を塗布し、1 % O V A にてブロックした。市販のマウス抗ヒト β 2 G P I (抗 - β 2 G P I、または “ α - β 2 G P I”)、3 G 4 S F M、およびコントロールマウス I g G (m I g G) の連続希釈を 1 % O V A にて調製した。図 10 B、マイクロタイタープレートのウェルに、全長の、組み換え h β 2 G P I (ドメイン I - V)、または、ドメイン I 欠如 (ドメイン I I - V)、ドメイン I および I I 欠如 (I I I - V)、ドメイン I - I I I 欠如 (I V - V)、またはドメイン I - I V 欠如 (V) h β 2 G P I を塗布した。プレートは 1 % O V A でブロックし、3 G 4 S F M の連続希釈は 1 % O V A で調製した。

40

【図 10 B】図 10 A および図 10 B。3 G 4 は、血漿タンパク質 β 2 G P I に結合し (図 10 A)、 β 2 G P I ドメイン I I において結合する (図 10 B)。図 10 A、マイク

50

ロタイタープレートに、ヒト血漿から精製したヒト $\beta 2\text{ GPI}$ ($h\beta 2\text{ GPI}$)を塗布し、1%OVAにてブロックした。市販のマウス抗ヒト $\beta 2\text{ GPI}$ (抗 $\beta 2\text{ GPI}$ 、または“ $\alpha\text{-}\beta 2\text{ GPI}$ ”)、3G4 SFM、およびコントロールマウスIgG (mIgG)の連続希釈を1%OVAにて調製した。図10B、マイクロタイタープレートのウェルに、全長の、組み換え $h\beta 2\text{ GPI}$ (ドメインI-V)、または、ドメインI欠如 (ドメインII-V)、ドメインIおよびII欠如 (III-V)、ドメインI-III欠如 (IV-V)、またはドメインI-IV欠如 (V) $h\beta 2\text{ GPI}$ を塗布した。プレートは1%OVAでブロックし、3G4 SFMの連続希釈は1%OVAで調製した。

【図11】図11。露出PSを持つ内皮細胞 (EC) に結合するには、 $ch 3\text{ G 4}$ および $\beta 2\text{ GPI}$ が同時に存在しなければならない。ABAE細胞を、DMEM+10%正常マウス血清 (MS)、プラス、(i) 精製 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、(ii) $ch 3\text{ G 4}$ 、または(iii) $ch 3\text{ G 4} + h\beta 2\text{ GPI}$ 同時、に溶解した200 μM リゾフォスファチジルコリン (LPC) と30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、それぞれ、(i) $ch 3\text{ G 4}$ 、(ii) $h\beta 2\text{ GPI}$ 、または(iii) DMEM+10%MSと30分インキュベートした。最後に細胞を洗浄し、固定し、 $ch 3\text{ G 4}$ の結合を検出するための蛍光マーカーで染色した。 $ch 3\text{ G 4}$ および $h\beta 2\text{ GPI}$ は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いた。 $ch 3\text{ G 4}$ 結合のピクセル面積は、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は、条件(i)の下における $ch 3\text{ G 4}$ の結合、これを1に設定、に対する相対値である。

【図12】図12Aおよび図12B。露出PSを持つ内皮細胞に対する $ch 3\text{ G 4}$ の結合を仲介するためには、 $\beta 2\text{ GPI}$ の脂質結合領域が必要である。図12A、ABAE細胞を、 $ch 3\text{ G 4}$ 、プラス、(i) $\beta 2\text{ GPI}$ の非脂質結合形 (ニック入り $h\beta 2\text{ GPI}$)、または(ii) 無傷の $h\beta 2\text{ GPI}$ とインキュベートした。インキュベーションは、DMEM+10%MSに溶解した200 μM LPCの存在下、または不在下に行う。次に、細胞を洗浄し、固定し、 $ch 3\text{ G 4}$ を検出するために蛍光マーカーで染色した。 $ch 3\text{ G 4}$ 、 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、およびニック入り $h\beta 2\text{ GPI}$ は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いた。 $ch 3\text{ G 4}$ 結合のピクセル面積は、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は、条件(i) LPC無しの下における $ch 3\text{ G 4}$ の結合、これを1に設定、に対する相対値である。図12B、マイクロタイタープレートのウェルに、 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、またはニック入り $h\beta 2\text{ GPI}$ を塗布し、1%OVAでブロックした。 $ch 3\text{ G 4}$ またはコントロールのmIgGの連続希釈を1%OVAで調製した。

【図13】図13。過剰な $ch 3\text{ G 4}$ は、露出PSを持つ内皮細胞に対する $ch 3\text{ G 4}/\beta 2\text{ GPI}$ 複合体の結合を抑制する。ABAE細胞を、DMEM+10%MSに溶解した、200 μM LPC、40 nM精製 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、および1力価の $ch 3\text{ G 4}$ と30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、固定し、 $ch 3\text{ G 4}$ を検出するために蛍光マーカーで染色した。 $ch 3\text{ G 4}$ 結合のピクセル面積は、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は、320 pM $ch 3\text{ G 4}$ の結合、これを1に設定、に対する相対値である。

【図14】図14A、図14B、および図14C。露出PSを持つ内皮細胞に対する $\beta 2\text{ GPI}$ 介在性結合のためには $ch 3\text{ G 4}$ の二価性が必要とされる。図14A、ABAE細胞を、DMEM+10%FBSに溶解した200 μM LPCの存在下、または不在下に、20 nMの、3G4、3G4 F(ab')₂、または3G4 Fab'モノマーと30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、固定し、3G4または3G4断片の結合を検出するために蛍光マーカーで染色した。抗体結合のピクセル面積は、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は、LPC不在下の3G4の結合、これを1に設定、に対する相対値である。図14B、ABAE細胞を、DMEM+10%MSに溶解した200 μM LPC、40 nM精製 $h\beta 2\text{ GPI}$ 、および1力価の3G4 Fab'モノマーと30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、固定し、3G4 Fab'の結合を検出するために蛍光マーカーで染色した。3G4 Fab'結合のピクセル面積は、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は、2 nM 3G4 Fab'の結合、これを1に設定、に対する相対値である。図14C、ABAE細胞を、DMEM

10

20

30

40

50

+10% FBS に溶解した 200 μ M LPC、40 nM 精製 h β 2 GPI、20 nM ch 3 G 4、および 1 力価の 3 G 4 Fab' モノマーと 30 分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、固定し、ch 3 G 4 の結合を検出するために蛍光マーカーで染色した。ch 3 G 4 結合のピクセル面積は、MetaVue ソフトウェアを用いて定量化した。数値は、競合する 3 G 4 Fab' 不在下の ch 3 G 4 の結合、これを 100 に設定、に対する相対値である。

【図 15】図 15。PS 表面に対する、3 G 4 抗体、および、“バビツキシマブ”と名づけられたヒト・マウスキメラ対応抗体の、 β 2 GPI 依存性結合の模式図。 β 2 GPI は、その五つのドメイン（I、II、III、IV、および V）を持つところが描かれる。細胞膜上に露出した PS を含む PS 表面に対する抗体の結合は、 β 2 GPI のドメイン I に対する結合によって仲介される。

10

【図 16】図 16。例示の Fc- β 2 GPI 構築物の模式図。この構築物は、抗体の可変域が取り除かれるが、 β 2 GPI によって置換されていない。むしろ、 β 2 GPI は、Fc 領域の C_H 3 ドメインの C-末端に結合する。図は、2 個のマウス β 2 GPI タンパク質に作動可能に結合した、マウス IgG_{2a} 由来の、ジスルフィド結合ヒンジ領域、および、Fc 領域の C_H 2 および C_H 3 の 2 ドメインを示す。対応するヒト構築物があるとなれば、ヒトの IgG₁ 由来の Fc 領域が、2 個のヒトの β 2 GPI タンパク質に作動可能に結合されることになる。ヒトの IgG₃ 由来の Fc 領域も、2 個のヒトの β 2 GPI タンパク質と共に使用するのに好適と考えられる。図示の、例示の Fc- β 2 GPI 構築物では、5 個のドメイン（I-V）全てを持つマウス β 2 GPI が描かれる。しかしながら、 β 2 GPI のドメイン V の脂質結合領域が維持される限り、必ずしも 5 個のドメイン全てを持たなくともよく、かつ、そのような 5 個のドメイン全てを含むことのない、他のマウスまたはヒトの構築物は簡単に調製することが可能であろう。

20

【図 17】図 17。Fc-m β 2 GPI 構築物のプラスミドマップ。“Fc-m β 2 GPI”と名づけられた、最初に調製された Fc- β 2 GPI 構築物は三つの単位から構成される。すなわち、（1）2 a G 4 構築物から PCR で増幅された 3 G 4 軽鎖のシグナル配列、（2）2 a G 4 構築物から PCR で増幅されたヒンジ、C_H 2、C_H 3 を含むマウス IgG_{2a} の Fc 領域、および、（3）市販のマウス肝臓 RNA から RT-PCR で増幅したマウスの β 2 GPI である。プラスミドマップを示す。このプラスミドの配列は配列番号 25 として提示される。

30

【図 18 A】図 18 A。Fc-m β 2 GPI アミノ酸配列。切断されたシグナルペプチド（「m IgG κ シグナル配列」）MDMRAPAQILGFLLLFPGTRCLR は、配列番号 18 で表される。ポジション 1 は、シグナルペプチドが切断された後の、成熟 Fc-m β 2 GPI タンパク質のスタート点を示す。成熟 Fc-m β 2 GPI のアミノ酸配列は配列番号 19 である。Fc 領域のヒンジ、C_H 2、および C_H 3 ドメインも、マウス β 2 GPI のドメイン I、II、III、IV、および V と同様に示される。 β 2 GPI においてドメイン内ジスルフィド結合形成に与る Cys 残基は、ゴシック体影付き文字で示す。下線を施したイタリック体で示されるアミノ酸は、陰イオン性リン脂質の認識に与る陽性荷電領域の一部である。二重下線を施したイタリック体で示されるアミノ酸は、脂質膜に対する結合にとって必要な疎水性ループの一部である。陰イオン性リン脂質の認識に与るアミノ酸配列から始まり、脂質膜に結合するのに必要な疎水性ループの一部であるアミノ酸配列で終わる、アミノ酸配列 KNKEKKCSYTV EAHCRDGTIEIPSCFKEHSSLA FWK は、配列番号 20 である。

40

【図 18 B】図 18 B。ヒトの Fc- β 2 GPI（Fc-h β 2 GPI）を調製するための、ヒトの重鎖定常域およびヒトの β 2 GPI のアミノ酸配列。ヒトの IgG₁ 重鎖定常域（アクセス番号 P01857；配列番号 21）は、C_H 1 ドメインから始めて提示されるが、このドメインは欠失させてもよい。ヒトの Fc-h β 2 GPI では、ヒンジ（ヒンジのスタートは、図 18 A のポジション 1 に一致する）、ヒト C_H 2 ドメイン、および、ヒト C_H 3 ドメインで、次いで、図ではドメイン I、II、III、IV、および V を含むところが示されるヒトの β 2 GPI（アクセス番号 1C1ZA；配列番号 22）が来る

50

。Fc-h β 2 GPIのアミノ酸配列は配列番号23である。ヒトの β 2 GPIのドメイン構造は、ドメイン内ジスルフィド結合形成に与るCys残基の場所（ゴシック体影付き文字）、陰イオン性リン脂質の認識に与る陽性荷電領域の一部であるアミノ酸（下線付きイタリック体）、および、脂質膜の結合に必要な疎水性ループの一部であるアミノ酸（二重下線付きイタリック体）を含め、マウスの β 2 GPI（図18A）に緊密に一致する。陰イオン性リン脂質の認識に与るアミノ酸配列から始まり、脂質膜に結合するのに必要な疎水性ループの一部であるアミノ酸配列で終わる、アミノ酸配列KNKEKKCSYTE DAQCIDGTIEVPKCFKEHSSLAFWKは、配列番号24である。

【図19】図19。Fc-m β 2 GPIの発現および抗マウスIgGによる捕捉。Fc-m β 2 GPI構築物を、FuGENE6試薬によってCHO細胞にトランスフェクトさせた。二日後、細胞上清を採取し、定量した。発現アッセイでは、マイクロタイタープレートに抗マウスIgGを塗布し、1%OVAでブロックした。細胞培養体上清の連続希釈を1%OVAで調製した。#8および#18は、Fc-m β 2 GPIの二つの異なるクローンである。結合は、ch3G4および抗ヒトIgG-HRPによって検出した。ベクターを陰性コントロールとし、基線とした。

10

【図20】図20。Fc-m β 2 GPIは、PS塗布プレートにおいてPSに結合する。この結合アッセイでは、マイクロタイタープレートにPSを塗布し、1%OVAでブロックした。Fc-m β 2 GPI細胞培養体上清の連続希釈を1%OVAで調製した。#8および#18は、Fc-m β 2 GPIの二つの異なるクローンである。抗マウスIgG-HRPとの結合が検出された。

20

【図21】図21。Fc-m β 2 GPIは陰イオン性リン脂質に結合する。このアッセイでは、10%FBSにおいてリン脂質に結合するFc-m β 2 GPIが測定された。マイクロタイタープレートに、図示の、種々の脂質を塗布し、1%OVAでブロックした。Fc-m β 2 GPI細胞培養体上清の連続希釈を1%OVAで調製した。抗マウスIgG-HRPとの結合が検出された。Fc-m β 2 GPIは、陰イオン性リン脂質PS、PA、PI、およびPGには結合するが、中性脂質PCおよびSMには結合しない。

【図22】図22A、図22B、および図22C。Fc-m β 2 GPIは、天然のアポトーシスABAE細胞の上に露出されるPSを検出する。DMEM+10%FBSに懸濁させた 2×10^4 のABAE細胞を、8ウェルのガラスチェンバースライドに撒き37℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞を洗浄し、2aG4（図22A）、Fc-m β 2 GPIをトランスフェクトしたCHO細胞の上清（図22B）、擬似トランスフェクトさせた細胞の上清（「コントロール上清」、図22C）とインキュベートした。2aG4とFc-m β 2 GPIは、FITC-標識二次抗体によって検出した（緑色）。細胞骨格および核を、それぞれ、テキサス赤標識ファロイジンおよびDAPI（青色）でカウンター染色した。矢印は、アポトーシス細胞をマークする。

30

【図23】図23Aおよび図23B。Fc-m β 2 GPIは、LPC-処理ABAE細胞の上に露出されるPSを検出する。DMEM+10%FBSに懸濁させた 2×10^4 のABAE細胞を、8ウェルのガラスチェンバースライドに撒き37℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞を洗浄し、Fc-m β 2 GPIをトランスフェクトしたCHO細胞の上清とインキュベートした。Fc-m β 2 GPIは、FITC-標識二次抗体によって検出した（緑色）。細胞骨格および核を、それぞれ、テキサス赤標識ファロイジンおよびDAPI（青色）でカウンター染色した。図23Aおよび図23Bはそれぞれ、小さな、緑色のピンポイントとして見られるFc-m β 2 GPIの結合を示す。

40

【図24】図24A、図24B、図24C、および図24D。 β 2 GPIの人工的二量体構築物は、露出PSを持つ内皮細胞に結合する。ABAE細胞を、DMEM+10%FBSに溶解した200 μ M LPC、プラス、精製h β 2 GPI-モノマー（図24A）、h β 2 GPI-二量体（図24B）、または、脂質に結合することができないh β 2 GPI-二量体変異種（図24C）と30分インキュベートした。次に、細胞を洗浄し、抗 β 2 GPIとインキュベートしてh β 2 GPIモノマーおよび二量体を検出した。抗 β 2 GPI抗体は、ウシの β 2 GPIを認識しないので、10%FBSの存在は、h β 2 GPI

50

モノマーまたは $h\beta 2GPI$ 二量体の検出を妨げなかった。次に、細胞を洗浄し、固定し、蛍光マーカーで染色した。細胞骨格は赤色に見え、核は青色に見え、 $h\beta 2GPI$ モノマーおよび $h\beta 2GPI$ 二量体は緑色に見える。図24D、 $h\beta 2GPI$ モノマーおよび $h\beta 2GPI$ 二量体の結合面積を、MetaVueソフトウェアを用いて定量化した。数値は全て、非LPC処理細胞に対する $h\beta 2GPI$ 二量体の結合、これを1に設定、に対する相対値である。

【図1】

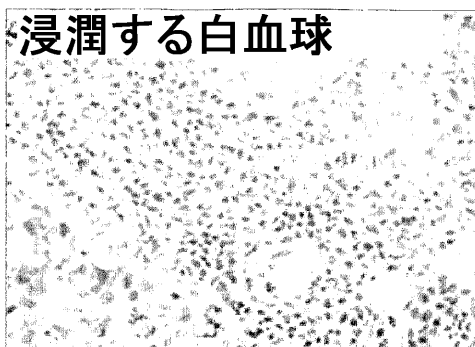


FIG. 1

【図2A】

FIG. 2A

3G4-2BVH 元の配列 :

```
121      M G W T N I F I L I L S V
      ATG GGA TGG ACC TGG ATC TTT ATT TTA ATC CTG TCA GTA
      TAC CCT ACC TGG ACC TAG AAA TAA AAT TAG GAC AGT CAT
      PvuII
      -----
      T T G V H S E V Q L Q Q S G P E L E K P
      ACT ACA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GAG AAG CCT
      TGA TGT CCA CAG GTG AGA CTC CAG GTC GAC GTC GTC AGA CCT GGA CTC GAC CTC TTC GGA
      G A S V K L S C E A S G Y S F T S Y N N
      GGC GGT TCA GTG AAG CTA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC AAC ATG
      CCG CGA AGT CAC TTC GAT AGG ACG TTC CGA AGA CCA ATG AGT AAG TGA CCG ATG TTG TAC
      N H V K Q S E G R S L E N I G H I D P Y
      AAC TGG CTC AAA CAG ACG CAT GSA AAG AGC CTT GNA TGG ATT GGA CAT ATT GAT CTT TAC
      TTG ACC CAC TTT GTC TCG GTA CTT TTC TCG GAA CTT ACC TAA COT GTA TAA CTA GSA ATG
      Y G D T S Y N Q K F R G K A T L T V D K
      TAT GGT GAT ACT TCC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GGC ACA TTG ACT GTA GAC AAA
      ATA CCA CTA TGA AAG ATG TTG GTC TTC AAG TCC CCG TTC CCG TGT AAC TGA CAT CTG TTT
      S S S T A Y M Q L K S L T S E D S A V Y
      TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AAG AGC CTS ACA CTC GAG GAC TCT GCA GTC TAT
      AAG AGG TCG TGT CGG ATG TAC CTC GAG TTC TCG GAC TGT AGA CTC CTG AGA GGT CAG ATA
      Y C V K G G Y Y G H W Y F D V W G A G T
      TAC TGT GTA AAG GGG GGT TAC TAC GGG CAC TGG TAC TTT GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC
      ATG ACA CAT TTC CCC CCA ATG ATG CCC GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG GGT CCC TGG
      BstEII
      -----
      T V T V S S A T T T A P S V Y P L V P
      ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT ACA ACA GCC CCA TCT GTC TAT CCC TTG GTC CCG GGC
      TGC CAG TGC CAG AAG AGT CGA TGT TGT TGT CGG GGT AGA CAG ATA GGG AAC CAG GGC CCG
      BamHI
      -----
      BstEII
      -----
      XhoI
      -----
      GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC GAG GGG
      CTT AAG GGG CCC GAC GTC CTT AAG CTA TAG TTC GAA TAG CTA TGG CAG CTG GAG GTC CCC
```

RACE産物3G4-2BVHをクローン化し、ヒトの $\gamma 1$ 定常域のBstEII部位において移植した。従って、これは、マウスのリーダー配列を含み、そのVHには、下記のようにヒトのCH1配列が接続する:リーダー /3G4VH/VSS-AST...

```
マウスリーダー      ↓成熟タンパク質
1  MGFWTWIFILI  LSVTTGVHSE  VOLQSQGPGL  EKPQASVKLS  CKASGYSFTG
51  YNMNVVKQSH  GKSLEWIGHI  DPLYGDTSYN  QKFRKATLT  VDKSSSTAYM
      ↓BstEII 移植部位
101  QLKSLTSEDS  AVYYCVKGGY  YGHWFYDVMG  AGTTVTVSS  ASTKGPSVFPL
151  APSKSTSG      ↑ヒトの $\gamma 1$ CH1
```

【図 2 B】

FIG. 2B

3G4-2BVL 元の配列：

```

61      M D M R A
      ATG GAC ATG AGG GCT
      TAC CTG TAG TCC CGA
      S C D I O
121  P A Q Q I L G F L L L L F P P G T
      COT GCA CAG ATT TTG GGC TTC TTG TTG CTC TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAC ATC CAG
      GGA COT GTC TAA AAC CCG AAG AAC GAG AAC AIA GGT CCA TGG TCT ACA CTG TAG GTC
      H T Q S P S S L S A S L G E R V S L Y C
181  ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC TTA TCT GGC TCT CTG GGA GAA AGA GCT AGT CTC ACT TGT
      TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG AAT AGA CCG AGA GAC COT CTT TCT CAG TCA GAG TGA ACA
      R A S Q D I G S S L H W L Q Q G F D S T
241  CCG GCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT ACC TTA AAC TGG CTT CAG CAG GGA CCA GAT GGA ACT
      GCC COT TCA GTC CTG TAA CCA TCA TCG AAT TTG ACC GAA GTC GTC COT GGT CTA COT TGA
      I K R L I Y A T S S L D S G V P K R F S
301  ATT AAA CCG CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT GGT GTC CCC AAA AGG TTC AGT
      TAA TTT GCG GAC TAG ATG CCG TGT AGG TCA AAT CTA AGA CCA CAG GGG TTT TCC AAG TCA
      G S R S G S D Y S L T I S S L E S S D F
361  GCG AGT AGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC ACC ACC CTT GAG TCT GAA GAT TTT
      CCG TAA TCC AGA CCC AGT CTA ATA AGA GAG TGG TAG TCC TCG GAA CTC AGA CTT CTA AAA
      V D Y Y C L Q Y V S S P P T F G A G T K
421  GTA GAC TAT TAC TCT CTA CAA TAT GTT AGT TCT COT CCG ACG TTC GGT GGT GGG ACC AAG
      CAT CTG ATA ATG ACA GAT GTT ATA CAA TCA AGA GGA GGG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC
      BbsI
      BbsHI
      P
481  L E L K R A D A A P T V F I F G R L P
      CTG GAG CTG AAA CCG GCT GAT GGT GCA CCA ACT GTC TTC ATC TTC GGG CCG ATC CCC CCG
      GAC CTC GAC TTT GCC CGA CTA CCA COT GGT TGA CAG AAG TAG AAG CCC GCG TAG GGG GCC

```

RACE産物3G4-2BVLをヒトのκ定常域のBstI部位において移植した。従って、これは、マウスのリーダー配列を含み、そのVLは、下記のようにヒトのCL1配列の内部において接続する：リーダー-/3G4-VL/TVF-IFP...

```

          マウスリーダー          ↓成熟タンパク質
1  MDMRAPAQIL GFLLLLFPFGT RCDIQMTQSP SLSASLGER VSLTCRASQD
51 IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI YATSSLDGCV PKRFGSGRSQ SDYSLTISSL
          FR4↓          ↓BbsI 移植部位
101 ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTTF IFPPSDEQLKSGTAS
          ↑ヒトのカッパ鎖定常部

```

【図 3】

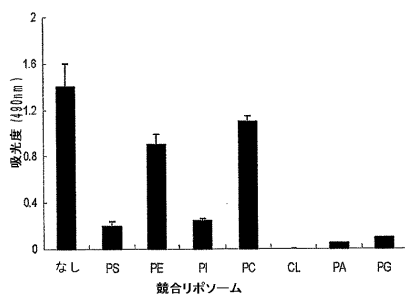


FIG. 3

【図 2 C】

FIG. 2C

3G4 IgG2a 重鎖 (配列番号:10)

```

1  /-----リ-ダ-----\\-----
  MSWTWIFILL LQVTTGVHSE VQLQDSPEL EEPGASVKLS CKASGYSPTG YMWVVKQSH GRSLEWIGHI
  S C D I O
71  /-----3G4 VL-----\\-----
  DPTYGDTSYN QKPRGKATLT VKSSSTAYM QLKSLTSDS AVIYCVKGY YGHWYFDWVG AGTTVTVSSA
  /-----\\-----
141  KTTAFSVYEL AFVCGDITGS SVTLGCLVKG YFPFPTLTW NSGSLSSGVH TFFAVLQSDL YLSSSVTVF
  /-----\\-----ヒンジ\\-----
211  SSTWFSQSIT CNVAHPAST KVDKEPRGP TIKPCPCRC PAPMLGGPS VTFPFKIRD VLMISLSFIV
  /-----\\-----
281  TCVVVDVSED DEDVQISFEV NNVEVHTAQF QTHREDYNST LRVSALPTQ HQDMMSGKEF KCKVNHKELP
  /-----\\-----マウス IgG2a CH2 ドメイン\\-----
351  ASIERCTISKP KGSVRAQVY VLPPSEEME KQVTLQCNV THNPEDIVV EWTNNGKTEL NYKTEFVLD
  /-----\\-----マウス IgG2a CH3 ドメイン\\-----
421  SDGSTMYISK LRVEKNWVL NNSYSCSVH EGLNHHHTK SFRATPGK

```

【図 2 D】

FIG. 2D

3G4 軽鎖 (C_κ) (配列番号:11)

```

1  /-----リ-ダ-----\\-----
  MDMRAPAQIL GFLLLLFPFGT RCDIQMTQSP SLSASLGER VSLTCRASQD IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI
  /-----3G4 VL-----\\-----
71  YATSSLDGCV PKRFGSGRSQ SDYSLTISSL ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTTFIF
  /-----\\-----マウス C-κ\\-----
141  PPSSQLTSG GASVVCFLNN FYFDIIVKX KIDGSEKQNG VLSNWTDQDS KDSYTNMST LTLTDEYER
  /-----\\-----
211  KNSYTCRATH KTSSTPIVKS PNRNRC

```

【図 4】

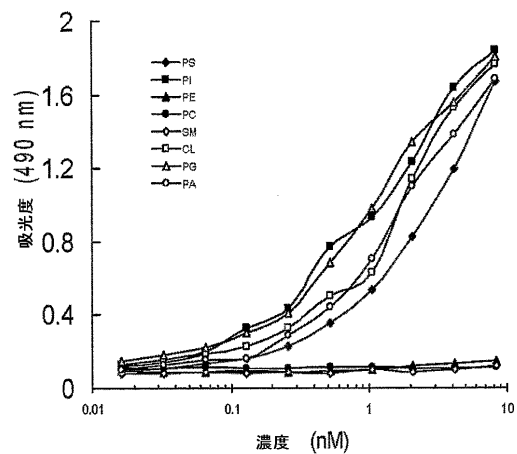
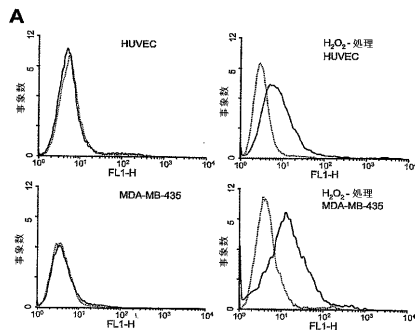


FIG. 4

【図 5】

FIG. 5



【図 6】

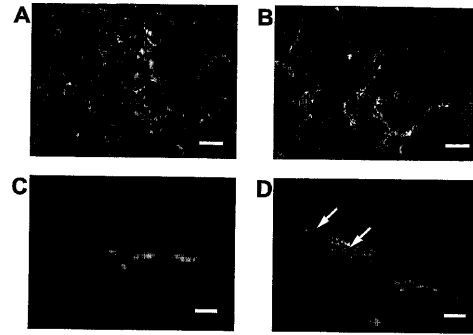
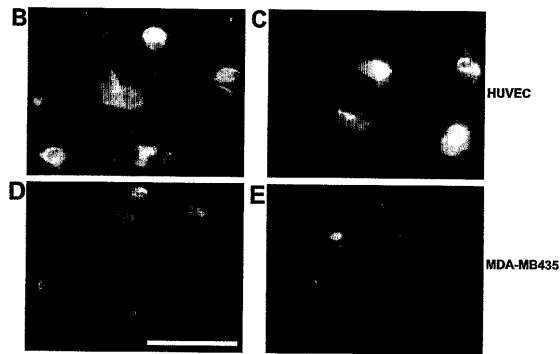


FIG. 6



【図 7】

食作用の 2 つの面

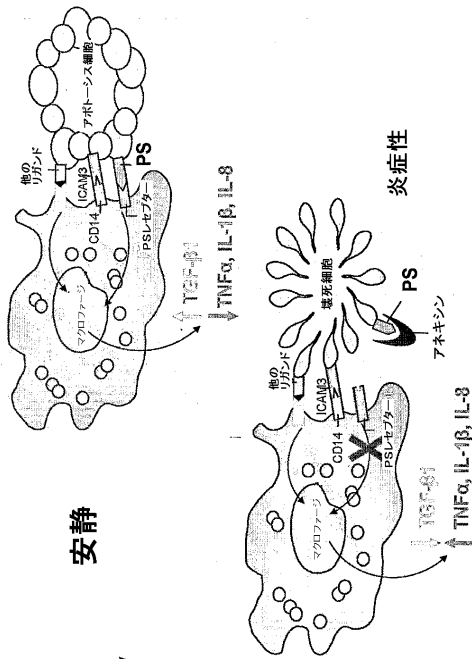


FIG. 7

【図 8】

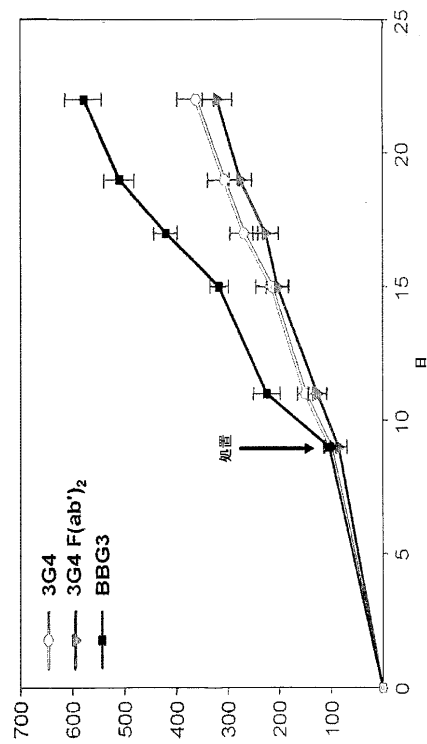
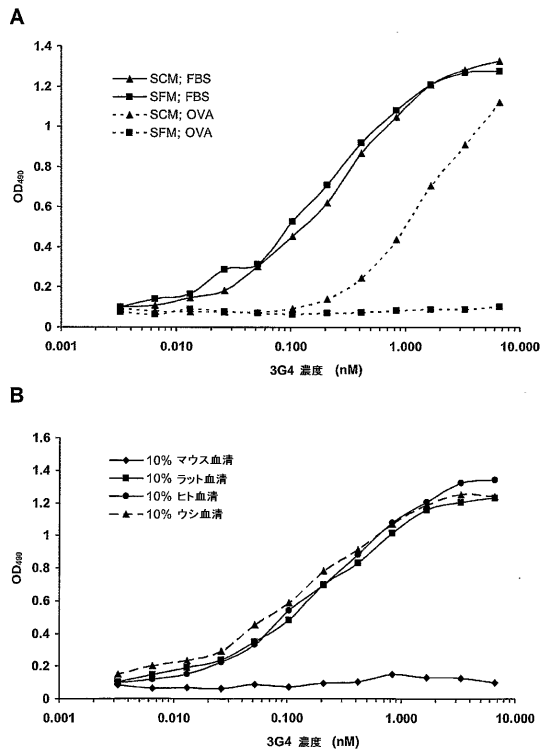


FIG. 8

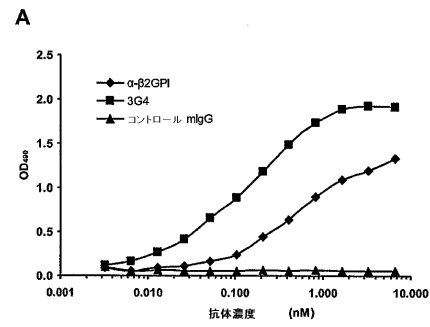
【図 9】

FIG. 9



【図 10 A】

FIG. 10



【図 10 B】

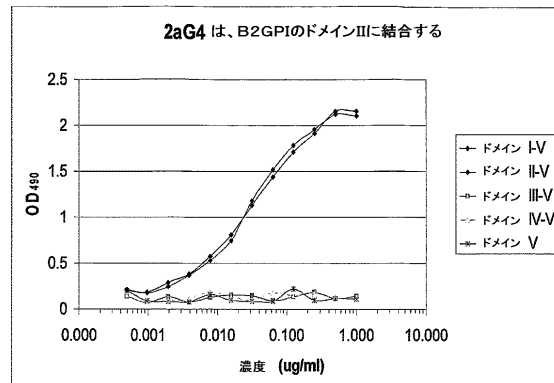
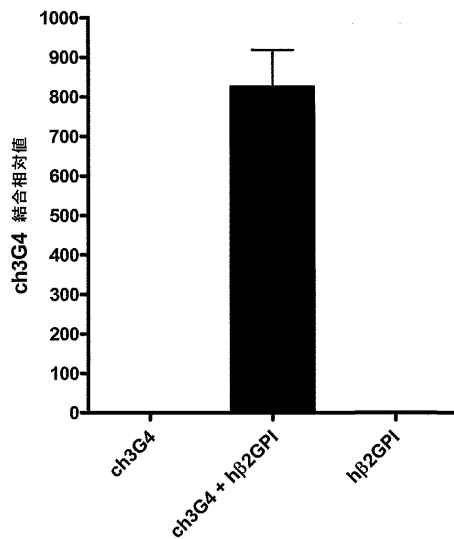


FIG. 10B

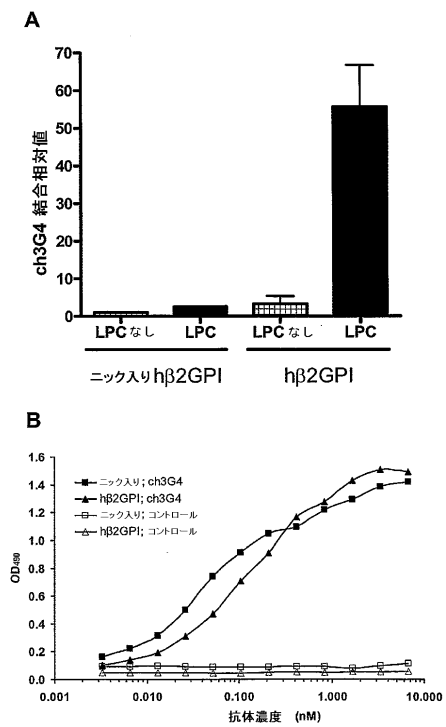
【図 11】

FIG. 11



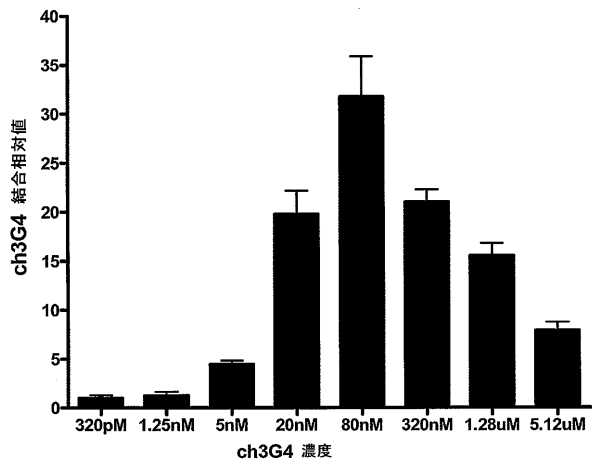
【図 12】

FIG. 12



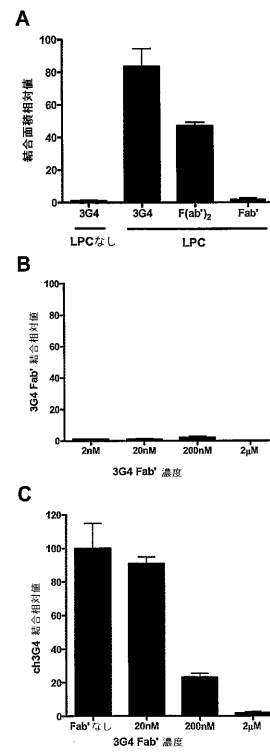
【図 13】

FIG. 13

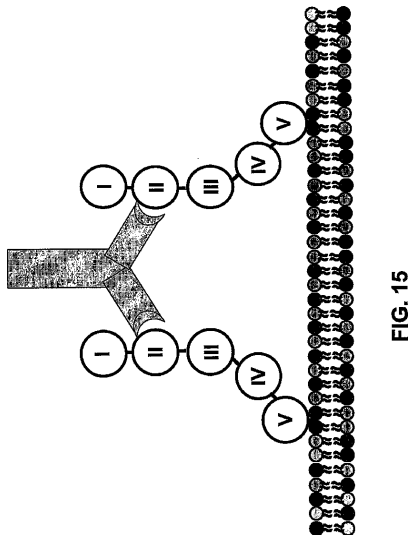


【図 14】

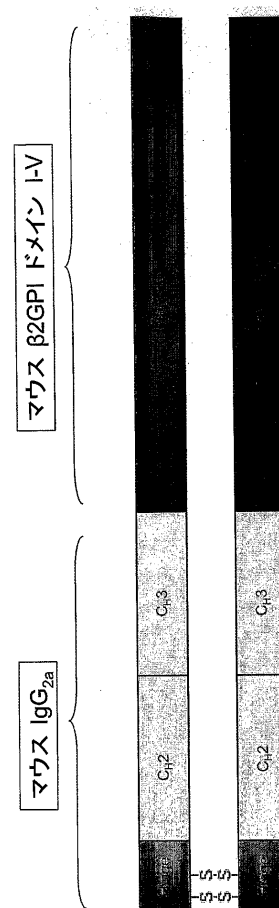
FIG. 14



【図 15】



【図 16】



【図 17】

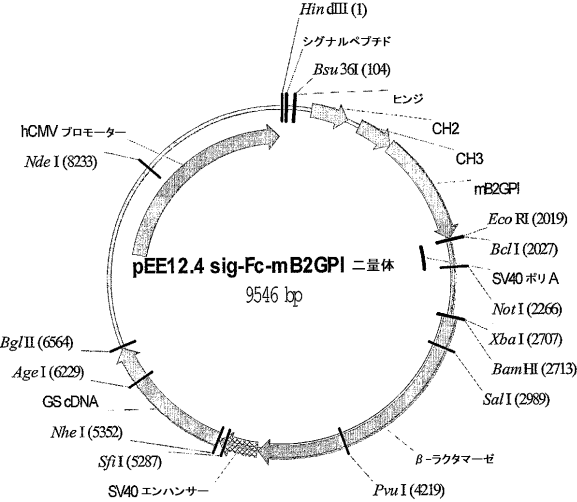


FIG. 17

【図 18 A】

FIG. 18A

Fc-mB2GPI タンパク質配列:

```
1
/---mIgGk シグナル配列---\
MEMADPAQIL GELLALPTOT RCLRPSPGPT ITPCPCKCP APNLLGSPSV PIPPPKIDV LMSLSPIVT CVVVDSRDD
-24
-----マウス IgG2a CH2 ドメイン-----\
PPVQISWFWV RVVHTAQIQ THRSDFHSTL RVVVALPIQH QWNMSGSEPK CKVNNKDLPA FIERITISFK GSVRAPOVYV
56
-----マウス IgG2a CH3 ドメイン-----\
LPPPREEMTK KQVILTCHVT DFMPEDIYVE WYNNQKTSLN YKTFEPVLDS DGSYFMISRL NVEKSNWVER NSTGCGVVHE
136
-----ドメイン I-----\
GLNHHHTTS FSRTPGKTGG RICPKPDOLF FAVVVLKTS YDGGQIVYS CKPGYVSRRG MRFTCELTG NMFHTLRSV
216
-----ドメイン II-----\
FRVQPFAGIL RRGIVNYSF RYKWNISFAC NGGFLNGTS SHCTEELGW SPDIKAGRI TQPPPPVPEF ALLKDYRPSA
296
-----ドメイン III-----\
GNNSLYQDTV VFELPHFAM IGNDTVNCTE QGNWTLFEC LEVHCFFPR FENGWVYPA KEVLLYKDA TFOCHETYL
376
-----ドメイン IV-----\
DGFERACTK TRTWSFLPG RESCLPVEK ATVLYQMRV KIQEQKNGM MRGDKHFYC QNNKPKCSY VEAHQDGTI
456
-----ドメイン V-----\
EIPSCFFERS SLAPWTDAS ELTPC
536
```

【図 18 B】

FIG. 18B

ヒト IgG1 重鎖定常域タンパク質配列:

```
-----CH1 領域-----\
ASTKGPSVFP LAPSSKTSQG GTAAAGCLVK DYFPAPVTYS WNSGALTSGV HYFPAVLQSS GLYLSLVYT VPSSSLGTQT
-----ヒンジ-----\
YICQVNHKPS NYKVDKVEFP KSCDKITPC PCAPAFLLGG FSVFLPPPKP KQTLMSITP EVTCVVVDVS HEDPSVKFHW
-----CH2 領域-----\
YVDGVRHNA KTFPSSQIN STYRVSVLT VLAQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIENTIS KARQQPRFQ VITLPPSRGE
-----CH3 領域-----\
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESMQGP ENNYKTFPV LQSDGSPFLY SKLVNDSRW QQGNVPSGV MREALDHYT
-----\
QKSLSLSPG
```

ヒト β 2GPI タンパク質配列:

```
1 /-----ドメイン I-----\
GRTPKPDOL PFTVVVLAT FYEPGESEITV SKRPGYVSG GRKFTCELT GLMFINTLEG TFRVCFEAGI LKNGAVRYT
81 -----ドメイン II-----\
FSTPNTISFS CNTGFGYNGA DSAKTERGK WSPFLVQAP IICPPPSIPT FALRVYKPS AGNSLYRDT AVFECPLQHA
161 -----ドメイン III-----\
MFGNDITCT TEGNWKLPK CREVKCPFP RPONGFVNP AKPTLYEDK ATFGCHDGSY LQGREIEDT KLGNSAMPS
241 -----ドメイン IV-----\
QKASCLPVE KATVVYQGR VKIQKFKNG MLAGDAVSFP QNNKPKCSY TEDAQCIDGT IEVFCPKERH SLAPWTDAS
321 -----ドメイン V-----\
SDVKPC
```

【図 19】

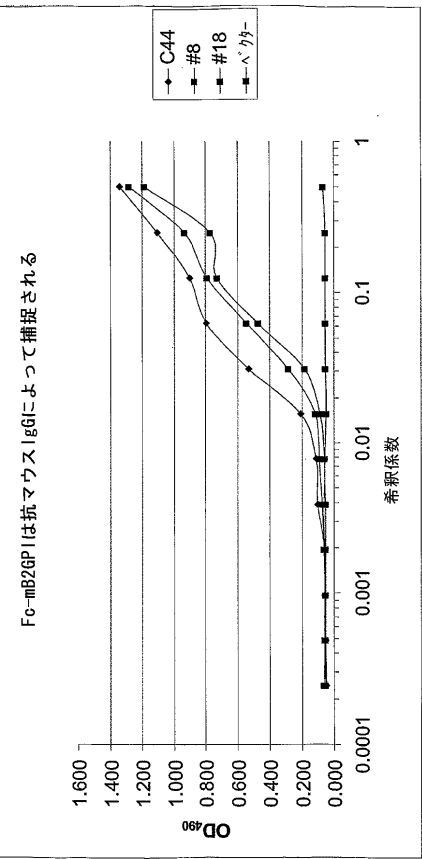


FIG. 19

【図 20】

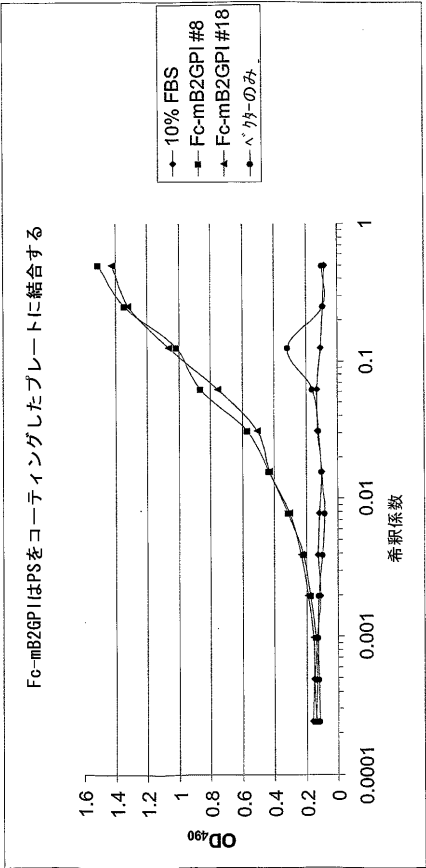


FIG. 20

【図 21】

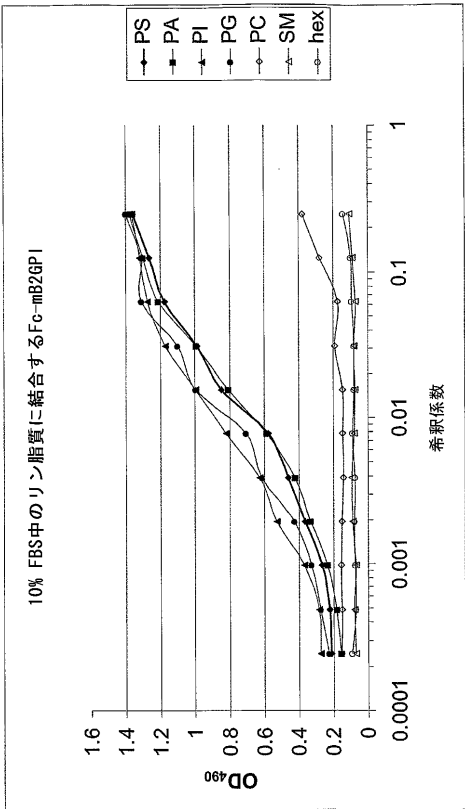
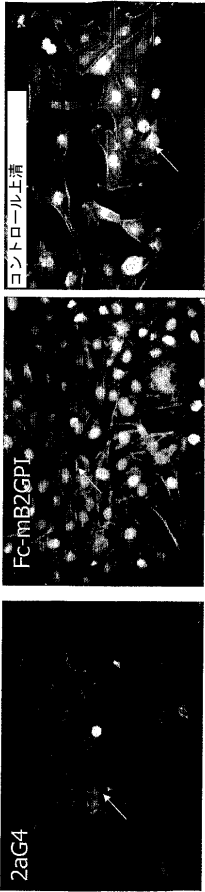
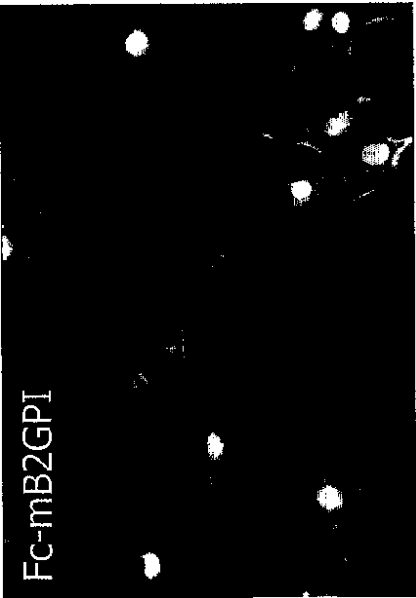


FIG. 21

【図 22】



【図 23A】



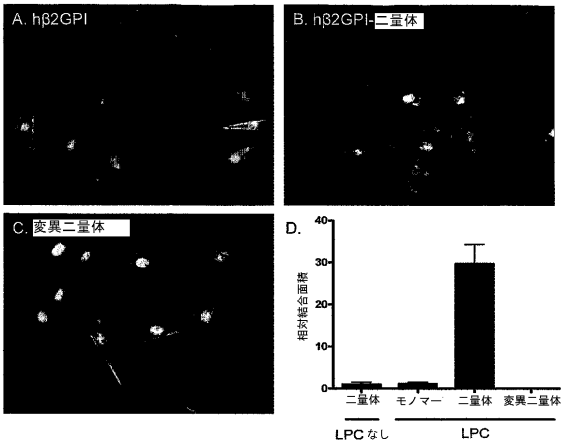
【図 2 3 B】



FIG. 23B

【図 2 4】

FIG. 24



【配列表】

0005127043000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/475	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
	A 6 1 P 31/22	

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ソープ, フィリップ イー

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 2 0 6, ダラス, モーニングサイド アベニュー 5 5 1 1

(72)発明者 ラスター, トロイ エー

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 2 3 8, ダラス, ペリカン ドライブ 1 1 2 2 7

(72)発明者 キング, スティーブン ダブリュー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 9 4, ラデラ ランチ, コピマス レーン 1 2

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 2 1 9 4 0 6 (US, A 1)

Thromb. Res., 2 0 0 4年, 114, p.455-9

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 0年, 87, p.4120-4

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N15/00-15/90

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed